A hólyagfájdalom szindrómában szenvedő betegek innovatív terápiás lehetőségei

Doktori (PhD)-értekezés

Dr. Horváth Adrienn

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Biológiailag aktív anyagok izolálása és vizsgálata program

Doktori iskola vezető: **Prof. Dr. Pintér Erika**

Programvezető: **Prof. Dr. Deli József**

Témavezetők: **Dr. Horváth Györgyi és Dr. Birinyi Péter**

Pécsi Tudományegyetem

Gyógyszerésztudományi Kar

OGYDHT Pécs

2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke ... 4

1. Bevezetés ... 6

2. Célkitűzés ... 14

3. Anyagok és módszerek ... 15

3.1. A BPS kezelési protokoll ajánlás megalkotása a hatályos külföldi társaságok irányelveinek tanulmányozásával ... 15

3.2 A káliummentes nyújtott hatóanyagleadású tabletta formulálása ... 16

3.2.1 A granulátumok rheológia mérései ... 18

3.2.2 A tabletta direkt préselése ... 18

3.2.3 A tabletta fizikai vizsgálata ... 19

3.3 A káliummentes nyújtott hatóanyagleadású tabletta analitikai vizsgálata ... 19

3.3.1 A tabletta hatóanyag-kioldódási vizsgálata ... 19

3.3.2 A tabletta hatóanyagtartalmi meghatározása ... 19

3.3.3 A tabletta kioldódási adatainak elemzése ... 20

3.3.4. A C/3 minta tabletta stabilitási vizsgálata ... 21

3.4 A tabletta hatásosságának vizsgálata kettős vak randomizált placebo kontrolált humán klinikai pilot vizsgálatban ... 21

3.5 Illóolajok gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata T24 hólyagepithel sejtvonalon 23

3.5.1 Illóolajok beszerzése és törzsoldatok elkészítése ... 23

3.5.2 Az illóolajok GC-MS analitikája ... 24

3.5.3 T24 sejtkultúra és kezelése ... 25

3.5.4 T24 sejtek viabilitási mérése ... 25

3.5.5 Real-Time PCR módszer ... 26

3.5.6 Humán IL-8 ELISA mérés ... 27

3.5.7. Illóolajok gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálatainál kapott eredmények statisztikai elemzése ... 27

4. Eredmények ... 28

4.1 A BPS kezelési protokoll ajánlás megalkotása a hatályos külföldi társaságok irányelveinek tanulmányozásával ... 28

4.1.1 A BPS kezelési protokoll ... 28

4.1.2 Nemzetközi irányelvek gyógyszeres kezelésének összehasonlítása ... 30

4.1.3 A dietetikai kérdőív felmérésének eredményei ... 32

4.2 A káliummentes nyújtott hatóanyagleadású tabletta formulálása ... 38

4.2.1 A granulátumok rheológiai és az előzetes hatóanyag-kioldódási vizsgálatok eredményei ... 38

4.2.2 A tabletta fizikai vizsgálata ... 41

4.2.3 A tabletta hatóanyag-felszabadulás mérése *in vitro* 41
4.2.4. A C/3 minta tabletta stabilitási vizsgálata 43
4.3 A tabletta hatásosságának vizsgálata kettős vak randomizált placebo kontrollált humán klinikai pilot vizsgálatban 44
4.4 Illóolajok gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata T24 hólyagepithel sejtvonalon 45
4.4.1 Az illóolajok és a standardok hatása a T24 sejtek viabilitására 45
4.4.2 A levendula illóolajok és a linalool hatása az Il-1β, IL-6 és IL-8 mRNS expressziójára és szekréciójára TNFα előkezelést követően. 48
4.4.3. Az eukaliptusz illóolaj és az eukaliptol hatása az Il-1β, IL-6 és IL-8 mRNS expressziójára és szekréciójára TNFα előkezelést követően. 50
4.4.4 A levendulaolajok és a linalool hatásának összehasonlítása az ACHP-kezeléssel 52
4.4.5 Az eukaliptusz olaj és az eukaliptol hatásának összehasonlítása az ACHP-kezeléssel 54
4.4.6 Humán IL-8 ELISA mérés 56
5. Megbeszélés 58
7. Publikációs jegyzék 73
7.1. A doktori disszertáció alapját képező publikációk 73
7.2. Egyéb, a disszertációhoz fel nem használt publikációk 73
7.3. Konferencia absztraktok 74
7.3.1 Előadás absztraktok 74
7.3.2.Poszter prezentációs absztraktok - Doktori értekezés alapját képező 74
7.3.3. Egyéb poszter prezentációs absztraktok 74
Köszönetnyilvánítás 76
Mellékletek 77
A doktori disszertáció alapját képező publikációk 94

Rövidítések jegyzéke

ACHP: 2-amino-6-[2-(ciklopropil-metoxi)-6-hidroxifenil]-4-(4-piperidinil)-3-piridin-karbonitril

AUA: Amerikai Urológiai Társaság (American Urological Association)

ATC kód: Anatómiai, terápiás, kémiai osztályozási rendszer (Anatomical Therapeutic Chemical classification system)

BPS: hólyagfájdalom szindróma (Bladder pain syndrome)

BSUG: Brit Urológiai Társaság (British Society of Urogynaecology)

CUA: Kanadai Urológiai Társaság (Canadian Urological Association)

DMSO: dimetil-szulfoxidot

EAU: Európai Urológiai Társaság (European Associaction of Urology)

ELISA: enzimhez kötött immunszorbiens próba (enzyme-linked immunosorbent assay)

FFNSC: Aromák és illatanyagok, természetes és szintetikus vegyületek könyvtára (Flavour and Fragrance Natural and Synthetic Compounds Library)

FID: lángionizációs detektor (Flame Ionization Detector)

FDA: Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság (Food and Drug Administration)

GAG: glükózaminoglikán

GC: gázkromatográfia (Gas Chromatography)

HPMC: hidroxi-propil-metil-cellulóz

IC: interstitialis cystitis

ICS: Nemzetközi Kontinencia Társaság (International Continence Society)

IL-1β: interleukin-1β

IL-6: interleukin-6

IL-8: interleukin 8

MAPK: Mitogén-aktiválta protein kináz

MS: tömegspektrométer (Mass Spectrometer)

NEAK: Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő

NFκB: nukleáris faktor kappa B

NS: normál sóoldat

OGYÉI: Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet

PBS: foszfát pufferelt sóoldattal

Real Time PCR: valós idejű polimer láncreakció (quantitative polymerase chain reaction)

RCT: randomizált, kontrollált vizsgálat

SUFU: Urodinamikai és Női Urológiai Társaság (The Society of Urodynamics, Female Pelvic Medicine & Urogenital Reconstruction)

TNFα: tumor nekrózis faktor α

1. Bevezetés

A Hólyagfájdalom szindróma (Bladder Pain Syndrome, BPS) más néven az Interstitialis Cystitis (IC) adja dolgozatom témáját, amely egyelőre egy kevésbé ismert betegség, bár valószínűleg sok embert érint világszerte. A BPS nomenklatúrája az elmúlt évszázadban több változáson is keresztül ment. A legelső kifejezésként interstitialis cystitis-t használták, amely eredetileg egy valódi gyulladásos hólyagbetegség leírására szolgált.

A Nemzetközi Kontinencia Társaság (ICS) 2002-ben fogadta el a fájdalmas hólyagszindróma kifejezést. Később, 2004-ben az elnevezést hólyagfájdalom-szindrómára változtatták, mivel az inkontinenciával foglalkozó nemzetközi konszenzus az előző elnevezés ellen érvelt. A közelmúltban az elnevezést és a definíciót az újabb ismeretek alapján finomították [1]. Az Amerikai Urológiai Társaság (AUA) is az Urodinamikai és Női Urológiai Társaság (SUFU) IC/BPS terminológiáját használja [2], amelyet így definiáltak: „A húgyhólyaggal kapcsolatosnak vélt kellemetlen érzés (fájdalom, nyomás, kellemetlenség), amely hat hétnél hosszabb ideig tartó alsó húgyúti tünetekkel jár, fertőzés vagy más azonosítható ok nem határozható meg” [3].

Az EAU irányelve a BPS kifejezés használatát javasolja, mivel a BPS-hez kapcsolódó negatív pszichológiai, érzelmi és szexuális szövődményeket is beépíti a meghatározásba, és nem javasolja az olyan régebbi kifejezések használatát, mint az „interstitialis cystitis” vagy a „fájdalmas hólyagszindróma” [4].

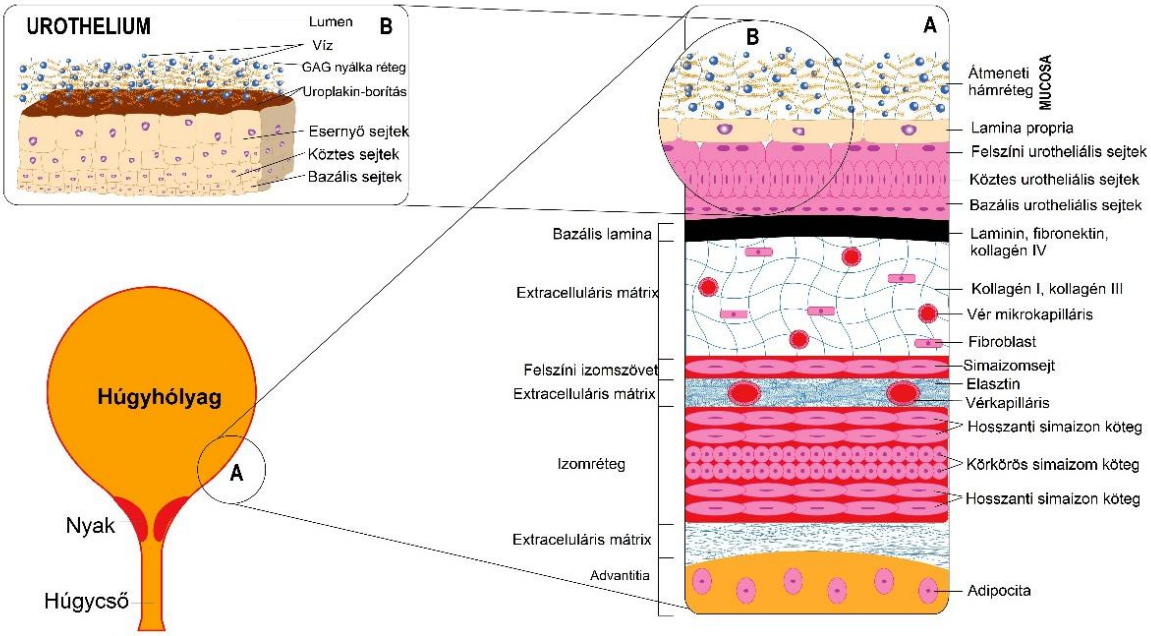
A kórkép gyakori vizelési panaszokkal és jelentős fájdalommal járó megbetegedés, amely a páciens életminőségét nagymértékben rontja. Diagnosztizálási aránya sajnos igen rossz, kb. 2,3%. A tünetek és a betegség súlyossága széles tartományban változhat. Egyes betegeknél csak enyhe kellemetlen érzés és nyomás van jelen a hólyagban, amelyhez gyakoribb vizelési inger társul. Előrehaladott stádiumban, azonban a páciensek nagyon erős fájdalmaktól szenvedhetnek, néha akár tartósan is, amit állandó vizelési inger egészíthet ki éjjel-nappal. A megfelelő kezelés hiányában a betegség progrediál, évek múltával zsugorhólyag és veseelégtelenség alakulhat ki [5].

A betegséghez nagyon gyakran társulhat depresszió és a szexuális funkciók zavara, amely ismét életminőség romlást eredményezhet a páciensnél. A magas félrekezelési ráta miatti késői diagnózis, valamint a betegséget kísérő erős fájdalom akár öngyilkossághoz is vezethet [6,7].

A BPS gyanúját alátámaszthatja néhány további specifikus tünet, mint például jellegzetes spirális erek megléte a hólyagban, amelynek előfordulási gyakorisága a betegség súlyossági fokával arányosan változhat [8].

A hólyagfájdalom szindróma kialakulásának pontos oka még ismeretlen, azonban bizonyított a panaszok háttere, amely a hólyaghártya felszíni nyák rétegének elégtelen termelődésével magyarázható [9]. Ez a réteg legnagyobb részt glükózaminoglikán (GAG) molekulákból áll, ezen kívül poliszacharid molekulák kombinációjából, mint például kollagén, elasztin, fibronectin és laminin. A húgyhólyag felszíni nyák rétege tartalmaz heparint, hyaluronátot, kondroitin-szulfátot, keratin-szulfátot és dermatin-szulfátot [10]. A heparin gyulladáscsökkentő hatással rendelkezik, gátolhatja a fibroblaszt-proliferációt, az angiogenezist és a simaizomsejtek proliferációját [11]. Viszont a hólyagból kevés heparin szívódik fel szisztémás keringésbe, még akkor is, ha a hólyag gyulladt. A hialuronsav csökkentheti a szinoviális membrán permeabilitását és ezáltal gátolja a leukociták kemotaktikus és fagocitikus funkcióit. Az BPS-ben szenvedő betegek hólyag uroepitheliumában kondroitin-szulfát proteoglikánok hiánya volt kimutatható, így ennek pótlása is elengedhetetlen [12,13].

A GAG-rétegben található proteoglikánok és glikoproteinek sűrű réteget képeznek, amelyek megvédik a submucosában található fájdalom receptorokat a vizelettel ürülő ingerlő anyagoktól, mint például sók, savak és bomlástermékek (1. ábra). Ez a réteg nem áthatolhatatlan, hanem ép, sérülésmentes állapotában egyensúlyt tart a ki- és beáramló anyagok között [14].



1. ábra: A húgyhólyag szerkezete (saját ábra)

A problémát a GAG-réteg folytonosságának megszűnése okozza, így nem véd a vizeletben található ingerlő anyagokkal szemben. Mindezek következtében kialakul egy krónikus kémiai irritáció és egy nem-bakteriális eredetű gyulladás (steril gyulladás) a hólyagfal rétegeiben (2. ábra). Ezt támasztja alá a BPS-ben szenvedő betegek biopsziás szövetminták elemzése is.

A barrier elvesztése kórszövettani, génexpressziós és molekuláris változásokhoz kapcsolódik. Előbbire példa a Hunner-léziókkal rendelkező hólyagok, melyek sugárirányú erezettséget ábrázolnak, közepén pedig fehér fibrinnel fedett hámhiányos, fekélyes területek találhatók. Ezen léziók diffúz és intenzív gyulladást mutatnak, a gyulladást kiváltó gének túlzott expressziója miatt [6].

A hólyagban megjelenhetnek Hunner-léziók. Így megkülönböztethetünk Hunner-léziós BPS-t és Nem-Hunner-léziós BPS-t. A húgyhólyag ezen területein receptorszám növekedés tapasztalható a fájdalom-receptorok tartós ingerlése miatt, amely további fájdalom fokozódással járhat [15]. Ezen folyamatok következtében az ödémássá vált szövetekbe bevándorolnak a kötőszöveti sejtek, így a hólyag elveszti a rugalmasságát. Ez a folyamat hosszú évek alatt heges zsugorhólyag kialakulásához vezethet [5].

Az elváltozás kezelése során a GAG pótlása történhet regisztrált orvostechnikai eszközök segítségével és törzskönyvezett gyógyszerek alkalmazásával intravezikálisan vagy orálisan. Magyarországon is elérhető orális gyógyszer az Elmiron®. Hatóanyaga:

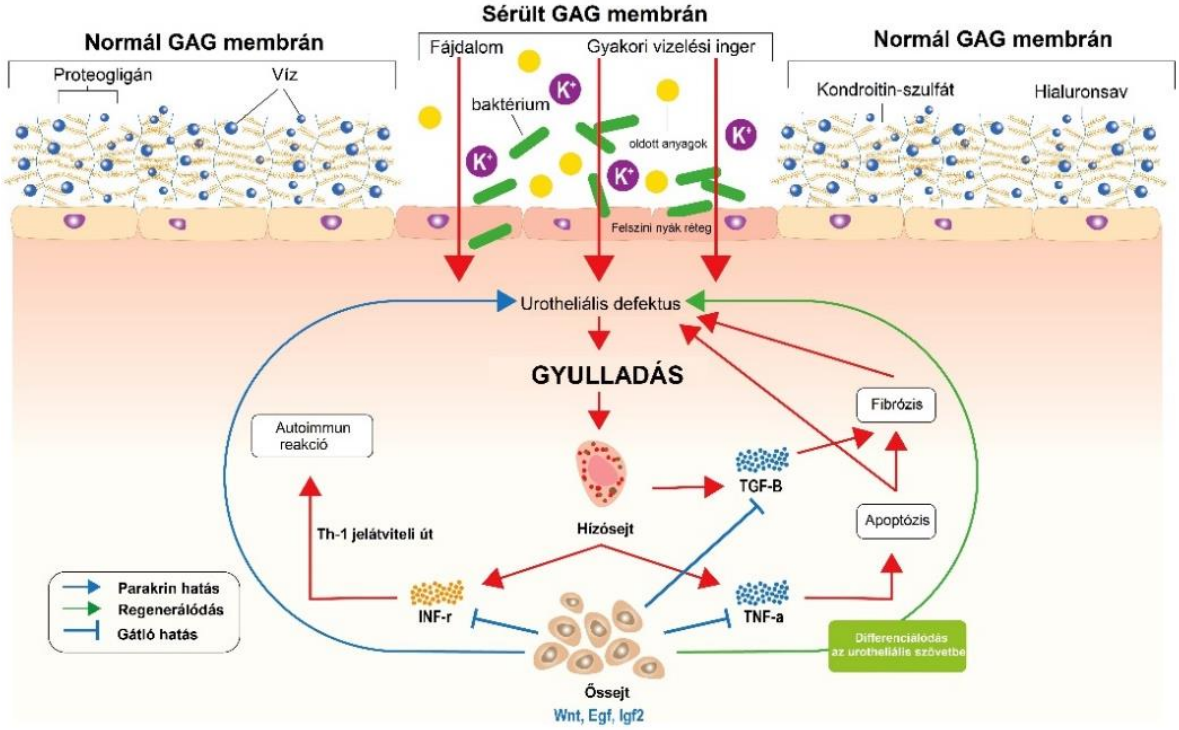
100 mg pentozán-poliszulfát-nátrium (ATC kódja: G04BX15). A készítmény gélszerű réteget képez a húgyhólyag apikális sejtmembránján, ezáltal elősegíti a GAG- réteg regenerálódását. A javasolt szedése 3x1 naponta, étkezés előtt 1 órával vagy étkezés után 2 órával. Terhesség és szoptatás alatt ellenjavalt. Mellékhatásként a hosszútávú alkalmazása pigmentáló maculophátiát okozhat, ezért szedése mellett ajánlott a rendszeres szemvizsgálat. [16]. Az Elmiron® jelenleg Magyarországon nem támogatott gyógyszer. Kizárólag egyedi méltányossági támogatás terhére finanszírozza a Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő (NEAK). A gyógyszer fogyását tekintve 2020 október óta növekvő tendencia figyelhető meg. 2020 október és 2022 május között összesen 1 672 doboz fogyott az országban (IQVIA adatbázis alapján).

A regisztrált orvostechnikai eszközök közül a Cystistat® (40mg/50ml) Magyarországon elérhető, amely nátrium-hialuronátot tartalmazó steril oldatos készítmény. Az alkalmazás módja: intavezikális instilláció [17].

Az iAluRil® Prefill fő hatóanyagként kondroitin-szulfátot és nátrium-hialuronátot tartalmaz egy 50 ml-es előretöltött fecskendőben. Az adagolása intravezikális instillációban történhet katéterrel vagy Urodapter®-en keresztül, a következő protokoll szerint: az első hónapban heti 1x, a második hónapban kéthetente 1x, majd ezt követően a tünetek megszűnéséig havonta 1x [18].

A Hyacyst®, 40 mg vagy 120 mg nátrium-hialuronátot tartalmazó előretöltött fecskendőben. Adagolási formája: intravezikális instilláció, katéterrel a húgyhólyagba kell beadni a húgyhólyag teljes leürítése után. A kezelést négy héten keresztül hetente egyszer kell elvégezni, majd fenntartó kezelés esetén havonta 1 alkalommal [19].

Az étrendkiegészítő kategóriában elérhető még a páciensek számára az UNISIS, amely glükózamin-szulfátot, kondroitin-szulfátot, nátrium-hialuronátot, kvercetint és rutint tartalmaz. Napi javasolt adagja 2x1 tabletta [20].



2. ábra: A húgyhólyag GAG- rétegének elégtelen működése (saját ábra)

A BPS tüneti kezelése kapcsán az elsődleges cél a fájdalom és az állandó vizelési inger csillapítása. Táplálkozási szokásaink eredményeként a vizelet kémhatása savas (5-6 pH körüli), amely állandósult fájdalmat és folyamatos vizelési ingert jelent a betegek számára. Ezért célszerű a vizeletet lúgosítani. Erre tökéletesen megfelelnek a citrát-sók, amelyek hatékonyan növelik a vizelet kémhatását elkerülve a hyperaciditást. Az alkáli-citrátok citrátionjai oxidatív metabolizmussal szén-dioxiddá illetve bikarbonáttá alakulnak. A fennmaradó alkáli-ionoknak köszönhető bázistúlsúly a vizelettel kiválasztódik és a vizelet pH-értékét megnöveli. Alkáli-citrátok orális adása az adagolástól függően a vizelet semlegesítéséhez vezethet. A szérum bikarbonát-koncentrációja (negatív bázistúlsúly) a citrát kiválasztás szabályozó faktora. A negatív bázistúlsúly az intracelluláris pH-érték eltolásával az anyagcserefolyamat alkalikus irányba tolódik el. Ez a vese tubuláris citrátmetabolizmusának alkalózis indukált gátlásához és csökkent citrát reabszorpcióhoz, valamint fokozott citrát kiválasztáshoz vezet. Az alkalizáció a renális kalciumtranszportot is oly módon befolyásolja, hogy a kalcium kiválasztása a vizeletben szignifikánsan csökkenjen [21].

A vizelet lúgosítására elérhető gyári készítmény a Blemaren-N® pezsgőtabletta, azonban ez K^+-t tartamaz. Terápiás javaslata:

- a vizelet lúgosítása húgysavkövek esetében, kalcium tartalmú kövek egyidejű létezése esetén vagy hiányában
- kalcium tartalmú kövek recidíva profilaxisa és/vagy a megmaradt fragmentumok növekedésének megakadályozása [22].

Fontos megemlíteni, hogy a K^+ irritatív hatású a húgyhólyagban. Ezért szerepet játszik a fájdalom és a fokozott vizelési inger kialakulásában, mivel a K^+ fokozza az urothelium permeábilitását [22]. A másik lehetőség a vizelet lúgosítására a nátrium-hidrogén-karbonát alkalmazása, mivel képes közömbösíteni a savakat. Azonban ez a molekula reakcióba lép a gyomorsavval, ezáltal szén-dioxid szabadul fel, amely fokozott gázképződést, haspuffadást és hasfeszülést idézhet el, végül gyomorégéshez vezethet. Továbbá több sav fog termelődni a gyomorban, így nagyobb a reflux kialakulásának az esélye is. Ezek által a szódabikarbóna fogyasztása tartósan nem jelent megoldást a pácienseknek.

A gyógyszeres kezelés mellett az orvosok alkalmazhatnak hólyag feltöltést is a terápia részeként. A hólyagban nyomás fokozódására kialakulhat bevérzett nyálkahártya terület, melyeknél vérszivárgás is észlelhető. Ezen jellegzetes elváltozások többsége általában csak a nagy nyomással végzett hólyagtágítás során, vagy utána észlelhetők. A hólyag tágítása történhet hidrodilatációval, ami egy katéteren keresztül végzik a hólyagba juttatott folyadékkal, illetve ballonos hólyagtágítással is végezhető a folyamat [23]. A hidrodilatációhoz általában steril, fiziológiás konyasó-oldatot használnak, melyet egyenletes sebességgel juttattnak a hólyagba egy urodinámiás pumpa segítségével. A ballonos hólyagtágítás előnye, hogy kizárható a töltőfolyadék elszivárgásának és a vesékbe történő felnyomásának veszélye [23]. A fentiek alapján úgy gondoljuk, hogy kiemelten fontos a BPS betegek kezelésével foglalkozni.

Mivel ismét egyre inkább a természetes anyagok, komponensek kerülnek előtérbe egyes betegségek kezelésében, az illóolajok népszerűsége is egyre nő. Az illóolajok összetett anyagok, amelyek több száz komponensből állhatnak. Az összetételük bizonyos körülményektől függően változhat, mint például a növény eredete, a betakarítás időpontja vagy a kivonási módszer, ami szintén befolyásolhatja farmakológiai hatásukat [24]. A levendulából és eukaliptuszból származó illóolajokat széles körben használják a kozmetikai, az élelmiszer- és a gyógyszeriparban egyaránt [21]. Gyulladásos

megbetegedésekben vizsgáltak olyan illóolajokat, mint a kamilla, az eukaliptusz, a rozmaring, a levendula, amelyek képesek modulálni a gyulladásos választ, és képesek befolyásolni a jelátviteli kaszkádokat, a szabályozó transzkripciós faktorokat, a gyulladásos génexpressziót és a citokinek termelését [25].

A közönséges levendula (*Lavandula angustifolia* Mill.) a Lamiaceae (Ajakosvirágúak) családjába tartozó, a Földközi-tenger vidékén őshonos félcserje. Hazánkban előszeretettel termesztik. A növénynek lila színű álfüzérben álló virágai jellegzetesen kellemes illatúak. Hosszú kocsányú, fürtös virágzatához széles tojásdad, kihegyezett végű, erős erezetű murvalevelek tartoznak. A levelei lándzsa alakúak, szélükön kissé lefelé görbülnek, fiatalon még molyhosak, később csupaszok és zöldek. Drogrészét képezi a levendulavirág (Lavandulae flos), aminek a fő hatóanyaga az illóolaj (Lavandulae aetheroleum). Az illóolajnak két fő komponense a linalool és a linalil-acetát. Kimutatták, hogy mindkét komponens erős gyulladáscsökkentő hatással rendelkezik [26].

Az eukaliptol az eukaliptuszolaj (Eucalypti aetheroleum) fő komponense, amit az eukaliptusz (*Eucalyptus globulus* Labill.) növény drogrészéből, a leveléből (Eucalypti folium) vonnak ki. Az eukaliptusz egy nagytermetű, Ausztráliában és Tasmániában őshonos fa, amely akár 60 m magasra is megnőhet. A kékeszöld levelek először a fiatal hajtásokon tojásdadok és átellenes állásúak, míg az idősebb ágakon szórt állásúak, rövid nyelűek és hosszabbak (kb. 10-15 cm), alakjuk keskeny-lándzsás. A levelek fonákján a középső ér erősen kidomborodik, a mellékerek egyenesek és párhuzamosak. A virágok a levelek hónaljában találhatóak, a vacok csésze formájú, a virágtakaró hiányzik és jellegzetesen sárgás porzók feltűnő csomókat alkotnak. Az eukaliptolról bebizonyították, hogy gátolja a citokintermelést, ezért gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkezik [27].

A nukleáris faktor kappa B (NFκB) útvonal szabályozása nagyon fontos a sejtek számára a változó környezeti feltételekhez való alkalmazkodásban. Az NFκB a sejtfolyamatok széles körét modulálja, mint például a proliferáció, a migráció, az apoptózis, az immunitás és a gyulladás. Az NFκB szabályozza a proinflammatórikus választ a tumor nekrózis faktor α (TNFα) és az interleukin jelátviteli útvonalak modulálásával [28]. Tehát a TNFα az NFκB nukleáris transzkripciós faktor egyik leghatásosabb fiziológiai induktora [29]. A TNFα, egy gyulladáskeltő citokin és számos szabályozó funkcióban vesz részt, pl. a sejtproliferációban, apoptózisban és más citokinek termelését is indukálja. A TNFα-t elsősorban a makrofágok termelik, de más sejtben is képes kifejeződni, beleértve az endothelsejteket is [30]. A gyulladásos válasz végül a

TNFα és más gyulladáskeltő citokinek, pl. az IL-6, IL-1β és IL-8 transzkripciós upregulációját eredményezi [28]. A BPS betegek szérumában kimutatták a gyulladáskeltő citokinek és kemokinek (IL-1β, IL-6, IL-8) fokozott expresszióját [31]. Az IL-1β gyakran szinergikusan hat a TNFα-val a gyulladáskeltő folyamat során, és az IL-6 és IL-8 termelését is indukálja. Az IL-6 fontos szerepet játszik a gyulladásban, mint az akut fázisú fehérjeszintézis induktora, valamint a makrofágok által gátolja a TNFα és IL-1β expresszióját. Az IL-6 egyszerre rendelkezik pro- és anti-inflammatórikus hatással. Az IL-8 a neutrofilek számára kemotaktikus és aktiváló tulajdonságokkal rendelkező kemokinként működik. Emellett az IL-8 szintjét az BPS betegség progressziójának markereként is használják a vizeletben, mint például pyelonephritisben, idiopátiás nefrotikus szindrómában [32–37].

2. Célkitűzés

A bevezetőben említettek ismeretében az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

- Egy hazai BPS kezelési protokoll kidolgozása. Figyelembe véve a gyógyszeres kezelési, valamint az étkezési szempontokat is.
- A folyamatos fájdalom és az esetleges mellékhatások (pl. reflux) mérséklésére egy káliummentes nyújtott hatóanyagleadású tabletta fejlesztése, amellyel a napi 2x1 dózis biztosítható. Ezzel növelve a betegadherenciát.
- A húgyhólyagban kialakuló steril, krónikus gyulladás sejtszintű csökkentése érdekében levendula és eukaliptusz illóolajokkal, illetve ezek fő összetevőivel (linalool, eukaliptol) végeztünk T24 hólyagepitél sejtvonalon vizsgálatokat. Célunk volt a gyulladáscsökkentő hatás mértékének meghatározása a gyulladáskeltő interleukinek (IL-1β, IL-6 és IL-8) mRNS expressziójának változása alapján. Emellett összehasonlítottuk hatékonyságukat az ACHP (2-amino-6-[2-(ciklopropil-metoxi)-6-hidroxifenil]-4-(4-piperidinil)-3-piridin-karbonitril) inhibitorral, egy bizonyított NFκB-gátlóval. Az mRNS szintek változása mellett fehérjeszinten is megvizsgáltuk a komponensek gyulladáscsökkentő hatását.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A BPS kezelési protokoll ajánlás megalkotása a hatályos külföldi társaságok irányelveinek tanulmányozásával

A hólyagfájdalom szindróma kezelésére kidolgozott protokoll javaslat a nemzetközi ajánlásokon és a hazai tapasztalatokon alapult. Magyarországon jelenleg nincs hivatalosan elfogadott szakmai ajánlás a hólyagfájdalom szindróma kezelésére. A protokollunk megalkotásánál a biztonságos és folyamatos gyógyszerellátás biztosítása érdekében, felkerestünk urológus szakorvosokat és az általuk kezelt IC betegek tüneteiről, kezeléséről konzultálva, valamint a betegek gyógyszerelését tanulmányozva, készítettük el ajánlásunkat. Továbbá figyelembe vettük külföldi országok Urológiai Társaságai [az Amerikai (AUA), a Japán, az Európai (EAU), a Kanadai (CUA) és a Brit Urológiai Társaság (BSUG)] által közzétett irányelveket. Az irányelvek tanulmányozása során összevetettük a protokollok evidencia szintjeit is, amelynek értelmezése az 1. táblázat alapján történt.

1. táblázat: Evidencia szintek és az ajánlási fokozatok értelmezése.

Evidencia szint	Ajánlási fokozat		
I.	A	Több RCT-ből származó bizonyíték	Fokozottan ajánlott
II.	B	Egyetlen RCT-ből vagy gyenge minőségű RCT-ből nyert bizonyítékok	Ajánlott
III.	C	Nem RCT vizsgálatokból származó bizonyíték	Ajánlott
IV.	D	Megfigyeléses vizsgálatokból vagy esetsorozatokból származó bizonyítékok	Nem ajánlott
V.	D	Esettanulmányokból vagy szakértői véleményekből származó bizonyítékok	Nem ajánlott

*RCT: randomizált, kontrollált vizsgálat

Az BPS terápiájában alkalmazott indikáción túli gyógyszerrendelésekre hatósági engedélyt kértünk (OGYÉI/64008-4/2019).

Annak feltérképezése érdekében, hogy milyen tényezők befolyásolják pozitív, illetve negatív irányba a BPS terápiájának kimenetelét, összeállítottunk egy táplálkozással kapcsolatos kérdőívet. A „Gyógyszerek, gyógyszernek nem minősülő termékek, étkezési és életviteli szokások hatása az interstitialis cystitis (hólyagfájdalom szindróma) tüneteire – kérdőíves felmérés" című kérdőívből nyert adatok a betegellátás színvonalát hivatottak javítani (1. melléklet). Az adatokat anonim módon gyűjtöttük és kezeltük. A kérdőívet 246 páciens kapta meg, közülük 126 fő vett részt a felmérésben, 30-99 éves kor között. Az adatgyűjtés 2019 márciusa és májusa között zajlott. A kérdőív 45 kérdésből állt. A kérdőív egy- és többszörös választási lehetőségű kérdést és néhány rövid kifejtős válaszlehetőséget tartalmazott. A kérdőív első felében általánosabb kérdések szerepeltek, mint például nem, állapot, tünetek, majd a második felében az élelmiszerfogyasztásra fókuszáltunk. Számos tudományos cikk, ajánlás és étrendi javaslat [38–40] elolvasása után a kérdőív elkészítése során a következő fő csoportokra összpontosítottunk: zöldségek, gyümölcsök, tejtermékek, az utolsó csoportba pedig a kávé, tea, energiaitalok tartoztak.

A vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudomány és Kutatásetikai Bizottság 8230-2/2019 számú engedélye alapján végeztük el.

3.2 A káliummentes nyújtott hatóanyagleadású tabletta formulálása

A már forgalomban lévő készítmény összetételeit figyelembe véve kialakítottuk a saját egyedi, speciális, K^+-mentes receptúránkat az alábbiak szerint:

A tabletták hatóanyagait Dr. Lovász Sándor, urológus empirikus tapasztalatai alapján határoztuk meg. A hatóanyag tartalmat 60%-ra állítottuk be a tabletta össztömegéhez viszonyítva. A tabletta fő hatóanyaga a citromsav (68 mg) (Hungaropharma Zrt, Budapest, Magyarország), a nátrium-citrát (183 mg) (Hungaropharma Zrt., Budapest, Magyarország) és a magnézium-citrát (243 mg) (Hungaropharma Zrt, Budapest, Magyarország) volt.

A citromsav és a nátrium-citrát hatóanyagok a homogenizálásuk során eutektikumot képeztek, ezért speciális megoldásokra volt szükségünk. Így az egyes hatóanyag komponenseket külön-külön porítottuk dörzsmozsárban a VII. szitafinomság eléréséig. Ezt követően összesen 0,5% Aerosil-t (Hungaropharma Zrt, Budapest, Magyarország) adtunk minden egyes összetevőhöz részletekben, folyamatos keverés mellett. A homogenizálás után 0,5% magnézium-sztearát (Hungaropharma Zrt, Budapest, Magyarország) segédanyaggal biztosítottuk a kívánt lubrikáns hatást. Végül, pedig

Avicel DG (IMCD Group B.V., Bécs, Ausztria) nevű magas vízmegkötő képességű segédanyagot alkalmaztunk, amely mikrokristályos cellulóz és vízmentes bázikus kalcium-foszfát elegye. A higroszkópos hatóanyag esetében az Avicel DG-vel optimalizáltuk a tablettázandó anyagok rheológiai tulajdonságát. Az Avicel DG száraz granuláláshoz használt segédanyag. Ezen kívül megkönnyíti a szilárd gyógyszerforma tömörítését azáltal, hogy javítja a tabletta robusztusságát és keménységét. A tabletta magas Mg^{2+}- és Na^{+}-tartalma miatt, polimerek, carbomer mátrix rendszerek nem jöhettek szóba, ezért a választásunk a magas viszkozitású Benecel hipromellóz (HPMC, mikrokristályos cellulóz) gradekre esett.

A HPMC a hidrofil mátrixrendszerekben a legszélesebb körben használt félszintetikus polimer. A Benecel hipromellóz 20-24% metoxi-részből és 7-12% hidroxipropil-tartalomból áll. Ezek megfelelnek az US Pharmacopeia 2208 típusú hipromellóz szubsztitúcióra vonatkozó követelményeinek. A hidrofil mátrixot aktív szubsztanciák és hidrofil vivőanyagok keverékének közvetlen préselésével állítottuk elő. A Benecel segédanyag segítségével alakítottuk ki a cellulózalapú mátrixtablettákat. Három előre kiválasztott Benecel típust: a Benecel K4M PH DC, a Benecel K15M PH DC és a Bencel K100M PH DC-t használtunk hatóanyag felszabadulási sebességet szabályozó segédanyagként az egyes tabletták elkészítésekor (2. táblázat) [41].

2. táblázat: Benecel® típus különböző viszkozitása (Ashland [41]).

Grade	Átlag molekulasúly	Oldat koncentráció	Nominal viszkózitás (mPa*s)[a]	Alkalmazás	Átlagos részecskeméret (µm); D90
Benecel® K4M PH DC	400,000	2%	2,700-5,040	Szabályozott hatóanyag-leadás	184 ± 0,2
Benecel® K15M PH DC	575,000	2%	13,500-25,200		191 ± 0,5
Benecel® K100M PH DC	1,000,000	2%	75,000-140,000		182 ± 0,7

*'K'HPMC típus.; 'PH' Gyógyszerkönyvi; 'DC' direkt préselés
'[a]' NF/EP/JP viszkózitási módszer

A "PH" jelölés azt jelzi, hogy megfelel a gyógyszerkönyvi minőségnek, a "DC" jelölés pedig azt, hogy közvetlen préselésre alkalmas. Minden esetben öt különböző

módon állítottuk össze a tabletta poranyagát (3. táblázat), amit rheológiai vizsgálatoknak vetettünk alá. A szakirodalmi adatok [41,42] és vizsgálataink alapján a Benecel® K100M PH DC HPMC (Ashland Inc., Kentucky, USA) volt a legígéretesebb.

3. táblázat: Az előzetes rheológiai mérések során vizsgált tabletta-összetételek.

	1 minta	**2 minta**	**3 minta**	**4 minta**	**5 minta**
Hatóanyag-tartalom	60 %	60 %	60 %	60 %	60 %
Magnézium-sztearát	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %
Aerosil	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %
Benecel® típusok *	30 %	25 %	20 %	15 %	10 %
Avicel DG	9 %	14 %	19 %	24 %	29 %

*Benecel® típus: A= K4M PH DC; B=K15M PH DC; C= K100M PH DC

3.2.1 A granulátumok rheológia mérései

Első lépésként 15 különböző összetételű granulátum folyási tulajdonságait vizsgáltuk meg a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv előírásai szerint. Stampfvoluméterrel (Erweka, SVM 102) meghatároztuk a Hausner faktort és a Carr-indexet. ASTM (American Society for Testing and Materials) tölcsért használtunk a kifolyási idő meghatározásához és a lejtőszög kiszámításához a következő egyenlet segítségével (1).

$$tg \propto = h\frac{d}{2} \quad (1)$$

ahol α a lejtőszög, h a porkúp magassága, illetve d az átmérője.

3.2.2 A tabletta direkt préselése

A rheológiai eredmények alapján 7 keveréket: A/3, A/4, A/5, B/2, B/3, B/5, C/3 választottunk ki direkt tablettázásra. A száraz granulálással előállított granulátumokat excenteres Korsch-típusú tablettázógéppel (KORSCH AG, Berlin, Németország) tablettáztunk, amelyhez oblong formájú présszerszámot használtunk (szélesség: 7,2 mm, hosszúság: 16,2 mm, magasság: 6 mm). A préserő minden esetben 10 kN volt. A tabletták átlagos tömege 643±2,44 mg.

3.2.3 A tabletta fizikai vizsgálata

Az így elkészített tablettákat a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv előírásai alapján vizsgáltuk, az alábbiak szerint:

- egyedi és átlagos tömeg meghatározása (AP224W analitikai mérleg, 220 g / 0,1 mg)
- kopási veszteség meghatározása (Erweka TAR220 kopási szilárdság mérő, Langen, Németország)
- törési szilárdság meghatározása (Erweka TBH 125 tabletta szilárdságtesztelő, Langen, Németország)
- hatóanyag kioldódás vizsgálata (Erweka DT700 forgólapátos készülék, Langen, Németország és Hanson Research Microette plus 6 mintavevő egység, Chatsworth, California, USA)
- hatóanyag-tartalmi meghatározása (Dionex UltiMate 3000 készülék UHPLC, Termo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

3.3 A káliummentes nyújtott hatóanyagleadású tabletta analitikai vizsgálata

3.3.1 A tabletta hatóanyag-kioldódási vizsgálata

A tabletta hatóanyag kioldódás 6 párhuzamos vizsgálatánál forgólapátos módszert (ERWEKA DT700 és Microette plus 6 autosampler) illetve az alábbi vizsgálati paramétereket alkalmaztuk:

- 37°C
- 75 fordulat/perc
- 2,4 ml minta
- foszfátpuffer 900 ml, pH 6,8
- mintatérfogat: 2,4 ml

3.3.2 A tabletta hatóanyagtartalmi meghatározása

A hatóanyag kioldódási vizsgálat során nyert minták előkészítésekor a HPLC méréshez 1 ml mintát 20 µl HPLC tisztaságú foszforsavval savanyítottuk, a citromsav jelenlét méréséhez.

A HPLC módszer validálás befejezése után az alábbi vizsgálati paramétereket alkalmaztuk:

- oszlop: Lichosper C18 250 x 6 mm (Merck Life Science Kft., Darmstadt, Németország)

- áramlás 1,2 ml/perc

- injektálási térfogat 10 µl

- eluensek: A: 0,05% H_3PO_4 /H_2O; (D: 10% H_2O/MeOH csak oszlopmosás)

- 26°C (izokratikus körülmények)

- kimutatási határ (LOD) 0,0607 mg/l

Három párhuzamos oldódási vizsgálatot végeztünk, n= 6 volt minden esetben.

A vizsgálatok eredményei alapján a C/3 tablettát választottuk ki további vizsgálatokhoz.

Tabletta összetétele:

- Hatóanyag tartalom: 60%

- Magnesium stearinicum: 0,5%

- Aerosil: 0,5%

- Benecel K100M PH DC HPMC: 20%

- Avicel DG: 19%

3.3.3 A tabletta kioldódási adatainak elemzése

Modellfüggetlen elemzést végeztünk a vizsgált tablettakészítmények kioldódási profiljainak összehasonlíthatóságának, valamint a köztük lévő hasonlóság és különbség értékének meghatározására. A kioldódási hatékonyságot (DE) is kiszámítottuk az összes összetétel átlagos kioldódási profiljára. (2. egyenlet)

$$DE = \frac{\int_0^t y \times dt}{y_{100} \times t} \times 100\%$$

(2)

ahol y a kumulatív százalékos oldódás a t időpontban [43].

A különbség, az f_1 faktor és a hasonlóság f_2 faktorok kiszámításával összehasonlítottuk a C/3 összetételt az A/3 és a B/3 összetétellel. A különbség- és hasonlósági tényezőket a következő egyenletek segítségével számoltuk ki:

$$f_1 = \frac{\sum_{j=1}^{n} |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^{n} R_j} \times 100$$

$$f_2 = 50 \times \log\left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{j=1}^{n} w_j \left| R_j - T_j \right|^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

ahol n a mintavételi szám, Rj és Tj a referencia- és a vizsgált termék százalékos oldódása minden egyes j időpontban, és ahol w_j egy választható súlytényező.

