

**Illóolajok hatásának vizsgálata akut légúti gyulladás
egérmodelljében**

Doktori (PhD) értekezés



Dr. Csikós Eszter

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika egyetemi tanár

Programvezető: Prof. Dr. Deli József egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Horváth Györgyi egyetemi docens

**Pécsi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Farmakognóziái Intézet**

Pécs, 2023

1. Bevezetés

A növényi illóolajok használatára már az ókortól kezdve számos bizonyíték áll rendelkezésünkre. A középkorban a vallási életben betöltött szerep mellett már a járványok elleni védekezés, illetve láz, fejfájás és köhögés csillapítása is felkerült a lehetséges felhasználási módok közé [Burt 2004]. Mivel napjainkban egyre nagyobb népszerűségnek örvendenek a természetes gyógymódok, így az illóolajok iránti érdeklődés is újra fellendült. Többségüket a tradicionális felhasználás, az évek során összegyűlt tapasztalatok alapján alkalmazzák, azonban ahhoz, hogy az illóolajokat kellő hatékonysággal és biztonsággal használhassuk, nélkülözhetetlen az élő szervezetre gyakorolt hatásuk alapos megismerése.

Az illóolajok alkalmazása a megfázás és más légúti megbetegedések esetében is egyre nagyobb teret hódít a lakosság körében, akár önállóan vagy a gyógyszeres terápia kiegészítőjeként. Az olyan légúti megbetegedések, mint a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), az alsólégúti fertőzések és a légutakat érintő rákos megbetegedések, mind vezető helyet foglalnak el a leggyakoribb halált okozó betegségek listáján [WHO], halálzási arányuk nő, még a kezelési lehetőségeikben történt előrelépések ellenére is. A legtöbb esetben ezek a betegségek akut vagy krónikus légúti gyulladással is járó folyamatok, a gyulladással járó állapotok hagyományos gyógyszeres terápiája pedig a szteroid (SAID) és nem-szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) alkalmazásán alapul. A szteroid gyulladáscsökkentők (pl. glükokortikoidok) alkalmazása ebben az indikációban már vitatott, mivel számos mellékhatással (pl. csonttritkulás, anyagcsere zavarok) járhatnak [Schäcke et al. 2002]. A nem szteroid gyulladáscsökkentők (pl. aszpirin, ibuprofen, diklofenak) hosszan tartó alkalmazása pedig gyomor-bélrendszeri, szív-érrendszeri, máj-, vese-, agyi és tüdőproblémákat okozhat [Buchanan és Bellamy 1991, Bindu et al. 2020]. Éppen ezért szükséges biztonságosabb gyulladáscsökkentő szerek keresése, fejlesztése. Az illóolajok alkalmazása a légutakat érintő problémákban logikus lépés, hiszen ilyen indikációkban érvényesül a komponenseik illékonyasága, aminek köszönhetően inhalálás útján könnyedén bejutnak a légutakba, így lokálisan hathatnak. *Per os* vagy szisztémás alkalmazást követően pedig több komponensük kiválasztódik a tüdőben, így akár késleltetett helyi hatás elérésére is alkalmasak lehetnek. Komplex összetételük többféle támadáspont/hatásmechanizmus lehetőségét is adja, az egyre

gyakrabban vizsgált antibakteriális tulajdonságuk például a légúti fertőzések kezelése esetén lehet hasznos. *In vivo* gyulladáscsökkentő hatásuk kevésbé ismert, kevés állatkísérletes és humán adat áll rendelkezésre, viszont az eddigi eredmények alapján a légúti megbetegedések megelőzésében, kezelésében, akár személyre szabott terápiák kiegészítésében, a betegek életminőségének javításában az illóolajoknak is szerepük lehet. Ezért is szükséges a hatásuk és az esetleges mellékhatásaik tanulmányozása. [Faleiro és Miguel 2013, Li et al. 2022]

2. Célkitűzések

Kutatómunkánk során a gyakorlatban gyakran előforduló, a szakirodalom alapján ígéretes gyulladáscsökkentő hatású, illetve mikrobiológiai kísérleteinkben antibakteriális hatású illóolajok gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálatát terveztük *in vivo* módszerek alkalmazásával a következők szerint:

- Közforgalomból származó illóolajok kémiai összetételének meghatározása gázkromatográfiás vizsgálattal.
- Az inhalált illóolajok hatásának *in vivo* vizsgálata, illetve hatásmechanizmusuk tanulmányozása endotoxinnal (lipopoliszacharid, LPS) kiváltott akut légúti gyulladás állatmodelljében. A légzésfunkciós mérések mellett az állatokból gyűjtött tüdőminták szövettani vizsgálatát, mieloperoxidáz-aktivitás (MPO-aktivitás) és gyulladásos citokinek mennyiségének mérését is célul tűztük ki.

3. Anyag és módszer

3.1. A kísérleti modell

Kísérleteinkben az endotoxin-indukálta tüdőgyulladás mechanizmusmodellét használtuk. Minden vegyszert a Sigma-Aldrich Kft-től (Budapest, Magyarország) szereztünk be.

3.1.1. Illóolajok

Kísérleteink során az állatok inhaláltatására közforgalomban beszerezhető (Aromax Zrt.)

- citromellaolajat (anyanövény: *Cymbopogon nardus*, gyártási szám: E8912/1309),
- fahéjolajat (anyanövény: *Cinnamomum zeylanicum*, gyártási szám: H4991/1511),
- fenyőolajat (anyanövény: *Pinus sylvestris*, gyártási szám: 69543/1509),
- kakukkfűolajat (anyanövény: *Thymus vulgaris*, gyártási szám: H3981/1509),
- szegfűszegolajat (anyanövény: *Eugenia caryophyllata*, syn. *Syzygium aromaticum*, gyártási szám: J3481/1609) használtunk.

Az illóolajokat a Herbária gyógynövényüzletben vásároltuk, és a felhasználásig, illetve a kísérletek ideje alatt az előírásoknak megfelelően tároltuk.

A shirazi kakukkfűolajat (anyanövény: *Zataria multiflora*) a növényi minta desztillációjával nyertük:

A *Zataria multiflora* csomagolt, szárított növényi anyagát (leveleit) 2018 tavaszán gyűjtötték Shirazban (Irán), és Younes Ghasemi professzor (Gyógyszerészeti Iskola, Shiraz Orvostudományi Egyetem) azonosította. Az illóolajat vízgőzdesztillációval nyertük 2018-ban a Magyar Gyógyszerkönyvben található kakukkfűolaj desztillációjának leírása szerint [Ph.Hg.VII]. Egy desztillációhoz 40,0 g aprított (szemcseméret <0,8 mm, V. szita) szárított levelet használtunk fel. Összesen három desztillációs eljárást végeztünk el, az egyes desztillációk időtartama 3 óra volt. Az illóolaj-tartalmat volumetrikus módszerrel mértük, és a növényi anyagra vonatkoztatott tömegszázalékban fejeztük ki: a szárított *Zataria multiflora* 2,5% illóolajat tartalmazott.

3.1.2. Állatok

A projektben felnőtt (10-18 hetes) nőstény egereket használtunk fel. A hím egerekben nagyobb valószínűséggel alakul ki súlyos LPS-indukálta tüdőgyulladás, a nőstények esetében viszont kisebb a mortalitás a protokoll folyamán [Chen et al. 2010, Helyes és Hajna 2012]. A hatásmechanizmus, ezen belül a TRP-csatornák szerepének meghatározása céljából C57Bl/6, TRPA1 vad típusú (wild type), TRPA1 géniűtött (knockout), TRPV1 knockout, TRPV1/A1 knockout egértörzseket vontunk be a kísérletbe. Az egerek életkor és tömeg szerinti megoszlása minden csoportban hasonló volt, hogy elkerüljük az ezekkel összefüggő különbségeket.

Az egereket a PTE AOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet állatházaiban tartottuk 325*170 *140 mm-es ketrecekben, 24-25°C-on, 12 órás sötét-világos ciklus mellett. Standard rágcsálótápot és ivóvizet szabadon fogyaszthattak.