A hatóanyag-felszabadulás kinetikai modellezéséhez a C/3 összetétel oldódási adatait nemlineáris illesztéssel végeztük nulladrendű (3. egyenlet), elsőrendű (4. egyenlet) és Korsmeyer-Peppas modellekkel (5. egyenlet) a Microsoft Excel segítségével.

$$Q = Q_0 + k_0 t$$
(3)

$$Q_t = Q_0 \times e^{-k_1 t}$$
(4)

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = k_{kp} t^n$$
(5)

ahol Q a t időpontban felszabaduló hatóanyag mennyisége, Q_0 a kezdeti hatóanyag mennyisége, Q_t a t időpontban maradó hatóanyag mennyisége, és ahol $\frac{Q_t}{Q_\infty}$ a t időpontban felszabaduló hatóanyag hányada. k_0, k_1 és k_{kp} a nulladrendű, elsőrendű, illetve Korsmeyer-Peppas modellek kinetikai állandói, n pedig a hatóanyag felszabadulási exponens, amely a hatóanyag felszabadulási mechanizmusára utal. A Korsmeyer-Peppas-modell esetében csak a felszabadulási adatpontokat használtunk fel az elemzésben a hatóanyag felszabadulásának 60%-áig [44].

3.3.4. A C/3 minta tabletta stabilitási vizsgálata

Az általunk összeállított és vizsgált C/3 tabletta stabilitását 24 hónap elteltével megvizsgáltuk. Száraz, fénytől védett helyen tároltuk. A stabilitási vizsgálat során megismételtük a fentebb ismertetett valamennyi mérést.

3.4 A tabletta hatásosságának vizsgálata kettős vak randomizált placebo kontrolált humán klinikai pilot vizsgálatban

A C/3 minta készítményt étrendkiegészítő kategóriában az OGYÉI-nél bejegyeztettük, és 24091/2020 notifikációs számot kapott. A pilot vizsgálatot egy helyszínen, a budapesti Rózsakert Medical Centerben végeztük. A vizsgálat az Észak-Közép-budai Centrum Új Szent János Kórház és Szakrendelő Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottság engedélye alapján történt (engedélyszám: 7074-

2/2020). A befogadási kritériumoknak megfelelően önkéntes alapon húsz felnőtt beteget, négy férfit és tizenhat nőt, terápia naiv BPS betegeket vontunk be a vizsgálatba.

A humán klinikai pilot vizsgálat végpontjai a következők voltak: a vizelet átlagos pH-értékének meghatározása, a nyújtott hatóanyag-leadású citrát tablettának (C/3 összetétel; 4. táblázat) megfelelő-e a lúgosító hatása az azonnali hatóanyag-leadású citrát tabletta és a placebo adagolásával összevetve.

4. táblázat: Nyújtott hatóanyag-leadású citrát tabletta [45] és az azonnali hatóanyag-leadású citrát tabletta összetételének összehasonlítása.

Nyújtott hatóanyag-leadású citrát tabletta		**Azonnali hatóanyag-leadású citrát tabletta**
53,04 mg	Citromsav	68 mg
142,74 mg	Nátrium citrát	183 mg
189,54 mg	Magnézium citrát	243 mg
3,215 mg	Magnézium sztearát	16 mg
3,215 mg	Kolloid szilícium-dioxid	3,50 mg
-	Sztearinsav	12,50 mg
-	Szorbit	300 mg
128,6 mg	Benecel K100M PH DC	-
122,17 mg	Avicel DG	-

A klinikai pilot vizsgálat alatt az első héten a betegek, úgynevezett „kimosási fázis” során nem szedtek olyan tablettákat, amelyek megváltoztathatták a vizelet pH-értékét. A következő három hétben a páciensek placebot (5. táblázat), káliummentes, azonnali felszabadulású citrát tablettát és nyújtott hatóanyag-leadású citrát tablettát kaptak. Randomizált sorrendben egy-egy héten át szedték a betegek az említett tablettákat, napi két alkalommal. A randomizálási sorrend meghatározása a Microsoft Excel programmal történt. Az összes készítmény egyedi azonosítót kapott a tabletták kiadagolás során, amelyek később a betegekhez lettek rendelve.

5. táblázat: A placebo tabletta összetétele.

Placebo tabletta összetétele	**mennyiség**
Szorbit	743,4 mg
Magnézium sztearát	41,3 mg
Talkum	41,3 mg

A placebokontrollált, kettős vak klinikai pilot vizsgálat követelményeinek megfelelően a három különböző tabletta azonos megjelenésű és tömegű volt (3. ábra). Ezért a nyújtott hatóanyagleadású tablettának 22%-kal kevesebb hatóanyagot kellett tartalmaznia, amit az eredmények tárgyalásánál figyelembe vettünk.

3. ábra: Vizsgálatban résztvevő tabletták: placebo, hagyományos- és nyújtott hatóanyag-leadású tabletta (balról jobbra).

A betegek kalibrált, digitális, Testo 201-típusú, hordozható pH-mérőt kaptak és pontos pH-mérési protokollt, ami tartalmazta lépésről-lépésre az utasításokat (2. melléklet). A betegeket arra kértük, hogy mérjék meg a vizeletük kémhatását, legalább ötször nappal és kétszer éjszaka vagy minden vizeléskor mérjék meg a pH-t. Az adatokat regisztrálták egy kifejezetten a klinikai vizsgálathoz tervezett weboldalon, amely az összes mért adat regisztrálására és tárolására szolgált, amelyet a vizsgálati időszak végén exportáltunk a statisztikai kiértékeléshez. Ezen túlmenően a betegek bármilyen szöveget hozzáadhattak a megjegyzésként, észrevételként, javaslatokra vagy mellékhatásokra vonatkozóan. Sürgős kérdések esetén biztosítottuk a telefonos kapcsolatot a klinikai vizsgálatot vezető orvossal.

Az adatok statisztikai kiértékelése a Statistica nevű programmal történt (TIBCO Software Inc. (2018). Statistica (Data Analysis Software System), 13. verzió. (http://tibco.com).

3.5 Illóolajok gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata T24 hólyagepithel sejtvonalon

3.5.1 Illóolajok beszerzése és törzsoldatok elkészítése

A levendulát elő- (2019. június 20) és utóvirágzásban (2019. július 18) gyűjtöttük be és a PTE GYTK Farmakognóziai Intézetében desztilláltunk belőle illóolajokat. A gyűjtés helye: Bolhó (Somogy megye, Magyarország, GPS-koordináták: 46.03904°N, 17.30376°E). Az illóolajokat a növényből vízgőzdesztillációval vontuk ki, a VIII. Magyar

Gyógyszerkönyv ide vonatkozó cikkelye szerint. Egy desztillációhoz 40 g szárított virágot és 500 ml desztillált vizet használtunk fel. A desztilláció folyamata 3 órát vett igénybe. Az illóolaj mennyiségét volumetrikus módszerrel határoztuk meg. Az eukaliptusz illóolajt az Aromaxtól (Aromax Zrt., Budapest, Magyarország) vásároltuk. A linalool és eukaliptol standardokat a Sigma-Aldrich-tól (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) rendeltük meg. Az illóolajok törzsoldatainak elkészítése során a 900 µl illóolajhoz 10% dimetil-szulfoxidot (100% DMSO, Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) adtunk. Az emulziókat vortexeltük és 500-szorosára hígítottuk foszfát pufferelt sóoldattal (PBS, Lonza Ltd., Basel, Svájc). A linalool és eukaliptol standardok törzsoldatait az illóolajokkal azonos módon készítettük el.

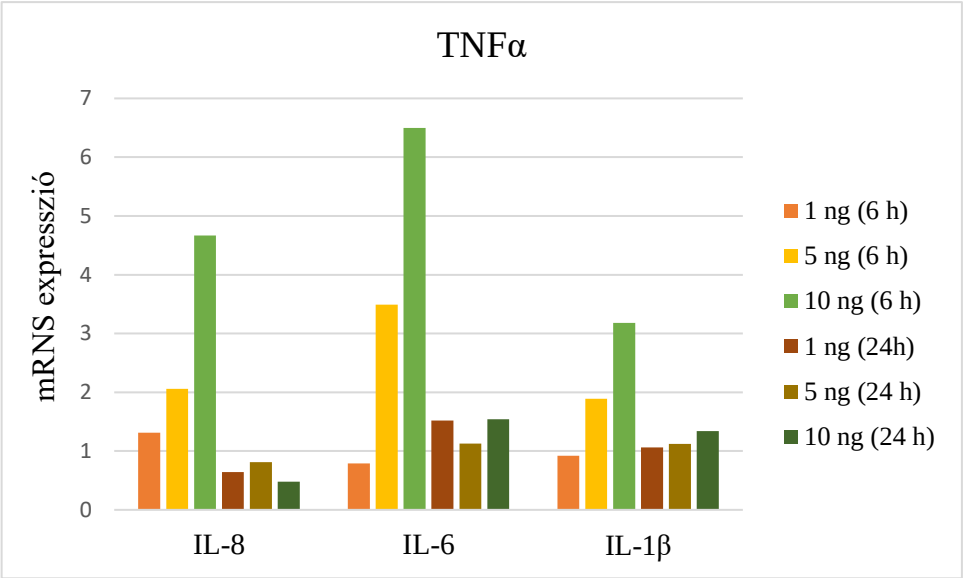
3.5.2 Az illóolajok GC-MS analitikája

Az analitikai elemzés előtt az eukaliptusz illóolajat (10 µL) 990 µl n-hexánban (hígítás: 1:100) oldottunk, a levendulaolajokat (10 µl) 990 µl metanolban (hígítás: 1:100) oldottunk, és GC-MS és GC-FID rendszerbe injektáltunk. A levendula illóolaj gázkromatográfiás méréseit az olaszországi Messinai Egyetemen (University of Messina) végezték el. Az eukaliptusz illóolaj gázkromatográfiás mérése a Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Karának Farmakognóziai Intézetében végeztük el (3. melléklet).

Az illóolajok elválasztását és azonosítását egy GCMS-QP2020 műszerrel (Shimadzu, Duisburg, Németország) végeztük, amely split-splitless injektorral (280°C) és AOC-20i automatikus mintavevővel volt felszerelve. A kapilláris oszlop alacsony polaritású volt, nevezetesen SLB-5ms 30 m × 0,25 mm id, 0,25 µm d_f (Merck Life Science). A hőmérsékleti program a következő volt: 50°C-tól 300°C-ig 3,0°C/perc sebességgel. Az injekciós térfogat 0,5 µl volt 1:10 osztási arány mellett. Héliumot használtunk vivőgázként, 26,7 kPa kezdeti bemeneti nyomáson és 30 cm/s átlagos lineáris sebességgel. Az MS paraméterek a következők voltak: a tömegtartomány 40-550 amu, az ionforrás hőmérséklete 220°C, a határfelületi hőmérséklet 250°C volt. Az adatgyűjtéshez és -kezeléshez a GC-MS solution szoftver (Shimadzu 4.50-es verziója) szolgált. A csúcsok hozzárendelése kettős szűrő alkalmazásával történt: spektrális hasonlóság (több mint 85%) és ± 5 LRI tolerance ablak. Az FFNSC tömegspektrum-könyvtár 3.01-es verziója (Shimadzu, Europe, Duisburg, Németország) főleg a vegyületek azonosítására szolgált.

3.5.3 T24 sejtkultúra és kezelése

A T24 humán hólyag epitélsejteket (HTB-4; American Type Culture Collection, USA) McCoy's 5A médiumban (Lonza, Ltd., Basel, Svájc) tartottuk, amelyet 10% borjú szérummal (FBS, EuroClone) és 1% penicillinnel/streptomicinnel (Lonza Ltd., Basel, Svájc) egészítettünk ki. A T24 sejteket 6 lyukú lemezekre helyeztük ki és a kezelések előtt 24 órán át tenyésztettük. A gyulladást TNFα kezeléssel (10 ng/mL, Shenandoah Biotechnology Inc. Warminster PA, USA) indukáltuk 6 és 24 órán keresztül. A TNFα koncentrációját koncentrációfüggőségi kísérletekkel határoztuk meg, majd elemeztük a gyulladáskeltő citokin mRNS expresszióját (4. ábra).



4. ábra: TNFα mRNS-expressziója 6 órás és 24 órás kezelés esetén.

Az illóolajok és fő összetevőik gyulladáscsökkentő hatását három különböző kísérleti időbeosztásban határoztuk meg: TNFα előkezelés 6 órán keresztül, majd 24 órás illóolaj/standard kezelés; TNFα előkezelés 24 órán keresztül, majd 6 órás illóolaj/standard kezelés; és TNFα előkezelés 24 órán keresztül, majd 24 órás illóolaj/standard kezelés. Az illóolajokat és a standardokat 500-szoros hígításban használtuk a citokintermelésre gyakorolt hatásuk meghatározásához. Minden kísérletben DMSO-val kezelt sejteket használtunk kontrollként. Minden kísérletet legalább háromszor végeztünk 37 °C-on, 5% CO_2-t tartalmazó párásított légkörben.

3.5.4 T24 sejtek viabilitási mérése

A T24 sejteket 96 lyukú lemezekre helyeztük ki 5000 sejt/lyuk alkalmazásával. A sejteket illóolajokkal és standardokkal kezeltük 200-szoros, 500-szoros, 1000-szeres és

2000-szeres hígításban 6 és 24 órán keresztül. A kezelések után a T24 sejtek életképességét Cell Counting Kit-8 (CCK-8) viabilitási teszttel (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) mértük. A DMSO-val kezelt sejteket az illóolajjal kezelt sejtek kontrolljaként, míg a DMSO sejtéletképességre gyakorolt hatását a kezeletlen sejtek kontrolljaként használtuk. DMSO törzsoldatot is készítettünk 10 µl 100%-os DMSO-t 990 µl PBS-sel (Lonza Ltd., Basel, Svájc) hígítottunk, majd további hígításokat (200-szoros, 500-szoros, 1000-szoros és 2000-szoros) végeztünk. A kezelést követően 10 µL WST-8 reagens került minden egyes lyukba, majd az összes lemezt 1 órán keresztül 37°C-on és 5% CO_2-on inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után 10 µl 1%-os nátrium-dodecil-szulfátot (SDS, Molar Chemicals Kft., Halásztelek) pipettáztunk minden egyes lyukba a reakció leállítása érdekében. Ezután a minták abszorbanciáját 450 nm-en határoztuk meg MultiSkan GO mikrolemez spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). A sejtek életképességét a megfelelő kontroll teljes sejtszámának százalékában fejeztük ki. A TNFα kezelés hatását a sejtek életképességére szintén különböző koncentrációkkal (1 ng/ml, 5 ng/ml; 10 ng/ml) határoztuk meg (6. táblázat).

6. táblázat: T24 sejtvonalon végzett TNFα viabilitási vizsgálat.

TNFα	Viabilitás (%)
1 ng	95±1,6
5 ng	94±2,5
10 ng	92±3,1

3.5.5 Real-Time PCR módszer

A T24 sejteket a korábban leírt módon kezeltük 6 lyukú lemezeken (200 sejt/lyuk). A kezelések után a T24 sejteket PBS-szel öblítettük, majd tripszinizálás után a sejtpelleteket összegyűjtöttük. Ezután a mintákból teljes RNS-t izoláltunk Quick RNA mini kit (Zymo Research, Irvine, CA) segítségével. A komplementer DNS-t 200 ng teljes RNS-ből szintetizáltuk a High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) protokollja szerint. A génexpressziót 20 µl teljes reakciótérfogatban mértük CFX96 valós idejű PCR rendszerrel (Bio-Rad Inc., Hercules, CA) iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Inc., Hercules, CA) segítségével. A kvantitatív PCR során olvadási görbéket készítettünk annak megerősítésére, hogy egyetlen specifikus termék keletkezett minden reakcióban. A relatív mennyiségi meghatározáshoz a Livak (2-ΔΔCt) módszert

használtuk a Bio-Rad CFX Maestro szoftver (Bio-Rad Inc., Hercules, CA) segítségével. A mintákban kapott génexpressziós szinteket a β-aktin szintjéhez viszonyítva ábrázoltuk. Így relatív expressziós szinteket kaptunk, amelyeket a kezeletlen és a kezelt minták összehasonlítására használtunk. A kontrollok relatív expressziós szintjét 1. értéknek tekintettük, majd a kezelt sejtek mRNS-expresszióját a kontrollokhoz viszonyítva határoztuk meg. A vizsgálatban használt primer szekvenciákat a 7. táblázat tartalmazza.

***7. táblázat*:** Real-time PCR gén primer lista.

Primer	Szekvencia 5' → 3'
IL-6 forward	CTGAGAAAGGAGACATGTAACAAG
IL-6 reverse	GGCAAGTCTCCTCATTGAATC
IL-8 forward	CAGTGCATAAAGACATACTCC
IL-8 reverse	CACTCTCAATCACTCTCAGT
IL-1β forward	GAAATGATGGCTTATTACAGTGG
IL-1β reverse	GGTGGTCGGAGATTCGTA
TNFα forward	CTCTCTCTAATCAGCCCTCT
TNFα reverse	CTTGAGGGTTTGCTACAACA
β-actin forward	AGAAAATCTGGCACCACACC
β-actin reverse	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA

3.5.6 Humán IL-8 ELISA mérés

A kezeléseket követően a kontroll és a kezelt sejtek felülúszóját összegyűjtöttük, és a mérésekig -80°C-on tároltuk. A felülúszóban lévő szekretált IL-8 koncentrációját humán IL-8 ELISA kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) segítségével határoztuk meg a gyártó utasításait követve.

3.5.7. Illóolajok gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálatainál kapott eredmények statisztikai elemzése

A statisztikai elemzést az SPSS szoftver (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) segítségével végeztük. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA-val határoztuk meg, amelyet Tukey's HSD post hoc teszt követett. Az adatokat átlag ± standard eltérés (SD) értékben tüntettük fel. A statisztikai szignifikanciát p-érték <0,05-nél határoztuk meg. Minden vizsgálatot három alkalommal ismételtünk, egymástól független kísérletekben (n=3).

4. Eredmények

4.1 A BPS kezelési protokoll ajánlás megalkotása a hatályos külföldi társaságok irányelveinek tanulmányozásával

4.1.1 A BPS kezelési protokoll

A jelenleg elérhető 5 protokoll tanulmányozása [36,46–49] alapján és a hazai tapasztalatok szerint terveztük meg a kezelési protokoll javaslatunkat.

Kezdeti stádiumban enyhe tüneteket mutató betegek esetén javasolható a BPS-diéta, bő folyadékfogyasztás és a vizelet lúgosítás, amellyel elérhető a vizelet irritáló hatásainak csökkentése. Ezek mellett szedhetők orális GAG-réteg regeneráló gyógyszerek, mint pl. kondroitin-szulfát és pentozán-poliszulfát-tartalmú készítmények, amelyek megfelelő beépüléséhez szükség van kis mennyiségű C-vitaminra (100 mg/nap) (5. táblázat). A kezdeti kezelést, ha szükséges, kiegészíthetjük nem-szteroid gyulladáscsökkentők (paracetamol, diklofenák), antihisztaminok (loratadin) anxiolitikumok (hidroxizin) adásával [7].

Előrehaladottabb stádiumban, közepesen súlyos panaszok esetében a leghatásosabb a kombinált terápia, amely alatt orális és lokális kezelés egyidejű alkalmazását értjük. Az előzőekben már említett szájon át szedett gyógyszerek mellett a húgyhólyagba intravezikális oldatokat (instilláló oldatot) adnak az urológusok, amelyek a GAG-réteg fő összetevőit tartalmazzák (heparin, hialuronsav, kondroitinszulfát) (8. táblázat) [50,51].

8. táblázat: A BPS kezdeti és előrehaladottabb stádiumában alkalmazandó hatóanyagok és adagolásuk.

Első vonalbeli szerek- Orális terápia	**Adagolás**
kondroitin-szulfát	800 mg/nap
pentozán-poliszulfát	300 mg/nap
Második vonalbeli szerek- Intravezikális terápia	**Adagolás**
nátrium-hialuronát 2,05 mg/ml oldat	20 mg/instillatio
heparin 25 000 NE oldatos injekció	12500 NE/instillatio
kondroitin-szulfát	200 mg/instillatio

A fenti kezeléstől a GAG-réteg regenerálódása és ennek következtében a hólyagfal gyulladásának csökkenése várható.

Súlyos stádiumban vagy a kezelés ellenére romló állapotok szükségessé teszik az érintett területek műtéti eltávolítását: transzuretrális lézerrel vagy elektrokoaguláció által.

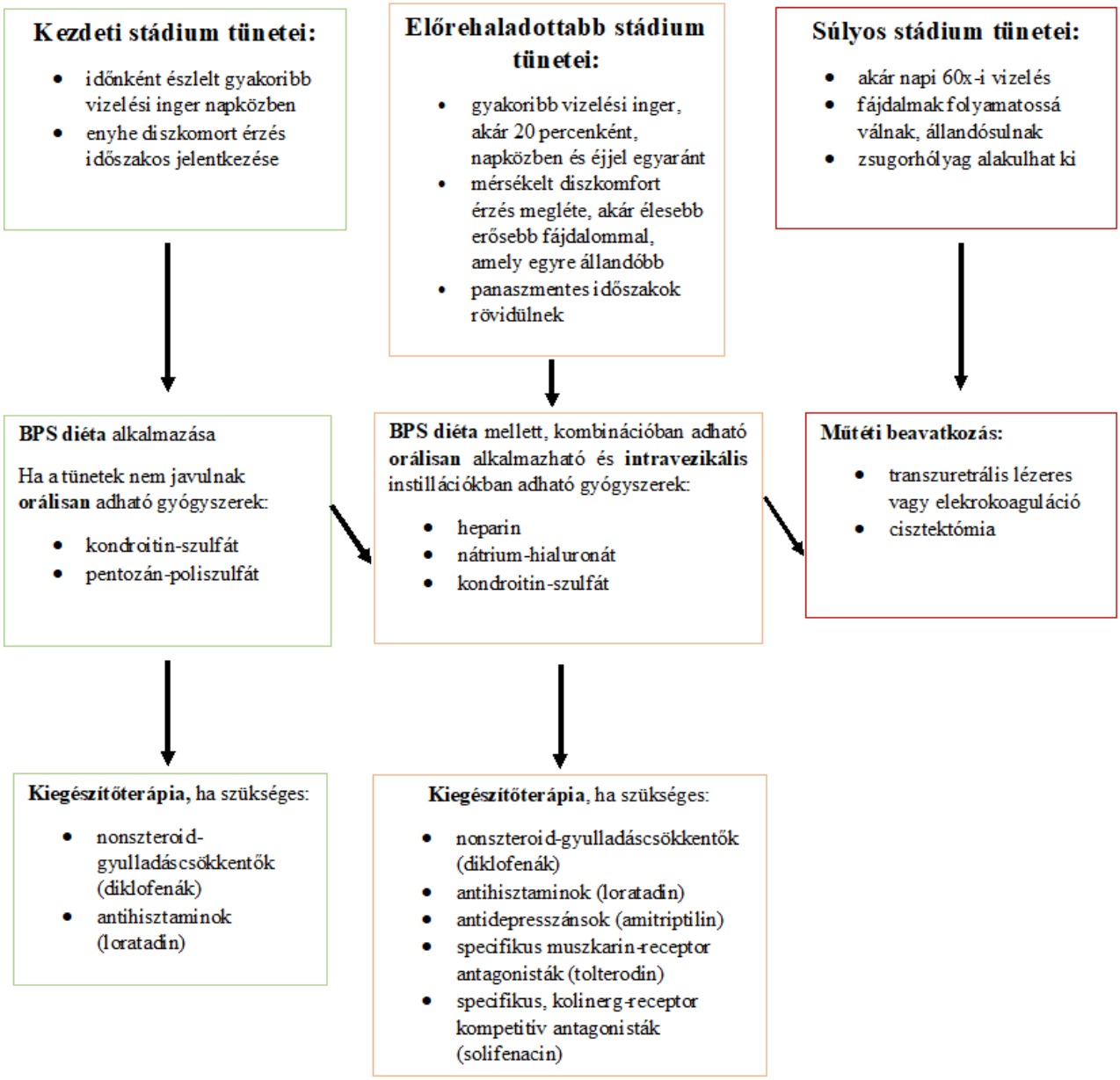
Végstádiumban zsugorhólyag alakulhat ki, amelynek kapacitása csupán 30-50 ml. Ez igen gyakori akár napi 60-szori vizelést és folyamatos fájdalmat eredményez, így a páciens életminősége rendkívül leromlik. Ilyen esetben végső megoldás már csak a cisztektómia lehet [5].

Amennyiben az oki terápia nem elégséges, akkor tüneti kezelést is kell alkalmazni, mely során erős fájdalomcsillapítókat (tramadol, gabapentin), antidepresszánsokat (amitriptilin), izomrelaxánsokat (tolterodin, solifenacin), antihisztaminokat és anxiolitikumokat (hidroxizin-hidroklorid) kapnak a páciensek (9. táblázat).

9. táblázat: BPS esetén a kiegészítő terápia hatóanyagai és adagolásuk [52].

Kiegészítő terápia	Adagolás
amitriptilin	25-100 mg/nap
diklofenák	50-150 mg/nap
gabapentin	1200 mg/nap fenntartó
hidroxizin	10-50 mg/nap
paracetamol	max 3000 mg/nap
solifenacin	5 mg/nap
tramadol	50-200 mg/nap
tolterodin	2 mg/nap

A protokoll javaslatunk összefoglalóját az 5. ábra tartalmazza.



***5. ábra*:** BPS-ben szenvedő betegek kezelésének protokoll javaslata.

4.1.2 Nemzetközi irányelvek gyógyszeres kezelésének összehasonlítása

A világ vezető urológiai társaságai öt fő iránymutatást tettek közzé. Ezen irányelvek farmakoterápiás ajánlásait a 10. táblázat foglalja össze. Az amerikai, a brit, az európai, a kanadai és a japán irányelvek ajánlási fokozatókat adnak meg. Emellett az európai-irányelv (EUA) tartalmazza az evidencia-szinteket, valamint a kanadai és a japán irányelv tartalmazza az ajánlott dózisokat is. A protokollunkban szereplő hatóanyagok és a nemzetközi irányelvek áttekintése az alábbi eredményeket adta:

1. Az orális pentozán-poliszulfát az enyhébb tünetek kezelésére ajánlott, mivel erősíti a GAG-ot és csökkenti a sérülést az urothelben. Az irányelvek közül az európai és a brit irányelv szerint A szintű ajánlásba sorolta be a hatóanyagot. Az Egyesült Államokban és Japánban B szintűek az erre vonatkozó bizonyítékok. A kanadai irányelv bizonyíték szintje D és napi kétszer 100 mg pentozán-poliszulfátot javasol.

2. A heparint is tartalmazza a protokoll javaslatunk. Az európai irányelvben az intravezikális heparin ajánlása kevésbé ajánlott, mint a brit-irányelvben (D). Az amerikai protokoll evidencia C szintű, csakúgy, mint a japán irányelvben. A kanadai irányelv C szintűnek sorolja, valamint 20 000-40 000 NE heparint ajánl hígítva 10 ml NS-ben, hetente 4-6 héten keresztül.

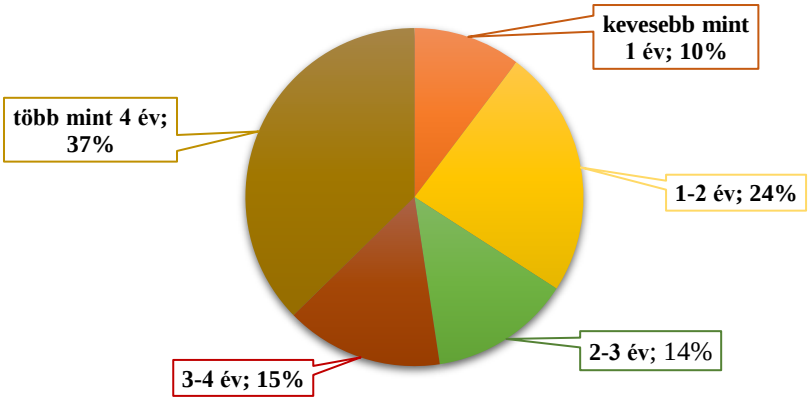
3. A hialuronsavra vonatkozó ajánlás evidencia szintje nem egyértelmű. A brit irányelvben a bizonyíték szintje B és az amerikai-protokoll pedig nem tartalmazza ezt a hatóanyagot. A japán irányelvben a bizonyíték szintje C, a kanadai irányelvben az ajánlott dózis 40mg/50ml és C szintű. Az átalunk ajánlott protokoll azért tartalmazza, mert fontos lehet a GAG-réteg helyreállításában: csökkenti a membrán permeabilitását, ami szükséges a GAG réteg regenerációjához.

4. A protokoll javaslatunkban megtalálható az orális és az intavezikális kondroitin-szulfát is, mivel a GAG réteg egyik alkotóeleme. Alkalmazását pozitív tapasztalatok igazolják, mert számos készítmény tartalmazza, amelyeket az Egyesült Királyságban és az EU-ban forgalmaznak (pl. Uracyst®, iAluRil®). Az ajánlás szintje azonban szintén nem egységes. Ugyanis az intravezikálisan adott kondroitin-szulfátnak az EAU irányelv ajánlása gyenge és az evidenciája II. szintű. A bizonyítékok szintje a brit irányelvben D, a japán irányelv C szintű. A kanadai irányelv javaslata 2% 20 ml-es fiola, heti adagolással 6 héten át, majd havonta a tünetek megszűnéséig és az ajánlási szintje D [2,4,53–55].

4.1.3 A dietetikai kérdőív felmérésének eredményei

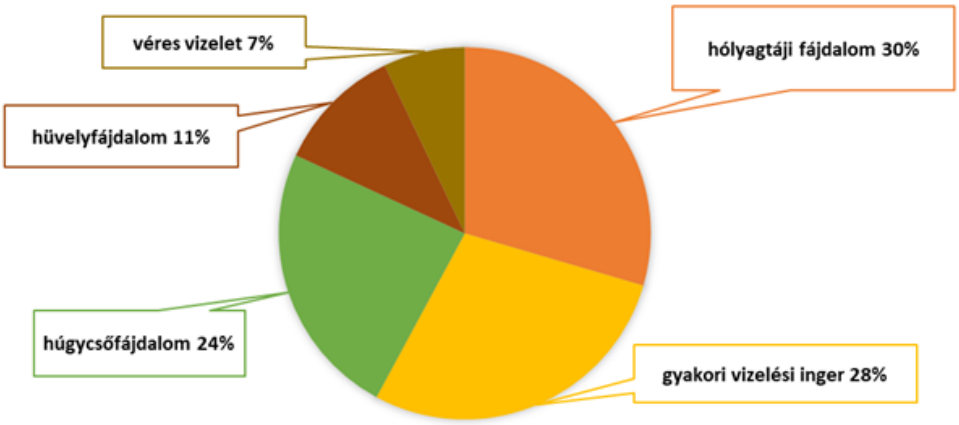
A kérdőív dietetikai tárgyú kérdésére kapott válaszok értékelése után az alábbi eredményeket kaptuk.

A betegség nehezen diagnosztizálható volta itt is megmutatkozott, a páciensek 37%-nál csak 4 év után történt meg a diagnózis felállítása. A legszerencsésebb esetekben a betegek 10%-nál már 1 éven belül sikerült (6. ábra).



6. ábra: Diagnózis felállításának ideje (n=126).

A leggyakoribb panaszok, amellyel felkeresték az orvosukat a betegek:
A hólyagtáji fájdalom (75%), gyakori vizelési inger (72%), húgycsőfájdalom (61%), hüvelyfájdalom (28%) és a véres vizelet (18%) (7. ábra).

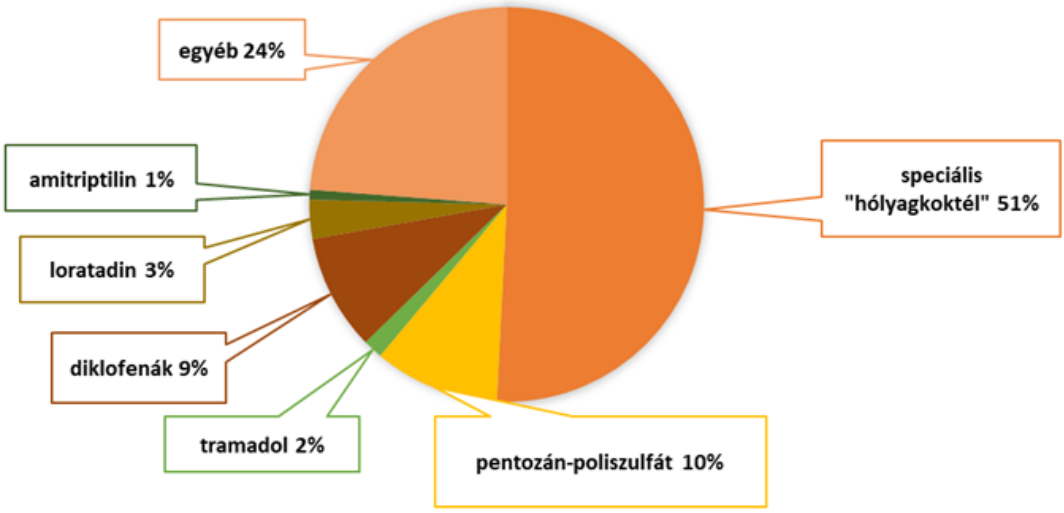


7. ábra: A leggyakoribb panaszok előfordulása IC esetén (n=126).

A betegek 60%-ban antibiotikumok szedtek a diagnosztizálás előtt. 19%-ban fájdalomcsillapítókat míg, 14%-uk gyógynövény készítményeket használt, illetve ezek

kombinációit. A betegek egyes esetekben azt tapasztalták, hogy az antibiotikumok rontották az állapotukat.

A leggyakoribb gyógyszeres kezelési mód, az urológus rendelése alapján, egy speciális hólyagkoktélnak nevezett intravezikális oldat, amit a megkérdezettek 51%-a kapott. A kezelés további jelentős részét a hatékonynak tartott pentozán-poliszulfát (10%), valamint nem-szteroid gyulladáscsökkentők (diklofenák, 9%), és fájdalomcsillapítók (tramadol, 2%) adták (8. ábra). Ezen felül 24%-ban egyéb gyógyszereket is szedtek a betegek, például antibiotikumokat és vizelet lúgosító készítményeket.



8. ábra: A gyógyszeres kezelési lehetőségek BPS indikációban urológus javaslata alapján (n=126).

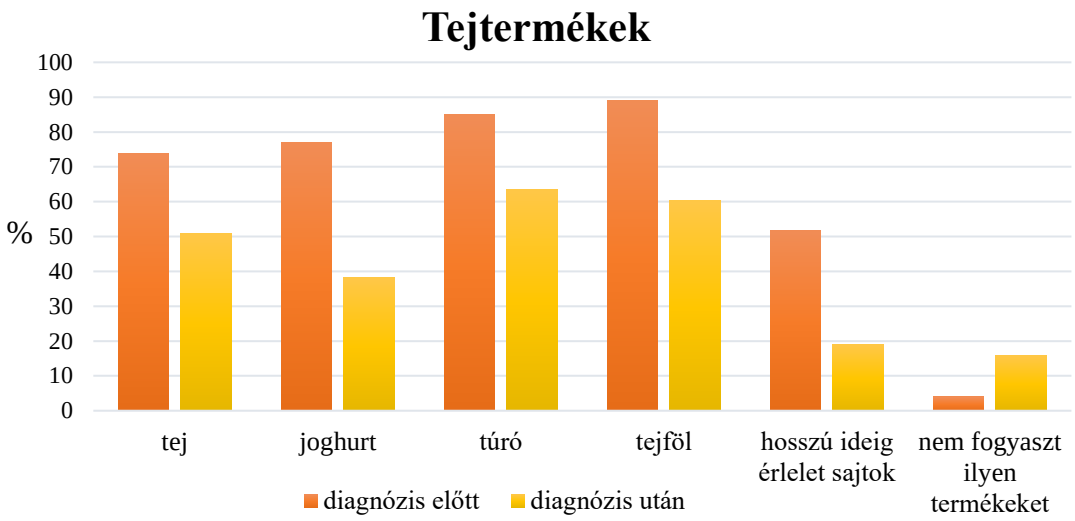
A felmért betegcsoport több mint, 50%-ának volt más krónikus betegsége is. Közülük a legtöbb pácienst a magas vérnyomás (43%) és a magas koleszterinszint (30%) érinti, de sok az allergiás (27%) és a refluxos (25%) panasszal küzdő beteg is.

A nők esetében megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a menstruációs ciklusuk és a panaszaik erősödése között. A megkérdezett női páciensek 58%-a nem tapasztalt összefüggést, 42%-nak közvetlenül a menstruáció előtt vagy után fokozódtak a tünetei.

A betegek 82%-a megváltoztatta étkezési szokásait, miután betegségét diagnosztizálták. Általában BPS betegeknek javasolt diétákra váltottak, de a diéták nem voltak egységesek.

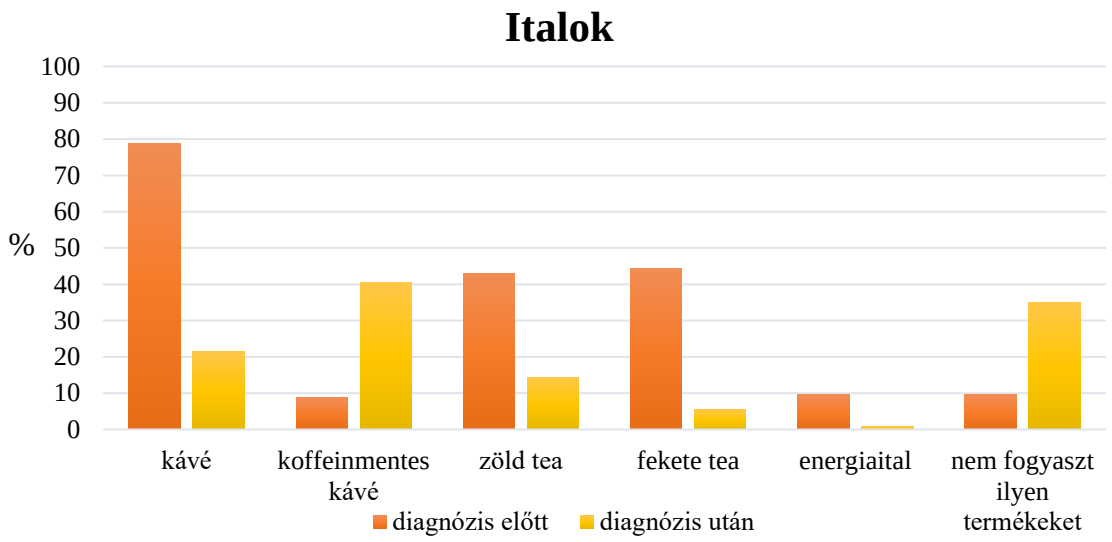
A megkérdezettek többsége napi 1-2 liter (46%) vagy 2-3 liter (44%) folyadékot fogyaszt. A tejtermékek közül a tej fogyasztását az irányelvek ajánlják. Ezzel szemben a megkérdezett korábbi tejfogyasztók 23%-a már egyáltalán nem iszik tejet. Hasonló csökkenést lehetett megfigyelni a joghurt, a túró, a tejföl és a hosszú ideig érlelt sajtok

esetén is. A betegek 16% nyilatkozta, hogy nem fogyaszt már egyáltalán tejtermékeket (9. ábra).



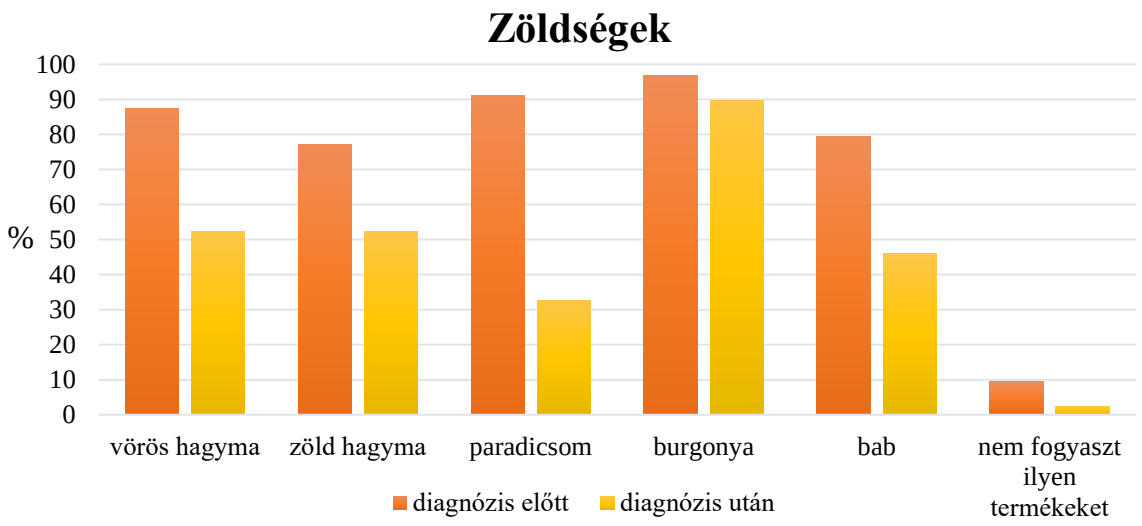
9. ábra: Tejtermékek fogyasztása IC esetén diagnózis előtt és után (n=126).

A kávé, a fekete tea, a zöld teák és az energiaitalok esetén elmondhatjuk, hogy a betegek többsége (79%) a betegség diagnosztizálása előtt rendszeresen fogyasztotta valamelyiket. A diagnózis felállítása után ez az érték lecsökkent 21%-ra. Ellenben a koffeinmentes kávé fogyasztása megnőtt 32%-kal. A zöld tea és a fekete tea fogyasztása is drasztikusan csökkent 39% illetve 29%-kal, az energiaital-fogyasztása is hasonlóan csökkent. A megkérdezettek 35%-a nyilatkozta azt, hogy egyáltalán nem fogyaszt kávét, teát és energiaitalokat (10. ábra). Ezeken túlmenően felmértük még, hogy milyen italok fogyasztása fokozta a tüneteket. A páciensek megemlítették még az alkoholos italokat (pl. vörösbor, sör, rövid italok), a narancslét, a feketeribizli-levet és a szénsavas üdítőket. Az alkohol fogyasztási szokásokat illetően a betegek 60%-a válaszolta, hogy nem fogyaszt semmilyen alkoholt. 37%-uk válaszolta, hogy „igen, de csak ritkán”, és csak a megkérdezettek 2%-a mondta, hogy rendszeresen fogyaszt alkoholt.



10. ábra: Élénkítőszerek fogyasztása BPS esetén diagnózis előtt és után (n=126).

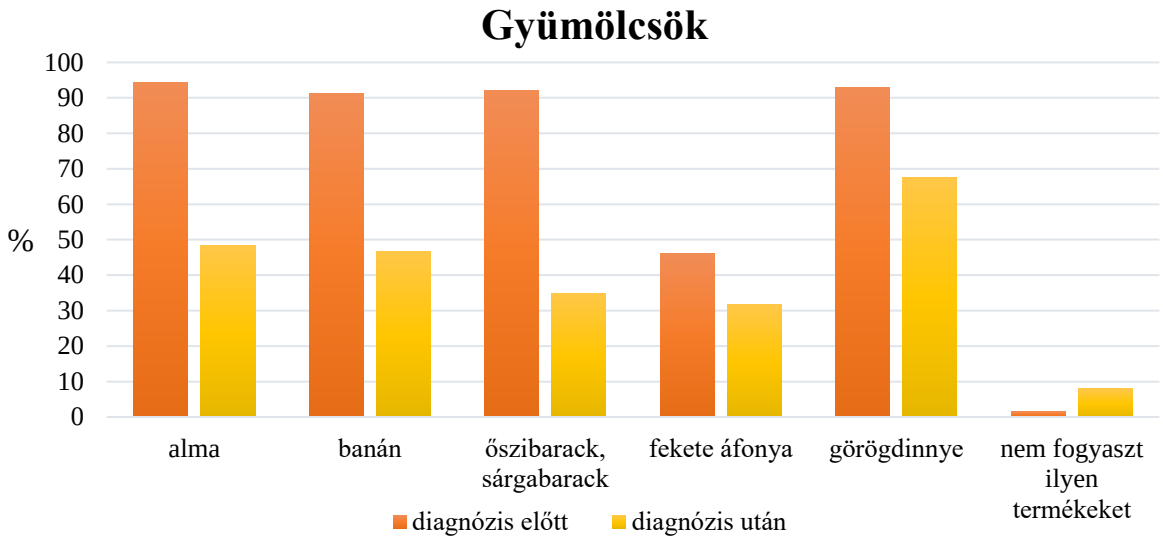
Megkérdeztük a betegek zöldségfogyasztásának szokásait is. A legjelentősebben a paradicsom fogyasztása csökkent (60%-kal) a diagnózist követően. Ezen kívül csökkent még a vöröshagyma, a zöldhagyma, a bab és a burgonya fogyasztása is. Azonban csak 2% nyilatkozta azt, hogy egyáltalán nem fogyaszt ilyen zöldségeket (11. ábra) Ezeken felül megemlítették a spenótot, a brokkolit és a tököt is a kellemetlen tüneteiket fokozó zöldségek között.



11. ábra: Zöldségek fogyasztása BPS esetén diagnózis előtt és után (n=126).

Néhány közkedvelt gyümölcs (alma, banán, sárgabarack, őszibarack, görögdinnye, fekete áfonya) fogyasztására is rákérdeztünk. A kérdőíves felmérés alapján mindegyik fogyasztása körülbelül a felére csökkent a diagnózist követően. Valamint közel 5%-kal nőtt azoknak a száma, akik azt válaszolták, hogy nem fogyasztanak ilyen

gyümölcsöket (12. ábra). Továbbá néhány beteg szerint a tüneteiket fokozzák még a citrusfélék, szőlő, szeder, málna, meggy és a körte is. Azonban voltak olyanok is, akik nem találtak összefüggést a gyümölcsök fogyasztása és a tüneteik rosszabbodása között.

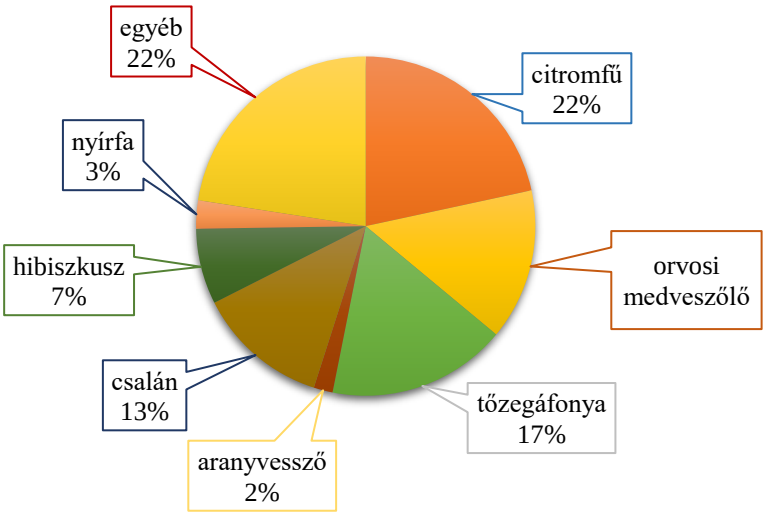


***12. ábra*:** Gyümölcsök fogyasztása IC esetén a diagnózis előtt és után (n=126).

A nemzetközi ajánlások [38,40,56,57] szerint a csípős és az erősen fűszerezett ételek ronthatják a betegek tüneteit. Ennek megfelelően a megkérdezettek többsége (66%) nem is fogyasztja ezeket az ételeket.

Érdekelt minket az allergia és az intolerancia előfordulása is a páciensek között. A betegek 71%-ának nincs semmilyen allergiája vagy intoleranciája. A betegek 29%-a nyilatkozta, hogy van intoleranciája és ebből a legtöbben (69%) laktóz-intoleranciában szenvednek. Ezután a leggyakoribb a glutén-érzékenység (36%) és sokkal ritkább a tojás allergia, a mogyoró és dió allergia.

Betegeink 64%-a fogyasztott étrendkiegészítőket és vitaminokat. A leggyakoribb termékek a vitamin készítmények voltak: C-vitamin és a „savmentes" C-vitamin (~C-vitamin alkáli fémmel alkotott sóját fogyasztják), D-vitamin, multivitaminok, de szedtek még A-, K-, B_6- és B_{12}-vitaminokat is. Ásványianyagokból és nyomelemből a leggyakoribbak a kalcium-, a magnézium- és a vas-készítmények voltak. Gyógynövénykészítményeket 17%-uk használ rendszeresen, és 49%-uk csak ritkán. A leggyakoribb gyógynövények a citromfű (37%), a tőzegáfonya (29%) és az orvosi medveszőlő (25%) voltak. Használtak még csalán, kamilla, hibiszkusz, aranyvessző, nyírfa és kisvirágú füzike-tartalmú készítményeket is (13. ábra).



13. ábra: Gyógynövények használata BPS-terápia kiegészítésre (n=126).

Ezen eredmények alapján elkészítettünk egy élelmiszer és ital besorolási táblázatot, amely teljes mértékben a páciensek tapasztalatain alapul és javaslatot tesz a különböző élelmiszerek fogyasztására BPS esetén (10. táblázat).

10. táblázat: Étkezési javaslat összefoglalója BPS páciensek tapasztalatai alapján.

ÉLELMISZEREK, ITALOK	MÉRTÉKKEL JAVASOLT	NEM JAVASOLT
alma	+	
bab	+	
banán		+
burgonya	+	
brokkoli		+
citrusfélék		+
fekete áfonya	+	
görögdinnye	+	
hosszú ideig érlelt sajtok		+
joghurt		+
körte		+
málna		+
őszibarack		+
paradicsom		+
sárgabarack		+
spenót		+
szeder		+
szőlő		+
tej	+	
tejföl	+	
tök		+
túró	+	
vörös hagyma	+	
zöldhagyma	+	
alkoholos italok		+
fekete tea		+
energia ital		+
kávé		+
koffeinmentes kávé	+	
rostos üdítők: narancs, ribizli		+
szénsavas üdítők		+
zöld tea		+

4.2 A káliummentes nyújtott hatóanyagleadású tabletta formulálása

4.2.1 A granulátumok rheológiai és az előzetes hatóanyag-kioldódási vizsgálatok eredményei

A 12. táblázatban látható 15 minta rheológiai eredménye. Az eredmények alapján 15 granulátumból 7 ígéretes keveréket: A/3; A/4; A/5; B/2; B/3; B/5; C/3 választottunk ki tablettázásra és előzetes hatóanyag-kioldódási vizsgálatra.

11. táblázat: A granulátumok folyási tulajdonságai.

Minta	Hausner-faktor	Carr-index	Térfogattömeg átlaga (g/65ml)	Kifolyási idő átlaga (s)	Lejtő szög (˚)
A/1	1,19±0,13	16.57±0,18	38,13±0,31	15,69±0,27	38,66
A/2	1,16±0,19	13,64±0,21	38,13±0,36	18,53±0,85	43,23
A/3	1,15± 0,10	13,72±0,11	38,97±0,15	15,75±0,34	43,83
A/4	1,13±0,15	11,64±0,23	39,07±0,26	19,30±0,88	43,23
A/5	1,14±0,22	12,02±0,34	37,93±0,35	13,59±0,45	44,13
B/1	1,19±0,17	15,99±0,15	39,10±0,12	15,55±0,33	43,83
B/2	1,16±0,31	15,96±0,22	39,50±0,27	13,73±0,11	43,83
B/3	1,17±0,13	14,34±0,09	39,97±0,06	10,88±0,08	43,23
B/4	1,18±0,17	15,31±0,14	39,37±0,42	10,12±0,20	43,83
B/5	1,18±0,25	14,95±0,31	39,60±0,35	10,56±0,12	44,42
C/1	1,19±0,35	15,31±0,24	38,43±0,16	17,23±0,21	44,71
C/2	1,18±0,11	14,95±0,35	39,07±0,44	18,65±0,32	44,42
C/3	1,17±0,07	14,16±0.05	39,28±0,05	15,37±0,04	44,71
C/4	1,15±0,20	12,66±0,26	37,93±0,56	10,76±0,23	46,67
C/5	1,14±0,15	12,33±0,19	38,35±0,27	17,47±0,17	47,47

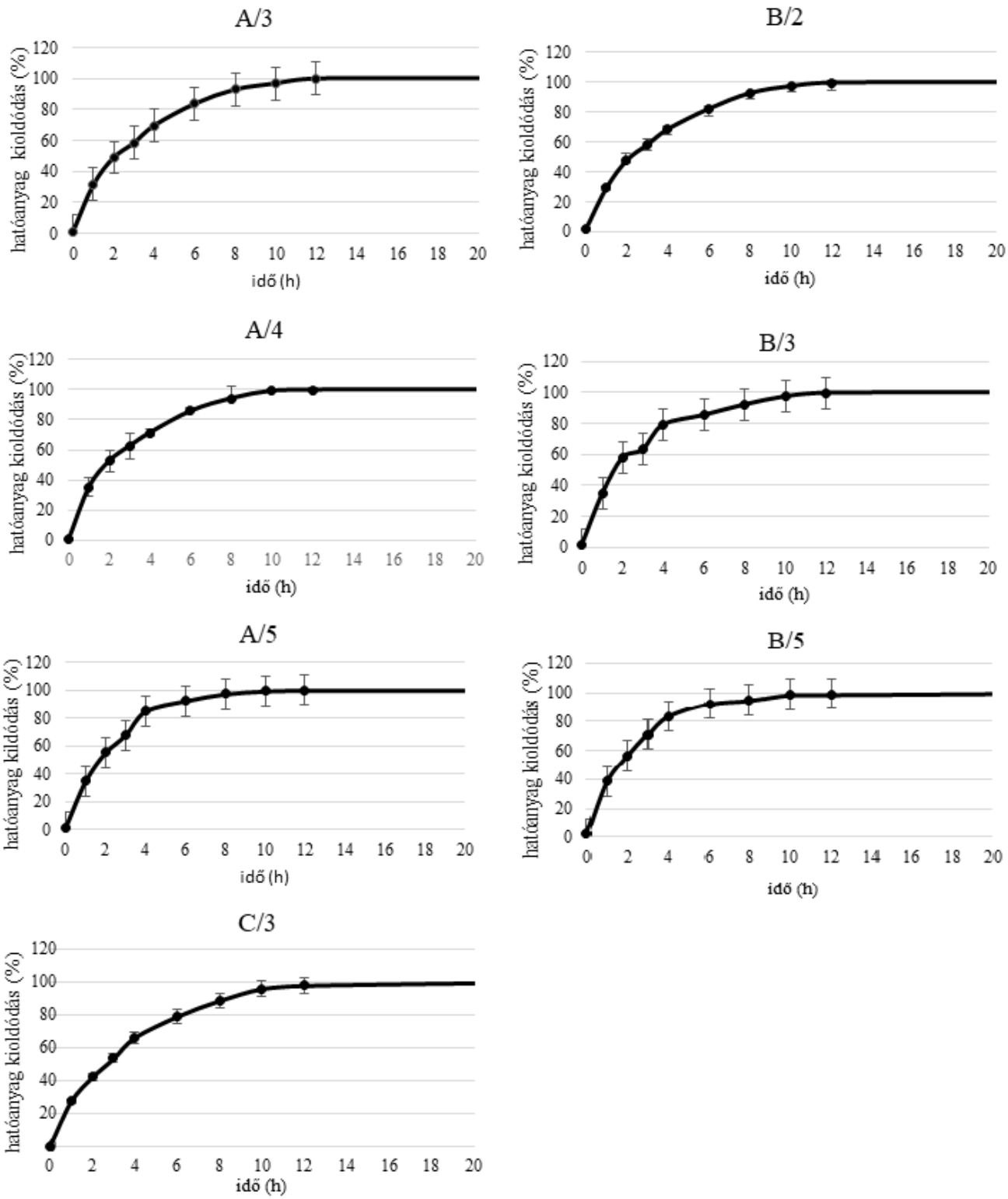
*A minták: Benecel K4M PH DC
B minták: Benecel K15M PH DC
C minták: Benecel K100M PH DC

A rheológiai eredmények és az előzetes hatóanyag-kioldódás mérések alapján csak további 3 tablettát vizsgáltunk tovább, amelyek az A/3; a B/3 és a C/3 összetételű tabletták voltak.

A kiválasztott granulátumok rheológiai eredményei a következők voltak:

- Az A/3összetétel esetében a Hausner-faktor 1,15, Carr-index 13,72 és a lejtőszög 43,83° volt.
- A B/3 összetételnél a Hausner-faktor 1,17, Carr-index 15,34 és 45,83° -os volt a lejtőszög.
- A C/3 porkeverékek rheológiai eredményei a következők voltak: Hausner-faktor 1,17, a Carr-index 15,28 és a lejtőszög 44,77° volt.

A Ph. Eur. alapján a Hausner-arány (1,12-1,18) és a CI (11-15) is a jó folyási kategóriába, a 44,77° pedig az elfogadható kategóriába (41-45) sorolható.
A 14. ábrán látható a 7 tabletta hatóanyag kioldódási vizsgálatának eredménye (n=3).



14. ábra: Kiválasztott minták egységnyi idő alatt felszabaduló tabletta hatóanyag kioldódás százalékát mutatja (n=3).

4.2.2 A tabletta fizikai vizsgálata

Az egyedi és az átlagos tömeg meghatározására kapott eredmények megfelelnek a Ph.Eur. 10 előírásoknak. N = 30 tabletta esetén a maximális eltérés 5% volt (határérték legfeljebb ± 10%).

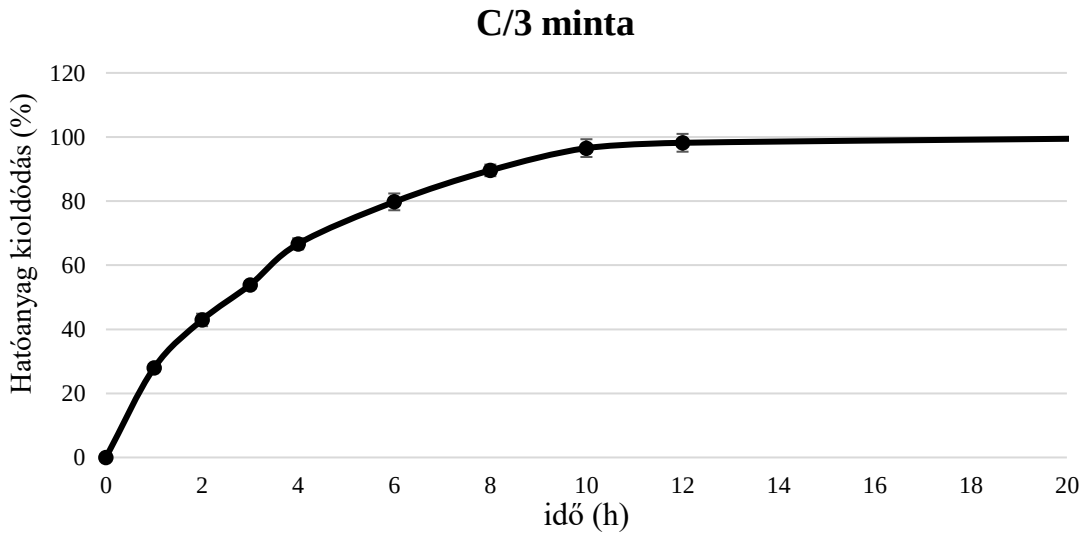
Hatóanyag-tartalom egységessége: min 372,4 mg; max 422,6 mg; 6 tabletta átlaga: 397,83±2,99 mg.

A tabletta kopási vesztesége is megfelelő volt. N = 20 tabletta esetében 0,88% ± 0,01 volt, amely megfelelt a Ph. Eur. 10 kritériumoknak.

A törési szilárdság átlagértéke (n = 20 tabletta): 182 N±4,3.

4.2.3 A tabletta hatóanyag-felszabadulás mérése *in vitro*

A 14. ábrán található összes minta esetében megmért *in vitro* kioldódási adatainak összehasonlításakor a C/3 minta szabadítja fel a hatóanyagtartalmát a legegyenletesebben a többi tablettához képest. A tabletták citrát-só tartalma átlagosan 28,33%-a oldódott fel 1 óra alatt. Ezt követően a hatóanyag 54,64%-a oldódik fel 3 óra alatt, és 6 óra elteltével a hatóanyag 80,83%-a szabadul fel a mátrix tablettából (15. ábra).



15. ábra: Az egységnyi idő alatt felszabaduló tabletta hatóanyag százalékát mutatja. A vizsgálatot hatszor (n=6) ismételtük meg.

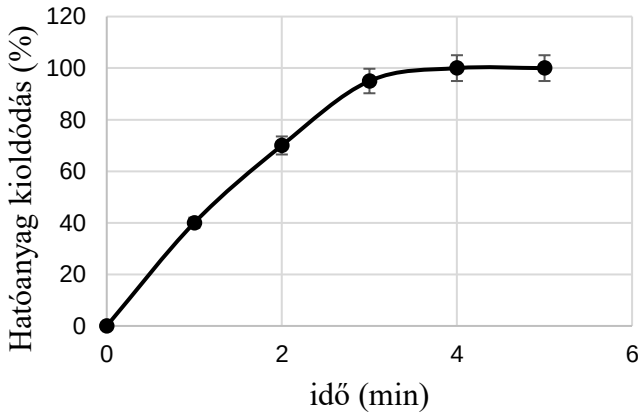
Az B/3 készítmény szabadította fel a leggyorsabban a citrát-sótartalmát, átlagosan 34,25%, 62,48% és 84,59% oldódott ki 1 óra, 3 óra és 6 óra alatt. A modellillesztések kioldódási hatásfokát és meghatározási együtthatóit az 12. táblázat mutatja be.

A C/3 összetételt (referencia termék) páronkénti összehasonlításban vetettük össze az A/3 és B/3 összetételekkel (vizsgálati termékek), a különbözőségi- és hasonlósági tényezőket a 13. táblázat tartalmazza. A hatóanyag-felszabadulás mechanizmusának tisztázása során az elsőrendű modell illeszkedésének determinációs együtthatója a legmagasabb értéket mutatta.

12. táblázat: A készítmények kioldódási hatékonysága és a modellillesztés eredményei.

	A/3	**B/3**	**C/3**	**Hagyományos tabletta**
DE (%)	87,51%	90,50%	84,35%	64.25%
Nulladrendű	0,8503	0,7898	0,8850	0,9185
Elsőrendű	0,9951	0,9752	0,9962	0,8782
Korsmeyer-Peppas	0,9313	0,9589	0,9226	0,9982

A hagyományos azonnali hatóanyag-leadású citrát tablettával is elvégeztük a hatóanyag-kioldódási vizsgálatot, amiből egyértelműen megállapítható volt, hogy az azonnali hatóanyag-leadású tabletta gyorsan szétesik, és a teljes feloldódás 3 perc után következik be (16. ábra). Az elsőrendű kinetika alátámasztására az azonnali hatóanyag-leadású tablettához képest a nyújtott hatóanyag-leadású tabletta (C/3) felszabadulási sebessége lassabb és egyenletesebb.



16.ábra: Azonnali hatóanyag-leadással rendelkező hagyományos citrát tabletta egységnyi idő alatt felszabaduló tabletta hatóanyag százalékos mutatja (n=6).

A páros összehasonlítás megerősítette, hogy az A/3 minta oldódási profilja jobban hasonlít a C/3-ra, mint a B/3-ra. A citrát mátrixukból történő kioldódásának sebességét tekintve, ez várható volt, mivel a hatóanyag- kioldódása a C/3 minta esetében volt a

leglassabb, míg a B/3 esetében a leggyorsabb. A C/3 összetételű tabletta oldódási tulajdonságai alapján választottuk ki a humán klinikai pilot vizsgálathoz.

13. táblázat: A C/3 összetélű tabletta különbözőségi és hasonlósági faktorainak összevetése az A/3 és a B/3 mintával.

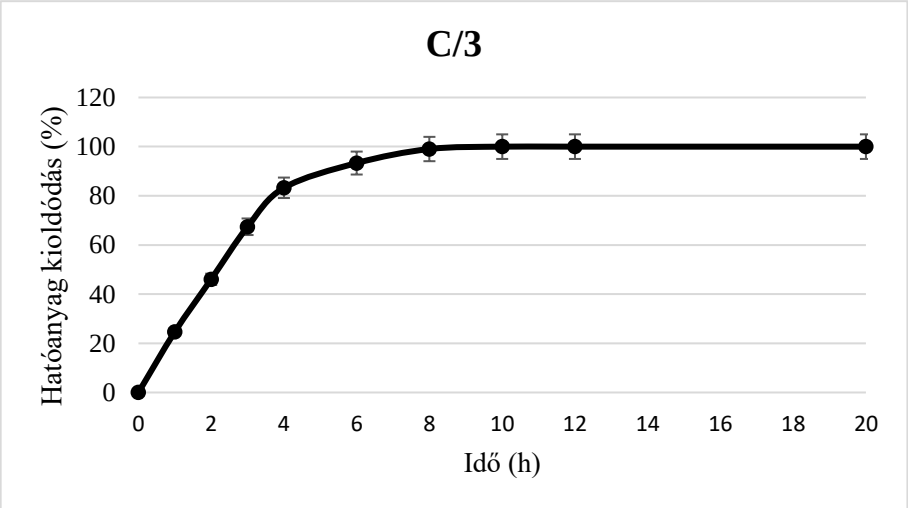
	A/3	**B/3**
f_1	4,56	9,34
f_2	75,37	58,59

4.2.4. A C/3 minta tabletta stabilitási vizsgálata

A tabletta paraméterei 2 év elteltével a következő értékeket mutatta.

- A tabletta hossza 16,2 mm, szélessége: 7,6 mm.
- A törési szilárdság átlagértéke (n = 20 tabletta): 167,9 N±3,3.
- Az átlagos tömege 625,2± 1,4 mg volt. A kopási vesztesége 1,02% ± 0,02 volt.
- A tabletta átlagos tömege 2,78%-kal, a törési szilárdság pedig 7,75%-kal csökkent.

A 24 hónapig tárolt C/3 tabletták hatóanyag kioldódási profilját összehasonlítottuk a kezdeti kioldódási adatokkal. A kioldódási hatékonyság 89,41%-osnak bizonyult (17. ábra). A modellillesztés eredményei még 24 hónap elteltével sem mutattak változást. Az elsőrendű felszabadulás modellje a legmagasabb determinációs együtthatóval, azaz R_2= 0,9743 értékkel rendelkezett. Ezen felül megvizsgáltuk a különbözőségi és a hasonlósági faktorokat a kioldódás tekintetében. A különbözőségi és a hasonlósági tényező értéke 8,34, illetve 59,94 volt.



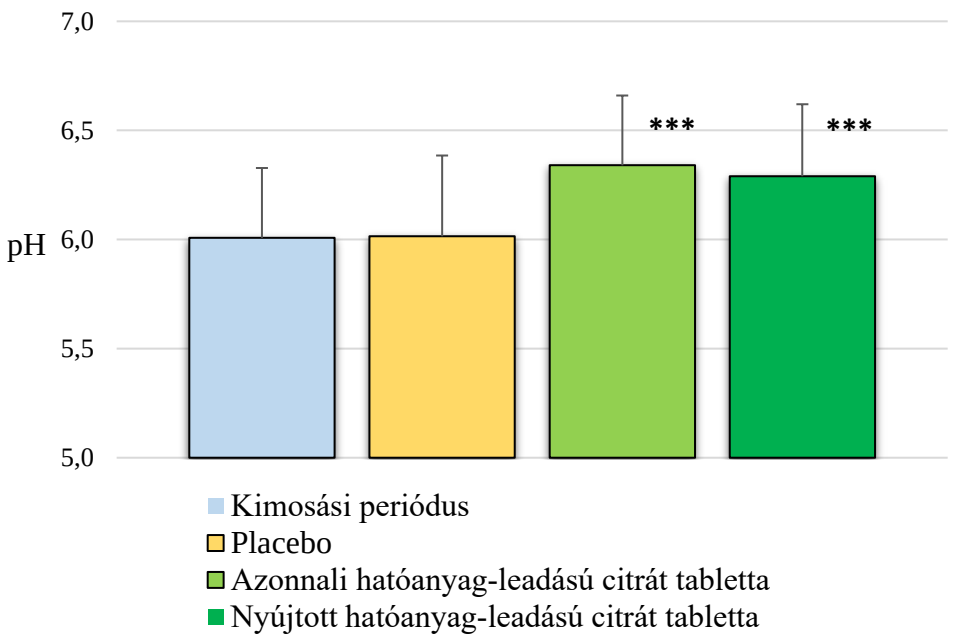
17. ábra: Az egységnyi idő alatt felszabaduló tabletta hatóanyag százalékát mutatja 2 év elteltével a C/3 tabletta esetében (n=6).

4.3 A tabletta hatásosságának vizsgálata kettős vak randomizált placebo kontrollált humán klinikai pilot vizsgálatban

A pilot vizsgálatban bevont mind a húsz betegnek sikerült betartania a vizsgálati protokollt, beleértve az adatok rögzítését is. A betegek együttműködése kiváló volt. Egyetlen beteg sem számolt be semmilyen mellékhatásról vagy állapotának romlásáról a bevett tablettákkal kapcsolatban.

A vizelet pH-értékének heti átlaga nem mutatott szignifikáns különbséget a kimosási időszak (első hét) és a placebo között (pH=6,10, illetve pH=6,13.). A placebohatás tehát elenyésző. Mind a hagyományos citrát tabletta, mind a nyújtott hatóanyag-leadású citrát tabletta jelentős, szignifikáns emelkedést eredményezett a vizelet kémhatásában azokhoz a hetekhez képest, amikor nem kaptak lúgosító tablettát (kimosás és placebo).

A vizelet pH-értékének heti átlaga nem mutatott szignifikáns különbséget a két lúgosító tabletta között (káliummentes hagyományos tabletta pH=6,34, káliummentes nyújtott hatóanyag-leadású tabletta pH=6,29) (18. ábra).



18. ábra: A betegek vizeletének átlagos heti pH-értéke kezelések után. A csillagok p<0,001 értéket jelzik a kontrollokhoz képest.

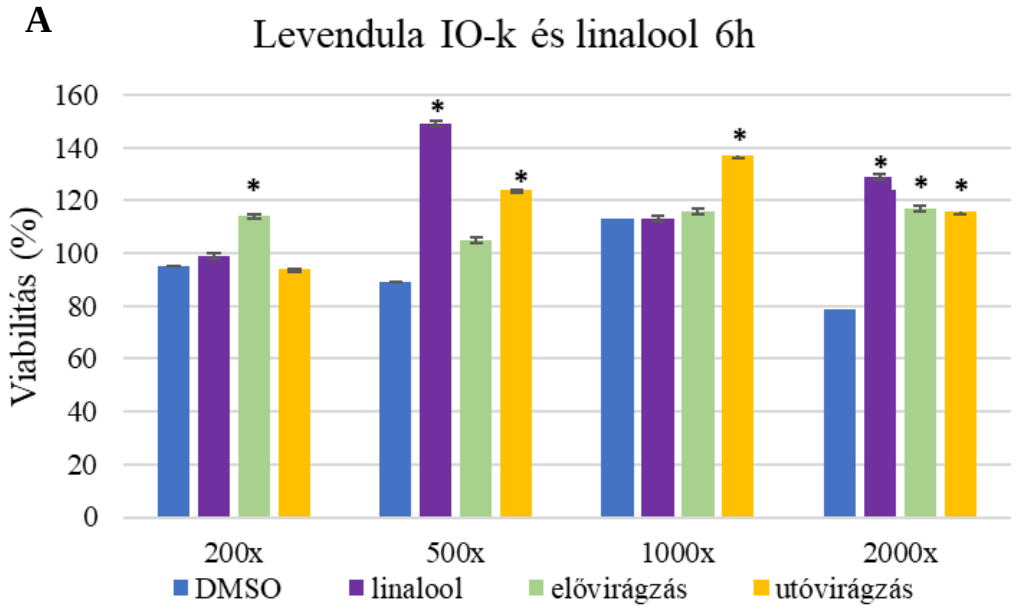
4.4 Illóolajok gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata T24 hólyagepithel sejtvonalon

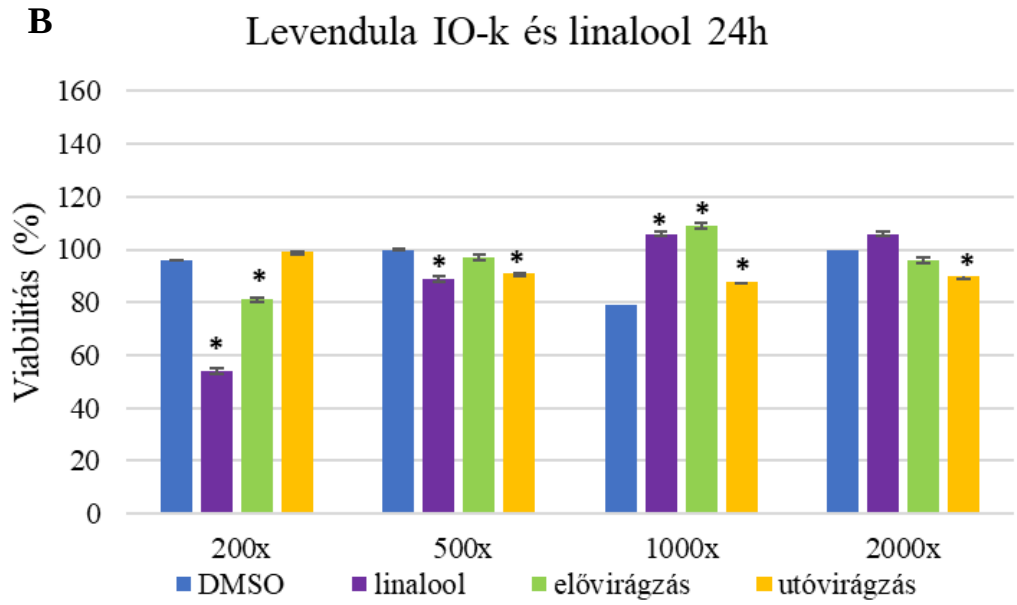
4.4.1 Az illóolajok és a standardok hatása a T24 sejtek viabilitására

Az illóolajokkal és a standardokkal végzett kezelések előtt vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolják ezek az anyagok a sejtek életképességét, mivel a túl magas koncentrációk a sejtek halálát okozhatják. Ezért viablilitási vizsgálatokat végeztünk 4-féle hígításban (200-szoros, 500-szoros, 1000-szeres illetve 2000-szeres) 6 és 24 órás kezelésekben.

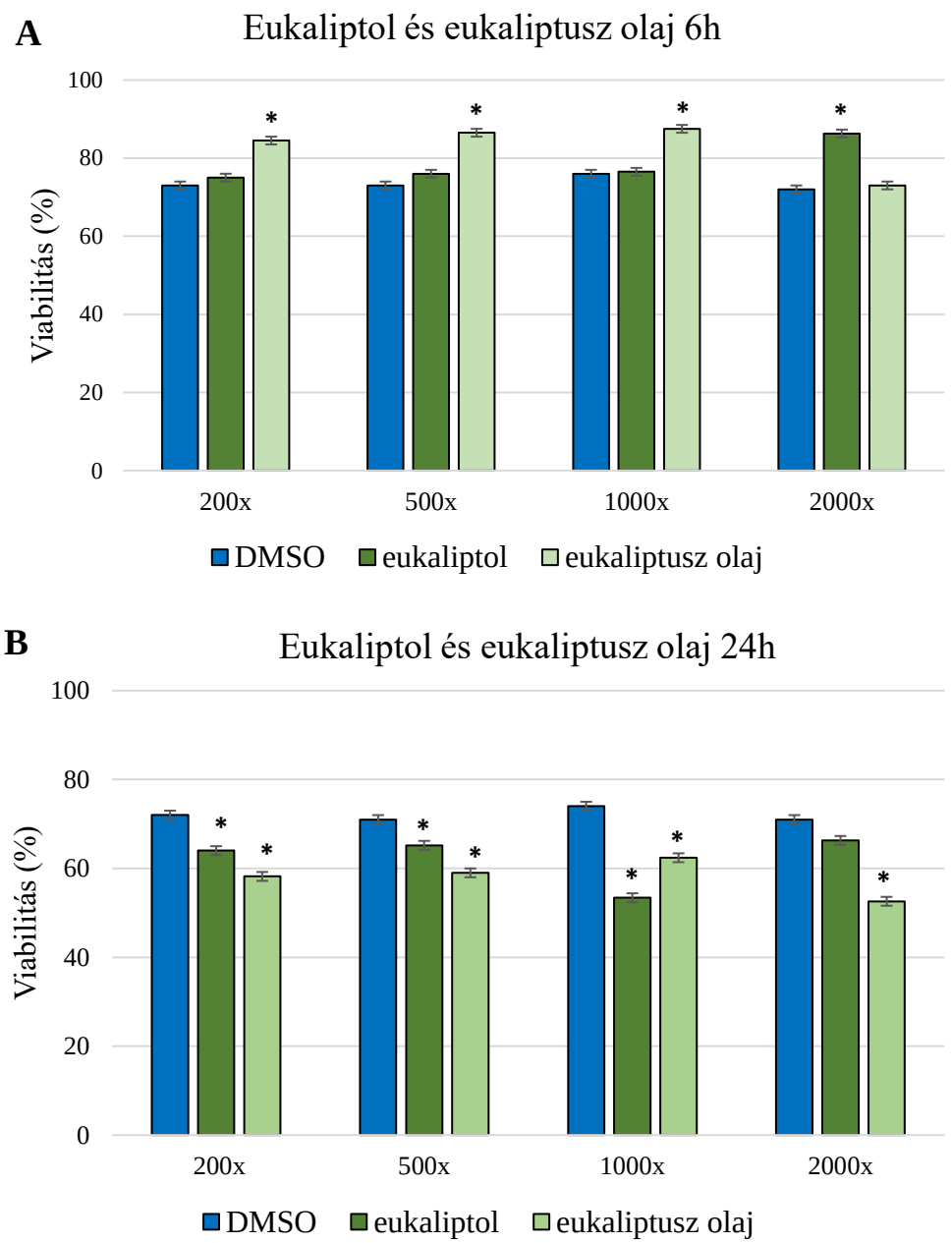
Célunk a vizsgálandó anyagok sejtek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata és a megfelelő hígítási koncentráció meghatározása volt. A törzsoldatokhoz DMSO-t alkalmaztunk hordozóként és vizsgáltuk azt is, hogy ez befolyásolja-e a sejtek viabilitását. Az eredmények azt mutatták, hogy a DMSO nem befolyásolta a sejtek életképességét az alkalmazott koncentrációkban. A T24 sejtek esetében az életképességben a következő változásokat figyeltük meg. A levendulaolajok és a linalool 200x hígításban nem okoztak csökkenést a sejtek számában 6 órát követően (19A. ábra). A 24 órás kezelések során a linalool erősen toxikusnak bizonyult a sejtekre, míg a levendulaolajok csak enyhe toxicitást mutattak (19B. ábra). Az 500-szoros, 1000-szeres és 2000-szeres hígításban a sejtek életképességét már nem befolyásolta jelentősen sem a linalool, sem a levendulaolajok 6 és 24 órás vizsgálatok esetén sem (19AB. ábra).

Az eukaliptuszolaj és az eukaliptol esetében egyik vizsgálati anyag sem volt toxikus a sejtekre 6 órás kezelések során egyik hígításban sem (20A. ábra). Toxicitást csak a 24 órás vizsgálatokban tapasztaltunk. A 20B. ábrán látható, hogy az 500-szoros hígítás volt a legkevésbé káros a sejtekre.





19. ábra: Levendula illóolajok és a linalool sejtviabilitás vizsgálata. (A) A sejteket linaloollal vagy elővirágzásból/utóvirágzásból nyert levendula illóolajokkal kezeltük négy különböző hígításban, 6 órán keresztül. (B) A sejteket linaloollal vagy elővirágzásból/ utóvirágzásból nyert levendula illóolajokkal kezeltük négy különböző hígításban, 24 órán keresztül. A kontroll sejteket azonos hígítású DMSO-val kezeltük ugyanúgy 6 vagy 24 órán keresztül. A kísérleteket háromszor (n=3) ismételtük. A csillagok $p<0,05$ értéket jelzik a kontrollokhoz képest.



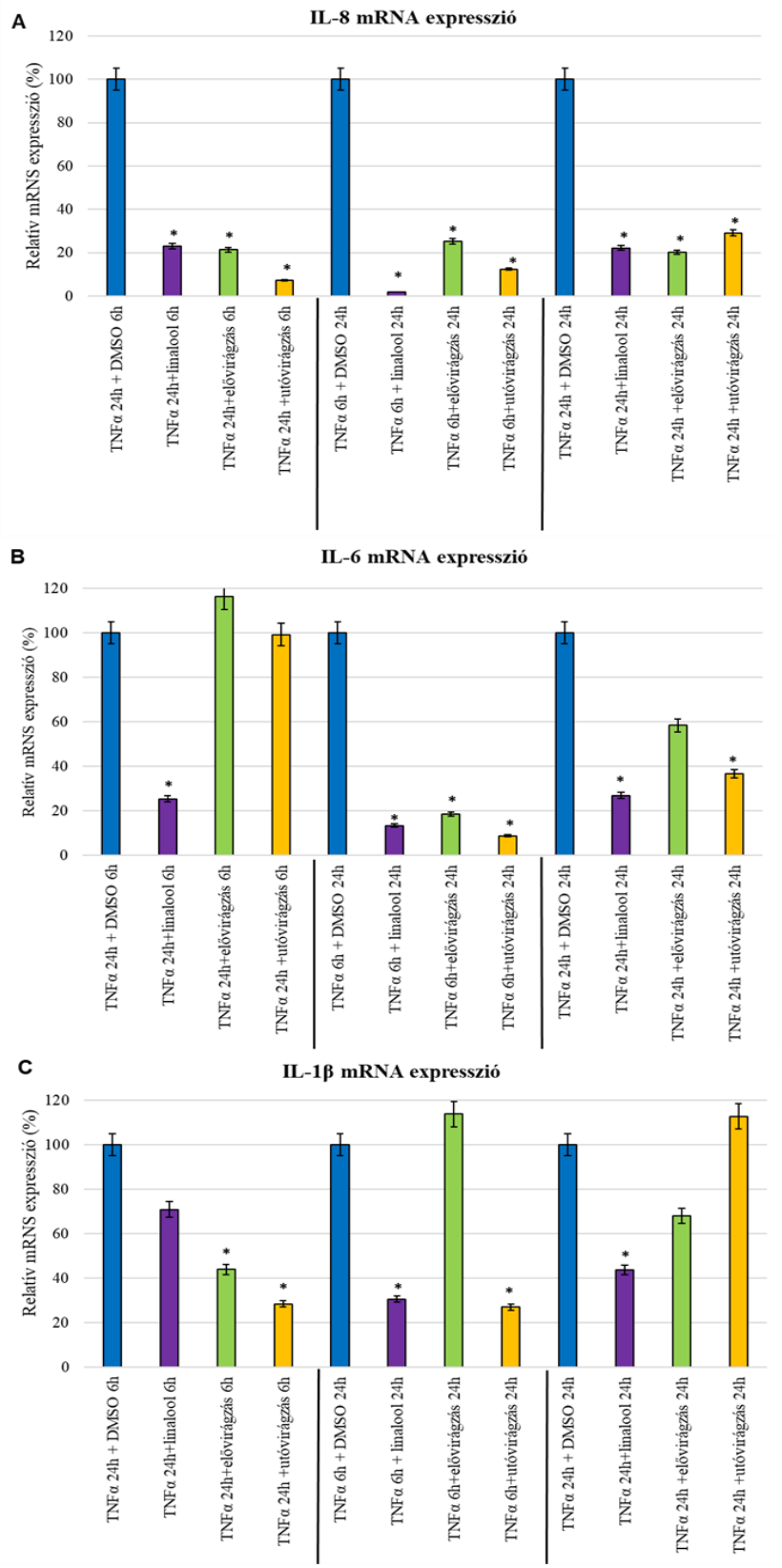
***20. ábra*:** Eukaliptusz olaj és az eukaliptol viabilitás vizsgálata. (A) A sejteket eukaliptollal vagy eukaliptuszolajjal kezeltük négy különböző hígításban, 6 órán keresztül. (B) A sejteket eukaliptollal vagy eukaliptuszolajjal kezeltük négy különböző hígításban, 24 órán keresztül. A kontroll sejteket ugyanilyen hígítású DMSO-val kezeltük 6 órán keresztül vagy 24 órán keresztül. A kísérleteket háromszor (n=3) ismételtük meg. A csillagok $p<0,05$ értéket jelzik a kontrollokhoz képest.

4.4.2 A levendula illóolajok és a linalool hatása az Il-1β, IL-6 és IL-8 mRNS expressziójára és szekréciójára TNFα előkezelést követően.

T24 sejteket levendula illóolajokkal és linaloollal kezeltük 6 és 24 órán át TNFα előkezelést követően, hogy meghatározzuk hatásukat az IL-8, IL-6 és IL-1β gyulladáskeltő citokinek mRNS-szintjére. A DMSO-val kezelt sejteket kontrollként használtuk. Az IL-8 mRNS expressziójánál szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető minden olaj és standard kezelés esetén (21. ábra). Rövid TNFα előkezelésnél (6 óra) a linalool standard hatékonyabbnak bizonyult, mint az illóolajok. A 24 órás TNFα előkezelést követő 6 órás kezelésnél a levendula utóvirágzásból desztillált illóolaj bizonyult a leghatékonyabbnak. A hosszú távú (24 órás) kezelés hatása 24 óra TNFα előkezelés után azonban nem volt kiemelkedő az anyagok között. A levendula elővirágzásból desztillált illóolaj volt a hatékonyabb ebben az esetben (21A. ábra).

Az IL-6 citokint nézve a leghatékonyabb kezelés a 6 órás TNFα előkezelést követő 24 órás illóolaj kezelés volt (21B. ábra). A levendula utóvirágzásból desztillált illóolaj volt a legjobb a gyulladáscsökkentés szempontjából, ezt követően pedig a linalool standard. A 24 órás TNFα előkezelés után történő 6 órás kezelés csak a linalool esetében volt sikeres. A 24 órás TNFα előkezelés utáni expresszió csökkenése azonban a 24 órás kezelésnél már megfigyelhető volt, itt is a legerősebb hatást a linaloolnál tudtuk kimutatni (21B. ábra).

Az IL-1β mRNS-expresszió csökkenését a 6 órás TNFα-előkezelés után történt 24 órás kezelést követően figyeltük meg a linalool standarddal és a levendula utóvirágzásából nyert illóolajjal való kezelések esetén (21C. ábra). A levendula elővirágzásából desztillált illóolaj használata nem volt hatékony az IL-1β esetében, nem tapasztaltunk expresszió csökkenést ebben az esetben. A 24 órás TNFα előkezelést követő rövid kezelés (6 óra) esetén az utóvirágzásból nyert illóolajnál mértük a legnagyobb expressziós változást. A linalool standard viszont itt bizonyult a legkevésbé hatékonynak. A 6 órás kezeléssel ellentétben a 24 órás előkezelést követő 24 órás kezelésnél más eredmények voltak megfigyelhetők. Az IL-1β expressziójának legnagyobb mértékű csökkenését a linalool standardnál kaptuk, valamint a rövid kezelés után a leghatékonyabbnak bizonyuló (levendula utóvirágzás) olaj 24 h után már nem produkált megfelelő hatást (21C. ábra).