Az európai (2010/63/EU irányelv) és magyar (40/2013., II. 14.) szabályozásnak megfelelő és a Nemzetközi Fájdalomkutató Szövetség (IASP) ajánlásai szerint összeállított kísérleti protokollokat a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága engedélyezte (BA02/2000-26/2018).

3.1.3. Kísérleti protokoll

Kísérleteink során az egereket négy, egyenként 8-10 elemszámú csoportba osztottuk:

- PBS-PO: intratracheális 60 µl PBS kontroll; inhalált paraffinolaj kontroll
- LPS-PO: intratracheális 60 µl LPS / PBS; inhalált paraffinolaj kontroll
- PBS-IO: intratracheális 60 µl PBS kontroll; inhalált illóolaj
- LPS-IO: intratracheális 60 µl LPS / PBS; inhalált illóolaj

Két csoport háromszor (0., 4. és 24. órában) 30 percig a vizsgált illóolajat kapta száraz inhalátatással, kettő kontrollként paraffinolajat. Az inhalátatáshoz egy 33,5 x 19 x 12 cm-es zárt dobozba helyeztük az állatokat. A száraz inhalálás modellezéséhez 2 csepp illóolajat cseppentettük a doboz tetejének belső feléhez rögzített 8 cm átmérőjű szűrőpapírkorongra. A maximális illóolaj-koncentráció a légtérben 6,55 µl/l-re kalkulálható.

Két csoport (intraperitoneális 100 mg/kg ketamin és 5 mg/kg xilazin) altatásban, egyenként 60 µl LPS-t (167 µg/ml, steril PBS-ben

oldva), a két másik csoport kontrollként 60 µl oldószert, PBS-t kapott intratracheálisan. Az LPS-t a PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetében izolálták *Escherichia coli* (O83 szerotípus) baktériumtenyészetből. Az intratracheális LPS adminisztrációval az intranazális adásnál is lokalizáltabb akut alsólégúti gyulladást idézhetünk elő, bár így is előfordulhatnak a szisztémás gyulladás tünetei, mint például láz, szedáció, csökkent étvágy és súlycsökkenés [Chen et al. 2010, Helyes és Hajna 2012].

Az LPS, illetve a tiszta PBS beadása után 24 órával mértük a légúti paramétereket non-invazív teljes test pletizmográffal, majd a termináció következett intraperitoneális ketamin-xilazin anesztéziával. A tüdőket kimetszettük, a baloldali tüdőlebenyt 6%-os formaldehidbe helyeztük szövettani feldolgozás céljából. A jobboldalit két darabba vágtuk, folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk, és -80°C-on tároltuk további (MPO és citokin) vizsgálatok céljából.

3.2. Vizsgálati módszerek

3.2.1. Az illóolajok összetételének analízise

Az illóolajok összetételének elemzésére leggyakrabban használt módszer a tömegspektrométer (MS) és a lángionizációs detektor (FID). Előbbit általában kvalitatív, utóbbit kvantitatív mérésekhez preferálják. Mi a vizsgálatunkhoz szilárd fázisú mikroextrakciós (SPME) mintavételű gázkromatográfiás (GC) eljárást használtunk egykvadrupólus tömegspektrométerrel (GC-MS) és lángionizációs detektorral (GC-FID).

Statikus gőztéranalízis szilárd fázisú mikroextrakcióval (sHS-SPME): A mintákat 20 ml-es, szilikon/PTFE szeptummal lezárt headspace (HS) üvegben vizsgáltuk. A minta statikus gőztéranalízise szilárdfázisú mikroextrakcióval (sHS-SPME) történt, CTC Combi PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) típusú automata mintavevő alkalmazásával. A minta 5 perces 40°C-on végzett inkubálása után a 65 µm filmvastagságú StableFlex polidimetilsziloxán/karboxen/divinilbenzol (CAR/PDMS/DVB) SPME szálát (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a minta gőzterébe juttattuk, az extrakciót 20 percig végeztük 40°C-on, majd a gázkromatográf injektorába vittük, ahol a deszorpció 250°C-on történt, 1 percig. Az injektálás split módban történt, 1:50 split aránnyal. Végül a szálát nagy tisztaságú nitrogén gázban 250°C-on 15 percig tisztítottuk és kondicionáltuk.