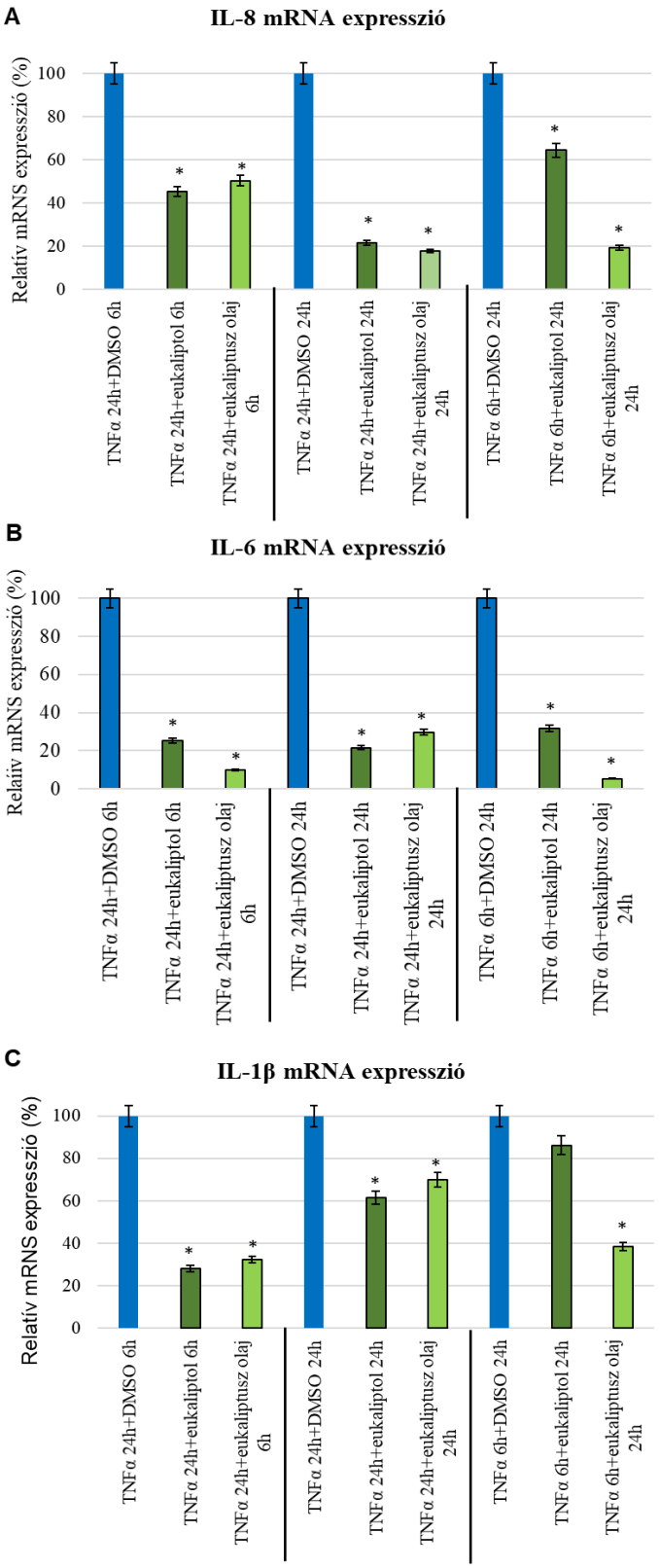
21. ábra: Az Il-1β, IL-6 és IL-8 mRNS-expresszió változása a T24 sejteken TNFα előkezelését követően. A valós idejű PCR-t SYBR zöld protokollal végeztük. A β-aktint belső kontrollként használtuk az értékek normalizálásához. A csillagok $p<0,05$ értéket jelzik a kontrollokhoz képest.

4.4.3. Az eukaliptusz illóolaj és az eukaliptol hatása az Il-1β, IL-6 és IL-8 mRNS expressziójára és szekréciójára TNFα előkezelést követően.

Az eukaliptusz olaj és az eukaliptol hatását is vizsgáltuk az IL-1β, IL-6 és IL-8 expressziójának változásával. Az IL-8 kemokin expressziójának változása a következőképpen alakult. A 6 órás TNFα előkezelést követően végzett 24 órás kezelések esetén az eukaliptusz olaj hatékonyabbnak mutatkozott a standardnál (22A. ábra). A 24 órás TNFα előkezelést követően végzett rövid kezelésnél az eukaliptol standard jobbnak bizonyult az eukaliptusz olajnál, míg a 24 órás kezelések esetében az illóolaj mutatkozott hatékonyabbnak (22A. ábra).

Az IL-6 expresszió változását tekintve az eukaliptusz olaj 6 órás TNFα előkezelést követő 24 órás kezelések során jobban csökkentette az IL-6 expresszióját. Hasonló eredményt kaptunk a 24 órás TNFα előkezelést követő 6 órás kezelés esetében is. Csak 24 órás kezelés után mutatott nagyobb hatékonyságot az eukaliptol az illóolajjal szemben (22B. ábra).

Az IL-1β mRNS-expressziójának változása a 6 órás TNFα előkezelést követően végezett 24 órás kezeléseknél szintén az eukaliptusz olajnak mutatkozott meg kifejezettebben a hatása, ahogy a másik három vizsgált citokin esetében is ez volt megfigyelhető. Mind a 6 órás, mind a 24 órás TNFα előkezelést követően történő 24 órás kezelések esetében azonban az eukaliptol standard volt hatékonyabb (22C. ábra).



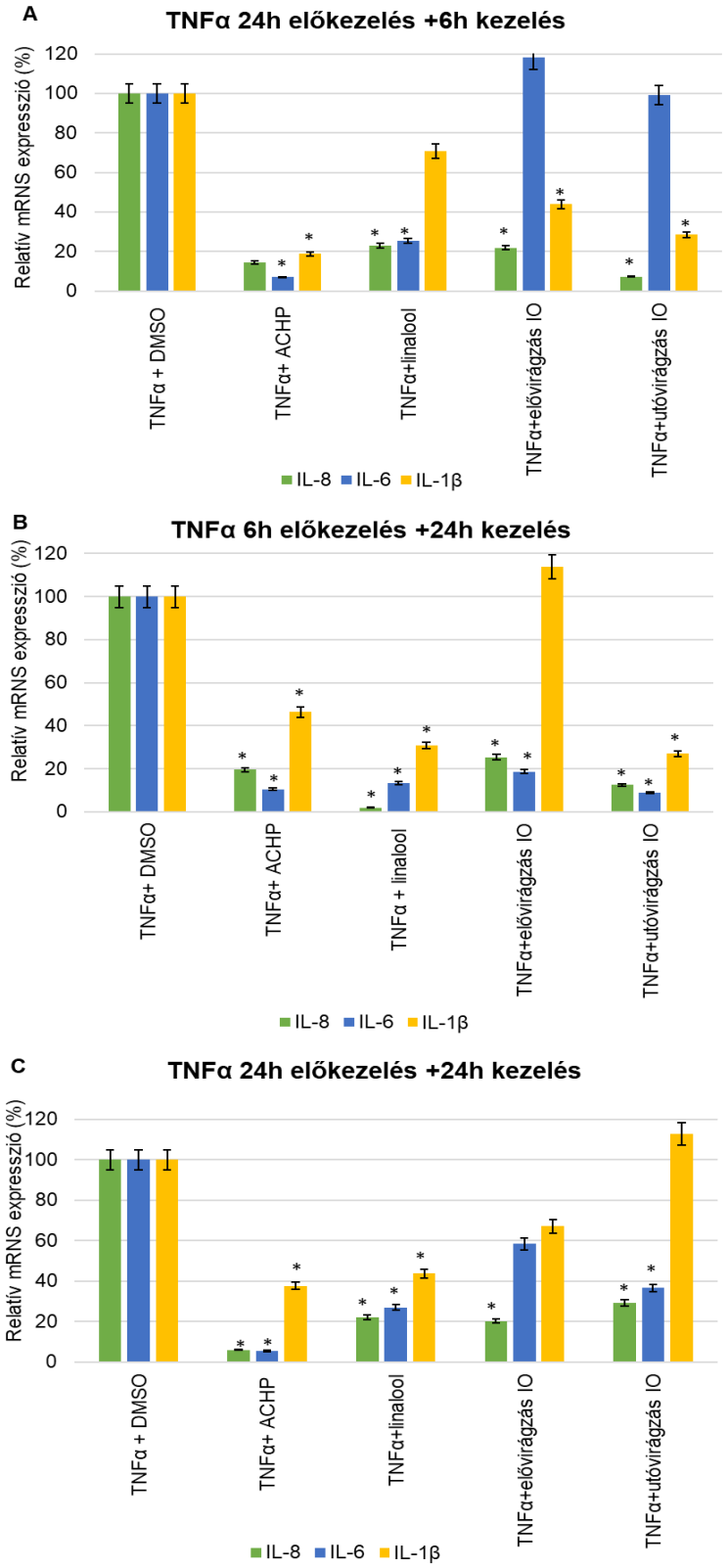
22. ábra: Az Il-1β, IL-6 és IL-8 mRNS-expresszió változása a T24 sejteken TNFα előkezelését követően. A valós idejű PCR-t SYBR zöld protokollal végeztük. A β-aktint belső kontrollként használtuk az értékek normalizálásához. A csillagok $p<0,05$ értéket jelzik a kontrollokhoz képest.

4.4.4 A levendulaolajok és a linalool hatásának összehasonlítása az ACHP-kezeléssel

A levendula illóolajok és fő komponensük hatékonyságának bizonyítására a 3 kezelési módot összehasonlítottuk az NFκB-gátló ACHP hatásával. A TNFα 24 órás előkezelés után az IL-6 mRNS expressziója 6 órás ACHP-kezelés hatására csökkent legjelentősebben. Az IL-8 mRNS expresszióját tekintve az utóvirágzásból származó illóolajjal történő kezelés volt a leghatásosabb, jobb eredményt mutatott, mint az ACHP inhibitoros kezelés. Az IL-1β esetében is az ACHP kezelés után kaptuk a legnagyobb expresszió csökkenést, ezt követte hatékonyságot tekintve az utóvirágzásból származó illóolaj (23A. ábra).

A 6 órás TNFα előkezelést követő 24 órás ACHP-kezelés tekintetében ismét a legjelentősebben az IL-6 expresszióját csökkentette. Az ACHP kezeléshez képest jobb eredményeket kaptunk az IL-8 esetében a linalool és az utóvirágzásból desztillált illóolaj alkalmazásával. Az IL-6 expresszió csökkenését vizsgálva az utóvirágzásból származó illóolaj hatékonyabbnak bizonyult, mint az ACHP-kezelés. Az IL-1β nézve az mRNS-expresszió változása az IL-8 követi, a linalool és az utóvirágzásból származó illóolaj hatása kedvezőbb volt, mint az ACHP-gátló kezelés (23B. ábra).

A 24 órás TNFα előkezelés és a 24 órás ACHP-kezelés során az IL-6 és az IL-8 expressziója közel azonos mértékben csökkent. Az ACHP-kezelésnél hatékonyabb eredményt ebben az esetben sehol sem kaptunk (23C. ábra).



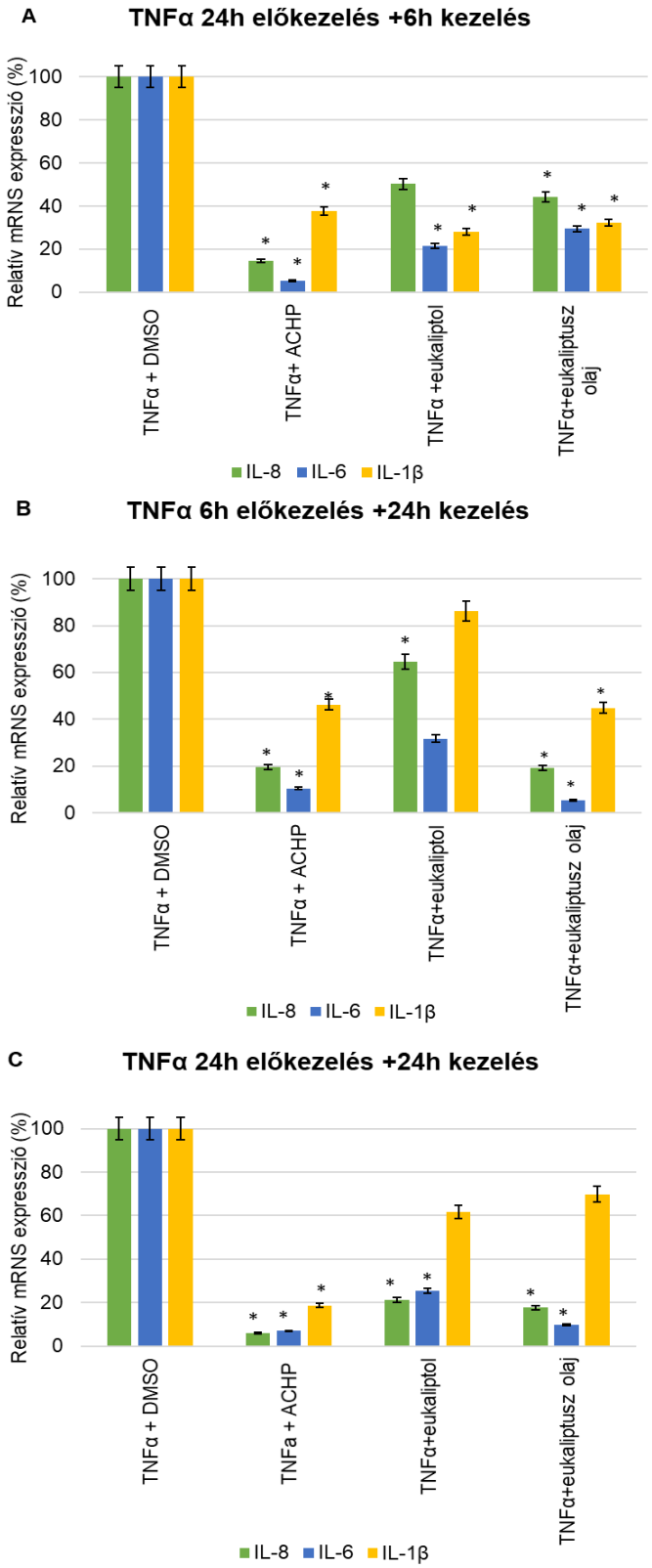
***23. ábra**:* A levendulaolajok és a linalool standard hatásainak összehasonlítása az ACHP-kezeléssel a TNFα előkezelést követően. A β-aktin expresszióját használtuk az értékek normalizálásához. A DMSO-kontrollok relatív expresszióját 1-nek tekintettük. A csillagok a kontrollhoz képest $p<0,05$ értéket jelzik.

4.4.5 Az eukaliptusz olaj és az eukaliptol hatásának összehasonlítása az ACHP-kezeléssel

A DMSO-kontrollhoz képest az ACHP NFκB-inhibitor szignifikánsan csökkentette az összes vizsgált citokin expresszióját (24. ábra). A 24 órás TNFα előkezelést és 6 órás ACHP-kezelést IL-6 expresszióját csökkentette a legjobban, majd az IL-8-at és az IL-1β-ét (24A. ábra). Sem az eukaliptuszolaj, sem az eukaliptol nem volt hatékonyabb az inhibitoros kezelésnél egyik citokin esetében sem. Az olajat és az eukaliptolt összehasonlítva az IL-8 esetében az olaj mutatkozott hatásosabbnak, viszont az IL-6 és IL-1β-nál az eukaliptol volt az eredményesebb.

A 6 órás TNFα-előkezelés után történő 24 órás kezeléseknél ismét az IL-6-nál tapasztaltuk a legnagyobb expresszió csökkenést, amelyet az IL-8 és az IL-1β követett. Az ACHP-nál hatékonyabb kezelést az eukaliptusz olaj alkalmazása után kaptunk mind az IL-8, mind az IL-6 esetében (24B. ábra).

24 órás TNFα előkezelés követően alkalmazott 24 órás ACHP kezeléseknél az IL-8 és az IL-6 expressziójának közel azonos mértékű csökkenése volt megfigyelhető. Az IL-8 és IL-6 esetében az eukaliptusz olaj mutatkozott hatásosabbnak, míg az IL-1β esetében sokkal kisebb volt az expresszió csökkenés a kontrollhoz képest és az eukaliptol volt a hatásosabb (24C. ábra).



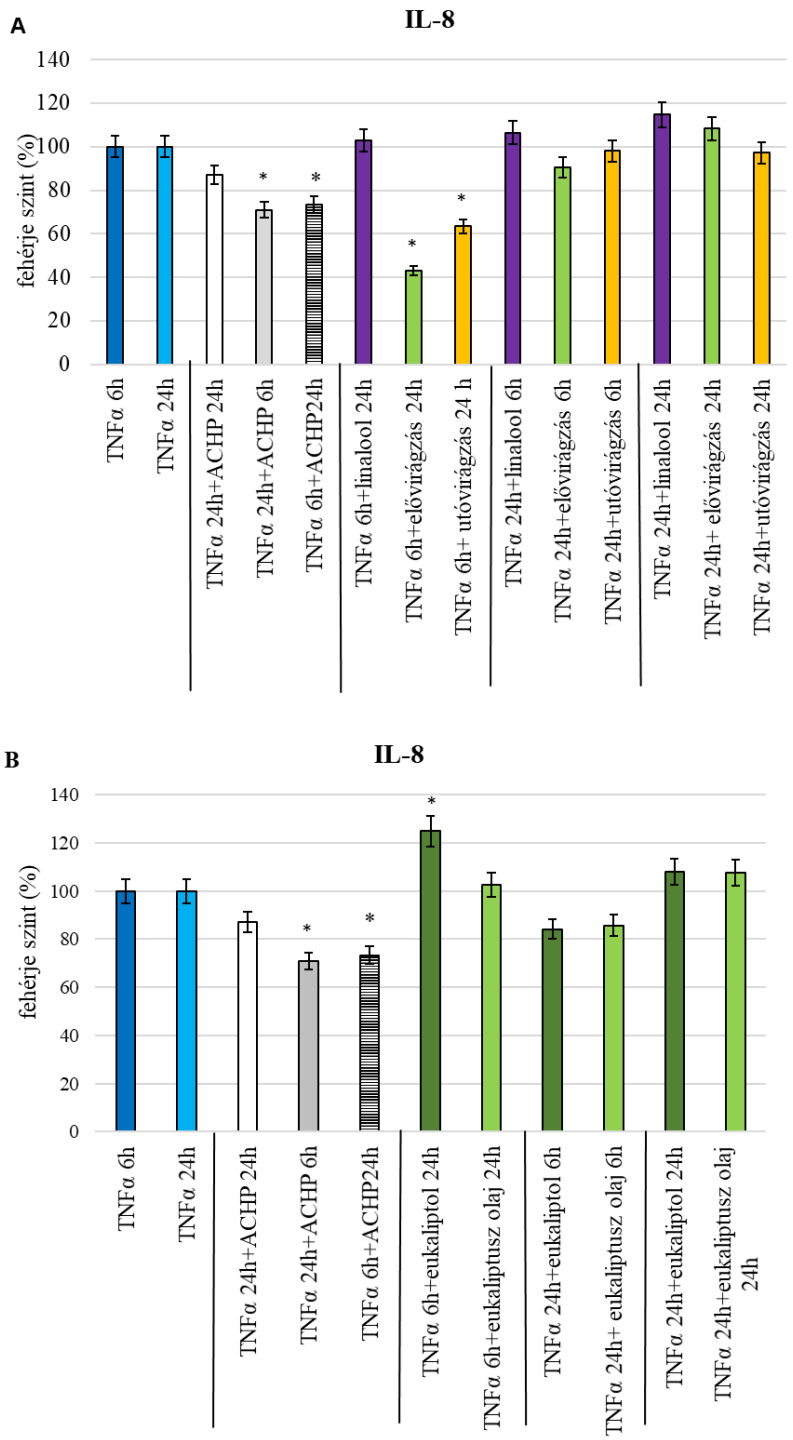
24. ábra: Az eukaliptusz és az eukaliptol standard hatásainak összehasonlítása az ACHP-kezeléssel a TNFα előkezelést követően. A β-aktin expresszióját használtuk az értékek normalizálásához A DMSO-kontrollok relatív expresszióját 1-nek tekintettük. A csillagok a kontrollhoz képest $p<0,05$ értéket jelzik.

4.4.6 Humán IL-8 ELISA mérés

A vizsgált illóolajok és fő vegyületeik (linalool, eukaliptol) legígéretesebb gátló hatását mRNS szinten az IL-8 kemokin esetében mértük. Ezért fontosnak tartottuk a szekretált IL-8 fehérje koncentrációjának meghatározását. Az eredmények a következőképpen alakultak: szignifikáns csökkenést mértünk a rövid távú TNFα előkezelés után 24 órával és a hosszú távú (24h) TNFα előkezelés után az ACHP inhibitor kezelés hatására.

A levendula illóolajok szignifikánsan csökkentették az IL-8 fehérje szintjét 24 órával a 6 órás TNFα előkezelés után. Sőt, a levendula elővirágzásból származó illóolaj mutatkozott a leghatékonyabbnak, összehasonlítva ugyanezen kezelésmenetű linaloollal és az utóvirágzásból származó levendula illóolajjal. A mért eredményt összevetve az ACHP inhibitoros kezeléssel, szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult a levendula elővirágzásból származó illóolaj. A linalool esetében nem volt kimutatható csökkenés a protein szintet illetőleg. A levendula illóolajokkal vagy a linalool standarddal végzett 6 és 24 órás kezelések, nem voltak képesek csökkenteni a 24 órás TNFα előkezelés indukálta gyulladási IL-8 protein szintjét (25A. ábra).

Az eukaliptusz illóolaj és az eukaliptol standard kezelések esetében a 24 órás TNFα előkezelés után történő 24 órás kezelésnél volt mérhető csökkenés változás, míg 6 órás TNFα előkezelés után történő 24 órás kezelésnél az eukaliptol szignifikánsan növelte az IL-8 szintet. A 24 órás TNFα előkezelést követően a 24 órás eukaliptuszolaj- és eukaliptol kezelés hatsására enyhe emelkedés volt mérhető az IL-8 szintjében (25B. ábra).



25. ábra: Humán IL-8 ELISA-mérés 3 féle kezelési idő tekintetében. A csillagok a kontrollhoz képest $p<0,05$ értéket jelzik.

5. Megbeszélés

Munkánk során arra fókuszáltunk, hogy a legnagyobb teljességgel ismertessük a hólyagfájdalom szindróma betegséggel kapcsolatos jelenlegi információkat, az elérhető terápiákat, valamint célunk volt a fejlesztéseinkkel a hiányos terápiás területekre megoldást találni.

Az első lépésben BPS-ben szenvedő betegek kezelésére létrehoztunk egy hazai gyógyszeres terápiás protokollt (5. ábra). A protokollhoz felhasználtuk mind a hazai urológusok tapasztalatait, mind pedig a külföldi szakmai irányelvekben található evidencia szintű konszenzusokat. A protokollunkban említett és a külföldi irányelvekben hivatkozott gyógyszerek az alábbiak: a pentozán-poliszulfát, a kondroitin-szulfát és a hialuronsav intavezikális alkalmazása.

Az orális citrát terápia a vizelet pH-jának lúgosítására, viszont csak a japán protokollban található meg [53]. Az amitriptilin és a hidroxizin hazánkban alkalmazott protokollban csak a kiegészítő terápiát képezi. Fontos kiemelni, hogy törekedni kellene a különböző társaságok kezelési irányelveinek az egységesítésére a hatékonyabb és betegségspecifikusabb kezelés érdekében. Az eltérő ajánlási szinteket az egyes gyógyszer hatóanyagok esetében szükséges lenne harmonizálni, amelyhez több klinikai vizsgálatra lenne szükség a betegcsoportnál.

A protokollunk ezen felül kiterjed még az étrendi tanácsokra, melyet a betegek tapasztalataira építettünk. Célja a tünetek enyhítése és a vizelet savas kémhatásának eltolása alkalikus irányba. Így csökken a húgyhólyag irritációja, amely jelentős fájdalomcsökkenéshez vezethet. A dietetikai kérdőívünk eredményeit összevetettük az egyik legnagyobb egyesület az Interstitialis Cystitis Association [38] ajánlott étrendjével. Az amerikai ajánlás és a betegeink véleménye megegyezik abban, hogy a magas sav-tartalmú gyümölcslék és a szénsavas üdítők, illetve az alkoholos italok súlyosbítják a betegség tüneteit. Továbbá megegyezik még a kávé, a joghurt, a tejföl, a hosszú ideig érlelt sajtok és a paradicsom ellenjavallata. Az amerikai tiltó listán lévő vöröshagyma és bizonyos bab fajták, illetve a csípős és az erősen fűszerezett ételek mellőzése a kérdőíves felmérésünk alapján is megerősítést nyertek. A kérdőívünkből az is kiderült, hogy bár az amerikai ajánlás nem ellenzi a tejtermékek közül a tej és a túró, a gyümölcsök közül a görögdinnye, a körte és a fekete áfonya fogyasztását, a pácienseink inkább kerülik ezen ételeket. Az amerikai ajánlás szerint a C-vitamin savassága miatt nem javasolt. A kérdőívünk alapján mi is megállapítottuk, hogy vannak páciensek, akik a C-vitamin alkáli

fémmel alkotott sóját használják szívesebben. Továbbá javasoljuk azt is, hogy az aszkorbinsav mennyisége ne haladja meg a 200 mg/nap-ot, mert a vizelet jelentős mértékű savanyítását eredményezheti. Azonban a B-vitaminok hátrányos hatásáról a mi betegeink nem számoltak be.

Ezen felül a folyadékbevitel szintén szerves részét képezi az étrendnek. Minden betegnek folyamatosan hígítania kell a vizeletet, hogy csökkentse annak irritáló hatását. A koncentrált (hipertóniás) vizelet minden irritatív vegyületet nagy koncentrációban tartalmaz. Ha a beteg nem törődik vele és éjszakánként 8-10 órán keresztül nem iszik, a vizelete koncentrált lesz és ezért erősen irritatívvá válik. Ennek eredményeként a reggeli vizelet pH értéke savas lesz és a vizelés jelentős fájdalommal fog járni. Ezért az egyik legfontosabb, amelyre figyelni szükséges, hogy éjszaka kb. 1 liter vizet kell inni. Ehhez kapcsolódóan kiemelendő, hogy a görögdinnye fogyasztás szerepe a BPS-ben meglehetősen vitatott, de úgy gondoljuk, hogy a rendkívül felgyorsult diurézis miatt inkább pozitív, mint negatív hatásai vannak [56].

A betegek, ahogy a felmérésből is kiderült gyakran használnak növényi termékeket. Rengeteg ilyen termék kapható a piacon, sőt, a reklámok is aktívan támogatják őket. Hatásmódjukat és lehetséges mellékhatásaikat azonban nem vizsgálták meg részletesen. Ezért használatuk nem ajánlható a BPS indikációjában. A növényi kivonatok hatóanyagai, többnyire közvetlenül a vizeletbe ürülő aromás vegyületek, melyek jelentős mértékben irritáló hatásúak lehetnek. Továbbá más növényi kivonatok a vizeletet rendkívül savassá tehetik és ennek következtében a tünetek inkább rosszabbodhatnak, mint javulnak. Azonban érdemes hangsúlyozni, hogy a helyes étrendet minden egyes beteg esetében személyre szabott módon, individuálisan kell meghatározni. Ugyanis a betegek fájdalomküszöbe, érzékenysége és a betegség súlyossága eltérő lehet.

A gyógyszeres kezelési és étkezési protokollunkat már több urológus szakorvos alkalmazza Magyarországon kiváló eredményekkel. Protokollunk könnyebb tüneti felismerést és gyógyszeres terápia átláthatóságot biztosít. A dietetikai javaslatunk nagymértékben hozzájárul a betegek fájdalomérzet csökkenéséhez és ezáltal életminőség javulásához is.

Egy nyújtott hatóanyagleadású lúgosító tablettát formuláltunk a vizelet savasságából adódó irritatív tünetek enyhítésére. Célunk volt egy olyan készítményt létrehozni, amely semlegesíti a vizelet savas kémhatását, ezáltal a hólyagfájdalom szindróma tüneteit tudjuk csökkenteni (gyakori vizelési inger, vizeléskor erős fájdalom stb.). A segédanyagok kiválasztásánál figyelembe kellett vennünk, hogy a magas Mg^{2+}-

és Na^+-tartalom miatt polimereket és karbomer mátrixrendszereket nem lehetett alkalmazni. A kationok által kiváltott ozmotikus nyomás ugyanis megtörte volna a mátrix textúráját. Ezért a választásunk a nagy viszkozitású Benecel hipromellózra (HPMC) esett. A HPMC érzékenysége a kationok által kiváltott ozmotikus nyomásra lényegesen kisebb, mint a karbomer mátrixrendszereké [58,59]. Tablettázásra kiválóan alkalmasnak bizonyult.

A formulálás első lépéseként először 15-féle segédanyag (Benecel, Avicel DG) kombinációt hoztunk létre, míg a hatóanyagok összetételén nem változtattunk. Ezt követően az elővizsgálatok során (rheológiai vizsgálatok, hatóanyag kioldódási vizsgálatok stb.) teszteltük a mintákat és végül kiválasztottuk a terápiára legmegfelelőbb tablettát.

Az FDA irányelvei [60] szerint a minta tabletták esetében in vitro kioldódási kinetikájuk alapján hasonlósági és különbségi tényezőket számoltunk. A határértékeken belül (f1 esetében: 0-15 és f2 esetében: 50-100) hasonlónak tekinthetők voltak. A modellillesztés megerősítette, hogy a tabletta a hatóanyag tartalmát elsőrendű kinetika szerint adta le, illetve a hatóanyag diffúzan szabadult fel a mátrixból. Figyelembe véve a hatóanyag felszabadulás kinetikáját, egyértelműen kijelenthető, hogy az újonnan fejlesztett tabletta in vivo egyenletes terápiás koncentrációt biztosíthat 2x1 bevétel esetén. Az elsőrendű hatóanyag-felszabadulási modell szerint, ahogy a mátrixban maradó hatóanyag mennyisége csökken, úgy csökken a felszabaduló hatóanyag mennyisége is. Ez a megállapítás nem meglepő a tablettánál, figyelembe véve a viszonylag magas hatóanyag-tartalmat (60%) és a 20%-os kioldódást szabályzó polimer-tartalom tényét. A hidrofil mátrix tabletták hatóanyag felszabadulását, a mátrix gélrétegén keresztül történő diffúziójával lehet szabályozni. Kezdetben a polimer a hidratáció során üveges állapotból gumiszerű állapotba kerül. Amennyiben a gélréteg vastagsága nem elég nagy, akkor a jól oldódó hatóanyagok (esetünkben a citrátok) gyorsan és ellenőrizetlenül oldódhatnak [61]. A kálium-citrát tartós, egyenletes felszabadulását más kutatók akkor érték el, amikor a hidrofób mátrixot karnauba-viasszal, sztearil-alkohollal és sztearinsavval formulálták, a hatóanyag-felszabadulásgátló arány 2,84:1 volt [62].

A vizsgálatunkban, a C/3 összetételű formulációban a citrátok és a Benecel polimer aránya valamivel magasabb, 3:1 volt. Érdekes módon ez kiegyensúlyozottabb hatóanyag-felszabadulást eredményezett a hidrofób mátrixhoz képest.

A kiválasztott C/3 tabletta 24 hónapos stabilitását vizsgálva, enyhe növekedést tapasztaltunk a kioldódási sebességben. Azonban a különbségi- és hasonlósági

faktorszámítások alapján a kioldódási profilok még 24 hónapos tárolás után is hasonlónak tekinthetők egymáshoz.

A nyújtott hatóanyag-leadású (C/3) citrát tablettával elvégeztünk egy kettős vak, placebo kontrollos, randomizált humán pilot vizsgálatot. A pilot eredményeként egyértelműen látható volt az első végpontja a vizsgálatnak, hogy szignifikáns módon emeli a vizelet pH-ját a kontrollhoz képest. A 10 órás nyújtott hatóanyagleadás miatt a napi 2x-i bevétel elegendőnek bizonyult, amely nagymértékben hozzájárul a betegek adherenciájának hatékony növeléséhez. Ennek köszönhetően ugyanis a déli adag elhagyható.

A semleges pH érték (6,8-7,2) eléréséhez azonban valószínűleg 2x2-re kell emelni a terápiás dózist. A klinikai vizsgálat másik végpontja annak a hipotézisnek a megerősítése volt, hogy a nyújtott hatóanyag-leadású tabletta csökkenti a vizelet napi pH-ingadozását, szemben a gyorsan felszívódó lúgosító tablettával, amely hirtelen, ellenőrizhetetlen pH-csúcsokat okozhat. A kisebb ingadozás kisebb fájdalmat és kevesebb vizelési ingert eredményezhet. A statisztikai értékelés szerint a klinikai vizsgálat nem igazolta ezt a hipotézist, a két tabletta között nem volt szignifikáns különbség. A feltételezett pH-csúcsokat akkor lehetett volna kimutatni, ha a betegek lehetőleg minden órában vagy a tabletta bevétele után egységesített időközönként ürítették volna a vizeletüket és mérték volna a vizeletük kémhatását. Sajnos ezeket a kritériumokat a gyakorlatban nem lehetett teljesíteni. Ezen felül a vizelet pH-értékét rengeteg tényező befolyásolja, például a beteg étrendje, életmódja, anyagcseréje, társbetegségei és a kezelés során alkalmazott gyógyszerek is. Mindezen tényezők nyomon követése vagy befolyásolása nem volt kivitelezhető a humán klinikai vizsgálat során, e paraméterek standardizálása nem volt lehetséges a pilot során.

A nyújtott hatóanyag-leadású tabletta 22%-kal kevesebb hatóanyagot tartalmazott, mint a hagyományos citrát tabletta, viszont a humán pilot vizsgálatban nem volt szignifikáns különbség a két készítmény vizelet lúgosító hatásában. Ez az eredmény arra utalhat, hogy a nyújtott hatóanyag leadású tabletta biológiai hasznosulása kedvezőbb.

A nyújtott hatóanyag-leadású tabletta további előnye, hogy nem okoz gyomorirritációt és fokozott savtermelést, mert a hatóanyag legnagyobb részét a készítmény a bélcsatornában adja le, így hiperaciditás és gastro-oesophagealis reflux esetén is szedhető. A készítmény káliummentes volta jelentősen csökkenti az egyéb lúgosító készítményekhez képest a kardiális kockázatot, a beszűkült vesefunkció miatt esetlegesen kialakuló hiperkalémiát. A készítmény káliummentessége pedig jelentős

előnynek számít, mivel nem irritálja a fokozottan kálium-érzékeny hólyagfalat, így csökkentve a vizelet által kiváltott erőteljes hólyagtáji fájdalmat és fokozott vizelési ingert.

Molekuláris részről is megközelítettük a hólyagba fellépő hisztopatológiai változást, mivel a hízósejtek jelenléte a hólyagokban arra utal, hogy az immunrendszer részt vesz a betegség kialakulásában és fenntartásában [63]. Ennek vizsgálatához létrehoztunk egy steril gyulladás modellt, melyben tanulmányozható a BPS során kialakuló steril gyulladás. A gyulladás kiváltására TNFα gyulladáskeltő citokin kezelést alkalmaztunk T24 humán hólyaghámsejtek esetében. A TNFα-val steril gyulladást tudtunk kiváltani, és a fő termelői a makrofágok. A makrofágok ezen felül a gyulladáskeltő citokinkaszkádoknak a termelését is modulálják [64]. Az IL-1β, IL-6, IL-8 fokozott expressziója az BPS betegek szérumában arra utal, hogy nemcsak a hízósejtek aktivációja, hanem néhány más gyulladásos mediátor is részt vesz az BPS patogenezisében.

Mivel az illóolajok kémiai összetételüktől függően gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkezhetnek, befolyásolhatják a citokintermelés folyamatát vagy a proinflammatórikus génexpresszió modulációját is, ezért vizsgálatainkhoz két illóolajat választottunk ki. Az egyik a levendula illóolaj és fő komponense a linalool volt, mivel gyulladáscsökkentő hatását számos tanulmány bizonyította. Leggyakrabban in vivo LPS által kiváltott tüdőkárosodási modellben, cigarettafüst által kiváltott tüdőgyulladásban és karragén által kiváltott ödéma modellben vizsgálták, továbbá hatásosnak bizonyult a vese ischaemia-ban is [65,66]. A linaloolról kimutatták még, hogy blokkolja az NFκB és a MAPK jelátviteli útvonalakat [66].

A másik az eukaliptusz illóolaj és fő komponense az eukaliptol volt, amely gyulladáscsökkentő hatása miatt légúti megbetegedések, például hörghurut, arcüreggyulladás, bronchiális asztma és krónikus obstruktív tüdőbetegség kezelésére használják. Ezen kívül a gyulladáscsökkentő hatását még neurodegeneratív betegségek esetén pl. Alzheimer-kórban használják ki [67]. Kardiovaszkuláris betegségekben a vizsgálatok szerint az eukaliptol paraszimpatikus mechanizmuson keresztül csökkenti a szívfrekvenciát, és vazorelaxációval hipotenziót idéz elő. Továbbá az eukaliptol blokkolja az NFκB jelátviteli útvonalat is [68].

Molekuláris biológiai vizsgálataink azt mutatták, hogy a citokin mRNS-expressziójának legnagyobb mértékű csökkenése a levendula illóolajok és a linalool kezelések hatására következett be minden esetben rövid ideig (6 óra) tartó TNFα

előkezelés után. Pontosabban a levendula utóvirágzásból desztillált illóolaj és a linalool standard volt a leghatékonyabb. Hasonló eredményeket lehetett megfigyelni, amikor az ACHP NFκB-gátló kezeléssel hasonlítottuk össze a citokin-transzkripció gátlásának pozitív kontrolljaként az illóolajok és a fő komponensek hatásait. Eredményeink alapján 6 h TNFα előkezelés után történő az utóvirágzásból desztillált levendula illóolajnál és a linalool standard kezelésnél tapasztaltunk nagyobb hatékonyságot az IL-8 és az Il-1β esetében, mint az ACHP kezelés. A hatékonyságbéli különbség a két levendula illóolaj között valószínűleg abból adódik, hogy az utóvirágzásból származó illóolaj linalool tartalma magasabb volt (41,63±0,13%), mint az elővirágzásból származó levendula illóolajnak (36,33±0,10%). A levendula illóolajok összetételének GC-MS alapján történő összehasonlításakor a különbségek egyértelműen megfigyelhetők. A levendula illóolaj linalool után a második legmagasabb százalékban linalil-acetátot és terpinen-4-olt tartalmazta. Az elővirágzásból származó levendula illóolajnak a fő összetevői a linalool (36,33%), a linalil-acetát (21,47%) és a terpinene-4-ol (9,47%). Ezzel összevetve az utóvirágzásból származó illóolaj nagyobb mennyiségű linaloolt (41,63%) és terpinen-4-olt (16,69%) tartalmazott, és kevesebb linalil-acetátot (14,78%) (1. melléklet). Mindezen hatóanyagok bizonyítottan gyulladáscsökkentő hatásúak és gátolják az NFκB útvonalat [25,69,70]. Az α-terpineol vegyület is hozzájárulhat az illóolajok gyulladáscsökkentő hatásához, mivel in vivo csökkenti a gyulladáskeltő citokinek, például az IL-1β, IL-6 és TNF-α szérumszintjét [71,72]. Az eukaliptusz illóolaj és az eukaliptol mRNS-expresszióra gyakorolt hatását összehasonlítva jól látható, hogy az összes citokin esetében az illóolajnál nagyobb hatékonyságot tapasztaltunk. Az ACHP NFκB-gátló hatásához képest az eukaliptusz illóolajjal végzett 24h kezelések hatékonyabbak voltak az IL-8 és az IL-6 esetében. Azaz az illóolaj komplex hatása nagyobb csökkenést okoz az interleukinok mRNS-expresszióban, mint maga a fő komponens. Az eukaliptol mellett az α-pinen, γ-terpinen, terpinen-4-ol és α-terpineol is feltételezhetően hozzájárul az eukaliptusz illóolaj komplex gyulladáscsökkentő hatásához [71,72]. Az α-pinene gyulladásos válaszokra gyakorolt gátló hatása bizonyítottan jelentősen csökkenti az IL-6 és TNFα termelődését [73]. A γ-terpinen is képes csökkenteni a gyulladáskeltő citokinek, mint például az IL-1β és az IL-6 termelését valamint, fokozni az IL-10 képződését [74]. Az IL-8 kemokin fehérjeszinten történő vizsgálata megerősítette, hogy a levendula illóolajokkal történő 24 órás kezelések hatékonyabbak a steril gyulladás rövid ideig (6h) tartó indukciója esetén az ACHP-inhibitoros kezeléssel szemben. Ezáltal a vizsgálataink egyértelműen bizonyítják, hogy az illóolaj összetevői döntő szerepet játszanak a

gyulladáscsökkentő hatás meghatározásában. Illetve, hogy a levendula illóolajok hatékonyabbnak bizonyultak a gyulladáscsökkentésben, mint az eukaliptuszolaj. Ennek oka a GC alapján az összetevőkre vezethető vissza. A két vizsgált fő komponens összehasonlításakor az eredményekből kitűnik, hogy a linalool erősebb gátló hatással rendelkezik, mint az eukaliptol. A levendula illóolajok nagy mennyiségben (min 4%) tartalmaznak még linalil-acetátot, terpinen-4-olt, α-terpineolt. Az eukaliptuszolaj ezzel szemben az eukaliptolon kívül csak kis mennyiségben tartalmaz más olyan komponenseket, amelyek kiegészíthetik a hatását, mint például az α-pinen (6,32%), γ-terpinen (3,2%) és terpinen-4-ol (1,9%). A két illóolaj összetétele között minimális az átfedés, és a mennyiségek is kicsik (0,02-1,6%). A közös összetevők az eukaliptol, terpinen-4-ol, α-terpineol, mikrén, α-pinen, β-pinen, γ-terpinen, α-phellandren. Egyes esetekben az összetevők kis százalékos arányának hatása elhanyagolható. Összegezve mind a levendula illóolajok, mind a linalool hatékonyabban csökkentette a gyulladáskeltő citokinek mRNS expresszióját, mint az ACHP inhibitor. Ez arra utal, hogy az illóolajok különböző összetevői nemcsak az NFκB útvonalra, hanem más (pl. MAPK) útvonalakra is hatással vannak. Továbbá mindkét levendula illóolaj szignifikánsan hatásosnak bizonyult rövid TNFα-előkezelés után történő 24 órás illóolaj kezelés során, az ACHP NFκB-gátlóval összehasonlítva az IL-8 ELISA mérésnél. Pontosabban az elővirágzásból származó levendula illóolaj hatásosabbnak mutatkozott, mint az utóvirágzásból származó levendula illóolaj. Ez részben azzal magyarázható, hogy a linalil-acetát úgy viselkedik, mint egy prodrug, a linaloolhoz képest késleltetett a hatása, ami az in vivo biotranszformációnak köszönhető [25]. Másrészt a folyamatban részt vevő transzlációs tényezők is befolyásolhatják a hatását. Így további kísérletek szükségesek e hatások feltárásához és pontositáshoz. Összefoglalva a különböző illóolajok bizonyos gyulladásos állapotokban eltérő terápiás hatással bírnak, és még a virágok betakarításának időzítése is fontos lehet.

6. Összefoglalás és új eredmények

A hólyagfájdalom szindróma egy kevéssé ismert, nehezen diagnosztizálható betegség, amely valószínűleg nagyon sok embert érint világszerte. A betegség hátterében a felszíni nyák rétegének elégtelen termelődése áll. A legnagyobb részt glükózaminoglikán molekulákból álló réteg hiánya esetén a vizeletben lévő anyagok irritációt váltanak ki, amely jelentős életminőségbeli romlást okoz a betegnek (gyakori vizelési inger, vizeléskor erős fájdalom stb.)

Ezért célul tűztük ki, hogy átfogóan tanulmányozzuk a betegséget és komplex módon segítjük a hólyagfájdalom szindrómában szenvedő betegek egészségügyi ellátását.

Munkánk során az alábbi eredményeket értük el:

1. Elkészítettük a hólyagfájdalom szindrómában szenvedő betegek gyógyszeres kezelési és étkezési protokollját. Szükség esetén OGYÉI engedélyt kérve az indikáción túli gyógyszerrendelésre.

2. Létrehoztunk egy új innovatív tablettát. Ez a készítmény káliummentes, amely nem irritálja a húgyhólyag nyálkahártyáját. A nyújtott hatóanyagleadásnak köszönhetően pedig folyamatosan biztosított a vizelet kémhatásának lúgosítása. A kettős vak, placebo kontrolált, randomizált pilot vizsgálat pedig egyértelműen bizonyította, hogy innovatív készítményünk szignifikáns módon emeli a vizelet pH értékét a kontroll csoporthoz képest.

3. Steril gyulladásos T24 humán uroepithel modellben a levendula illóolajok hatékonyabbnak bizonyultak, mint az eukaliptusz illóolaj. Továbbá arra a következtetésre jutottunk a T24 sejtek által szekretált IL-8 gyulladáskeltő citokin mennyisége alapján, hogy a levendula illóolajok hatékonyabbak voltak, mint az ACHP inhibitorral történő kezelés. A két levendula illóolajt egymással összehasonlítva a virágzási időszak elején gyűjtött és desztillált levendula illóolaj volt a hatékonyabb az utóvirágzásból nyert illóolajnál.

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a hólyagfájdalom szindrómában szenvedő betegek egészségügyi ellátásában jelentős eredményeket értünk el. A gyógyszeres kezelési és étkezési protokollunkat már több urológus szakorvos alkalmazza Magyarországon kiváló eredményekkel. Protokollunk könnyebb tüneti felismerést és gyógyszeres terápia átláthatóságot biztosít.

A dietetikai javaslatunk nagymértékben hozzájárul a betegek fájdalomérzet csökkenéséhez és ezáltal életminőség javulásához is.

Innovatív, nyújtott hatóanyagleadású készítményünkkel hatékonyan tudjuk a vizelet pH értékét emelni, ezáltal pedig bizonyított módon csillapítjuk a hólyagfájdalom szindrómában szenvedő betegek tüneteit (vizelési fájdalom, vizelési inger stb.). Az elsőrendű hatóanyag kioldódásnak köszönhetően pedig elégségesnek bizonyult a napi 2x dozírozás, amely hozzájárul a betegek adherenciájának hatékony növeléséhez.

A pH semleges vizelet elérése és szinten tartása céljából a napi dózis megemelését javasoljuk 2x2-re. Ezzel biztosítva a hatékonyabb terápiát, amellyel a hólyagfájdalom szindrómában szenvedő betegek teljes tünetmentessége is elérhető lehetne.

A tabletta 2 éves stabilitási vizsgálatai alapján pedig kijelenthetjük, hogy készítményünk stabilnak tekinthető, megfelel az előírt követelményeknek.

Az újonnan fejlesztett készítményünk jelenleg hazai gyógyszergyártás alatt van.

Kutatásunk kiterjedt a levendula és az eukaliptusz illóolajok és fő összetevőik gyulladáscsökkentő hatásának a vizsgálatira is steril gyulladásos modellben T24 humán uroepithel sejtvonalon. Az itt kapott eredményeink konklúzióját a 3. pont tartalmazza, amely alapján a levendula illóolajok megfelelő formulálás után alkalmasak lehetnek az intravezikális terápia kiegészítőjeként való alkalmazásra, mivel a gyulladáscsökkentő hatásuk jól kiegészítheti a GAG-regeneratív terápiát a hólyagban.

Irodalomjegyzék

1. Han, E.; Nguyen, L.; Sirls, L.; Peters, K. Current Best Practice Management of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome. *Ther. Adv. Urol.* **2018**, *10*, 197–211, doi:10.1177/1756287218761574.

2. Hanno, P.M.; Erickson, D.; Moldwin, R.; Faraday, M.M. Diagnosis and Treatment of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome: AUA Guideline Amendment. *J. Urol.* **2015**, *193*, 1545–1553, doi:10.1016/j.juro.2015.01.086.

3. Hanno, P.; Domochowski, R. Status of International Consensus on Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome/Painful Bladder Syndrome: 2008 Snapshot. *Neurourol. Urodyn.* **2009**, *28*, 274–286, doi:10.1002/nau.

4. Malde, S.; Palmisani, S.; Al-Kaisy, A.; Sahai, A. Guideline of Guidelines: Bladder Pain Syndrome. *BJU Int.* **2018**, *122*, 729–743, doi:10.1111/bju.14399.

5. Nyirady, P. *Urológia*; Semmelweis Kiadó és Multimédia Kiadó: Budapest, 2019; ISBN 9789633314906.

6. Vij, M.; Srikrishna, S.; Cardozo, L. Interstitial Cystitis: Diagnosis and Management. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2012**, *161*, 1–7, doi:10.1016/j.ejogrb.2011.12.014.

7. Rosamilia, A. Painful Bladder Syndrome/Interstitial Cystitis. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2005**, *19*, 843–859, doi:10.1016/j.bpobgyn.2005.08.004.

8. van de Merwe, J.P.; Nordling, J.; Bouchelouche, P.; Bouchelouche, K.; Cervigni, M.; Daha, L.K.; Elneil, S.; Fall, M.; Hohlbrugger, G.; Irwin, P.; et al. Diagnostic Criteria, Classification, and Nomenclature for Painful Bladder Syndrome/Interstitial Cystitis: An ESSIC Proposal. *Eur. Urol.* **2008**, *53*, 60–67, doi:10.1016/j.eururo.2007.09.019.

9. Zacchè, M.M.; Srikrishna, S.; Cardozo, L. Novel Targeted Bladder Drug-Delivery Systems: A Review. *Res. Reports Urol.* **2015**, *7*, 169–178, doi:10.2147/RRU.S56168.

10. Daniels, A.M.; Schulte, A.R.; Herndon, C.M. Interstitial Cystitis: An Update on the Disease Process and Treatment. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* **2018**, *32*, 49–58, doi:10.1080/15360288.2018.1476433.

11. David A. Lane; Lewis Adams Non-Anticoagulant Uses of Heparin. *N Engl J Med* **1993**, *329*, 129–130, doi:10.1056/NEJM199307083290212.

12. Meng, E.; Hsu, Y.-C.; Chuang, Y.-C. Advances in Intravesical Therapy for Bladder Pain Syndrome (BPS)/Interstitial Cystitis (IC). *LUTS Low. Urin. Tract Symptoms* **2018**, *10*, 3–11, doi:10.1111/luts.12214.

13. Jay Khastgir Intravesical GAG Replacement Therapies for Bladder Pain Syndrome / Interstitial Cystitis – an Update Available online: https://www.urologynews.uk.com/features/features/post/intravesical-gag-replacement-therapies-for-bladder-pain-syndrome-interstitial-cystitis-an-update (accessed on 5 August 2021).

14. Wyndaele, J.J.J.; Riedl, C.; Taneja, R.; Lovász, S.; Ueda, T.; Cervigni, M. GAG Replenishment Therapy for Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis.

Neurourol. Urodyn. **2019**, *38*, 535–544, doi:10.1002/nau.23900.

15. Rosa, A.C.; Fantozzi, R. The Role of Histamine in Neurogenic Inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *170*, 38–45, doi:10.1111/bph.12266.

16. Elmiron Available online: https://ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis&action=show_details&item=161386 (accessed on 24 June 2022).

17. Cystistat Available online: https://www.laboratoriosrubio.com/en/product/cystistat/ (accessed on 24 June 2022).

18. Ialuril Prefill Available online: https://www.ibsa.hu/dam/jcr:543614b3-9e9c-4fc6-818d-04bdb6f3da90/IFU Ialuril prefill HU 2019.11.pdf (accessed on 24 June 2022).

19. Syner-Med Hyacyst Available online: https://www.syner-med.com/product/hyacyst (accessed on 24 June 2022).

20. UNISIS Available online: https://www.diamondlily.hu/termek/unisis-by-diamondlily-3-havi-adag/ (accessed on 24 June 2022).

21. Simpson, D.P. Citrate Excretion: A Window on Renal Metabolism. *Am. J. Physiol. - Ren. Fluid Electrolyte Physiol.* **1983**, *13*, 223–234, doi:10.1152/ajprenal.1983.244.3.f223.

22. BLEMAREN-N Pezsgőtabletta Alklamazási Előirata Available online: https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fogyei.gov.hu%2Fkiseroirat%2Fah%2Fah_0000014047_20190111110842.doc&wdOrigin=BROWSELINK (accessed on 6 July 2022).

23. Hólyagfájdalom Szindróma Diagnosztikája Available online: https://www.holyagfajdalom.hu/ic_diagnosztikaja.html (accessed on 28 June 2022).

24. Moghaddam, M.; Mehdizadeh, L. Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. *Soft Chem. Food Ferment.* **2017**, 379–419, doi:10.1016/B978-0-12-811412-4.00013-8.

25. Miguel, M.G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules* **2010**, *15*, 9252–9287, doi:10.3390/molecules15129252.

26. Peana, A.T.; D'Aquila, P.S.; Panin, F.; Serra, G.; Pippia, P.; Moretti, M.D.L. Anti-Inflammatory Activity of Linalool and Linalyl Acetate Constituents of Essential Oils. *Phytomedicine* **2002**, *9*, 721–726, doi:10.1078/094471102321621322.

27. Santos, F.A.; Rao, V.S.N. Antiinflammatory and Antinociceptive Effects of 1,8-Cineole a Terpenoid Oxide Present in Many Plant Essential Oils., doi:10.1002/1099-1573.

28. Biswas, R.; Bagchi, A. NFkB Pathway and Inhibition: An Overview. *Comput. Mol. Biol.* **2016**, *6*, 1–20, doi:10.5376/cmb.2016.06.0001.

29. Schütze, S.; Wiegmann, K.; Machleidt, T.; Krönke, M. TNF-Induced Activation of NF-KB. *Immunobiology* **1995**, *193*, 193–203, doi:10.1016/S0171-2985(11)80543-7.

30. Li, H.; Lin, X. Positive and Negative Signaling Components Involved in TNFα-Induced NF-KB Activation. *Cytokine* **2008**, *41*, 1–8, doi:10.1016/J.CYTO.2007.09.016.

31. Jiang, Y.H.; Peng, C.H.; Liu, H.T.; Kuo, H.C. Increased Pro-Inflammatory Cytokines, C-Reactive Protein and Nerve Growth Factor Expressions in Serum of Patients with Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome. *PLoS One* **2013**, *8*, 4–9, doi:10.1371/journal.pone.0076779.

32. Sheu, J.N.; Chen, S.M.; Meng, M.H.; Lue, K.H. The Role of Serum and Urine Interleukin-8 on Acute Pyelonephritis and Subsequent Renal Scarring in Children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2009**, *28*, 885–890, doi:10.1097/INF.0B013E3181A39E23.

33. Dinarello, C.A. Interleukin-1β and the Autoinflammatory Diseases. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2467–2470, doi:10.1056/NEJMe0811014.

34. Mantovani, A.; Dinarello, C.A.; Molgora, M.; Garlanda, C. IL-1 and Related Cytokines in Innate and Adaptive Immunity in Health and Disease. *Immunity* **2019**, *50*, 778, doi:10.1016/J.IMMUNI.2019.03.012.

35. Opal, S.M.; DePalo, V.A. Anti-Inflammatory Cytokines. *Chest* **2000**, *117*, 1162–1172, doi:10.1378/CHEST.117.4.1162.

36. Cavaillon, J.M. [Interleukins and Inflammation]. *Pathol. Biol. (Paris).* **1990**, *38*, 36–42.

37. Huang, F.; Horikoshi, S.; Kurusu, A.; Shibata, T.; Suzuki, S.; Funabiki, K.; Shirato, I.; Tomino, Y. Urinary Levels of Interleukin-8 (IL-8) and Disease Activity in Patients with IgA Nephropathy. *J. Clin. Lab. Anal.* **2001**, *15*, 30–34, doi:10.1002/1098-2825(2001)15:1<30::AID-JCLA6>3.0.CO;2-X.

38. ICN Food List – Diet Reference Guide REVISION Available online: https://www.ic-network.com/interstitial-cystitis-diet/diet-cheat-sheet/ (accessed on 22 October 2018).

39. Interstitial Cystitis Diet Confident Choices- IC Diet Food List Available online: http://ic-diet.com/IC-diet-food-list (accessed on 2 February 2022).

40. IC-Network: ICN Food List – Diet Reference Guide Available online: https://www.ic-network.com/interstitial-cystitis-diet/diet-cheat-sheet/ (accessed on 22 January 2019).

41. Ashland Benecel™ Hypromellose; Directly Compressible HPMC Grades Available online: https://solving.ashland.com/pharmaceutical/benece-dc-ga.

42. Grdešič, P.; Paudel, A.; German Ilić, I. High-Molecular-Weight Hypromellose from Three Different Suppliers: Effects of Compression Speed, Tableting Equipment, and Moisture on the Compaction. *AAPS PharmSciTech* **2020**, *21*, 1–14, doi:10.1208/s12249-020-01688-y.

43. Khan, K.A. The Concept of Dissolution Efficiency. *J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, *27*, 48–49, doi:10.1111/j.2042-7158.1975.tb09378.x.

44. Samaha, D.; Shehayeb, R.; Kyriacos, S. Modeling and Comparison of Dissolution Profiles of Diltiazem Modified-Release Formulations. *Dissolution Technol.* **2009**, *16*, 41–46, doi:10.14227/DT160209P41.

45. Patent application number: P2000144. Filing date: 29.04.2020. Oral Treatment and Formulation of a Urinary Alkalizing Medicinal Product and/or a Medicinal Product for Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome (IC/BPS).

46. No, G.G.; Guideline, B.J. Management of Bladder Pain Syndrome: Green-Top Guideline No. 70. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2017**, *124*, e46–e72, doi:10.1111/1471-0528.14310.

47. Greiner, J.F.W.; Müller, J.; Zeuner, M.T.; Hauser, S.; Seidel, T.; Klenke, C.; Grunwald, L.M.; Schomann, T.; Widera, D.; Sudhoff, H.; et al. 1,8-Cineol Inhibits Nuclear Translocation of NF-KB P65 and NF-KB-Dependent Transcriptional Activity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2013**, *1833*, 2866–2878, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.07.001.

48. Cardia, G.F.E.; Silva-Filho, S.E.; Silva, E.L.; Uchida, N.S.; Cavalcante, H.A.O.; Cassarotti, L.L.; Salvadego, V.E.C.; Spironello, R.A.; Bersani-Amado, C.A.; Cuman, R.K.N. Effect of Lavender (Lavandula Angustifolia) Essential Oil on Acute Inflammatory Response . *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2018**, *2018*, 1–10, doi:10.1155/2018/1413940.

49. Olasveengen, T.M.; Semeraro, F. Guidelines 2020. **2020**, 2020.

50. Scarneciu, I.; Bungau, S.; Lupu, A.-M.; Scarneciu, C.C.; Bratu, O.G.; Martha, O.; Tit, D.M.; Aleya, L.; Lupu, S. Systematic Review and Meta-Analysis of Intravesical Hyaluronic Acid and Hyaluronic Acid/Chondroitin Sulfate Instillation for Interstitial Cystitis/Painful Bladder Syndrome. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *139*, 105067, doi:10.1159/000447863.

51. Scarneciu, I.; Bungau, S.; Lupu, A.M.; Scarneciu, C.C.; Bratu, O.G.; Martha, O.; Tit, D.M.; Aleya, L.; Lupu, S. Efficacy of Instillation Treatment with Hyaluronic Acid in Relieving Symptoms in Patients with BPS/IC and Uncomplicated Recurrent Urinary Tract Infections - Long-Term Results of a Multicenter Study. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *139*, doi:10.1016/j.ejps.2019.105067.

52. Gyógyszer-Adatbázis Available online: https://ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis/ (accessed on 26 June 2020).

53. Cox, A.; Golda, N.; Nadeau, G.; Nickel, J.C.; Carr, L.; Corcos, J.; Teichman, J. CUA Guideline: Diagnosis and Treatment of Interstitial Cystitis/ Bladder Pain Syndrome. *Can. Urol. Assoc. J.* **2016**, *10*, E136–E155, doi:10.5489/cuaj.3786.

54. Homma, Y.; Ueda, T.; Tomoe, H.; Lin, A.T.; Kuo, H.C.; Lee, M.H.; Lee, J.G.; Kim, D.Y.; Lee, K.S. Clinical Guidelines for Interstitial Cystitis and Hypersensitive Bladder Syndrome: Guidelines. *Int. J. Urol.* **2009**, *16*, 597–615, doi:10.1111/j.1442-2042.2009.02326.x.

55. Engeler, D.; A.P. Baranowski, B.B.; J. Borovicka, A.M. Cottrell, P. Dinis-Oliveira, S.E.; J. Hughes, E.J. Messelink (Vice-chair), A.C. de C.W.; Zumstein *EAU Guidelines on Chronic Pelvic Pain*; L. Pacheco-Figueiredo, B.P., S. Goonewardene, V., Eds.; 2020; ISBN ISBN 978-94-92671-07-3.

56. Friedlander, J.I.; Shorter, B.; Moldwin, R.M. Diet and Its Role in Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome (IC/BPS) and Comorbid Conditions. *BJU Int.* **2012**, *109*, 1584–1591, doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10860.x.

57. Bassaly, R.; Downes, K.; Hart, S. Dietary Consumption Triggers in Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome Patients. *Female Pelvic Med. Reconstr. Surg.* **2011**, *17*, 36–39, doi:10.1097/SPV.0b013e3182044b5c.

58. Grades, C.; Lusvardi, K.M.; Harcum, W.W. Benecel ™ Hypromellose Competitive Grades. **2012**, *2*, 1–7.

59. Huang, L.-L.; Schwartz, J.B. Studies on Drug Release from a Carbomer Tablet Matrix. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1995**, *21*, 1487–1501, doi:10.3109/03639049509069240.

60. Shah, V.P.; Lesko, L.J.; Fan, J.; Fleischer, N.; Handerson, J.; Malinowski, H.; Williams, R.L. FDA Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. *Dissolution Technol* **1997**, *4*, 15–22, doi:10.14227/DT040497P15.

61. Vasvári, G.; Kalmár, J.; Veres, P.; Vecsernyés, M.; Bácskay, I.; Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Haimhoffer, Á.; Rusznyák, Á.; Fenyvesi, F.; et al. Matrix Systems for Oral Drug Delivery: Formulations and Drug Release. *Drug Discov. Today Technol.* **2018**, *27*, 71–80, doi:10.1016/j.ddtec.2018.06.009.

62. Cao, Q.-R.; Kim, T.-W.; Lee, B.-J. Photoimages and the Release Characteristics of Lipophilic Matrix Tablets Containing Highly Water-Soluble Potassium Citrate with High Drug Loadings. *Int. J. Pharm.* **2007**, *339*, 19–24, doi:10.1016/j.ijpharm.2007.04.016.

63. Van De Merwe, J.P.; Arendsen, H.J. Interstitial Cystitis: A Review of Immunological Aspects of the Aetiology and Pathogenesis, with a Hypothesis. *BJU Int.* **2001**, *85*, 995–999, doi:10.1046/j.1464-410x.2000.00646.x.

64. Parameswaran, N.; Patial, S. Tumor Necrosis Factor-a Signaling in Macrophages. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2010**, *20*, 87–103, doi:10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v20.i2.10.

65. Aboutaleb, N.; Jamali, H.; Abolhasani, M.; Pazoki Toroudi, H. Lavender Oil (Lavandula Angustifolia) Attenuates Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats through Suppression of Inflammation, Oxidative Stress and Apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *110*, 9–19, doi:10.1016/j.biopha.2018.11.045.

66. Ma, J.; Xu, H.; Wu, J.; Qu, C.; Sun, F.; Xu, S. Linalool Inhibits Cigarette Smoke-Induced Lung Inflammation by Inhibiting NF-KB Activation. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *29*, 708–713, doi:10.1016/j.intimp.2015.09.005.

67. Huo, M.; Cui, X.; Xue, J.; Chi, G.; Gao, R.; Deng, X.; Guan, S.; Wei, J.; Soromou, L.W.; Feng, H.; et al. Anti-Inflammatory Effects of Linalool in RAW 264.7 Macrophages and Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury Model. *J. Surg. Res.* **2013**, *180*, e47–e54, doi:10.1016/j.jss.2012.10.050.

68. Bhowal, M.; Gopal, M. Eucalyptol: Safety and Pharmacological Profile. *RGUHS J Pharm Sci* **2016**, *5*, 125–131, doi:10.5530/rjps.2015.4.2.

69. Nogueira, M.N.M.; Aquino, S.G.; Rossa, C.; Spolidorio, D.M.P. Terpinen-4-Ol and Alpha-Terpineol (Tea Tree Oil Components) Inhibit the Production of IL-1β, IL-6 and IL-10 on Human Macrophages. *Inflamm. Res.* **2014**, *63*, 769–778, doi:10.1007/s00011-014-0749-x.

70. Erickson, D.R.; Kunselman, A.R.; Bentley, C.M.; Peters, K.M.; Rovner, E.S.; Demers, L.M.; Wheeler, M.A.; Keay, S.K. Changes in Urine Markers and Symptoms After Bladder Distention for Interstitial Cystitis. *J. Urol.* **2007**, *177*, 556–560, doi:10.1016/j.juro.2006.09.029.

71. Ning, J.; Xu, L.; Zhao, Q.; Zhang, Y. yan; Shen, C. qing The Protective Effects of Terpinen-4-Ol on LPS-Induced Acute Lung Injury via Activating PPAR-γ. *Inflammation* **2018**, *41*, 2012–2017, doi:10.1007/s10753-018-0844-1.

72. Held, S.; Schieberle, P.; Somoza, V. Characterization of α-Terpineol as an Anti-Inflammatory Component of Orange Juice by in Vitro Studies Using Oral Buccal Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8040–8046, doi:10.1021/jf071691m.

73. Kim, D.S.; Lee, H.J.; Jeon, Y.D.; Han, Y.H.; Kee, J.Y.; Kim, H.J.; Shin, H.J.; Kang, J.; Lee, B.S.; Kim, S.H.; et al. Alpha-Pinene Exhibits Anti-Inflammatory Activity Through the Suppression of MAPKs and the NF-KB Pathway in Mouse Peritoneal Macrophages. *Am. J. Chin. Med.* **2015**, *43*, 731–742, doi:10.1142/S0192415X15500457.

74. Ramalho, T.R.D.O.; Pacheco De Oliveira, M.T.; Lima, A.L.D.A.; Bezerra-Santos, C.R.; Piuvezam, M.R. Gamma-Terpinene Modulates Acute Inflammatory Response in Mice. *Planta Med.* **2015**, *81*, 1248–1254, doi:10.1055/s-0035-1546169.

7. Publikációs jegyzék

7.1. A doktori disszertáció alapját képező publikációk

Adrienn Horváth, Gábor Vasvári, Sándor Lovász, Györgyi Horváth, Péter Birinyi: Formulation and examination of a new urine alkalizing tablet for the symptomatic treatment of bladder pain syndrome. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2022**, 74, 103537
IF:5,062; Q1 DOI: 10.1016/j.jddst.2022.103537

Adrienn Horváth, Edina Pandur, Katalin Sipos, Giuseppe Micalizzi, Luigi Mondello, Andrea Böszörményi, Péter Birinyi, Györgyi Horváth: Anti-infammatory efects of lavender and eucalyptus essential oils on the *in vitro* cell culture model of bladder pain syndrome using T24 cell. *BMC Complementary Medicine and Therapies* **2022**, 22 (1) 119.
IF: 2,838, Q1 DOI:10.1186/s12906-022-03604-2.

∑IF:7,9

7.2. Egyéb, a disszertációhoz fel nem használt publikációk

Edina Pandur, Giuseppe Micalizzi, Luigi Mondello, **Adrienn Horváth**, Katalin Sipos, Györgyi Horváth: Antioxidant and anti-inflammatory effects of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils prepared at different plant phenophases on *Pseudomonas aeruginosa* LPS activated THP-1 macrophages. *Antioxidants* **2022**, 11 (7), 1330;
IF: 7,675 DOI: 10.3390/antiox11071330

Edina Pandur, Alex Balatinácz, Giuseppe Micalizzi, Luigi Mondello, **Adrienn Horváth,** Katalin Sipos, Györgyi Horváth: Anti-inflammatory effect of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) essential oil prepared during different plant phenophases on THP-1 macrophages. *BMC Complementary Medicine and Therapies* **2021,** 21 (1) 287.
IF: 2,838 DOI: 10.1186/s12906-021-03461-5.

Eszter Csikós, **Adrienn Horváth,** Kamilla Ács, Nóra Papp, Viktória Lilla Balázs, Marija Sollner Dolenc, Maša Kenda, Nina Kočevar Glavač, Milan Nagy, Michele Protti, Laura Mercolini, Györgyi Horváth, Ágnes Farkas: Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia by Natural Drugs. *Molecules* **2021**, 26 (23):7141.
IF: 4,927 DOI: 10.3390/molecules26237141.

Györgyi Horváth, **Adrienn Horváth**, Gréta Reichert, Andrea Böszörményi, Katalin Sipos, Edina Pandur: Three chemotypes of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and their main compounds affect differently the IL-6 and TNFα cytokine secretions of BV-2 microglia by modulating the NF-κB and C/EBPβ signalling pathways. **2021**, 21 (1):148.
IF: 2,838 DOI: 10.1186/s12906-021-03319-w.

Horváth Adrienn, Birinyi Péter: Magisztrális gyógyszerkészítés a Wilson kór terápiájában-retrospektív vizsgálat. *GYÓGYSZERÉSZET* **2022** (elfogadva)

Horváth Adrienn, Birinyi Péter: Allergénspecifikus immunterápia. *GYEREKORVOS TOVÁBBKÉPZÉS* (1589-0309) **2021**, 20 (3.): 145-149

Horváth Adrienn, Ács Kamilla: Fototerápia helyzete, elfogadottsága, az orvosi alkalmazása Európában és Magyarországon. *Terápia Natura* **2020**, ősz, 15-16

Birinyi Péter, **Horváth Adrienn**: A helyes vitamin-, nyomelem- és ásványianyag-bevitel a várandósoknál. *GYÓGYSZERÉSZET* **2019,** 63, 716-722.

Birinyi Péter, **Horváth Adrienn**: A várandósgondozásról-2: Táplálkozási ajánlások várandósoknak. *GYÓGYSZERÉSZET* **2019,** 63, 609-612

Birinyi Péter, **Horváth Adrienn**: A várandósgondozásról-1: Teratogén és fetotoxikus gyógyszerek. *GYÓGYSZERÉSZET* **2019**, 63, 601-608

∑IF:26,178

7.3. Konferencia absztraktok

7.3.1 Előadás absztraktok

Horváth Adrienn, Birinyi Péter: Advanced pharmaceutical care for interstitial cystitis. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVI. Debrecen, Hungary, 10-12 September 2020
ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA **2020,** 90, 60-60

7.3.2.Poszter prezentációs absztraktok - Doktori értekezés alapját képező

Horváth Adrienn, Pandur Edina, Sipos Katalin, Horváth Györgyi: Levendula és eukaliptusz illóolajok gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata hólyagfájdalom szindróma *in vitro* sejtkultúrás modelljében, T24 sejteken. XXV. Tavaszi Szél Konferencia, Pécs, **2022.**05.06-05.08.

7.3.3. Egyéb poszter prezentációs absztraktok

Horváth Adrienn, Pandur Edina, Jánosa Gergely, Pap Ramóna, Sipos Katalin: Interaction of dithiothreitol-induced unfolded protein response and vitamin D in a neuronal cell model. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, 25-27 August, 2022, Pécs Hungary

Jánosa Gergely, Pandur Edina, Pap Ramóna, **Horváth Adrienn**, Sipos Katalin: A D-vitamin selejtfehérje válaszra (unfolded protein response) gyakorolt hatása az idegrendszer vonatkozásában. XXV. Tavaszi Szél Konferencia. Pécs, **2022**.05.06-05.08.

Böszörményi Andrea, Szögi-Tatár Bernadett, **Horváth Adrienn**, Balázs Viktória Lilla, Kovács Judit, Schneider György, Horváth Györgyi: 100%-ban tiszta és természetes: Mi rejlik egy illóolajos üvegben? METT25 a Magyar Elválasztástudományi Társaság

jubileumi konferenciája. Egerszalók, **2021**.10.18.-2021.10.20. Magyar Elválasztástudományi Társaság: P-08. (2021). ISBN: 9786155270666

Birinyi Péter, Tinta Anikó, Árvai István, Hubay Zsuzsa, Vukmann Nikolett, **Horváth Adrienn**: Drug developments for rare diseases. Hungaricus XVI. Debrecen, Hungary, 10-12 September 2020 *ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA* **2020,** 90, 48-49

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt szeretném megköszönni témavezetőimnek a *Dr. Horváth Györgyinek* és *Dr. Birinyi Péternek* a támogatásukat, szakértelmüket és töretlen biztatásukat egész PhD munkám során. Köszönöm a bizalmukat, amelyben részesítettek PhD hallgatójukként. Külön köszönettel tartozom *Prof. Dr. Deli Józsefnek* a Gyógyszertudományok Doktori Iskola, „Biológiailag aktív anyagok izolálása és vizsgálata" c. programjának vezetőjének, aki kutatómunkám során végig támogatott. Szeretném megköszönni *Dr. Sipos Katalinnak* és *Dr. Pandur Edinának*, akik lehetővé tették és támogattak, hogy elsajátíthassam a kutatómunkámhoz nélkülözhetetlen molekuláris sejtbiológiai kutatási módszereket. Köszönettel tartozom *Dr. Bencsik Tímeának*, aki segítette és figyelemmel kísérte a kutatómunkámat a PhD hallgató első éveimben.

Ezúton szeretném megköszönni minden kollégáimnak a töretlen támogatását az évek alatt. Köszönöm *Dr. Böszörményi Andreának* az eukaliptusz illóolajának GC analízisét (Semmelweis Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Farmakognóziai Intézet), illetve *Giuseppe Micalizzi*-nek és *Luigi Mondello*-nak (Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina) a levendula illóolajok GC vizsgálatát. Köszönöm *Dr. Vasvári Gábornak* (Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai Intézet) a tabletta kioldódási számolásoknál nyújtott segítségét. Valamint köszönöm az urológus kollégáknak, hogy megosztották velünk a tapasztalataikat, ezzel segítve munkánkat.

Végezetül nagy hálával tartozom családomnak és barátaimnak, akik végig támogattak és lelkesítettek. Külön köszönet illeti a *szüleimet*, akik erkölcsi és anyagi támogatással végig segítettek tanulmányaimon, illetve szeretném megköszönni *páromnak* a feltétel nélküli támogatását, a végtelen türelmét és biztatását.

Mellékletek

1. melléklet: Dietetikai kérdőív

Gyógyszerek, gyógyszernek nem minősülő termékek, étkezési és életviteli szokások hatása az interstitialis cystitis (hólyagfájdalom szindróma) tüneteire-kérdőíves felmérés

Beteg -beleegyező nyilatkozat

A hólyagfájdalom szindróma egyelőre egy kevésbé ismert betegség, amely egyre több embert érint világszerte. Az érintettek száma Magyarországon is 20.000 főre becsülhető. A kérdőívből nyert adatok az egészségügyi ellátás színvonalát hivatottak javítani. Az Ön hozzájárulása segíthet annak megértésében, hogy a hólyagfájdalom szindróma kialakulását követően milyen tényezők befolyásolják pozitív, illetve negatív irányba a terápia kimenetelét. Az adatokat név nélkül gyűjtjük és kezeljük, kérjük, ne adjon meg semmilyen olyan adatot, amely segítségével az Ön személyazonossága kideríthető.

A kérdőív kitöltése előtt a vizsgálat céljára és az adatkezelésre vonatkozó tájékoztatást megkaptam. Elfogadom és részt kívánok venni a felmérésben. Tudomásul veszem, hogy a
kérdőív kitöltésének befejezése előtt bármikor jogomban áll ezen beleegyezésemet

1. A fent leírtakat: *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- Elfogadom
- Nem fogadom el

2. Korosztály *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- 30-40
- 40-50
- 50-60
- 60-

indoklás nélkül visszavonni.

3. Nem *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- nő
- férfi

4. Az Ön legmagasabb iskolai végzettsége: *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- alapfokú
- középfokú
- felsőfokú
- posztgarduális képzés
- egyéb

5. Lakhelyének jellege *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- város
- falu

6. Hány évnyi panaszos állapot után diagnosztizálták a betegségét? *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- kevesebb mint 1 év
- 1-2
- 2-3
- 3-4
- több mint 4 év

7. Milyen panasszal kereste fel az orvosát? *

Válassza ki az összeset, amely érvényes.

- [ ] gyakori vizelési inger
- [ ] hólyagtáji fájdalom
- [ ] véres vizelet
- [ ] hüvelyfájdalom
- [ ] húgycsőfájdalom
- [ ] egyéb

8. Mikor diagnosztizálták a betegségét? *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- ( ) kevesebb mint 1 éve
- ( ) 1-2
- ( ) 2-3
- ( ) 3-4
- ( ) több mint 4 éve

9. Kap-e kezelést azóta? *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- ( ) igen
- ( ) nem

10. Hogyan változott az állapota kezelések hatására? *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- ( ) romlott
- ( ) változatlan
- ( ) kicsit javult
- ( ) sokat javult
- ( ) teljesen panaszmentes

11. Milyen gyógyszereket szedett az interstitialis cystitis betegség megállapitása elött? *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- fájdalomcsillapítók
- antibiotikumok
- gyógynövény készítmények
- egyéb

12. Egyéb:

_____

13. Szedett-e olyan gyógyszert, amitől romlott az állapota? *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- igen
- nem

14. Ha előző kérdésre a válasza igen, milyen gyógyszert?

_____

15. Milyen gyógyszereket írt fel a kezelő orvosa? *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- SP54
- Teperin
- Atarax
- Claritin
- Cataflam
- Tramadol
- "speciális hólyagkoktél"
- egyéb

16. Egyéb:

_____

17. Van-e más krónikus betegsége? (pl. magas vérnyomás, magas koleszterinszint, asztma, ízületi panaszok, szívritmuszavarok, stb.) *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- igen
- nem

18. Ha előző kérdésre a válasza igen, kérjük jelölje azt:

Válassza ki az összeset, amely érvényes.

- [ ] magas vérnyomás
- [ ] magas koleszterinszint
- [ ] asztma
- [ ] biabétesz/ cukorbetegség
- [ ] reflux
- [ ] allergia
- [ ] egyéb

19. Egyéb:

20. Csak nők részére: Vett-e észre összefüggést a panaszainak erőssége és a menstruációs ciklusának különböző fázisai között?

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- igen
- nem

21. Ha az előző válasza igen, mit tapasztalt?

22. A hólyagfájdalom szindróma diagnosztizálását követően megváltoztatta-e az étkezési szokásait? *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- igen
- nem

23. Ha előző válasza igen, milyen módon?

24. Hány liter folyadékot fogyaszt naponta átlagosan? *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- ( ) kevesebb mint 1 liter
- ( ) 1-2 liter között
- ( ) 2-3 liter között
- ( ) 3 liter felett

25. Korábban fogyasztott-e valamit a felsorolásból? Tejtermékek: *

Válassza ki az összeset, amely érvényes.

- [ ] tej
- [ ] joghurt
- [ ] tejföl
- [ ] túró
- [ ] hosszú ideig érlelet sajtok
- [ ] nem fogyasztottam korábban ilyen tejtemékeket

26. Most fogyaszt-e valamit a felsorolásból? Tejtermékek: *

Válassza ki az összeset, amely érvényes.

- [ ] tej
- [ ] joghurt
- [ ] tejföl
- [ ] túró
- [ ] hosszú ideig érlelet sajtok
- [ ] nem fogyasztok ilyen tejtermékeket

27. Korábban fogyasztott-e valamit az alábbi felsorolásból? Italok: *

Válassza ki az összeset, amely érvényes.

- [ ] kávé
- [ ] koffeinmentes kávé
- [ ] zöld tea
- [ ] fekete tea
- [ ] energiaital
- [ ] nem fogyasztottam korábban ilyen italokat

28. Most fogyaszt-e valamit az alábbi felsorolásból? Italok: *

Válassza ki az összeset, amely érvényes.

- [ ] kávé
- [ ] koffeinmentes kávé
- [ ] zöld tea
- [ ] fekete tea
- [ ] energiaital
- [ ] nem fogyasztok ilyen italokat

29. Milyen italok fogyasztása esetén észlelte a tünetek fokozódását?

_____

30. Korábban fogyasztott-e valamit az alábbi felsorolásból? Zöldségek: *

Válassza ki az összeset, amely érvényes.

- [ ] vörös hagyma
- [ ] zöldhagyma
- [ ] paradicsom
- [ ] bab
- [ ] burgonya
- [ ] nem fogyasztottam korábban ilyen zöldségeket

31. Most fogyaszt-e valamit az alábbi felsorolásból? Zöldségek: *

Válassza ki az összeset, amely érvényes.

- [ ] vörös hagyma
- [ ] zöldhagyma
- [ ] paradicsom
- [ ] bab
- [ ] burgonya
- [ ] nem fogyasztok ilyen zöldségeket

32. Korábban fogyasztott-e valamit az alábbi felsorolásból? Gyümölcsök: *

Válassza ki az összeset, amely érvényes.

- [ ] alma
- [ ] banán
- [ ] görögdinnye
- [ ] sárgabarack, őszibarack
- [ ] fekete áfonya
- [ ] nem fogyasztottam korábban ilyen gyümölcsöket

33. Most fogyaszt-e valamit az alábbi felsorolásból? Gyümölcsök: *

Válassza ki az összeset, amely érvényes.

- [ ] alma
- [ ] banán
- [ ] görögdinnye
- [ ] sárgabarack, őszibarack
- [ ] fekete áfonya
- [ ] nem fogyasztok ilyen gyümölcsöket

34. Milyen ételek fogyasztása után romlottak a tünetei? *

35. Fogyaszt-e alkoholt? *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- igen, rendszeresen
- igen, de csak ritkán
- nem

36. Szereti-e a csípős ízű ételeket? *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- igen
- nem

37. Van-e valamilyen ételallergiája vagy laktóz intoleranciája? *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- igen
- nem

38. Ha előző válasza igen, kérjük jelölje

Válassza ki az összeset, amely érvényes.

- [ ] fruktóz intolerancia
- [ ] laktóz intolerancia
- [ ] glutén érzékenység
- [ ] mogyorú, dió allergia
- [ ] tojás allergia
- [ ] szója allergia
- [ ] egyéb

39. Egyéb

_____

40. Fogyaszt-e egyéb termékeket? (pl. vitaminok, étrendkiegészítők, pezsgőtabletták stb.) *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- ( ) igen
- ( ) nem

41. Ha előző válasza igen, kérjük sorolja fel:

_____

_____

_____

_____

_____

42. Valamely formában alkalmaz gyógynövényeket? (pl. tea, tabletta, kapszula stb.) *

Soronként csak egy oválist jelöljön be.

- rendszeresen
- ritkán
- soha

43. Ha előző válasza rendszeresen vagy ritkán, milyen gyógynövényeket?

Válassza ki az összeset, amely érvényes.

- [ ] orvosi medveszőlő
- [ ] tőzegáfonya
- [ ] aranyvessző
- [ ] csalán
- [ ] hibiszkusz
- [ ] citromfű
- [ ] nyírfa
- [ ] egyéb

44. Egyéb:

_____

45. Vannak-e olyan gyógynövények, amelyek enyhítik panaszait?

_____

_____

_____

_____

_____

Köszönjük, hogy segítette a munkákat a kérdőív kitöltésével!

2. melléklet: A Vizelet pH vizsgálathoz szükséges tudnivalók

1) A pH mérő készüléket vegye ki a TOP Safe védőtokból és készítse elérhető közelségbe. Ekkor még ne vegye le az elektrolittal feltöltött tartókupakot.

2) A szokásos módon vegyen vizeletet, tiszta körülmények között, a frissen, csapvízzel vízzel kiöblített vizelettartó edénybe, és az edényt tegye elérhető közelségbe. Vigyázzon, hogy a vizelet a mérésig ne szennyeződjön.

3) Óvatosan vegye le a készülék tartókupakját és kapcsolja be a készüléket az ON/HOLD gombbal (jelzőfények felvillannak, és a készülék "mérő" üzemmódba vált).

4) Az eszközön be van állítva az Auto-Hold és Auto-Off funkció, így az eredményeket a készülék automatikusan elmenti, illetve 10 mp után a készülék automatikusan kikapcsol.

5) Mossa le a pH mérő készülék szondáját (elektródáját) híg szappanos vizes oldattal, majd ezt követően öblítse le 40 °C-nál hidegebb csapvízzel.

6) A készülék szondáját (elektródáját) tegye bele a vizeletbe.

7) Indítsa el a mérést az ON/HOLD gomb rövid megnyomásával.

8) Az Auto-Hold funkció miatt a mérés alatt képernyőn addig villog az Auto-Hold felirat, amíg a mért pH-érték stabil nem lesz. Ekkor az Auto-Hold folyamatosan fog világítani, a mért érték pedig nem változik, és a készülék egy hangjelzést is ad. Amennyiben 300 másodperc után sem stabil a mért pH érték, a mérés abbamarad.

9) Olvassa le az eredményeket, azaz a hőmérsékletet és a pH értéket. Írja fel az eredményeket a dátum és a pontos idő rögzítésével. Az értékeket a készülék automatikusan rögzíti ezért szükség esetén visszaolvashatók.

10) Kapcsolja ki a készüléket az ON/HOLD gomb hosszan tartó lenyomásával vagy hagyja, hogy 10 mp után a készülék automatikusan kikapcsoljon.

11) Mossa le a pH mérő készülék elektródáit híg szappanos vizes oldattal, majd ezt követően 40 °C-nál hidegebb csapvízzel. Törölje szárazra az eszközt papírtörlővel, de ne dörzsölgesse!

12) Helyezze vissza tartókupakot. Az elektrolittal feltöltött tartókupak nélkül a készülék nem tárolható.

13) A megszárított készüléket helyezze vissza a védőtokba, és függőlegesen tárolja a következő mérésig.

14) A vizelettartó edényt is öblítse el csapvízzel.

15) Vizelet-mintavétel és mérés legalább három óra gyakorisággal szükséges, napi egyenletes elosztásban.

16) Biztosítsa a napi 2-2,5 l folyadékbevitelt.

17) A készülékhez mellékelt részletes használati utasítást tanulmányozza, ha szükséges.

18) Forduljon munkatársunkhoz, amennyiben bármilyen kérdése van.

FIGYELMEZTETÉS: Az eszköz hegye üvegből készült, ezért törékeny! Amennyiben a mért anyagban üvegszilánkok maradnak, az sérüléseket okozhat. Minden egyes mérés után győződjünk meg róla, hogy a pH-mérő hegye nem sérült.