Gázkromatográfia és tömegspektrometria (GC-MS, GC-FID): A direkt folyadék injektálás során 1 µl etanolban oldott illóolajat (10µl/ml) juttattunk a készülékbe. Az injektálás 250°C-on történt, split módban, 1:50 split aránnyal. Az analízist Agilent 6890N/5973N GC-MSD (Santa Clara, CA, USA) készülékkel, Supelco SLB-5MS kapilláris kolonnán (30 m × 250 µm × 0.25 µm, GC-MS), és J&W (Agilent) DB-5MS kapilláris kolonnán (25 m × 250 µm × 0,25 µm; GC-FID) végeztük. A kolonna hőmérséklete egy 3 perces izoterm szakasz után 60-250°C-ra emelkedett 8°C/perc sebességgel, a végső hőmérsékletet 1 percig tartottuk. A vivőgáz nagy tisztaságú, 6,0 hélium, az áramlási sebesség 1,0 ml/perc (37 cm/s) volt, constant flow módban.

A tömegspektrometriás detektálás quadrupole tömegszelektív detektorral (MSD) elektronionizációs módban (70 eV), teljes scan módban (41–500 amu, 3,2 scan/s) történt.

A lángionizációs detektor (FID) hőmérséklete 300°C, volt, a hélium (He) áram 30ml/perc, a szintetikus levegő áram 400,0 ml/perc volt. Makeup gázként nitrogént használtunk constant flow módban, 25 ml/perc áramlási sebességgel.

Az adatokat MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent) segítségével értékeltük ki. A komponensek azonosítása során a retenció adatokat és tömegspektrumokat standardok és a NIST 2.0 könyvtár adataival hasonlítottuk össze, a százalékos értékelést területnormalizációval végeztük.

3.2.2. Légzésfunkció mérése

A légzésfunkciós paramétereket teljestest pletizmográfia (Buxco Europe Ltd, Winchester, UK) mértük 24 órával az LPS beadása után éber, szabadon mozgó állatokon. A Penh méréséhez az alapvonalat 50 µl fiziológiás sóoldat porlasztása közben vettük fel. A bronchokonstriktiót a kolinerg agonista karbakol oldatának (50 µl/egér, 11,0 és 22,0 mM fiziológiás sóoldatban) 2 perces porlasztásával váltottuk ki. A porlasztásokat 15 perces mérési periódusok követték.

A vizsgált paraméterek:

- frekvencia (f),
- légzési térfogat (TV),
- percventilláció (MV),
- relaxációs idő (RT),
- belégzési idő (Ti),
- kilégzési idő (Te),

- maximális belégzési áramlás (PIF),
- maximális kilégzési áramlás (PEF),
- Penh (Enhanced Pause).

A Penh egy kalkulált paraméter, a szoftver az alábbi képlet alapján számolja:

$$\frac{\text{kilégzési idő} / \text{relaxációs idő} - 1}{\text{max. kilégzési áramlás} / \text{max. belégzési áramlás}}$$

Ez az érték korrelál az elterjedt invazív technikával lélegeztetett állaton mért légúti hiperreaktivitással [Helyes et al. 2009].

3.2.3. Szövetteni értékelés

A 6 %-os pufferolt formalinban fixált, paraffinba ágyazott tüdőmintákból mikrotómmal 5-7 μm vastagságú metszeteket készítettünk, majd hematoxin-eozin (HE), valamint a nyáktermelő sejtek láthatóvá tételéhez perjódsav-Schiff (PAS) festést végeztünk. Az elkészült metszeteket fénymikroszkóppal szemikvantitatív pontrendszer alapján értékeltük patológus kolléga segítségével. Minden tüdőmintából 3 mélységből készítettünk metszeteket, és ezeket átlagoltuk.