3. melléklet: Az eukaliptusz illóolaj és a levendula illóolajok (elő- és utóvirágzás) komponenseinek százalékos (%) és relatív koncentrációja (ng/ml)

		Komponensek százalékos aránya az illóolajban[a]			**A komonensek realtív koncentrációja a vizsgálat során (ng/ml)[b]**		
Komponensek	**LRI_{exp}**	**levendula IO: elővirágzás**	**levendula IO: utóvirágzás**	**eukaliptusz IO**	**levendula IO: elővirágzás**	**levendula IO: utóvirágzás**	**eukaliptusz IO**
Triciklén	923	0,02	0,01	n.d	0,34	0,17	n.d
α-Tujon	925	0,18	0,2	n.d	3,36	3,74	n.d.
α-Pinén	933	0,36	0,32	6,32	6,33	5,62	108,45
Kámfén	949	0,34	0,19	n.d.	6,12	3,42	n.d.
Sabinen	972	0,11	0,06	n.d.	1,98	1,08	n.d.
β-Pinén	977	0,15	0,06	0,70	6,54	2,62	12,03
Oktán-3-on	984	0,35	0,75	n.d.	5,60	12,00	n.d.
Mircén	988	1,62	1,35	1,00	25,90	21,60	15,82
Butil-butanoat	994	0,04	0,02	n.d.	0,72	0,36	n.d.
n-Dekan	999	0,03	0,03	n.d.	0,42	0,42	n.d.
α-Fellandrén	1006	0,02	0,02	1,60	0,34	0,34	27,20
δ-3-Karén	1009	0,27	0,09	n.d.	4,67	1,56	n.d.
Hexil-acetát	1011	0,15	0,04	n.d.	2,61	0,69	n.d.
α-Terpinén	1017	0,03	0,02	0,50	0,48	0,32	8,37
o-Cimén	1019	0,05	0,03	n.d.	0,88	0,53	n.d.
p-Cimén	1024	0,67	0,81	n.d.	11,52	13,93	n.d.
Limonén	1029	1,1	0,62	n.d.	18,52	10,44	n.d.
β-Fellandrén	1030	0,24	0,06	n.d.	3,93	0,98	n.d.
Eukaliptol	1032	0,48	0,32	82,3	8,84	5,89	1515,96
(Z)-, β-Ocimén	1034	3,43	1,33	n.d.	53,23	20,64	n.d.
(E)-, β-Ocimén	1045	0,77	0,48	n.d.	12,32	7,68	n.d.
γ-Terpinén	1058	0,02	0,02	3,20	0,32	0,32	54,40
(Z)-Linalool oxid	1070	0,18	0,16	n.d.	3,40	3,02	n.d.
Terpinolén	1086	0,04	0,26	n.d.	0,72	4,68	n.d.
(E)-Linalool oxid	1087			n.d.			n.d.

p-Cimén	1091	0,11	0,11	n.d.	1,92	1,92	n.d.
α-Naginatén	1091						
Linalool	1099	36,33	41,63	n.d.	632,00	724,00	n.d.
3-Acetoxy-oktén	1107	0,8	0,76	n.d.	14,40	13,68	n.d.
allo-Ocim-(4E,6Z)-én	1128	0,58	0,19	n.d.	9,41	3,08	n.d.
(E)-Miroxid	1139	0,09	0,06	n.d.	1,58	1,06	n.d.
Hexil-isobutirát	1146	0,03	0,03	n.d.	0,52	0,52	n.d.
Kámfor	1148	0,29	0,36	n.d.	5,80	7,20	n.d.
Nerol-oxid	1152	0,03	0,03	n.d.	0,57	0,57	n.d.
Terpinén-4-ol	1182	9,47	16,69	1,90	176,71	311,43	35,38
Kripton	1188	0,87	0,27	n.d.	16,20	5,03	n.d.
Hexil-butirát	1190	0,59	0,62	n.d.	10,62	11,16	n.d.
α-Terpineol	1197	4,27	5,23	1,50	80,28	98,32	27,90
Bornil- formát	1230	0,02	0,03	n.d.	0,41	0,61	n.d.
Nerál	1239	0,01	0,02	n.d.	0,17	0,34	n.d.
Kuminaldehid	1244	0,11	0,05	n.d.	2,20	1,00	n.d.
Karvon	1245	0,11	0,06	n.d.	1,98	1,08	n.d.
Linalil-acetát	1249	21,47	14,78	n.d.	386,46	266,04	n.d.
Geraniol	1252	0,11	0,19	n.d.	1,98	3,42	n.d.
Geranial	1269	0,05	0,03	n.d.	0,86	0,51	n.d.
Lavandulil-acetát	1283	2,35	1,1	n.d.	44,51	20,83	n.d.
Bornil-acetát	1285	0,18	0,14	n.d.	3,60	2,80	n.d.
Hexil-tiglát	1325	0,06	0,07	n.d.	1,07	1,25	n.d.
α-Terpinil- acetát	1347	0,07	0,07	n.d.	1,26	1,26	n.d.
Neril-acetát	1357	1,64	1,46	n.d.	29,52	26,28	n.d.
Geranil- acetát	1377	3,19	2,92	n.d.	57,42	52,56	n.d.
Hexil-hexanoát	1385	0,01	0,03	n.d.	0,18	0,54	n.d.
7-*epi*-Sesquitujon	1387	0,03	0,03	n.d.	0,54	0,54	n.d.
α-(Z)-Bergamotén	1413	0,03	0,01	n.d.	0,53	0,18	n.d.
α-Szantalén	1419	1,98	1,18	n.d.	35,64	21,24	n.d.

(E)-Kariofillén	1421						
α-, (E)-Bergamotén	1433	0,08	0,04	n.d.	1,42	0,71	n.d.
Kumarin	1439	0,02	0,01	n.d.	0,48	0,24	n.d.
α-Himachalén	1444	0,04	0,03	n.d.	0,80	0,60	n.d.
epi-, β-Szantalén	1447	0,04	0,02	n.d.	0,71	0,36	n.d.
(E)-, β-Farnesén	1452	1,51	1,3	n.d.	24,37	20,98	n.d.
α-Humulén	1457	0,07	0,04	n.d.	1,19	0,68	n.d.
Sesquisabinén	1458	0,04	0,01	n.d.	0,72	0,18	n.d.
(Z)-Murola-4(14),5-dién	1463	0,03	0,01	n.d.	0,54	0,18	n.d.
Germakrén D	1483	0,05	0,03	n.d.	0,85	0,51	n.d.
β-, (E)-Bergamotén	1484	0,04	0,03	n.d.	0,71	0,53	n.d.
γ-Kadinén	1514	0,65	0,33	n.d.	11,70	5,94	n.d.
(E)-Kalamenén	1522	0,06	0,03	n.d.	1,20	0,60	n.d.
Kariofillén-oxide	1585	0,9	0,98	n.d.	18,00	19,60	n.d.
1-,10-di-*epi*-Kubenol	1618	0,05	0,06	n.d.	0,95	1,14	n.d.
(Z)-β-Terpineol	1147	n.d.	n.d.	0,6	n.d.	n.d.	11,00
1,2,3,4,4a,7,8,8a-Oktahidro-, 4-isopropil-, 1,6-dimetil-nafth-1-ol	1645	0,31	0,79	n.d.	6,66	16,97	n.d.
Total		99,35	99,27	99,50			

* LRI exp: experimental linear retention index.
* n.d.: nem detektálható

A doktori disszertáció alapját képező publikációk

Dr. Horváth Adrienn

Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Biológiailag aktív anyagok izolálása és vizsgálata program

Doktori iskola vezető: Prof. Dr. Pintér Erika
Programvezető: Prof. Dr. Deli József
Témavezetők: Dr. Horváth Györgyi és Dr. Birinyi Péter

Pécsi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
OGYDHT Pécs
2022

Journal of Drug Delivery Science and Technology 74 (2022) 103537

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst

Formulation and examination of a new urine alkalizing tablet for the symptomatic treatment of bladder pain syndrome

Adrienn Horváth [a], Gábor Vasvári [b], Sándor Lovász [c], Györgyi Horváth [d], Péter Birinyi [e,*]

[a] Adrienn Horváth Department of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, H-7624, Rókus u. 2, Pécs, Hungary
[b] Gábor Vasvári Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Debrecen, H-4032, Nagyerdei krt. 98, Debrecen, Hungary
[c] Sándor Lovász, Rózsakert Medical Center, H-1026, Gábor Áron u. 74-78, Budapest, Hungary
[d] Györgyi Horváth Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, H-7624, Rókus u. 2, Pécs, Hungary
[e] Péter Birinyi Department of Pharmacodinamics, Faculty of Pharmacy, Semmelweis University, H - 1085, Üllői út 26, Budapest, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:
Interstitial cystitis
Bladder pain syndrome
Alkalization
Potassium-free
Prolonged-release tablet
Increased urinary pH

ABSTRACT

The bladder pain syndrome is a condition with frequent urinary complaints and significant bladder pain. The problem is caused by the loss of the barrier function of the GAG-layer against the irritant substance in the urine, resulting a chronic inflammation of non-bacterial origin.

Our aim was to create a potassium-free, prolonged-release tablet that provides a pH of about 7 by alkalizing the urine, reducing pain and provides proper patient adherence.

Powder blends were formulated, their powder flow was tested and tablets were prepared by direct compression of the powder mixtures with the best flow properties. Dissolution characteristics of the hydrophilic matrix tablets were evaluated, appropriate candidate was selected for a clinical study involving 20 adult patients, previously diagnosed with bladder pain syndrome.

Summarizing the results, an effective alkalizing tablet, causing fewer side effects has been developed for interstitial cystitis/bladder pain syndrome patients. We can conclude that our objectives have been achieved, because the prolonged-release and potassium-free tablet, effectively increases urinary pH, does not irritate the wall of the stomach, and the bladder, which is especially sensitive to potassium.

1. Introduction

Interstitial cystitis (IC) also called bladder pain syndrome (BPS) or painful bladder syndrome (PBS) is a chronic nonbacterial inflammatory disease. In 2002, the International Society for Continence adopted the term painful bladder syndrome. Later, in 2004, the name was changed to bladder pain syndrome because the international consultation on incontinence argued the previous name. After all, the name did not focus on the complexity of the actual symptom. Recently, the name and definition have been refined based on newer findings [1]. The American Urological Association (AUA) also uses the IC/BPS terminology of the Society for Urodynamics and Women's Urology (SUFU) [2], which is precisely defined as "An unpleasant sensation (pain, pressure, discomfort) perceived to be related to the urinary bladder, associated with lower urinary tract symptoms of more than six weeks duration, in the absence of infection or other identifiable causes" [3]. This special disease causes bladder pain and lower urinary tract symptoms, such as pain with or without urgency, frequency, nocturia, and sometimes bloody urine. Symptoms and severity can vary according to stages. Some patients experience only mild discomfort and pressure in the bladder with more frequent urination. However, in advanced stages, people can suffer from extreme pain, sometimes even permanent accompanied by a constant urge to urinate day and night. It is well documented that IC/BPS severely impacts quality of life. It very often leads to depression and impaired sexual function of the patients. Although there are several theories on the etiology of IC/BPS, the cause is not known exactly, and therefore, no definite cure is available either [4–6]. The only background for the development of complaints, the insufficiency of the superficial mucus layer of the bladder, has been proven. This layer consists of glycosaminoglycan (GAG) (Fig. 1) [7]. The proteoglycans and glycoproteins in the GAG layer form a dense layer that protects the pain receptors in the submucosa from urinary excitatory substances such as

* Corresponding author.
E-mail addresses: horvath.adrienn2@pte.hu (A. Horváth), vasvari.gabor@pharm.unideb.hu (G. Vasvári), lovasz.sandor@chello.hu (S. Lovász), horvath.gyorgyi@gytk.pte.hu (G. Horváth), peter.birinyi@gmail.com (P. Birinyi).

https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103537
Received 13 April 2022; Received in revised form 17 June 2022; Accepted 19 June 2022
Available online 21 June 2022
1773-2247/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

salts, acids, degradation products. This barrier layer is not completely impermeable, but in its intact, undamaged state, it maintains a balance between in and out streaming of fluids and ions. The problem is caused by the loss of the barrier function of the GAG-layer against the irritant substances in the urine. This results in a chronic chemical irritation and an inflammation of nonbacterial origin (sterile inflammation) in the bladder wall [8,9]. The injury of the bladder mucosa is supported by the analysis of biopsy specimens taken from patients with IC/BPS. Loss of the barrier function causes histopathological and molecular changes [10]. An example of them is the appearance of Hunner lesions that show diffuse and intense inflammation due to overexpression of pro-inflammatory genes [11,12].

Treatment strategies consist of oral-, and/or topical (intravesical) treatments, furthermore surgery, or combinations thereof. We studied the main guidelines, the Guideline of the American Urological Association (AUA) and the Canadian Urological Association (CUA), European Urological Association (EUA), and Japanese Urological Association (JUA). All of them contains pain management and medication recommendation:

- Orally: pentosan polysulfate, amitriptyline, cimetidine, hydroxyzine, cyclosporine A
- Intravesically: Heparin, Dimethyl sulfoxide, Lidocaine

Intravesically, in addition to the aforementioned treatments, the CUA, EUA, and JUA recommend hyaluronic acid, chondroitin sulfate and oxybutynin [13–16]. Some articles suggest other intravesical therapy for IC/BPS; containing heparin, hyaluronic acid, chondroitin sulfate, pentosan polysulfate, dimethyl sulfoxide, and botulinum toxin [17].

In the clinical practice GAG replenishing substances (supplements) can be used. Some of such products are already available to patients, like ialuril®containing chondroitin sulfate, hyaluronic acid, calcium chloride, Cystistat®; Hyacyst® containing sodium hyaluronate, and Elmiron® containing pentosan polysulfate, which forms a gel-like layer on the apical cell membrane. Therefore, they help the permeation barrier to regenerate. These active components are used alone or in combination and significant success rates have been reported in patients with IC/BPS [18,19].

It is essential to know that potassium sensitivity differentiates patients with interstitial cystitis from the other sensory disorders of the bladder. Therefore, it was initially recommended to perform a potassium sensitivity test. However, it is not routinely used any longer as it is also ethically questionable because of causing extra pain to the patient. Therefore, therapy aims to avoid increased urine potassium levels to prevent worsening of symptoms [20]. The urine pH is also important because the acidic urine irritates the bladder and increases the pain [14, 21]. Urinary alkalinity can be influenced by proper diet, forced fluids intake, and the use of citrates or sodium bicarbonate [22,23]. Citrate salts alkalize urine. For alkalization, a weak acid salt of a strong base is formed. Citrate ions of alkaline citrates are converted to carbon dioxide by oxidative metabolism. They are converted to bicarbonate. The excess base due to the remaining alkali ions is excreted in the urine and increases the pH of the urine. Oral administration of alkaline citrates leads to neutralization or alkalization of urine, depending on the dosage. Serum bicarbonate concentration (negative base excess) is a regulatory factor for citrate secretion. With a negative base excess, the metabolic process moves in an alkaline direction by shifting the value of intracellular pH. This leads to alkalosis-induced inhibition of renal tubular citrate metabolism and decreased citrate resorption as well as increased citrate secretion. Alkalization also affects renal calcium transport in such a way that urinary calcium excretion is significantly reduced. Increased diuresis, and citrate excretion, as well as decreased calcium excretion reduce the potential for calcium oxalate formation, as citrate forms a stable complex with calcium in a weakly alkaline medium. The bioavailability of citrate salts is 100%, they are perfectly degradable. Moreover, citrate salts do not accumulate in the body. As an example, citrate-containing product Blemaren-N® can be mentioned. However, this formulation could be disadvantageous in several aspects: It

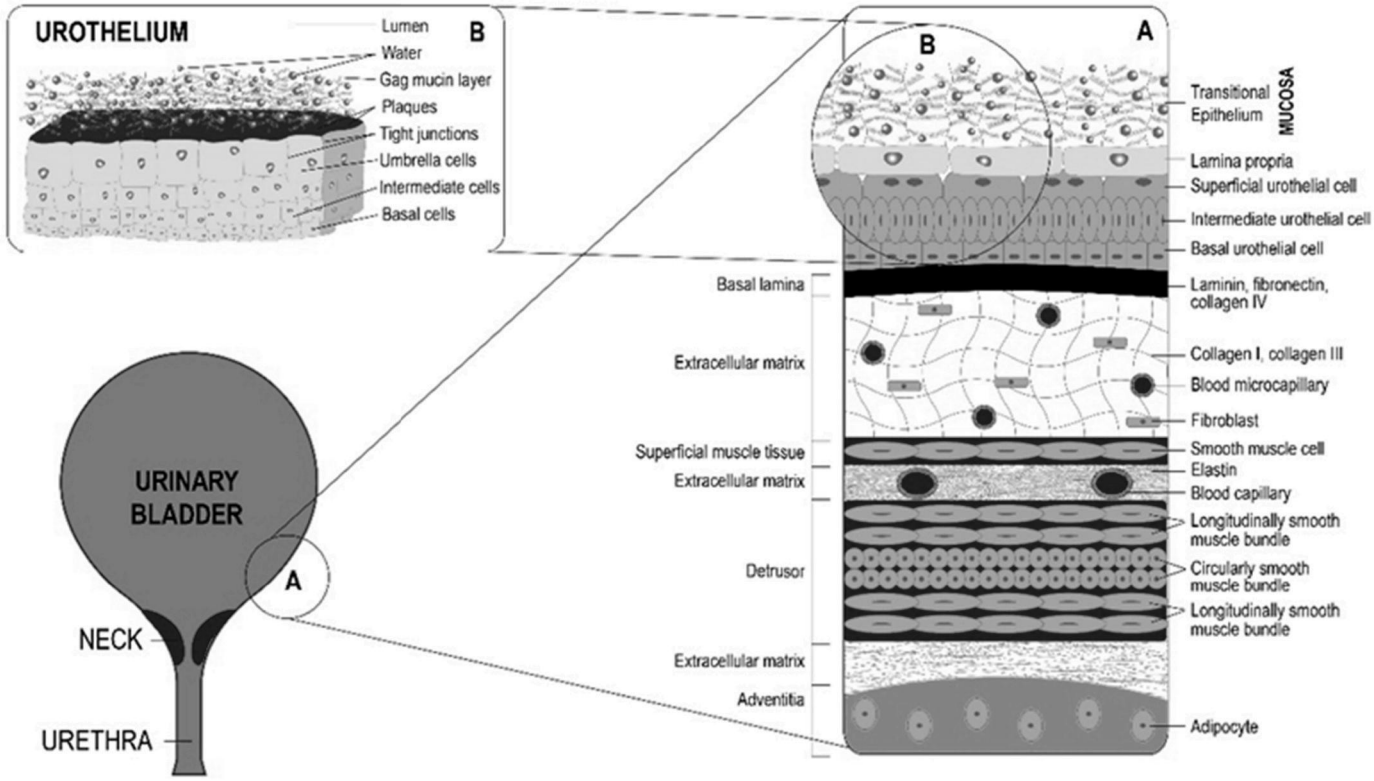


Fig. 1. The bladder structure.

increases urinary potassium levels and therefore severely irritates the inner wall of the bladder in IC/BPS patients.

Taking into account the pharmacokinetic parameters, the amount of sodium and magnesium ingested in one day is entirely eliminated by the kidneys within 24–48 h. During long-term treatment, the daily amounts of excreted sodium and magnesium correspond to the daily intake. Gas and electrolyte levels in blood and serum do not change significantly. This means that by renal regulation of alkalization, the acid-base balance is maintained in the body, and the possibility of accumulation of sodium and magnesium is ruled out in the case of proper renal function [24].

Matrix tablets are solid oral dosage forms. This system is very popular for modified release formulations. The definition of modified release by EMA: "Preparations where the rate and/or place of release of the active substance(s) is different from that of the conventional dosage form administered by the same route. This deliberate modification is achieved by special formulation design and/or manufacturing method. Modified release dosage forms include prolonged release, delayed release, pulsatile release and accelerated release dosage forms" [25]. The active substance may be homogeneously dispersed or dissolved in hydrophilic or hydrophobic polymers in matrices. The preparation of sustained release matrix tablets involves the direct compression of powder mixture of active subtances, retardant material and other additives [24].

We aimed to develop a potassium-free prolonged-release tablet that significantly alkalizes the urine. Important aspect was that the treatment is effective locally, reduce persistent pain, eliminates side effects e.g. gastro-oesophageal reflux, and provides proper patient adherence by a convenient dosage of twice a day. Another aim was to test the efficacy of the new formulation in a randomized double-blind, placebo-controlled clinical pilot study.

2. Materials and method

Materials: Citric acid, sodium citrate, magnesium citrate, colloidal silicon dioxide and magnesium stearate were purchased from Hungaropharma Ltd. (Budapest, Hungary). A high water-binding excipient was used Avicel DG (IMCD Group B.V.,Vienna, Austria) and Benecel K4M PH DC, Benecel K15 M PH DC, and Bencel K100 M PH DC (Ashland Inc., Kentucky, USA) are high viscosity HPMCs were applied. The Benecel™ hypermellose consists of a metoxy content of 20–24% and a hydroxypropil content of 7–12%. These conform to US Pharmacopoeia requeriment for type 2208 subtitution of hypermellose [26]. Hydrophilic matrix may be formulated by direct compression of the blended mixture of active subtances and certain hydrophilic carriers. Such as a hydrophilic carriers is the hydroxipropylmethylcellulose (HPMC). The HPMC is the most widely used semi-synthetic polymer in hydrophilic matrix systems. The best grades to use for sustained release formulations are K4M and K100 M due to their high tensile strength [27]. The "PH" mark indicates that it meets Pharmacopoeia quality and the "DC" mark indicates that it is suitable for direct compression. Avicel DG is a compound of microcrystalline cellulose and anhydrous dibasic calcium phosphate. Avicel DG is an excipient used in dry granulation processes. In addition, this excipient facilitates the compression of the solid pharmaceutical form by improving the robustness of the process, the hardness of the tablet. Furthermore, Avicel DG was chosen because it successfully improves the rheological properties of the formulation for hygroscopic substances.

2.1. Powder blend for direct compression

The first phase of the formulation required special excipients due to the hygroscopic character of magnesium citrate (Ph. Eur.10.). Each active ingredient was powdered separately in a mortar and after sieved until a particle size of 160 μm was obtained, in accordance with the European Pharmacopoeia 10. Then a total of 0.5% anhydrous colloidal silicon dioxide was added to each component in portions with continuous mixing. After homogenization of the active ingredients, the desired lubricating effect is ensured with 0.5% magnesium stearate excipient. A high water-binding excipient called Avicel DG was used to optimize the rheological properties of the blend. The compositions of the blends are shown in Table 2. In all cases the active subtances were the same amount (60%), because the basic immediate release citrate tablet containing 60% by active subtances was efficient previously . The active substances of the tablets were determined based on the empirical experience of Sándor Lovász, MD, PhD, urologist. Based on the literature [27,29,30], high viscosity HPMC is one of the best options for the preparation of prolonged-release tablets. Three pre-selected Benecel types, namely Benecel K4M PH DC, Benecel K15 M PH DC, and Bencel K100 M PH DC, were used as release rate controlling agents [28]. Powder blends were prepared with five different Avicel DG/Benecel PH DC ratios, using the three different Benecel grades (Table 1). The blends listed in Table 1 were tested to determine their flow properties.

2.2. Powder flow

Flow properties of the 15 different compositions (Hausner ratio and Carr's compressibility index) were determined according to Ph. Eur.10. chapter 2.9.16. ASTM funnel was used for the outflow time determination and for calculating the angle of repose, using the following equation (Eq. (1)). [31].

$$tg\alpha = \frac{h}{d/2} \tag{1}$$

where α is the angle of repose, h and d is the height and the diameter of the powder cone, respectively.

2.3. Tablet compression and physical properties

Based on the rheological results (Hausner ratio and Carr's compressibility index, outflow time) and preliminary dissolution tests three mixtures, namely A/3, B/3, C/3 were selected for direct compression. A Korsch single-punch tablet press equipped (Korsch, Berlin, Germany) with oval shape puches (dye: 7.6 mm, tablet height: 16.2 mm). Compression forces were 10 kN in all cases (4000 tablets/min).

For comparison study the immediate-release tablets with 60% of the active agents (citric acid, sodium citrate, magnesium citrate) were compressed. Average weight of the tablet was 643 ± 2.44 mg.

Uniformity of mass of single-dose preparation (AP224W analytical balance, 220 g/0.1 mg), friability of uncoated tablets (Erweka TAR220 friability tester; ERWEKA GmbH, Langen, Germany) and resistance to crushing of tablets (Erweka TBH 125 tablet hardness tester) was performed according to Ph. Eur.10.

2.4. Dissolution test

Rotating paddle method was used (ERWEKA DT700 and Microette plus 6 autosampler and content uniformity test (Dionex UltiMate 3000 UHPLC + focused with UV detection; Thermo Fisher Scientific Inc., Budapest, Hungary) with the following test parameters: temperature 37 °C, 75 rpm, dissolution media: 900 mL of pH 6.8 phosphate buffer and 2.4 mL of sample volume. HPLC analyses of the active substance content was performed as follows: 1 mL of the sample was acidified with 20 μL of HPLC grade phosphoric acid. A Lichosper 18 °C 250 × 6 mm column was used for the analysis. The determinations were carried out in isocratic conditions at 26 °C. The flow rate of the mobile phase was 1.2 mL min-1. The injection volume was 10 μL. The eluent was 0.05% H_3PO_4/H_2O; (10% H_2O/MeOH column wash only). The limit of detection (LOD) was 0.0607 mg/L. Three parallel dissolution studies were performed, $n = 6$ was in all cases.

Table 1
Different viscosity of Benecel™ grades (from Ashland [28]).

Grade	Weight Average Molecular Weight	Solution Concentration	Nominal Viscosity(mPa*s)[a]	Application	Avareage partical size(μm); D_{90}
Benecel™ K4M PH DC	400.000	2%	2.700–5.040	Controlled released	184 ± 0.2
Benecel™ K15 M PH DC	575.000	2%	13.500–25.200	Controlled released	191 ± 0.5
Benecel™ K100 M PH DC	1.000.000	2%	75.000–140.000	Controlled released	182 ± 0.7

*'K' identifies type of HPMC.; 'PH' Pharmacopoiea; 'DC' direct compression.
[a] NF/EP/JP viscosity method.

Table 2
Composition of the powder blends.

Sample ID	1	2	3	4	5
Active substances	60%	60%	60%	60%	60%
Magnesium- stearate	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Colloidal silicon dioxide	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Benecel [a]	30%	25%	20%	15%	10%
Avicel DG	9%	14%	19%	24%	29%

[a] Type of Benecels

2.5. Dissolution data analysis

A model-independent analysis was performed to determine the comparability of the dissolution profiles of the tested tablet composition and the value of the similarity and difference between them. Dissolution efficacy (*DE*) was also calculated for the average dissolution profile of all compositions (Eq. (2)).

$$DE = \frac{\int_0^t y dt}{y_{100} t} \cdot 100\% \tag{2}$$

where *y* is the cumulative percentage dissolution at time *t* [32].

By calculating the difference, f_1 factor, and similarity f_2 factor, we compared composition C/3 vs. composition A/3, and B/3, respectively. Difference and similarity factors were calculated using the following equations:

$$f_1 = \frac{\sum_{j=1}^{n} |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^{n} R_j} \times 100$$

$$f_2 = 50 \times \log\left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{j=1}^{n} w_j |R_j - T_j|^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

where n is the sampling number, R_j and T_j are the percent dissolved of the reference and the test products at each time point *j* and where w_j is an optional weight factor.

For kinetic modeling of drug release, dissolution data of composition C/3 were performed by non-linear fitting with zero-order (Eq. (3)), first-order (Eq. (4)), and Korsmeyer-Peppas models (Eq. (5)) using Microsoft Excel.

$$Q = Q_0 + k_0 t \tag{3}$$

$$Q_t = Q_0 e^{-k_1 t} \tag{4}$$

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = k_{kp} t^n \tag{5}$$

where *Q* is the amount of drug release at time *t*, Q_0 is the initial amount of drug, Q_t Qt is the amount of drug remaining at time *t*, and where $\frac{Q_t}{Q_\infty}$ Qt/Q∞ is a fraction of drug released at time *t*. k_0, k_1, and k_{kp} are the kinetic constants for zero order, first order, and Korsmeyer-Peppas models, respectively and *n* is the release exponent, indicative of the drug release mechanism. For Korsmeyer-Peppas model, only release data points were used in the analysis up to 60% drug release [33].

2.6. Stability test of C/3 tablet

After 24 months, we examined the stability of the C/3 tablets that we formulated and tested. It was stored in a dry place, protected from light. We examined the parameters of the tablet again, such as length, width, mass and breaking strength. In addition, the amount of active components was checked by 6 parallel dissolution tests. Finally, the release kinetics were defined.

2.7. A clinical pilot study to examine efficacy and patients' compliance of the prolonged-release tablet

The trial was conducted at a single location; at Rózsakert Medical Center (RMC, Hungary, Budapest). According to the inclusion criteria, twenty adult patients, four men, and sixteen women, previously diagnosed IC/BPS patients on maintenance therapy were involved on a voluntary basis. The trial was carried out under a licence of the Local Committee of Research Ethics (permit number:7074–2/2020).

The endpoints of the clinical trial were the following: to estimate the average urine pH fluctuation depending on the time of the day; to determine whether the conventional (immediate-release dosage formulation, without modified-release) citrate tablet (Table 3) mitigates the pH fluctuation; to estimate the pH raising effect on the average of administering 2 × conventional citrate tablet daily; to estimate the raising effect on the average of administering 2 × 1 of prolonged-release tablet (composition C/3) and determining whether the prolonged-release tablet mitigates the daily pH fluctuation.

During the clinical pilot trial, on the first week, the patients did not take any tablets that may alter the pH of the urine. In the following three weeks, they took either placebo (Table 4), or potassium free immediate-release citrate blend tablet, or prolonged-release citrate tablet, which has a long-lasting (10 h) release effect containing the same compounds as the normal tablet – for one week, 2 tablets per day. Every patient receives every treatment once, one week long, in a randomized

Table 3
Compositions of Prolonged-release citrate tablet and Immediate release citrate tablet [34].

Prolonged-release citrate tablet		Immediate release citrate tablet
53.04 mg	Citric acid	68 mg
142.74 mg	Sodium citrate	183 mg
189.54 mg	Magnesium citrate	243 mg
3.215 mg	Magnesium stearate	16 mg
3.215 mg	Colloidal silicon dioxide	3.50 mg
–	Stearic acid	12.50 mg
–	Sorbitol	300 mg
128.6 mg	Benecel K100 M PH DC	–
122.17 mg	Avicel DG	–

Table 4
Composition of Placebo tablet.

Placebo tablet	–
Sorbitol	743.4 mg
Magnesium stearate	41.3 mg
Talcum	41.3 mg

sequence.

Due to the requirements of a placebo-controlled, double-blind clinical pilot trial, the three different tablets had to be of the same appearance and mass. (Fig. 2). According to this, the prolonged-release tablet contained 22% less active compounds, which was taken into consideration in the discussion of the results.

The patients were given a freshly calibrated, digital Testo-type portable laboratory quality urine pH meter and were given an accurate pH measurement protocol including step-by-step instructions. Patients were asked to measure the pH of the urine, at least five times during the day and twice at night. These data were asked to be registered on a webpage that had been designed especially for the clinical trial, for registering and storing all measured data. These data were exported for the statistical evaluation at the end of the trial period. Moreover, patients were allowed to add any text containing comments, remarks, suggestions, or side effects. In case of urgent issues, we provided a contact to the doctor who was leading the clinical trial.

All twenty patients involved were able to comply with the trial requirements, including recording of the data. The patient compliance, thus, was excellent. No patient reported any side effects or worsening of their condition in connection with the tablets taken.

The statistical evaluation of the data was performed with the program named Statistica (TIBCO Software Inc. (2018). Statistica (Data Analysis Software System), version 13. http://tibco.com).

3. Results and discussion

3.1. Powder flow

Based on the preliminary examination the rheological results of 15 samples are shown in Table 5. Based on preliminary rheological results (Hausner ratio, Carr's compressibility index, etc.) and due to the small variance, we found 3 promising mixtures with rheological 15 grains: A/3; B/3; C/3 mixtures were chosen. These mixtures have the same ratio composition, differing only in the Benecel™ type variety.

3.2. Physical parameters of tablets A/3, B/3, C/3

The rheology results are summarised. The A/3 results: Hausner ratio 1.15, Carr index 13.72 and the tilt angle was 43.83°. The B/3 rheological results were 1.17, 15.34 and 45.83°.The rheological results of C/3 powder mixtures are as follows: Hausner ratio, Carr's index, and angle of repose were 1.17, 15.28, and 44.77°, respectively. Based on the Ph. Eur. 10. Hausner ratio (1.12–1.18) and CI (11–15) can also be classified as good flow category and 44.77° in the acceptable category (41–45).

The results obtained for the determination of the individual and average weight comply with the Pharmacopoeia specifications. For N = 30 tablets, the maximum deviation was 5%, up to a maximum of ±10%.

Table 5
Powder flow results of the powder blends.

Sample	Hausner ratio	Carr's index	Bulk density average (g/65 ml)	Flow rate (sec) average	Angle of repose (degree)
A/1	1.19 ± 0.13	16.57 ± 0.18	38.13 ± 0.31	15.69 ± 0.27	38.66
A/2	1.16 ± 0.19	13.64 ± 0.21	38.13 ± 0.36	18.53 ± 0.85	43.23
A/3	1.15 ± 0.10	13.72 ± 0.11	38.97 ± 0.15	15.75 ± 0.34	43.83
A/4	1.13 ± 0.15	11.64 ± 0.23	39.07 ± 0.26	19.30 ± 0.88	43.23
A/5	1.14 ± 0.22	12.02 ± 0.34	37.93 ± 0.35	13.59 ± 0.45	44.13
B/1	1.19 ± 0.17	15.99 ± 0.15	39.10 ± 0.12	15.55 ± 0.33	43.83
B/2	1.16 ± 0.31	15.96 ± 0.22	39.50 ± 0.27	13.73 ± 0.11	43.83
B/3	1.17 ± 0.13	14.34 ± 0.09	39.97 ± 0.06	10.88 ± 0.08	45.23
B/4	1.18 ± 0.17	15.31 ± 0.14	39.37 ± 0.42	10.12 ± 0.20	43.83
B/5	1.18 ± 0.25	14.95 ± 0.31	39.60 ± 0.35	10.56 ± 0.12	44.42
C/1	1.19 ± 0.35	15.31 ± 0.24	38.43 ± 0.16	17.23 ± 0.21	44.71
C/2	1.18 ± 0.11	14.95 ± 0.35	39.07 ± 0.44	18.65 ± 0.32	44.42
C/3	1.17 ± 0.07	14.16 ± 0.05	39.28 ± 0.05	15.37 ± 0.04	44.71
C/4	1.15 ± 0.20	12.66 ± 0.26	37.93 ± 0.56	10.76 ± 0.23	46.67
C/5	1.14 ± 0.15	12.33 ± 0.19	38.35 ± 0.27	17.47 ± 0.17	47.47

*A samples contain: Benecel K4M PH DC.
B samples contain: Benecel K15 M PH DC.
C samples contain: Benecel K100 M PH DC.

Active substances content uniformity: min 372.4 mg; max 422.6 mg; average of 6 tablets: 397.83 ± 2.99 mg.

Friability is also adequate. For N = 20 tablets, it was 0.88% ± 0.01, fulfilling the pharmacopoeial critera. Mean value of crushing strength (n = 20 tablets): 182 N ± 4.3.

3.3. In vitro drug release: A/3, B/3, C/3

When the in vitro dissolution data of all compositions were compared, composition C/3 were found to release its API content in the most balanced manner. An average of 28.33% of the citrate salts dissolves in 1 h. Subsequently, 54.64% of the active ingredient is dissolved in 3 h, and after 6 h, 80.83% of the active ingredient is released from the matrix tablet (Fig. 3). On the other hand, composition B/3 has released its citrate salt content in the fastest manner, An average of 34.25%, 62.48% and 84.59% dissolved in 1 h, 3 h and 6 h, respectively. The dissolution efficiencies and determination coefficients of model fittings are presented in Table 5. Composition C/3 was compared in a pair-wise way to composition A/3 and B/3, difference and similarity factors are presented in Table 6. When the mechanism of drug release is elucidated, the coefficient of determination of the fit for the First-order model was found with the highest value.

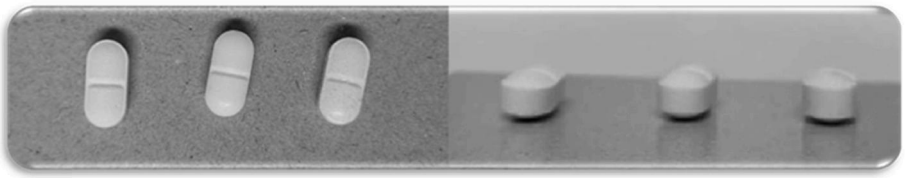


Fig. 2. Patients received placebo, potassium-free prolonged-release and potassium-free normal citrate tablets of the same appearance.

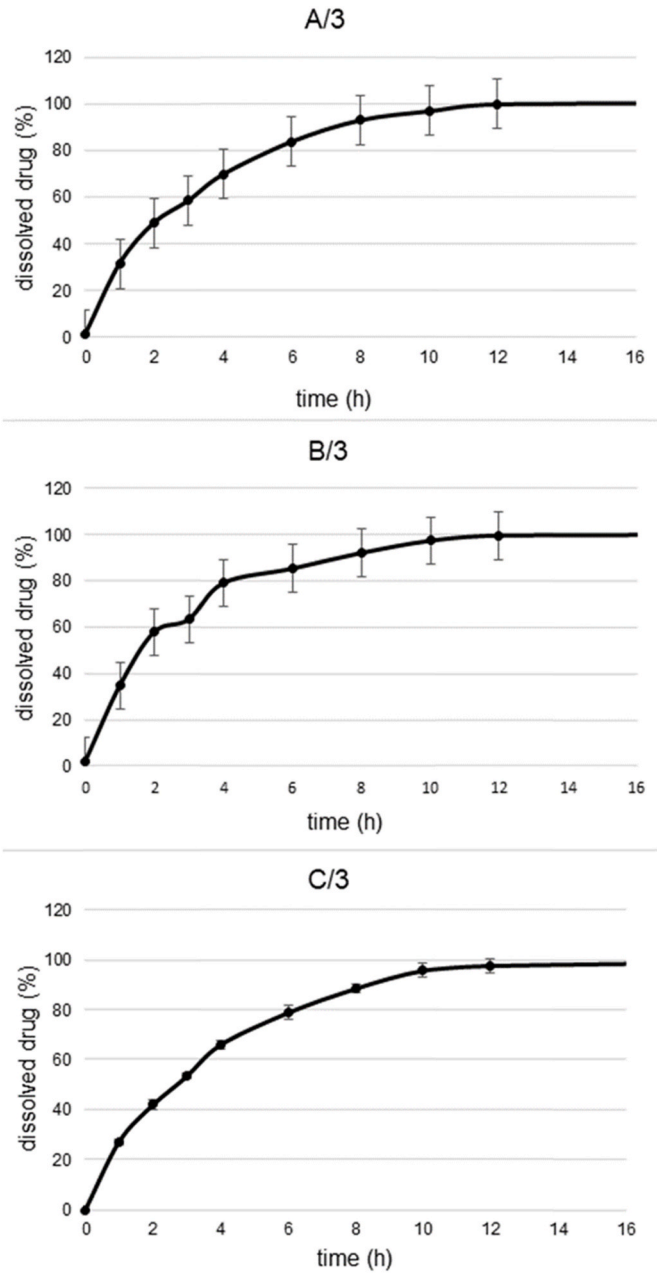


Fig. 3. The amount of prolonged-release tablet dissolved per unit of time (n = 6).

Table 6
Dissolution efficacies of the compositions and model fitting results.

-	A/3	B/3	C/3
DE (%)	87.51%	90.50%	84.35%
Zero order	0.8503	0.7898	0.8850
First order	0.9951	0.9752	0.9962
Korsmeyer-Peppas	0.9313	0.9589	0.9226

The immediate release tablet was also tested, to determine the drug release. The immediate-release tablet disintegrates quickly and complete dissolution occurs after 3 min (Fig. 4). In support of first-order kinetics, compared to the immediate-release tablet, the release rate of the prolonged-release tablet (C/3) is slower and more uniform.

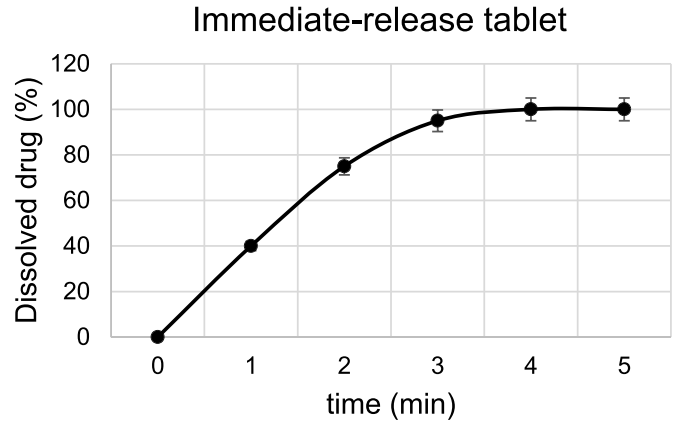


Fig. 4. The amount of immediate-release tablet dissolved per unit of time (n = 6).

The pair-wise comparison have confirmed that the dissolution profile of A/3 is more similar to C/3 than B/3. Concerning the rate of citrate dissolution form their matrix, this is not surprising, drug dissolution was the slowest in case of C/3, while the fastest for B/3. Based on the dissolution properties of composition C/3 tablet, it was selected for a human clinical pilot study.

3.4. Stability test of C/3 tablet

The parameters of the tablet after 2 years were: length 16.2 mm, oblong tablet width: 7.6 mm. Mean value of crushing strength (n = 20 tablets): 167.9 N ± 3.3. The average mass was 625.2 ± 1,4 mg. Friability was 1.02% ± 0.02.

Based on these results, the average weight of a tablet decreased by 2.78% and the crushing strength by 7.75%. C/3 tablets stored for 24 months were analysed and compared to the initial dissolution data. Dissolution efficacy was found to be 89.41%. Model fitting results showed no alteration even after 24 month, First-order release model was found with the highest value for determination coefficient, namely R_2 = 0.9743.

Difference and similarity was also assessed for C/3 tablets regarding their dissolution. Value of difference and similarity factor was 8.34 and 59.94, respectively (Supplementary Fig. 1).

3.5. Clinical study and patients compliance

The weekly average of the urine pH showed no significant difference between the washout period (first week) and the placebo. (pH = 6.10 and pH = 6.13, respectively.) Thus, the placebo effect is minuscule.

Both the immediate release citrate tablet and prolonged-release citrate tablet caused a significant rise in the urine pH (weekly average) compared to the weeks when no active alkalizing compounds were administered (washout and placebo).

The weekly average of the urine pH showed no significant difference between the two alkalizing tablets (potassium-free conventional tablet pH = 6.34, potassium-free prolonged-release tablet pH = 6.29) (Fig. 5). Considering that prolonged-release tablet contained 22% less active ingredients, this result can refer to the fact that the biological utilization of the prolonged-released tablet was more effective.

Another endpoint of the clinical trial was to confirm the hypothesis that the retard tablet mitigates the daily pH fluctuation of the urine, compared to the fast-absorbed alkalizing tablet, which may cause sudden, uncontrollable pH peaks. The smaller fluctuation may result in less pa in and fewer urinary symptoms. According to the statistical evaluation, the clinical trial did not confirm this hypothesis.

The suspected pH peaks might have been detected if the patients, most preferably, had voided and measured the urine in every hour; or at

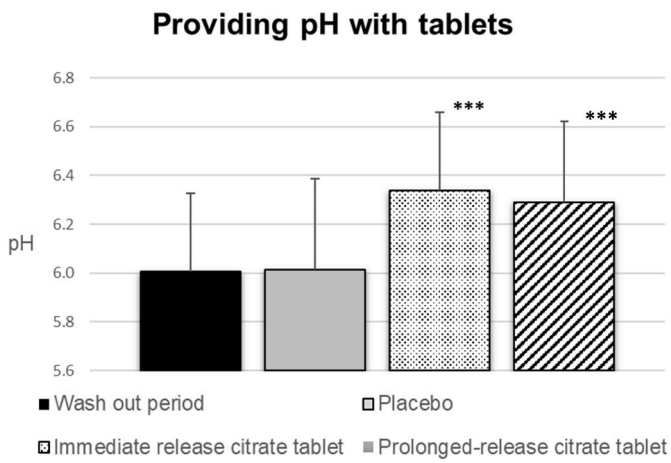


Fig. 5. The patient's mean pH after 1-1 week treatment. Asterisks indicate $p < 0.05$ compared to the wash out period.

a unified amount of time after having taken the tablet. These criteria could not be fulfilled in practice. There are plenty of factors affecting the urine pH, for example, the patient's diet, lifestyle, metabolism, comorbidities, and any medication administered during the treatment. Monitoring or affecting all these factors could not be executed during the trial; standardizing these parameters would have been impossible. The relatively low patient number (20 persons), which is normal for a pilot trial, did not help confirm our hypothesis either.

Nevertheless, the statistical evaluation of the data did not deny our hypotheses either.

Summarizing the results, we successfully developed a prolonged-release tablet, which is suitable as a treatment of patients with BPS. This matrix tablets are solid oral dosage forms. This system is very popular for modified release formulations. The definition of modified release by EMA: "Preparations where the rate and/or place of release of the active substance(s) is different from that of the conventional dosage form administered by the same route. This deliberate modification is achieved by special formulation design and/or manufacturing method. Modified release dosage forms include prolonged release, delayed release, pulsatile release and accelerated release dosage forms" [25].

Based on the measured rheological values, the tested granulate has good flow properties. The choice of excipients had to take into account that polymers and carbomer matrix systems could not be used due to the high Mg^{2+} and Na^{+} content. Because the reason for this, the osmotic pressure induced by the cations would have divided the texture of the matrix. Therefore, the best choice was high viscosity Benecel hypromellose (HPMC, microcrystalline cellulose). Because, the HPMC is the most widely used semi-synthetic polymer in hydrophilic matrix systems. The preparation of sustained release matrix tablets involves the direct compression of powder mixture of active subtances, retardant material and other additives [24]. Hydrophilic matrix may be formulated by direct compression of the blended mixture of active subtances and certain hydrophilic carriers. Such as a hydrophilic carriers is the hydroxipropylmethylcellulose (HPMC). The sensitivity of HPMC to cation-induced osmotic pressure is significantly lower than that of Carbomer matrix systems [32] and the best grades to use for sustained release formulations are K4M and K100 M due to their high tensile strength [26]. Our data have supported this statement, that high viscosity HPMC is the best solution for the preparation of a prolonged-release tablet.

An alternative could be pellets coated with semipermeable membranes, such as Aquacoat ECD. Pellets are then filled into hard gelatin capsules.

According to FDA guidelines [35], based on similarity and difference factors, tablet samples can be considered similar according to their in vitro dissolution kinetics, within the limit (for f_1: 0–15 and f_2: 50–100). The model fit confirmed the First-order kinetics; the drug is released diffusely out of the matrix. According to the First order drug release model, as the remaining drug in the matrix decreases, the released amount of drug by time drops, as well. This finding is not surprising, considering the fact of a relatively high drug loading (60%) with a 20% of dissolution controlling polymer content. Hydrophilic matrices control drug release via the diffusion of the drug through the gel layer of the matrix. Initially, the polymer should transit from the glassy state to the rubbery state during hydration. If the thickness of gel layer is not large enough, highly soluble drugs (in our case, the citrates) could dissolve quickly in an uncontrolled manner [36]. Sustained release of potassium citrate was achived when hydrophobic matrix was formulated with carnauba wax, stearyl alcohol and stearic acid with the drug: release retardant ratio of 2.84:1 [37]. In our case, the C/3 composition formulation, the ratio of citrates to the Benecel polymer was slighty higher, namely 3:1. Interestingly, this resulted a more balanced release compared to the hydrophopbic matrix. Slight increase in the dissolution rate was found up on storage for C/3 tablets. According to the difference and similarity factor calculations the dissolution profiles can be considered to be similar to each other even after 24 months of storage.

It is confirmed that prolonged-release effectively raises the urine pH. To reach the optimal pH range (6.5–7.2) its dose can be increased according to the needs. It appears to be more effective than the standard alkalizing tablet, although the difference may be insignificant (Table 7).

The dosing of twice per day, considering the 10-h release (which was confirmed), is beneficial because patients do not have to be remembered to take their third dose in the middle of the day. This beneficial aspect results in high patient compliance.

Due to the prolonged-release property, this tablet does not irritate the stomach, does not cause substantial acid production since the active ingredients are mostly absorbed in the intestines. Thus, it can securely be administered in case of hyperacidity and gastroesophageal reflux, as well.

Since prolonged-release tablet is potassium-free, its administration significantly lowers the risk of cardiac symptoms, which is present in other alkalizing tablets. It is not contraindicated even in case of hyperkalemia caused by impaired kidney function, and it does not irritate the bladder wall, which is especially sensitive to potassium.

However, the new tablet minimally increased urinary pH compared with placebo. Thus, based on the results, 2×2 dosing would be more efficient, and the urine pH could get even closer to 7. Furthermore, a longer duration of the study and a higher patient number would be required for more accurate results.

Our results could not be compared with other results in IC/BPS indication. Citrate preparations have been used in other indications such as hypersensitive bladder syndrome [14], but these preparations contained potassium and did not possess a prolonged-release.

4. Conclusion

Considering the release kinetics of the drug, it can be clearly stated that the newly developed tablet provides a uniform therapeutic concentration in vivo at a frequency of 2×1. According to the results of the prospective, placebo-controlled, randomized, double-blind clinical pilot trial the potassium-free, prolonged-release alkalizing tablet effectively mitigates the acidity of the urine, causes fewer side effects. Due to the long-lasting and stable release of the active compounds, it is to be

Table 7
Difference and similarity factors of dissolution data of composition C/3 compared to the other compositions.

-	A/3	B/3
f_1	4.56	9.34
f_2	75.37	58.59

administered twice a day, which results in positive patient compliance.

An easy-to-take, effective alkalizing tablet causing fewer side effects has been developed for interstitial cystitis/bladder pain syndrome patients.

Based on the stability tests performed, we can state that our preparation is stable even after 2 years and meets the requirements.

Funding

Urosystem Zrt. supported the research by using its own resources and from grants. The funding was provided by the National Research, Development and Innovation Office [2018–1.1.2-KFI-2018-00195].

Author statement

Conceptualization, P.B.; methodology, P.B.; validation, A.H; formal analysis, G.V.; investigation, A.H.; writing—original draft preparation, A.H.; writing—review and editing, G.H., S.L.; supervision, P.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Declaration of competing interest

We declare that no conflict of interest exists.

Data availability

The data that has been used is confidential.

Acknowledgements

We would like to thank the following colleagues for their conscientious and accurate work during the human clinical trial:Jenő Kunovits (software), András Kéri (human clinical trial program) and Dr. Marianna Nagy (human clinical trial manager). Thanks also to the graphic designer Pál Remete for the excellent illustrations, edited by himself.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103537.

References

[1] R.L. Soiza, A.I.C. Donaldson, P.K. Myint, Current best practice management of interstitial cystitis/bladder pain syndrome, Ther. Adv. Urol. 10 (2018) 197–211, 2018 10.1177.
[2] P.M. Hanno, D. Erickson, R. Moldwin, M.M. Faraday, Diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome: AUA guideline amendment, J. Urol. 193 (2015) 1545–1553, https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.01.086.
[3] P. Hanno, R. Domochowski, Status of international consensus on interstitial cystitis/bladder pain syndrome/painful bladder syndrome: 2008 snapshot, Neurourol. Urodyn. 28 (2009) 274–286, https://doi.org/10.1002/nau.
[4] M. Vij, S. Srikrishna, L. Cardozo, Interstitial cystitis: diagnosis and management, Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 161 (2012) 1–7, https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.12.014.
[5] A. Rosamilia, Painful bladder syndrome/interstitial cystitis, Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 19 (2005) 843–859, https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2005.08.004.
[6] A. Cox, Management of interstitial cystitis/bladder pain syndrome, Can. Urol. Assoc. J. 12 (2018) S157–S160, https://doi.org/10.5489/cuaj.5324.
[7] R.E. Hurst, Structure, function, and pathology of proteoglycans and glycosaminoglycans in the urinary tract, World J. Urol. 12 (1994) 3–10, https://doi.org/10.1007/BF00182044.
[8] C.L. Parsons, The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis, Urology 69 (2007), https://doi.org/10.1016/j.urology.2006.03.084.
[9] A.M. Daniels, A.R. Schulte, C.M. Herndon, Interstitial cystitis: an update on the disease process and treatment, J. Pain Palliat. Care Pharmacother. 32 (2018) 49–58, https://doi.org/10.1080/15360288.2018.1476433.
[10] B.Y.J.A.Y. Khastgir, Intravesical GAG replacement therapies, Urol. NEWS. 24 (2020).
[11] R.A. Payne, R.C. O'Connor, M. Kressin, M.L. Guralnick, Endoscopic ablation of Hunner's lesions in interstitial cystitis patients, J. Can. Urol. Assoc. 3 (2009) 473–477, https://doi.org/10.5489/cuaj.1178.
[12] K.M. Peters, K.A. Killinger, M.H. Mounayer, J.A. Boura, Are ulcerative and nonulcerative interstitial cystitis/painful bladder syndrome 2 distinct diseases? A study of coexisting conditions, Urology 78 (2011) 301–308, https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.04.030.
[13] D. Engeler, B.B.A.P. Baranowski, S.E.J. Borovicka, A.M. Cottrell, P. Dinis-Oliveira, A.C. de C.W.J. Hughes, E.J. Messelink, Vice-chair), Zumstein, EAU Guidelines on Chronic Pelvic Pain, 2020. https://uroweb.org/guideline/chronic-pelvic-pain/.
[14] Y. Homma, T. Ueda, H. Tomoe, A.T. Lin, H.C. Kuo, M.H. Lee, J.G. Lee, D.Y. Kim, K. S. Lee, Clinical guidelines for interstitial cystitis and hypersensitive bladder syndrome: Guidelines, Int. J. Urol. 16 (2009) 597–615, https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2009.02326.x.
[15] P.M. Hanno, D.A. Burks, J.Q. Clemens, R.R. Dmochowski, D. Erickson, M. P. Fitzgerald, J.B. Forrest, B. Gordon, M. Gray, R.D. Mayer, D. Newman, L. Nyberg, C.K. Payne, U. Wesselmann, M.M. Faraday, AUA guideline for the diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome, J. Urol. 185 (2011) 2162–2170, https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.03.064.
[16] A. Cox, N. Golda, G. Nadeau, J.C. Nickel, L. Carr, J. Corcos, J. Teichman, CUA guideline: diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome, Can. Urol. Assoc. J. 10 (2016) E136–E155, https://doi.org/10.5489/cuaj.3786.
[17] E. Meng, Y.-C. Hsu, Y.-C. Chuang, Advances in intravesical therapy for bladder pain syndrome (BPS)/interstitial cystitis (IC), LUTS Low. Urin. Tract Symptoms 10 (2018) 3–11, https://doi.org/10.1111/luts.12214.
[18] J.J.J. Wyndaele, C. Riedl, R. Taneja, S. Lovász, T. Ueda, M. Cervigni, GAG replenishment therapy for bladder pain syndrome/interstitial cystitis, Neurourol. Urodyn. 38 (2019) 535–544, https://doi.org/10.1002/nau.23900.
[19] M. Cervigni, Interstitial cystitis/bladder pain syndrome and glycosaminoglycans replacement therapy, Transl. Androl. Urol. 4 (2015) 638–642, https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2015.11.04.
[20] C. Parson, M. Greenberger, L. Gabal, M. Bidar, G. Barme, The role of urinary potassium in the pathogenesis and diagnosis of interstitial cystitis, J. Urol. 159 (1998) 1862–1867, https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)63178-1.
[21] T. Ueda, T. Yoshida, H. Tanoue, M. Ito, M. Tamaki, Y. Ito, N. Yoshimura, Urine alkalization improves the problems of pain and sleep in hypersensitive bladder syndrome, Int. J. Urol. 21 (2014) 512–517, https://doi.org/10.1111/iju.12324.
[22] C.Y.C. Pak, C. Skurla, L. Brinkley, K. Sakhaee, Augmentation of renal citrate excretion by oral potassium citrate administration: time course, dose frequency schedule, and dose-response relationship, J. Clin. Pharmacol. 24 (1984) 19–26, https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1984.tb01809.x.
[23] G.M. Kamphuis, J.W. Van Hattum, P. De Bie, B.K. Somani, Method of alkalization and monitoring of urinary pH for prevention of recurrent uric acid urolithiasis: a systematic review, Transl. Androl. Urol. 8 (2019) S448–S456, https://doi.org/10.21037/tau.2019.05.01.
[24] M.A. Crawford, M.D. Milne, B.H. Scribner, The effects of changes in acid-base balance on urinary citrate in the rat, J. Physiol. 149 (1959) 413–423, https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006348.
[25] European Medicines Agent, Guideline on Quality of Oral Modified Release Products, 2014. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-oral-modified-release-products_en.pdf.
[26] Hypermellose, United States Pharmacopeial Conv, Stage 6 Harmonization, 2016. https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/excipients/hypromellose_monograph.pdf. (Accessed 2 June 2022).
[27] E. Bakhrushina, M. Anurova, N. Demina, A. Kashperko, O. Rastopchina, A. Bardakov, I. Krasnyuk, Comparative study of the mucoadhesive properties of polymers for pharmaceutical use, Open Access Maced, J. Med. Sci. 8 (2020) 639–645, https://doi.org/10.3889/oamjms.2020.4930.
[28] Ashland, Benecel^{TM} hypromellose; directly compressible HPMC grades, (n.d.). https://solving.ashland.com/pharmaceutical/benece-dc-ga.
[29] P. Grdešič, F. Vrečer, I. Ilić, Flow and compaction properties of hypromellose: new directly compressible versus the established grades, Drug Dev. Ind. Pharm. 42 (2016) 1877–1886, https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1181079.
[30] P. Grdešič, A. Paudel, I. German Ilić, High-molecular-weight hypromellose from three different suppliers: effects of compression speed, tableting equipment, and moisture on the compaction, AAPS PharmSciTech 21 (2020) 1–14, https://doi.org/10.1208/s12249-020-01688-y.
[31] Flowability, Eur. Pharmacopoeia 10.0 (2008), 01/2008:20916.
[32] G. Vasvári, B. Csontos, T. Sovány, G. Regdon, A. Bényei, J. Váradi, I. Bácskay, Z. Ujhelyi, P. Fehér, D. Sinka, T.L.P. Nguyen, M. Vecsernyés, F. Fenyvesi, Development and characterisation of modified release hard gelatin capsules, based on in situ lipid matrix formation, AAPS PharmSciTech 19 (2018) 3165–3176, https://doi.org/10.1208/s12249-018-1146-5.
[33] D. Samaha, R. Shehayeb, S. Kyriacos, Modeling and comparison of dissolution profiles of diltiazem modified-release formulations, Dissolution Technol. 16 (2009) 41–46, https://doi.org/10.14227/DT160209P41.
[34] Patent application number: P2000144, Filing date: 29.04.2020., Oral treatment and formulation of a urinary alkalizing medicinal product and/or a medicinal product for interstitial cystitis/bladder pain syndrome (IC/BPS), Natl. Intellect. Prop. Off. (2020).
[35] V.P. Shah, L.J. Lesko, J. Fan, N. Fleischer, J. Handerson, H. Malinowski, R. L. Williams, FDA guidance for industry: dissolution testing of immediate release

solid oral dosage forms, Dissolution Technol. 4 (1997) 15–22, https://doi.org/10.14227/DT040497P15.

[36] G. Vasvári, J. Kalmár, P. Veres, M. Vecsernyés, I. Bácskay, P. Fehér, Z. Ujhelyi, Á. Haimhoffer, Á. Rusznyák, F. Fenyvesi, J. Váradi, Matrix systems for oral drug delivery: formulations and drug release, Drug Discov. Today Technol. 27 (2018) 71–80, https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.06.009.

[37] Q.-R. Cao, T.-W. Kim, B.-J. Lee, Photoimages and the release characteristics of lipophilic matrix tablets containing highly water-soluble potassium citrate with high drug loadings, Int. J. Pharm. 339 (2007) 19–24, https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.04.016.

Horváth *et al.*
BMC Complementary Medicine and Therapies (2022) 22:119
https://doi.org/10.1186/s12906-022-03604-2

BMC Complementary Medicine and Therapies

RESEARCH

Open Access

Anti-inflammatory effects of lavender and eucalyptus essential oils on the in vitro cell culture model of bladder pain syndrome using T24 cells

Adrienn Horváth[1,2], Edina Pandur[2], Katalin Sipos[2], Giuseppe Micalizzi[3], Luigi Mondello[3,4,5], Andrea Böszörményi[6], Péter Birinyi[7] and Györgyi Horváth[1*]

Abstract

Background: Interstitial cystitis (IC) has a chronic chemical irritation and inflammation of non-bacterial origin in the bladder wall leading to various severe symptoms**.** There is evidence that chronic inflammation is significantly associated with abnormal urothelial barrier function, epithelial dysfunction. This is the underlying cause of urothelial apoptosis and sterile inflammation.

Method: The anti-inflammatory effects of lavender and eucalyptus essential oils (EOs) and their main components (linalool and eucalyptol) were investigated in the T24 human bladder epithelial cell line on TNFα stimulated inflammation, at 3 types of treatment schedule. The mRNA of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, IL-8) were measured by Real Time PCR. Human IL-8 ELISA measurement was performed as well at 3 types of treatment schedule. The effects of lavender and eucalyptus EOs and their main components were compared to the response to NFκB inhibitor ACHP (2-amino-6-[2-(cyclopropylmethoxy)-6-hydroxyphenyl]-4-(4-piperidinyl)-3-pyridinecarbonitrile).

Result: There is no significant difference statistically, but measurements show that lavender EOs are more effective than eucalyptus EO. Long time treatment (24 h) of both lavender EO and linalool showed higher effect in decreasing pro-inflammatory cytokine mRNA expression than ACHP inhibitor following TNFα pre-treatment. Moreover, both lavender EOs were found to be significantly more effective in decreasing IL-8 secretion of T24 cells after TNFα pre-treatment compared to the ACHP NFκB-inhibitor.

Conclusion: The lavender EOs may be suitable for use as an adjunct to intravesical therapy of IC. Their anti-inflammatory effect could well complement glycosaminoglycan-regenerative therapy in the urinary bladder after appropriate pharmaceutical formulation.

Keywords: Bladder pain syndrome, Anti-inflammatory effects, T24 cells, Lavender essential oil, Linalool, eucalyptus essential oil, Eucalyptol

Background

The popularity of essential oils (EOs) has been growing over the last decade. There are EOs such as chamomile, eucalyptus, rosemary, lavender and yarrow that modulate the inflammatory response and are able to influence signalling cascades, regulatory transcription factors,

*Correspondence: horvath.gyorgyi@gytk.pte.hu
[1] Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, H-7624, Rókus u. 2, Pécs, Hungary
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

pro-inflammatory gene expression and cytokine production [1]. EOs from lavender and eucalyptus species are widely used in the cosmetic, food and pharmaceutical industries [2] Eucalyptol is the main constituent of eucalyptus oil. Eucalyptol has been shown to inhibit cytokine production and therefore, it is considered to have anti-inflammatory properties [3]. Because of its anti-inflammatory effect, it has been used to treat respiratory diseases, such as bronchitis, sinusitis, bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. In addition, its anti-inflammatory effects are exploited even in neurodegenerative diseases, e.g. Alzheimer's disease [3]. In cardiovascular disease, studies suggest that eucalyptol reduces heart rate via a parasympathetic mechanism and induces hypotension by vasorelaxation. This component also blocks nuclear factor kappa B (NFκB) pathway [4, 5].

The main pharmacologically active constituents of lavender EO are linalool and linalyl acetate. The potent anti-inflammatory effects of both components have been described [6]. Linalool has most commonly been tested in an in vivo LPS-induced lung injury model, cigarette smoke-induced lung inflammation, a carrageenan-induced edema model, and has also been shown to be effective in renal ischaemia [7, 8]. In addition, it is also being tested for adjuvant treatment of various bacterial infections, such as *Pseudomonas aeruginosa* [6, 9]. Linalool has been shown to block the NFκB and MAPK pathways [4].

EOs are complex substances that can be composed of hundreds of components and their composition can vary depending on certain circumstances, such as the origin of the plant, the time of harvest or the extraction method, which may also affect their pharmacological effects [10].

Regulation of the NFκB pathway is very important for cells to adapt to changing environmental conditions. NFκB modulates a wide range of cellular processes such as proliferation, migration, apoptosis, immunity and inflammation. NFκB regulates the pro-inflammatory response by regulating TNFα and interleukin signaling pathways [11]. On the other hand, TNFα is one of the most potent physiological inducers of the nuclear transcription factor NFκB [12]. TNFα, a pro-inflammatory cytokine is involved in a number of regulatory functions, such as cell proliferation, apoptosis and induces the production of other cytokines. TNFα is synthetized primarily by macrophages, but is also expressed in many other cells, including endothelial cells [13].

The bladder pain syndrome (BPS)/ interstitial cystitis (IC) is caused by insufficiency of the mucus layer of the bladder. This could develop into a chronic chemical irritation and inflammation of non-bacterial origin in the bladder wall leading to various severe symptoms e.g. excessive urinary frequency and constant bladder pain [14]. It is estimated that 2.4 to 5.3 million men and 3.5 to 8.6 million women in the United States suffer from symptoms of IC/BPS [15]. It is very difficult to diagnose this syndrome. The main principle of the treatment is to promote the regeneration of the glycosaminoglycan layer with oral and intravesical preparations. The main active components in these preparations are mostly heparin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate [16, 17]. IC/BPS is a chronic inflammatory bladder disease. There is evidence that chronic inflammation is significantly associated with abnormal urothelial barrier function, epithelial dysfunction. This is the underlying cause of urothelial apoptosis. It has even been shown to decrease the expression of certain proteins, such as zonula occludens-1 (ZO-1) and E-cadherin [18]. Histopathologically, an infiltration of mast cells in the bladders is observed suggesting that the immune system is involved in the development and maintenance of the disease [19]. For inducing IC/BPS sterile inflammation tumor necrosis factor (TNF) α pro-inflammatory cytokine treatment was used for human bladder epithelial cells [1]. However, TNFα also regulates many cellular functions such as cell proliferation, differentiation, survival and apoptosis. The main producers of TNFα are macrophages, but they are also sensitive to changes in TNFα levels. It also modulates pro-inflammatory cytokine cascade production in macrophages [20]. Correlation was found between IL-1β, IL-6 and IL-8 in the serum of patients and the existence of IC/BPS serum. The increased expression of IL-1β, IL-6, IL-8 in the serum of IC/BPS patients indicates that not only mast cell activation but also some other inflammatory mediators are involved in the pathogenesis of IC/BPS [21, 22].

The inflammatory response of cells eventually results in transcriptional upregulation of TNFα and other pro-inflammatory cytokines e.g. IL-6, IL-1β and IL-8 [10]. The uroepithelial cells secreted IL-8, IL-6 and IL-1β [23] and the blood serum of IC/BPS patients was shown to have increased expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines (IL-1β, IL-6, IL-8) [24], therefore we focused on these cytokines.

IL-1β often acts synergistically with TNFα during the pro-inflammatory process, and it induces the production of IL-6 and IL-8, as well. IL-1ß secretion is significantly increased even in autoinflammatory diseases such as chronic infantile neurological, skin and arthritis syndrome, familial cold autoinflammatory syndrome, familial Mediterranean fever [25]. IL-6 plays an important role in inflammation as an inducer of acute phase protein synthesis, and inhibition of TNFα and IL-1β expression by macrophages. IL-6 has simultaneously pro-inflammatory and anti-inflammatory effects [26]. IL-8 acts as a chemokine with chemotactic and activating properties

for neutrophils. In addition, IL-8 levels in urine are also used as a marker of disease progression, e.g. in pyelonephritis or idiopathic nephrotic syndrome [27–32].

The aim of our research was to reveal whether lavender and eucalyptus EOs and their main components (linalool and eucalyptol) were able to reduce sterile, chronic inflammation in the bladder at the cellular level during bladder pain syndrome. We examined the extent of anti-inflammatory effect of EOs and the main components by the determination of the changes of pro-inflammatory interleukins (IL-1β; IL-6; IL-8) at mRNA expression level. In addition, we compared the efficacy of EOs with that of the known NFκB-inhibitor ACHP (2-amino-6-[2-(cyclopropylmethoxy)-6-hydroxyphenyl]-4-(4-piperidinyl)-3-pyridinecarbonitrile) to prove the rate of effectiveness of the EOs. Finally, we investigated the anti-inflammatory effects of the components at the secreted protein level of T24 human bladder epithelial cells.

Materials and methods

Essential oils

Lavandula angustifolia Mill. was collected in two phenophases of the plant: at the beginning of the flowering period (20 June, 2019) and at the end of the flowering period (18 July, 2019). The location of the plant harvesting was: Bolho village (Somogy county, Hungary, coordinates: 46.03904°N 17.30376°E). The EO was extracted from the plant by water-steam distillation based on the description of the 8th edition of the Hungarian Pharmacopoeia (2003). 40 g of dried flowers were used for one distillation. The procedure took 3 h. The EO content was measured with the volumetric method. Three distillation procedures were prepared parallel. The lavender EOs have been examined on THP-1 (human monocyte; Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Hungary; 88,081,201) cell line as well [33]. *Eucalytus globulus* Labill. EO was purchased from Aromax (Aromax Zrt., Budapest, Hungary). Linalool and eucalyptol standards were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Hungary). Stock solutions of the essential oils were prepared by adding 10% (22 μg/mL) (100 μL) dimethyl sulfoxide (100% DMSO, Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Hungary) to 900 μL of essential oil. The emulsions were vortexed and diluted 500-fold with phosphate buffered saline (PBS, Lonza Ltd., Basel, Switzerland). Stock solutions of linalool and eucalyptol standards were prepared in the same way as EOs.

GC-MS and GC-FID analysis

Analyzes were carried out according to our previous study [33]. Briefly, distilled EOs were solubilized in methanol solvent (dil. 1:100) and injected into GC instrumentations for the chromatographic separation. In this respect, the identification of the volatile components was carried out by using a gas chromatograph GCMS-QP2020 (Shimadzu, Duisburg, Germany) equipped with a single quadrupole mass spectrometer. An AOC-20i auto-sampler was used for the injection of distilled oils. Injection volume was 0.5 μL with a split ratio (split/splitless injector) of 1:10. The capillary column was a low-polarity one, namely SLB-5 ms 30 m × 0.25 mm ID, 0.25 μm d_f (Merck Life Science). The separation of components was performed in temperature gradient as follows: from 50 °C to 300 °C at 3.0 °C/min. Helium was used as carrier gas, at an initial inlet pressure of 26.7 kPa and at an average linear velocity of 30 cm/s. MS parameters were as follows: mass range: 40–550 amu; ion source temperature: 220 °C; interface temperature: 250 °C. GCMS solution software (version 4.52, Shimadzu) was used for data collection and data processing. As detailly described in Micalizzi et al. [34], two different identification parameters were utilized for peak assignment: spectral similarity (over 85%) and a ± 5 LRI tolerance window. FFNSC mass spectral library version 4.0 (Chromaleont, Messina, Italy) was mainly used for the identification of analytes. Quantitative analyses were carried out by using a gas chromatograph GC-2010 (Shimadzu) equipped with a flame ionization detector (GC-FID). Capillary column, temperature gradient and gas carrier were the same used in GC-MS analyses except for initial inlet pressure (99.5 kPa). FID parameters were as follows: temperature: 300 °C; hydrogen flow: 40 mL/min; air flow: 400 mL/min; nitrogen flow (make-up gas): 30 mL/min; sampling rate: 40 ms. LabSolutions software (version 5.92, Shimadzu) was used for the acquisition of chromatograms and their processing [35].

Cell culture and treatments

T24 human bladder epithelial cells (HTB-4; American Type Culture Collection, USA) were maintained in McCoy's 5A Medium Modified (Lonza, Ltd., Basel, Switzerland) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, EuroClone S.p.A, Pero, Italy) and 1% penicillin/streptomycin (Lonza Ltd., Basel, Switzerland).

T24 cells were seeded in 6-well plates and cultured for 24 h before treatments. The inflammation was induced using TNFα treatment (10 ng/mL, Shenandoah Biotechnology Inc. Warminster PA, USA) for 6 h and 24 h. TNFα concentration was determined by concentration dependence experiments followed by the analysis of pro-inflammatory cytokine mRNA expression (Supplementary Fig. 2.) The anti-inflammatory effects of EOs and their main components were determined in three different experiments: TNFα pre-treatment for 6 h followed by 24 h of EO/standard treatment; TNFα pre-treatment for 24 h followed by 6 h of EO/standard treatment; and TNFα

pre-treatment for 24 h followed by 24 h of EO/standard treatment. The EOs and standards were used at 500-fold dilution of stock solutions to determine their effect on cytokine production. In all experiments, cells treated with DMSO were used as controls. All experiments were performed at least 3 times and carried out at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

Cell viability assay

T24 cells were plated onto 96-well plates using 5000 cells/well. The cells were treated with EOs and standards in 200-fold (0.16 µg/mL), 500-fold (0.1 µg/mL), 1000-fold (0.05 µg/mL) and 2000-fold (0.025 µg/mL) dilutions for 6 h and 24 h. Viability of the T24 cells were measured using Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Hungary) after the treatments. Cells treated with DMSO were used as a control for cells treated with EOs, while the effect of DMSO on cell viability was used as a control for untreated cells. A DMSO stock solution was also prepared (10 µL of 100% DMSO was diluted with 990 µL of phosphate buffered saline (PBS, Lonza Ltd., Basel, Switzerland) and further dilutions (200-fold (0.16 µg/mL), 500-fold (0,1 µg/mL), 1000-fold (0.05 µg/mL), and 2000-fold (0.025 µg/mL) were performed. After treatment, 10 µL of WST-8 reagent was applied to each well and all plates were incubated for 1 h at 37 °C and 5% CO_2. After the incubation time, 10 µL of 1% sodium dodecyl sulfate (SDS, Molar Chemicals Ltd., Halásztelek, Hungary) was pipetted to each well to stop the reaction. Then, the absorbance of the samples was determined at 450 nm with a MultiSkan GO microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). This workflow can be found in Supplementary Fig. 3. Cell viability was expressed as a percentage of the total cell number of the corresponding control. The effect of TNFα treatment on cell viability was also determined using different concentrations (1 ng/mL, 5 ng/mL; 10 ng/mL) [36]. These results can be found in Supplementary Table 2.

Real-time PCR

T24 cells were treated as previously described in 6-well culture dishes (4×10^5 cells/well). After treatments, T24 cells were rinsed with PBS, and finally, after trypsinization, the cell pellets were collected. Then, samples were subjected to total RNA isolation using the Quick RNA mini kit (Zymo Research, Irvine, CA). The complementary DNA was synthesized from 200 ng of total RNA following the protocol of the high capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Gene expression was measured in 20 µL total reaction volume using a CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad Inc., Hercules, CA) with iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Inc., Hercules, CA). After running quantitative PCR, melting curves were generated to confirm that a single specific product was recovered. The Livak (2-ΔΔCt) method was used for relative quantification using a Bio-Rad CFX Maestro software (Bio-Rad Inc., Hercules, CA). The workflow can be found in Supplementary Fig. 4. The gene expression levels obtained in the samples were plotted against β-actin levels. Thus, relative expression levels were obtained and used to compare untreated and treated samples. The relative expression level of the controls was regarded as 1., then the mRNA expression of treated cells was determined relative to controls [37]. The primer sequences used in this study are described in Table 1.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) measurements

After each treatment of cells, the culture supernatant of control and treated cells was collected and kept at −80 °C until measurements. The concentration of IL-8 secreted in the culture media was determined using human IL-8 ELISA kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) following the manufacturer's instructions [38].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post hoc test. Data are shown as mean ± standard deviation (SD). Statistical significance was set at p value < 0.05. Each assay was carried out in triplicate in each independent experiments ($n = 3$).

Table 1 Real-time PCR gene primer list

Primer	Sequence 5′ → 3′
IL-6 forward	CTGAGAAAGGAGACATGTAACAAG
IL-6 reverse	GGCAAGTCTCCTCATTGAATC
IL-8 forward	CAGTGCATAAAGACATACTCC
IL-8 reverse	CACTCTCAATCACTCTCAGT
IL-1β forward	GAAATGATGGCTTATTACAGTGG
IL-1β reverse	GGTGGTCGGAGATTCGTA
TNFα forward	CTCTCTCTAATCAGCCCTCT
TNFα reverse	CTTGAGGGTTTGCTACAACA
β-actin forward	AGAAAATCTGGCACCACACC
β-actin reverse	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA

Results

Effect of essential oils and standards on T24 human bladder epithelial cell viability

To determine the appropriate dilution of the EOs and standards used in our experiments, first we carried out viability assays on T24 human bladder epithelial cells, because too high concentrations of the components may cause cell death [1, 34]. Viability tests were carried out after 6 h and 24 h treatments with four dilutions (200-fold (0.16 μg/mL), 500-fold (0.1 μg/mL) and 1000-fold (0.05 μg/mL) to 2000-fold (0.025 μg/mL) of the EOs. DMSO being the vehicle of the stock solutions was also tested. Lavender oils and linalool at 6 h treatment did not induce a decrease in cell viability (Fig. 1A). In the 24 h treatments, at 200-fold dilution, linalool was found to be highly toxic to cells, while lavender oil prepared at the beginning of flowering period was only slightly toxic (Fig. 1B). At 500-fold dilutions, cell viability was

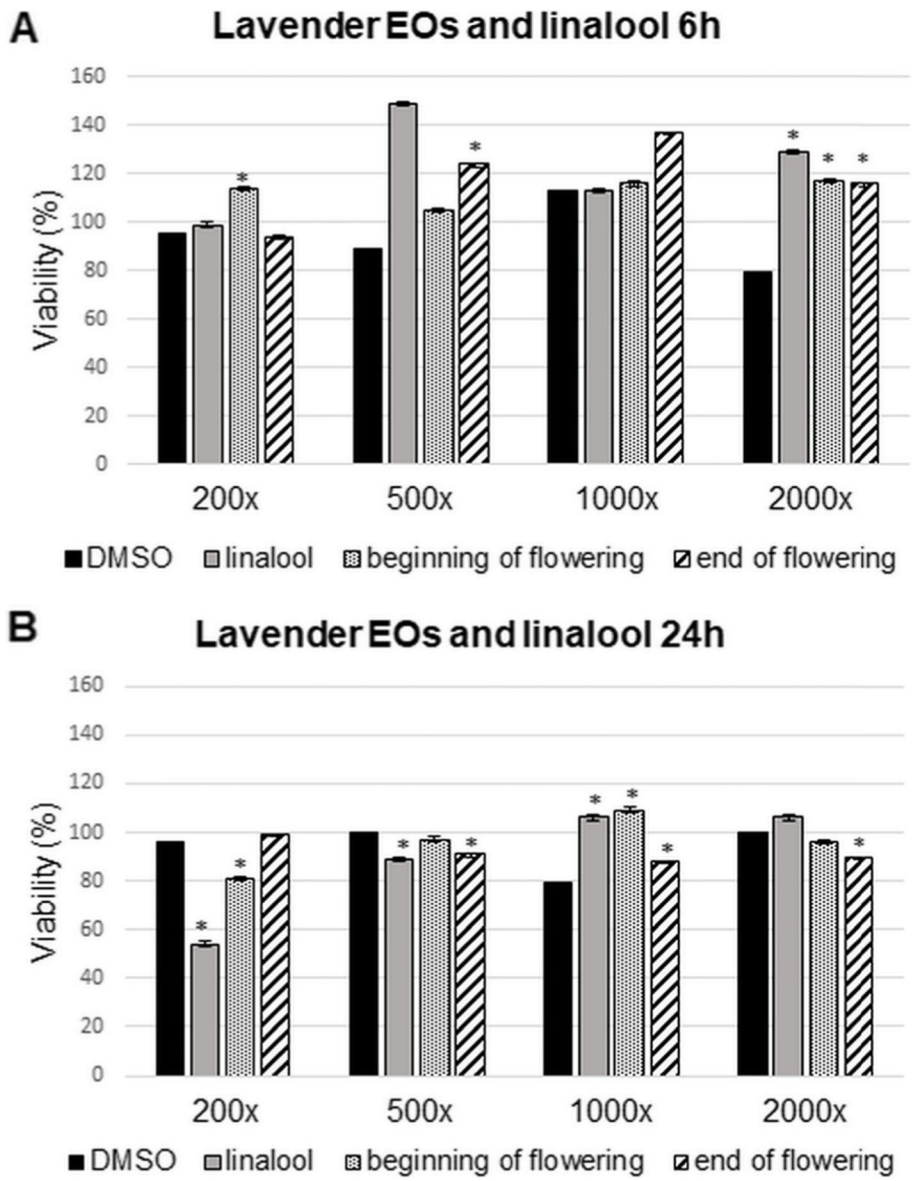


Fig. 1 Cell viability assays of lavender EOs and linalool on T24 cells. Viability of the cells were determined using CCK-8 kit. **A** Cells were treated by linalool and lavender EOs prepared at the beginning of flowering and the end of flowering period with four different dilutions, for 6 h. **B** Cells were treated by linalool and lavender EOs prepared at the beginning of flowering and the end of flowering period using four different dilutions, for 24 h. Control cells were treated with the same dilutions of DMSO for 6 h or 24 h. The experiments were repeated three ($n = 3$) times in triplicates. Asterisks indicate $p < 0.05$ compared to the controls

no longer significantly affected by either linalool or lavender oils at either 6 h or 24 h. At 1000-fold and 2000-fold dilutions neither linalool standard nor lavender oils were toxic at either duration of treatments (Figure 1A and B). In the case of eucalyptus oil and eucalyptol, none of the substances tested were toxic to cells in any of the dilutions after 6 h of treatment (Fig. 2A). Toxicity could be detected in 24 h studies. Figure 2B shows that the 500-fold (0.1 μg/mL) dilution was the least harmful to the cells. Considering the above results we decided to use the 500-fold (0.1 μg/mL) dilutions of all materials. A correlation between viability and EO composition can be assumed (Supplementary Table 1. and Supplementary Fig. 1.).

Effects of lavender essential oils and linalool standard on mRNA expression of IL-1β, IL-6 and IL-8 after TNFα pre-treatment of T24 cells

As IC disease is characterized by non-bacterial inflammation of the bladder, TNFα was used as a pre-treatment to induce inflammation to mimic the clinical symptom. The uroepithelial cells secret IL-8, IL-6 and IL-1β, therefore

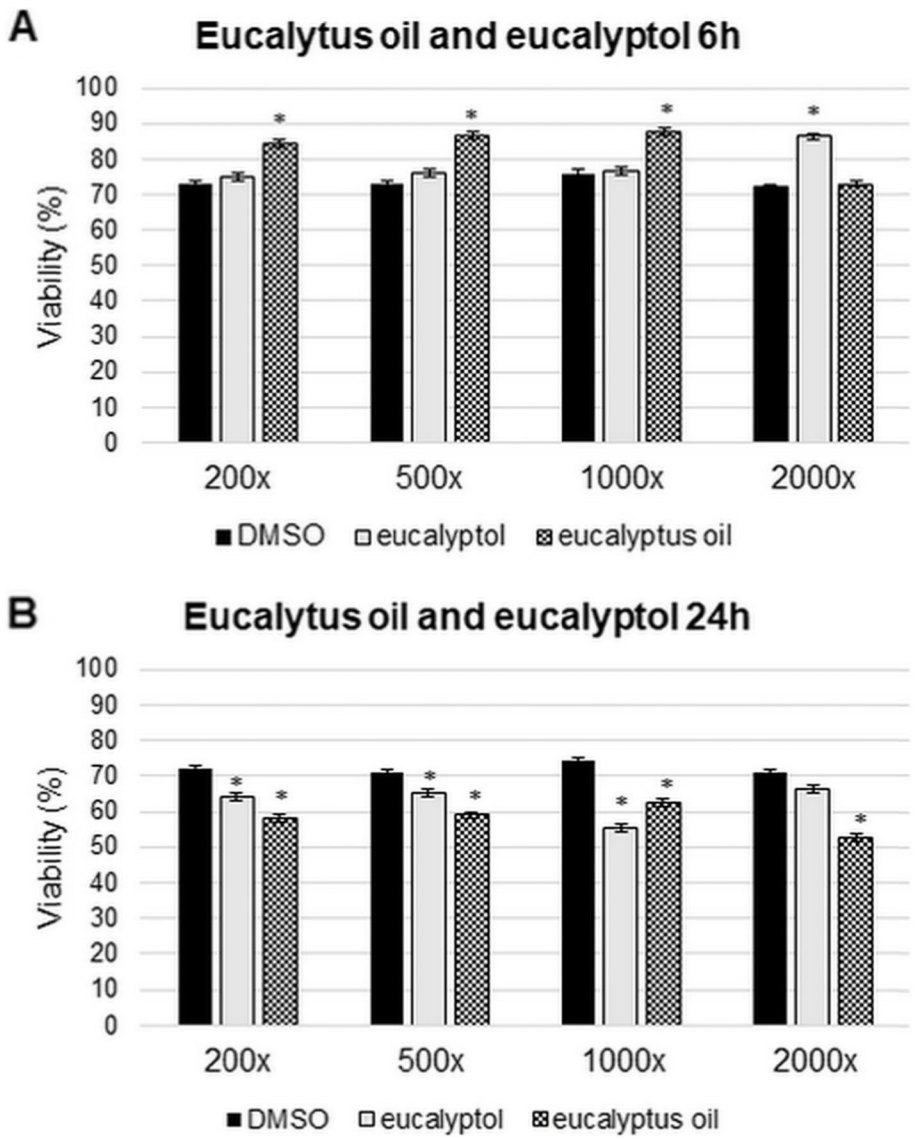


Fig. 2 Cell viability assays of eucalyptus oil and eucalyptol on T24. Cell viability was determined using CCK-8 kit. **A** Cells were treated by eucalyptol and eucalyptus oil with four different dilutions, for 6 h. **B** Cells were treated by eucalyptol and eucalyptus oil with four different dilutions, for 24 h. Control cells were treated with the same dilutions of DMSO for 6 h or 24 h. The experiments were repeated three times ($n = 3$) in triplicates. Asterisks indicate $p < 0.05$ compared to the controls

we focused on these cytokines. T24 cells were treated in different schedule with linalool and lavender EOs for 6 h and 24 h after TNFα pre-treatment (6 h or 24 h durations) to find out if they have beneficial effects on mRNA levels of the above mentioned cytokines. The appropriate dilution of DMSO was administered to the control cells.

A significant reduction in IL-8 mRNA expression was observed for all oils and standard treatments (Fig. 3). Some treatments were very outstanding. In case of IL-8, using 6 h EO treatment after 24 h of TNFα pre-treatment, EO distilled from lavender at the end of flowering period was found to be the most effective. The change of IL-6 was only considered to be effective the linalool standard. For the short treatment (6 h) after TNFα 24 h pre-treatment, the highest IL-1β expression alteration was measured for the EO obtained from the end of flowering (Fig. 3A).

In case of IL-6 mRNA levels, the most effective treatment was 24 h EO treatment after 6 h of TNFα pre-treatment. Based on changes in IL-8 the linalool standard proved to be more effective than EOs. A decrease in IL-1β mRNA expression was observed 24 h after 6 h TNFα pre-treatment with linalool standard and end of flowering EO (24 h) (Fig. 3B).

For the long treatment (24 h) after TNFα 24 h pre-treatment, the greatest change in mRNA expression was observed for IL-8. In this case, the most effective was the beginning of flowering lavender EO. In the case of IL-6 again, the effect was most pronounced for linalool. The greatest reduction in IL-1β expression was seen with the linalool standard. Based on the IL-1β mRNA expression, this treatment was proved to be the least effective in this case (Fig. 3C).

As lavender EO exert their anti-inflammatory effects via the NFκB pathway, the activity of lavender EOs and linalool was compared to the efficacy of ACHP treatment that inhibits the entire NFκB pathway. Compared to the DMSO control, the ACHP inhibitor significantly reduced the expression of all examined cytokines (Fig. 3).

After TNFα 24 h pre-treatment, IL-6 and IL-8 mRNA expressions decreased most after 6 h of ACHP treatment. It should be highlighted that lavender EO prepared at the end of flowering showed better result than the ACHP inhibitor for IL-8 (Fig. 3A).

The 24 h ACHP treatment following 6 h TNFα pretreatment significantly reduced IL-6, IL-8 and IL-1β expression (Fig. 3B). Compared to the ACHP treatment, better results for IL-8 were obtained with linalool and EO from end of flowering period. Moreover, for IL-6, EO from end of flowering was more effective than ACHP treatment. In case of IL-1β, the alteration in mRNA expression in response to linalool treatment and end of flowering EO was more beneficial than the ACHP NFκB inhibitor treatment (Fig. 3B).

At 24 h TNFα pre-treatment and 24 h ACHP treatment, both IL-6 and IL-8 expressions were reduced in almost equal extent. EOs and linalool were not effective compared to ACHP treatment in this case (Fig. 3C).

Effects of eucalyptus essential oil and eucalyptol standard on mRNA expression of IL-1β, IL-6 and IL-8 after TNFα pre-treatment

Similarly to lavender EOs and linalool experiments, sterile inflammation was induced in T24 cells by TNFα. The effects of eucalyptus oil and eucalyptol standard were also investigated by monitoring the changes in IL-1β, IL-6 and IL-8 expression.

Comparing the effects of eucalyptus EO and eucalyptol in the case of IL-8 expression, after 24 h of TNFα pre-treatment, the eucalyptus EO was better for 6 h of treatments. IL-1β and IL-6, mRNA expression was effectively reduced by both eucalyptus oil and eucalyptol. There was no significant difference in results between the two substances (Fig. 4A).

The alteration in IL-8 chemokine expression after 6 h of TNFα pre-treatment was found to be more promising for 24 h of treatments with eucalyptus oil. The largest significant reduction in IL-6 mRNA expression changes was observed after 6 h of TNFα pretreatment with long treatment (24 h). For IL-1β, a significant reduction was seen again with eucalyptus EO treatment (Fig. 4B).

The IL-8 and IL-6 mRNA expression in case of 24 h TNFα pre-treatment following 24 h treatment with eucalyptol standard and eucalyptus EO was decrease significantly. Comparing these two results, the eucalyptus EO was more effective. No significant change was observed in IL-1β with this treatment protocol (Fig. 4C).

(See figure on next page.)

Fig. 3 Relative mRNA expression of IL-1β, IL-6 and IL-8 after TNFα pre-treatment of T24 and comparison of the effects of lavender oils and linalool standard with ACHP treatment. The mRNA expression levels were determined with Real-time PCR using SYBR Green protocol. The relative expression of controls was regarded as 1. β-actin was utilized for normalization. **A** T24 cells were pre-treated with TNFα for 24 h then with ACHP, linalool and lavender EOs beginning of flowering and end of flowering for 6 h. **B** T24 cells were pre-treated with TNFα for 6 h then with ACHP, linalool and lavender EOs beginning of flowering and end of flowering for 24 h. **C** T24 cells were pre-treated with TNFα for 24 h then with ACHP, linalool and lavender EOs beginning of flowering and end of flowering for 24 h. DMSO treatment was used as a control of the treated cells. The experiments were repeated three times ($n = 3$) in triplicates. Asterisks indicate $p < 0.05$ compared to the control. Cross marks $p < 0.05$ compared to the ACHP treatment. Double cross shows $p < 0.05$ compared to the linalool treatment. Number sign indicates $p < 0.05$ compared to the beginning of flowering

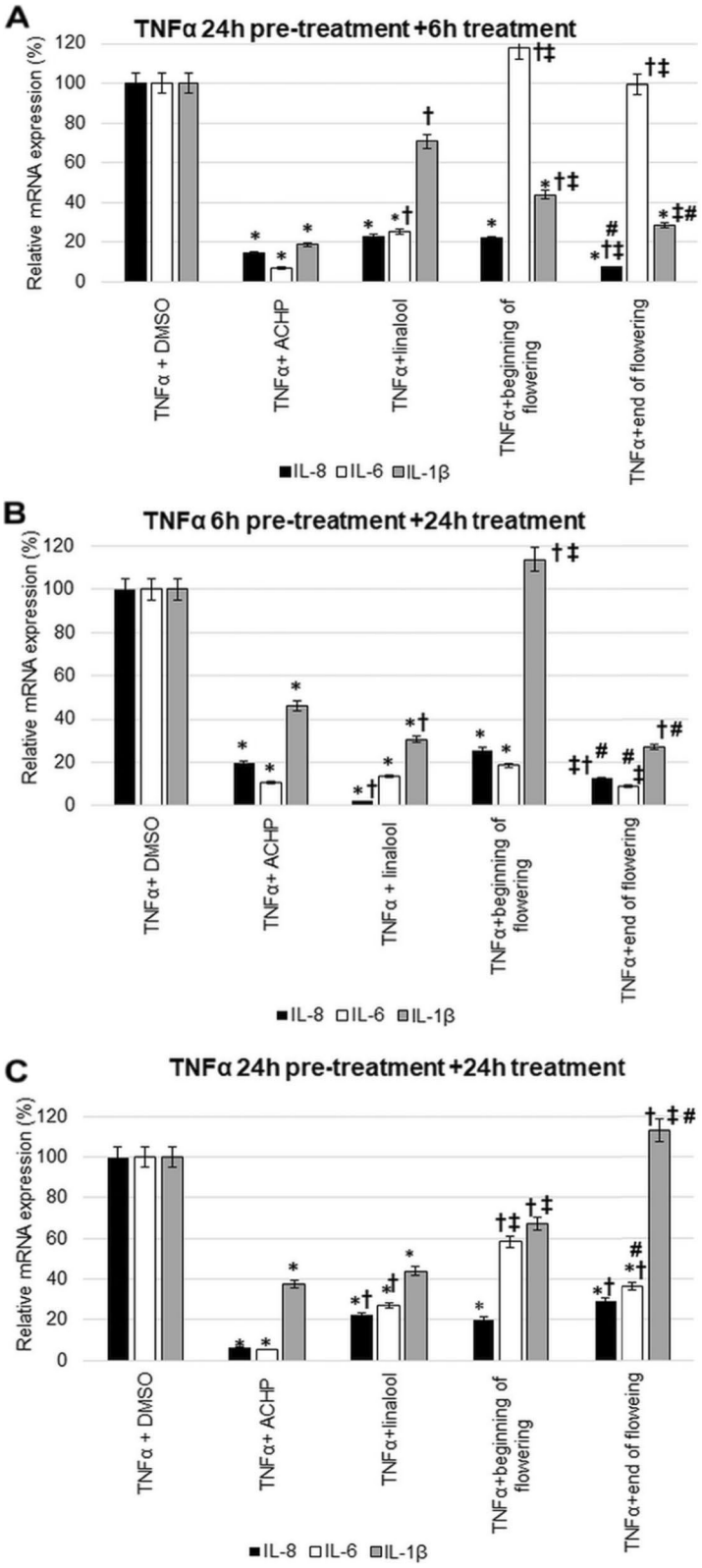


Fig. 3 (See legend on previous page.)

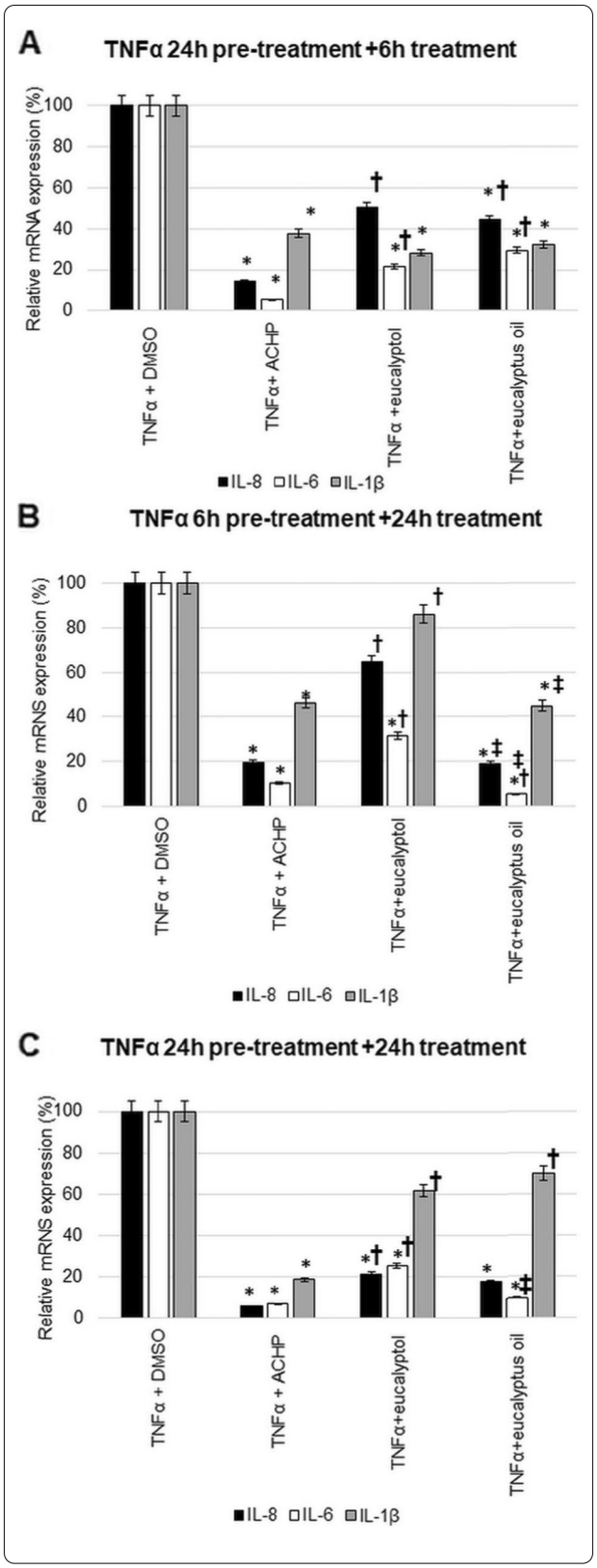


Fig. 4 Relative mRNA expression of IL-1β, IL-6 and IL-8 after TNFα pre-treatment of T24 and comparison of standard effects of eucalyptol and eucalyptus oils with ACHP treatment. The mRNA expression levels were determined with Real-time PCR using SYBR Green protocol. The relative expression of controls was regarded as 1. β-actin was utilized for normalization. **A** T24 cells were pre-treated with TNFα for 24 h then 6 h treated with ACHP/eucalyptol and eucalyptus oil. **B** T24 cells were pre-treated with TNFα for 6 h then 24 h treated with ACHP/ eucalyptol and eucalyptus oil **(C)** T24 cells were pre-treated with TNFα for 24 h then 24 h treated with ACHP/ eucalyptol and eucalyptus oil. DMSO treatment was used as a control of the treated cells. The experiments were repeated three times ($n = 3$) in triplicates. Asterisks indicate $p < 0.05$ compared to the control. Cross marks $p < 0.05$ compared to the ACHP treatment. Double cross shows $p < 0.05$ compared to the eucalyptol treatment

The effect of eucalyptus EO and eucalyptol standard on the inhibition of NFκB pathway was also compared to the ACHP treatment.

After 24 h of TNFα pre-treatment and 6 h of ACHP treatment, the decrease of IL-6 expression was the most significant (Fig. 4A). Neither eucalyptus oil nor eucalyptol was more effective than the inhibitor treatment for any of the cytokines (Fig. 4A).

Again, the mRNA expression levels obtained at 24 h of ACHP treatment after 6 h of TNFα pre-treatment showed the largest decrease for IL-6, followed by IL-8 and IL-1β. More effective treatment than ACHP was seen for both IL-8 and IL-6 with the eucalyptol EO (Fig. 4B).

IL-8 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) measurement at T24 cells with linalool, lavender oils, eucalyptol and eucalyptus oil treatments after TNFα pre-treatment

The most promising inhibitory effect of the examined EOs and their main compounds was found in case of IL-8 chemokine. Therefore, secreted IL-8 protein concentrations were also determined. Significant reductions were measured 24 h after short term TNFα pre-treatment and 6 h after long term TNFα pre-treatment in response to ACHP inhibitor treatment.

Lavender EOs significantly reduced IL-8 protein levels 24 h after 6 h of TNFα pre-treatment. Moreover, the EO distilled from the beginning of flowering was more effective (Fig. 5A). No change was observed for linalool. Treatments with EO of lavender or linalool standard after 24 h TNFα pre-treatment were not capable to decrease the IL-8 protein levels (Fig. 5A).

In the case of eucalyptus EO and eucalyptol standard treatments, there was no change in EO after 6 h of TNFα pre-treatment and 24 h of treatment, whereas eucalyptol significantly increased IL-8 level (Fig. 5B). After 24 h of TNFα pre-treatment, 6 h of eucalyptus oil and eucalyptol

treatments caused a decrease, while 24 h of treatment caused increase in IL-8 levels (Fig. 5B).

Discussion

In this study, we examined the effects of lavender and eucalyptus EOs and their main components (linalool and eucalyptol) in an in vitro T24 cell culture (human bladder epithelial cells) modelling of IC/BPS. It is important to highlight that the IC/BPS is a non-bacterial inflammation of the bladder wall, only the symptoms are similar to bacterial cystitis. Usually the cystitis is caused by Gram negative bacterial infection and the signaling pathway starts with activation by lipopolysaccharide (LPS) that is the common virulence factor [39]. The LPS targets the Toll-like receptors (TLRs) [40]. The TLRs are involved in the expression of transcriptional mediators, which leads to the production of pro-inflammatory cytokines and Type I IFNs, such as IL-1β, IL-6, IL-8, INF-γ, and TNF-α [41, 42]. In contrast, sterile inflammation of IC/BPS increases TNFα activity, which acts through TNFα receptors, similarly leading to pro-inflammatory interleukin production (Fig. 6).

Utilization of EOs against bacterial infections is emerging due to the increased occurrence of antibiotic resistance. Hybrid lavender EOs seem to be promising candidates as new therapies against the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* due to their low cytotoxicity and high effectiveness [38]. Lavender oils from true lavender, spike lavender and hybrid lavenders differ in the constitution and therefore in biological and therapeutic activities. Lavender EOs are also potent candidates as anti-cancer therapy since they affect cell morphology, cell cycle and proliferation of cancer cells [34]. Further examination of the lavender EOs may lead to the development of innovative therapies and could be used for new clinical applications.

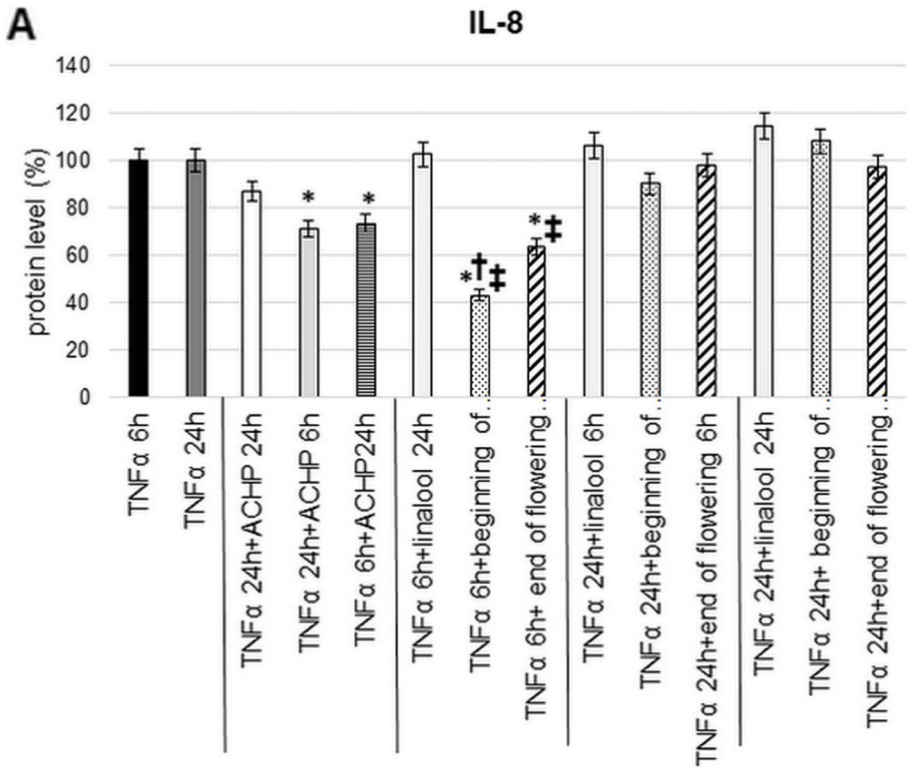
Our studies showed that the most pronounced reduction in the cytokine mRNA expression in response to lavender oils and linalool treatments was obtained in all cases after short time (6 h) TNFα pre-treatment. Furthermore, linalool and lavender EO prepared at the end of flowering period were the most effective. Similar results could be observed when comparison was made with ACHP NFκB inhibitor treatment, which was utilized as a positive control of cytokine transcription inhibition. For both IL-8 and IL-1β, lavender EO prepared at the end of flowering and linalool had better effect than the ACHP treatment. Treatment with end of flowering lavender EO for 6 h after long TNFα pre-treatment showed better efficacy on IL-8 cytokine expression compared to the ACHP treatment. The lavender oil distilled at end of flowering was presumably more effective than EO produced at beginning of flowering (36.33 ± 0.10%) because of its linalool content was higher (41.63 ± 0.13%). When comparing the composition of lavender EOs based on GC-MS, the differences are clearly observed. It contains the second highest percentage of linalyl acetate and terpinene-4-ol, after linalool. The major components of the beginning of flowering EO are linalool (36.33%; 632 ng/mL), linalyl acetate (21.47%; 386.46 ng/mL) and terpinene-4-ol (9.47%; 176.71 ng/mL). Meanwhile, end of flowering lavender EO contains higher level of linalool (41.63%; 724 ng/mL) and terpinene-4-ol (16.69%; 311.43 ng/mL), and lower level of linalyl acetate (14.78%; 266.04 ng/mL) (Supplementary Table 1). All these active substances have a proven anti-inflammatory effect and inhibit the NFκB pathway [8, 20, 43, 44]. α-Terpineol may also contribute to the anti-inflammatory effect of the EOs since in vivo it reduces the serum levels of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1β, IL-6 and TNF-α [33, 45, 46].

Comparisons between eucalyptus oil and eucalyptol in terms of effect on mRNA expression showed overall higher potency of the EO for all cytokines. Furthermore, compared to the effect of ACHP NFκB inhibitor, long treatments with eucalyptus EO were more effective for IL-8 and IL-6. The results revealed that the eucalyptus EO was more effective than the main component eucalyptol. The complex effect of EO causes more decrease in mRNA expression. In addition to eucalyptol, α-pinene, γ-terpinene, terpinen-4-ol and α-terpineol may contribute to the anti-inflammatory effect of eucalyptus EO [46, 47]. The inhibitory effects of α-pinene on inflammatory responses are significantly decreased the production of the IL-6 and TNFα [48]. γ-terpinene decreases the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1β and IL-6, and enhance IL-10 [49]. Examining IL-8 chemokine at protein level confirms that the examined EOs and components were the most effective in case of short induction of sterile inflammation. EOs distilled from lavender at the beginning of flowering and at the end of flowering significantly reduced IL-8 levels and even proved to be more effective than ACHP treatment.

Our studies clearly demonstrate that the components of the EO are crucial in determining the anti-inflammatory effect. Lavender EOs were found to be more effective than eucalyptus oil in reducing inflammation. The reason for this, based on GC, can be traced back to the

(See figure on next page.)

Fig. 5 Human IL-8 ELISA measurement at 3 types of treatment schedule. **A** Secreted IL-8 protein level determination of TNFα pre-treated T24 cells after treated with ACHP, linalool and lavender EOs: beginning of flowering and end of flowering. **B** Secreted IL-8 protein level determination of TNFα pre-treated T24 cells after treated with ACHP, eucalyptol, and eucalyptus oil. The experiments were repeated three times ($n = 3$) in triplicates. Asterisks indicate $p < 0.05$ compared to the TNFα pre-treatments. Cross marks $p < 0.05$ compared to the ACHP treatment. Double cross shows $p < 0.05$ compared to the linalool treatment



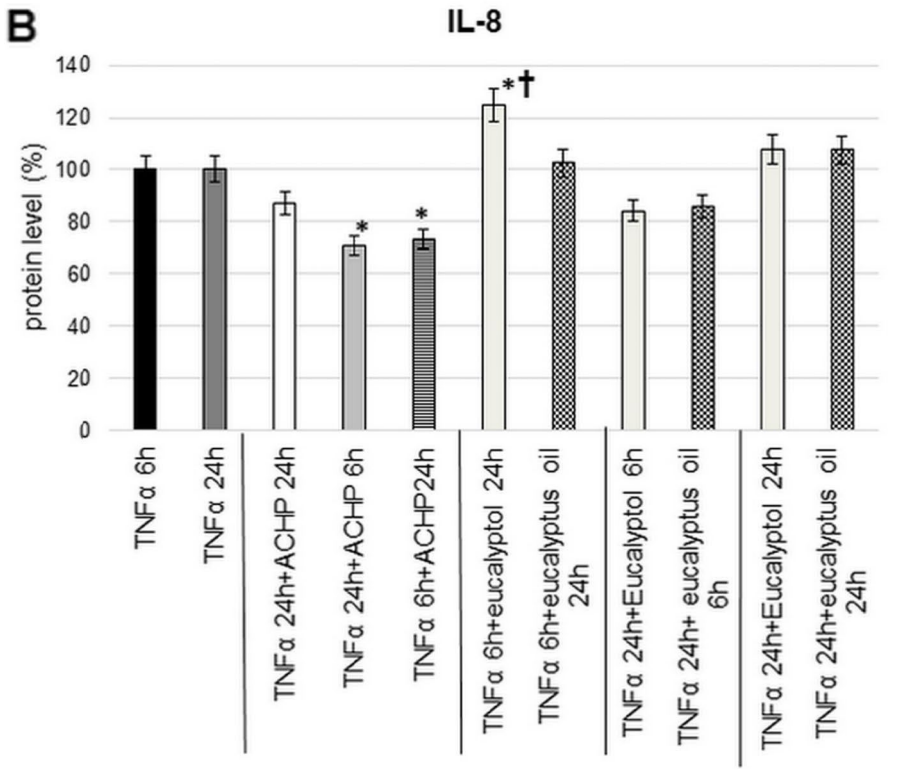


Fig. 5 (See legend on previous page.)

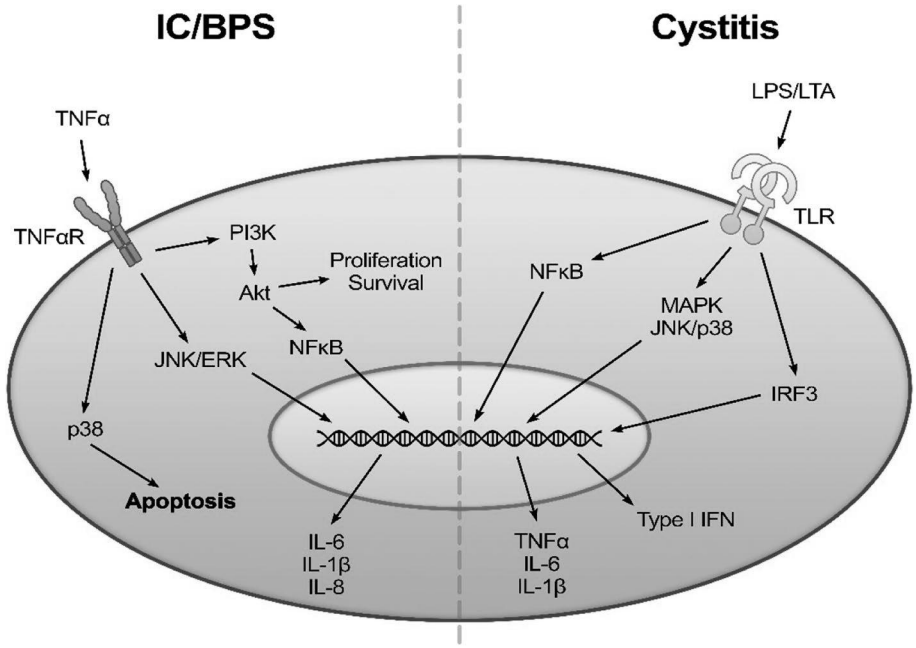


Fig. 6 Comparison of IC/BPS signaling pathway and cystitis signaling pathway

components. When comparing the two main components analysed, it is evident from the results that linalool has a stronger inhibitory effect than eucalyptol. Lavender EOs also contain high levels (min 4%) of linalyl acetate, terpinen-4-ol, α-terpineol. Eucalyptus oil, on the other hand, contains only small amounts of other components besides eucalyptol, which could complement its effect, such as α-pinene (6.32%; 108.45 ng/mL), γ-terpinen (3.2%; 54.40 ng/mL) and terpinen-4-ol (1.9%; 35.36 ng/mL). The overlap between the constitution of the two essential oils is minimal and the amounts are small (0.02–1.6%). The common components are eucalyptol, terpinen-4-ol, α-terpineol, mycrene, α-pinene, β-pinen, γ-terpinen, α-phellandrene. In some cases the effect of these small percentages of components may be negligible (Supplementary Table 1).

Based on our study the lavender EOs are more effectively reduce the inflammatory components in this in vitro system than eucalyptus EO. Both lavender EOs and linalool were more effective in decreasing pro-inflammatory cytokine mRNA expression than ACHP inhibitor, suggesting that the different components of EO affect not only the NFκB pathway, but others (e.g. MAPK), as well. Moreover, both lavender EOs were found to be significant effective in short TNF pre-treatment after long EO treatment, compared to the ACHP NFκB-inhibitor in the IL-8 ELISA assay. However, the beginning of flowering lavender EO was better than end of flowering EO. Part of the reason for this may be that linalyl acetate has a delayed onset of action compared to linalool, due to in vivo biotransformation, which increases linalool concentration in the EO [50]. On the other side, there may be translation factors involved in the process that influence its effect. Additional experiments are needed for revealing these effects. In summary, we may say that the different EOs have distinct therapeutic effects at certain inflammatory conditions, as our study demonstrates. Even the timing of the harvesting of flowers may have importance because of the composition of the EO. The composition of EOs can also vary from year to year due to weather conditions and different extraction techniques, which should always be considered when experimenting with them. Examination of EOs obtained from different years may result in the determination of the best ratio of the components, which gives the possibility for the development of "artificial" EOs with high efficiency.

Conclusions

In our study, we investigated the anti-inflammatory effects of lavender and eucalyptus EOs and their main components on T24 human uroepithelial cell line. We mimicked the sterile inflammation of the IC/BPS induced by TNFα, which was the pre-treatment. In conclusion, our results showed that lavender EOs were more effective than eucalyptus EO in this case. Furthermore, we concluded that, comparing the protein levels of IL-8 pro-inflammatory cytokine secreted by the T24 cells treated with EOs and standards, with the inhibitory effect of ACHP inhibitor, the lavender EOs showed better efficacy

than ACHP treatment. Comparing lavender EOs with each other, lavender EO prepared at the beginning of flowering period was the more effective. This is presumably due to the different composition of the two EOs.

Finally, lavender EOs may be suitable for use as an adjunct to intravesical therapy. Their anti-inflammatory effect may well complement GAG-regenerative therapy in the bladder after pharmaceutical formulation.

Abbreviations

ACHP: 2-Amino-6-[2-(cyclopropylmethoxy)-6-hydroxyphenyl]-4-(4-piperidinyl)-3-pyridinecarbonitrile; BPS: Bladder Pain Syndrome; CCK-8: Cell counting kit-8; DMSO: Dimethyl sulphoxide; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; EOs: Essential oils; FBS: Fetal bovine serum; GC-FID: Gas chromatography flame ionisation detector; GC-MS: Gas chromatography mass spectrometer; IC: Interstitial cystitis; IL-1β: Interleukin-1β; IL-6: Interleukin-6; IL-8: Interleukin-8; LPS: Lipopolysaccharide; MAPK: Mitogen activated protein kinase; NFκB: Nuclear factor kappaB; PBS: Phosphate buffered saline; TNFα: Tumor necrosis factor α; T24: Human bladder epithelial cells line.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s12906-022-03604-2.

Additional file 1: Supplementary Table 1. Percentage (%) and relative concentrations (ng/mL) of the compounds of eucalyptus essential oil; *LRI_{exp}: experimental linear retention index. *The components structure come from PubChem. *RT: Retention time. **Supplementary Table 2.** Cell viability assays of TNFα on T24. **Supplementary Fig. 1.** Eucalyptus oil chromatogram. **Supplementary Fig. 2.** mRNA expression of TNFα for 6 h and 24 h treatments. **Supplementary Fig. 3.** Cell viability workflow. **Supplementary Fig. 4.** Real time PCR workflow

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Shimadzu Corporation and Merck Life Science for their continuous support.

Authors' contributions

Conceptualization, G.H.; methodology, E.P.; validation, G. M., L. M. and A. B..; formal analysis, A.H.; investigation, A.H..; writing—original draft preparation, A.H..; writing—review and editing, P. B, E. P. and K. S..; supervision, G.H. and E. P.; funding acquisition, G. H.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. The author(s) read and approved the final manuscript.

Funding

Open access funding provided by University of Pécs. This research was funded by the NKFI (National Research, Development and Innovation Office) K 128217 grant of Györgyi Horváth. The project partially has been supported by the European Union, co-financed by the European Social Fund (EFOP-3.6.1.-16–2016-00004).

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article. The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the Mendeley Data repository, doi: https://doi.org/10.17632/6m9xsj5t35.1. https://data.mendeley.com/datasets/6m9xsj5t35/

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Experimental research and field studies on plants was complied with relevant institutional, national, and international guidelines and legislation. The permission was obtained from the private field/land owner who is also one of the friend's of Györgyi Horváth to collect ***Lavandula angustifolia*** Mill".

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Author details

[1]Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, H-7624, Rókus u. 2, Pécs, Hungary. [2]Department of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, H-7624, Rókus u. 2, Pécs, Hungary. [3]Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, 98168 Messina, Italy. [4]Chromaleont s.r.l., c/o Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, 98168 Messina, Italy. [5]Unit of Food Science and Nutrition, Department of Medicine, University Campus Bio-Medico of Rome, 00128 Rome, Italy. [6]Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Semmelweis University, H-1085 Üllői út 26, Budapest, Hungary. [7]Mikszáth Pharmacy, H-1088, Mikszát Kálmán tér 4, Budapest, Hungary.

Received: 12 January 2022 Accepted: 18 April 2022
Published online: 30 April 2022

References

1. Cavalleri R, Becker JS, Pavan AM, Bianchetti P, Goettert MI, Ethur EM, et al. Essential oils rich in monoterpenes are unsuitable as additives to boar semen extender. Andrologia. 2018;50:1–10. https://doi.org/10.1111/and.13074.
2. Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, et al. Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - a review. Curr Drug Metab. 2018;19:1100–10. https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850.
3. Bhowal M, Gopal M. Eucalyptol: safety and pharmacological profile. RGUHS J Pharm Sci. 2016;5:125–31. https://doi.org/10.5530/rjps.2015.4.2.
4. Huo M, Cui X, Xue J, Chi G, Gao R, Deng X, et al. Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. J Surg Res. 2013;180:e47–54. https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.10.050.
5. Erickson DR, Kunselman AR, Bentley CM, Peters KM, Rovner ES, Demers LM, et al. Changes in urine markers and symptoms after bladder distention for interstitial cystitis. J Urol. 2007;177:556–60. https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.09.029.
6. Donadu M, Usai D, Pinna A, Porcu T, Mazzarello V, Fiamma M, et al. In vitro activity of hybrid lavender essential oils against multidrug resistant strains of pseudomonas aeruginosa. J Infect Dev Ctries. 2018;12:9–14. https://doi.org/10.3855/jidc.9920.
7. Aboutaleb N, Jamali H, Abolhasani M, Pazoki TH. Lavender oil (Lavandula angustifolia) attenuates renal ischemia/reperfusion injury in rats through suppression of inflammation, oxidative stress and apoptosis. Biomed Pharmacother. 2019;110(September 2018):9–19. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.045.
8. Ma J, Xu H, Wu J, Qu C, Sun F, Xu S. Linalool inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting NF-κB activation. Int Immunopharmacol. 2015;29:708–13. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.09.005.
9. Amorese V, Donadu MG, Usai D, Sanna A, Milia F, Pisanu F, et al. In vitro activity of essential oils against pseudomonas aeruginosa isolated from infected hip implants. J Infect Dev Ctries. 2018;12:996–1001. https://doi.org/10.3855/jidc.10988.
10. Moghaddam M, Mehdizadeh L. Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. (in) Soft Chem Food Ferment. Handbook of Food Bioengineering, Volume 3. In: Grumezescu AM, Holban AM, editors. London: Academic Press, Elsevier; 2017. p. 379–419. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811412-4.00013-8.
11. Biswas R, Bagchi A. NFkB pathway and inhibition: an overview. Comput Mol Biol. 2016;6:1–20. https://doi.org/10.5376/cmb.2016.06.0001.
12. Schütze S, Wiegmann K, Machleidt T, Krönke M. TNF-induced activation of NF-κB. Immunobiology. 1995;193:193–203. https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80543-7.

13. Li H, Lin X. Positive and negative signaling components involved in TNFα-induced NF-κB activation. Cytokine. 2008;41:1–8. https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2007.09.016.
14. Daniels AM, Schulte AR, Herndon CM. Interstitial cystitis: an update on the disease process and treatment. J Pain Palliat Care Pharmacother. 2018;32:49–58. https://doi.org/10.1080/15360288.2018.1476433.
15. Dan Vickery. Demonstrating clinical benefit for drugs intended to treat interstitial cystitis/bladder pain syndrome (IC/BPS). 2017. https://www.fda.gov/media/109920/download. .
16. Meng E, Hsu Y-C, Chuang Y-C. Advances in intravesical therapy for bladder pain syndrome (BPS)/interstitial cystitis (IC). LUTS. 2018;10:3–11. https://doi.org/10.1111/luts.12214.
17. Khastgir J. Intravesical GAG replacement therapies for bladder pain syndrome / interstitial cystitis – an update. Urol News. 2020;4:1-3. https://www.urologynews.uk.com/features/features/post/intravesical-gag-replacement-therapies-for-bladder-pain-syndrome-interstitial-cystitis-an-update. .
18. Shie J-H, Kuo H-C. Higher levels of cell apoptosis and abnormal E-cadherin expression in the urothelium are associated with inflammation in patients with interstitial cystitis/painful bladder syndrome. BJU Int. 2011;108:E136–41. https://doi.org/10.1111/J.1464-410X.2010.09911.X.
19. Van De Merwe JP, Arendsen HJ. Interstitial cystitis: a review of immunological aspects of the aetiology and pathogenesis, with a hypothesis. BJU Int. 2000;85:995–9. https://doi.org/10.1046/j.1464-410X.2000.00646.x.
20. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor-a signaling in macrophages. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2010;20:87–103. https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v20.i2.10.
21. Kuo HC, Liu HT, Shie JH. Potential urine and serum biomarkers for patients with overactive bladder and interstitial cystitis/bladder pain syndrome. Tzu Chi Med J. 2013;25:13–8. https://doi.org/10.1016/j.tcmj.2012.10.005.
22. Peters KM, Diokno AC, Steinert BW. Preliminary study on urinary cytokine levels in interstitial cystitis: does intravesical bacille Calmette-Guérin treat interstitial cystitis by altering the immune profile in the bladder? Urology. 1999;54:450–3. https://doi.org/10.1016/S0090-4295(99)00162-4.
23. Hedges S, Agace W, Svensson M, Sjögren AC, Ceska M, Svanborg C. Uroepithelial cells are part of a mucosal cytokine network. Infect Immun. 2021;62:2315–21. https://doi.org/10.1128/iai.62.6.2315-2321.1994.
24. Jiang YH, Peng CH, Liu HT, Kuo HC. Increased pro-inflammatory cytokines, C-reactive protein and nerve growth factor expressions in serum of patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome. PLoS One. 2013;8:4–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076779.
25. Behzadi P, Sameer AS, Nissar S, Banday MZ, Gajdács M, García-Perdomo HA, et al. The Interleukin-1 (IL-1) superfamily cytokines and their single nucleotide polymorphisms (SNPs). J Immunol Res. 2022;2022:1–25. https://doi.org/10.1155/2022/2054431.
26. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res. 2011;1813:878–88. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
27. Cavaillon JM. Interleukins and inflammation. Pathol Biol (Paris). 1990;38:36–42.
28. Dinarello CA. Interleukin-1β and the autoinflammatory diseases. N Engl J Med. 2009;360:2467–70. https://doi.org/10.1056/NEJMe0811014.
29. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. IL-1 and related cytokines in innate and adaptive immunity in health and disease. Immunity. 2019;50:778. https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2019.03.012.
30. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. Chest. 2000;117:1162–72. https://doi.org/10.1378/CHEST.117.4.1162.
31. Sheu JN, Chen SM, Meng MH, Lue KH. The role of serum and urine interleukin-8 on acute pyelonephritis and subsequent renal scarring in children. Pediatr Infect Dis J. 2009;28:885–90. https://doi.org/10.1097/INF.0B013E3181A39E23.
32. Huang F, Horikoshi S, Kurusu A, Shibata T, Suzuki S, Funabiki K, Shirato I, Tomino Y. Urinary levels of interleukin-8 (IL-8) and disease activity in patients with IgA nephropathy. J Clin Lab Anal. 2001;15:30-34.
33. Pandur E, Balatinácz A, Micalizzi G, Mondello L, Horváth A, Sipos K, et al. Anti-inflammatory effect of lavender (Lavandula angustifolia mill.) essential oil prepared during different plant phenophases on THP-1 macrophages. BMC Complement Med Ther. 2021;21:287. https://doi.org/10.1186/s12906-021-03461-5.
34. Ekpenyong CE, Akpan E, Nyoh A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of Cymbopogon citratus (DC.) Stapf extracts. Chin. J Nat Med. 2015;13:321–37. https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30023-6.
35. Micalizzi G, Ragosta E, Farnetti S, Dugo P, Tranchida PQ, Mondello L, et al. Rapid and miniaturized qualitative and quantitative gas chromatography profiling of human blood total fatty acids. Anal Bioanal Chem. 2020;412:2327–37. https://doi.org/10.1007/s00216-020-02424-y.
36. Horváth G, Horváth A, Reichert G, Böszörményi A, Sipos K, Pandur E. Three chemotypes of thyme (Thymus vulgaris L.) essential oil and their main compounds affect differently the IL-6 and TNFα cytokine secretions of BV-2 microglia by modulating the NF-κB and C/EBPβ signalling pathways. BMC Complement Med Ther. 2021;21:1–14. https://doi.org/10.1186/s12906-021-03319-w.
37. Pandur E, Tamási K, Pap R, Jánosa G, Sipos K. Distinct effects of Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus cell wall component-induced inflammation on the iron metabolism of THP-1 cells. Int J Mol Sci. 2021;22:1–20. https://doi.org/10.3390/ijms22031497.
38. James NE, Emerson JB, Borgstadt AD, Beffa L, Oliver MT, Hovanesian V, et al. The biomarker HE4 (WFDC2) promotes a pro-angiogenic and immunosuppressive tumor microenvironment via regulation of STAT3 target genes. Sci Rep. 2020;10:1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-65353-x.
39. Ueda N, Kondo M, Takezawa K, Kiuchi H, Sekii Y, Inagaki Y, et al. Bladder urothelium converts bacterial lipopolysaccharide information into neural signaling via an ATP-mediated pathway to enhance the micturition reflex for rapid defense. Sci Rep. 2020;10:1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-020-78398-9.
40. Behzadi E, Behzadi P. The role of toll-like receptors (TLRs) in urinary tract infections (UTIs). Cent Eur J Urol. 2016;69:404–10. https://doi.org/10.5173/ceju.2016.871.
41. Behzadi P, García-Perdomo HA, Karpiński TM. Toll-like receptors: general molecular and structural biology. J Immunol Res. 2021;2021:9914854. https://doi.org/10.1155/2021/9914854.
42. Jenab A, Roghanian R, Emtiazi G. Bacterial natural compounds with anti-inflammatory and immunomodulatory properties (Mini review). Drug Des Devel Ther. 2020;14:3787–801. https://doi.org/10.2147/DDDT.S261283.
43. Wyndaele JJJ, Riedl C, Taneja R, Lovász S, Ueda T, Cervigni M. GAG replenishment therapy for bladder pain syndrome/interstitial cystitis. Neurourol Urodyn. 2019;38:535–44. https://doi.org/10.1002/nau.23900.
44. Seol GH, Kim KY. Eucalyptol and its role in chronic diseases. Adv Exp Med Biol. 2016;929:389–98. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41342-6_18.
45. Sales A, L de O F, Bicas JL. Production, properties, and applications of α-Terpineol. Food Bioprocess Technol. 2020;13:1261–79. https://doi.org/10.1007/s11947-020-02461-6.
46. Held S, Schieberle P, Somoza V. Characterization of α-terpineol as an anti-inflammatory component of orange juice by in vitro studies using oral buccal cells. J Agric Food Chem. 2007;55:8040–6. https://doi.org/10.1021/jf071691m.
47. Clemens JQ, Link CL, Eggers PW, Kusek JW, Nyberg LM, McKinlay JB. Prevalence of painful bladder symptoms and effect on quality of life in black, Hispanic and white men and women. J Urol. 2007;177:1390–4. https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.11.084.
48. Kim DS, Lee HJ, Jeon YD, Han YH, Kee JY, Kim HJ, et al. Alpha-Pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF-κB pathway in mouse peritoneal macrophages. Am J Chin Med. 2015;43:731–42. https://doi.org/10.1142/S0192415X15500457.
49. Ramalho TR, Filgueiras LR, De Oliveira MTP, De Araujo Lima AL, Bezerra-Santos CR, Jancar S, et al. Gamma-Terpinene modulation of LPS-stimulated macrophages is dependent on the PGE2/IL-10 Axis. Planta Med. 2016;82:1341–5. https://doi.org/10.1055/s-0042-107799.
50. Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, Serra G, Pippia P, Moretti MDL. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. Phytomedicine. 2002;9:721–6. https://doi.org/10.1078/094471102321621322.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.