A következő paraméterek kerültek pontozásra:

- perivaszkuláris ödéma (0-3),
- perivaszkuláris/peribronchiális granulocita infiltráció (0-3),
- nyáktermelő kehelysejtek (goblet-sejtek) hiperpláziája (0-2) és
- alveoláris makrofág infiltráció (0-2) [Zeldin et al. 2001].

3.2.4. Mieloperoxidáz-aktivitás meghatározása

A neutrofil granulociták és makrofágok akkumulációjának kvantitatív markere a mieloperoxidáz (MPO) enzim aktivitása, ennek meghatározásához a -80°C -ra fagyasztott tüdőmintákat használtuk fel. A felengedett és lemért, de folyamatosan jégen tartott, foszfát pufferben homogenizált mintákból centrifugálás után letapadt pellet tartalmazza az MPO-t. Ezt az üledéket HTAB-os pufferoldattal (0,5%-os hexadecyl-trimetilammónium-bromid foszfát-pufferben) homogenizálva, majd centrifugálás után a tiszta felülúszót gyűjtve kaptuk meg a mérhető, megfelelően előkészített és tisztított mintákat. A minták mieloperoxidáz-aktivitását tetrametilbenzidin-dihidroklorid (TMB, foszfátos citrátos pufferben oldva) reagens és hidrogén-peroxid

segítségével mértük spektrofotometriás módszerrel, plate-reader (Labsystems) alkalmazásával 620 nm-es hullámhosszon, két mérési ponttal, 5 perc eltéréssel. Standardként humán leukocitákból származó MPO-t (Sigma „MPO from human leukocytes”) használtunk.

A szintelen tetrametil-benzidin protondonorként vesz részt a reakcióban, amely során első lépésben kék (csúcs 370 és 652 nm-en), majd a második oxidáció során sárga (csúcs 450 nm-en) színű termék képződik [Josephy et al. 1982].

A két párhuzamos mérés optikai denzitás átlagaival számolva, a két mérési ponton mért értékek különbségét, vagyis az optikai denzitás változását (növekedését) összevetve a standard mintából számolt kalibrációs görbével, megkaptuk az [egység MPO/ml] értékeket. A hígítás és a szövetsúlyok segítségével számoltuk ki az egy grammra jutó MPO-aktivitást.

3.2.5. Gyulladásos citokinek meghatározása

A -80°C -ra fagyasztott tüdőszövetminták másik részét felengedtük és lemértük, majd azonnal hideg PBS-be helyeztük, amely 0,01% fenil-metánszulfonil-fluorid (PMSF) proteáz inhibitor tartalmazott, és folyamatosan jégen tartottuk őket. Homogenizálás és centrifugálás után a tiszta felülúszót gyűjtve kaptuk meg a mérhető, megfelelően előkészített és tisztított mintákat. Ezeket használva Luminex Multiplex Immunoassay-t végeztünk személyre szabott Milliplex egér citokin/kemokin mágneses gyöngy panellel (Milliplex Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, Millipore) a következő citokinek/kemokinek fehérjekoncentrációjának meghatározásához:

- interleukin-1béta (IL-1 β);
- interleukin-6 (IL-6);
- kemokin (C-X-C motif) ligandum-1 (CXCL1), más néven keratinocita kemoattraktáns (KC);
- kemokin (C-C motif) ligandum-2 (CCL2), más néven monocita kemoattraktáns protein 1 (MCP-1);
- kemokin (C-X-C motif) ligandum-2 (CXCL2), más néven makrofág gyulladásos fehérje-2 (MIP-2); és
- tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α).

A hat analitot egyidejűleg detektáltuk egy 96 cellás lemezen. Minden mintát hígítatlanul, vakon és két párhuzamossal teszteltünk. A használati utasítás alapján a hat antitesttel bevont gyöngypopuláció

keverékét adtuk a lemezhez 25 μ l/cella mennyiségben a standardokkal és a kontrollokkal együtt a kijelölt cellákba. Egy éjszakán át 4°C-on végzett inkubálást követően a lemezt háromszor mostuk kézi mágneses lemez segítségével. Mosás után cellánként 25 μ l detektáló antitest oldatot adtunk hozzá, és 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk 500 fordulat/perc rázatással. A következő mosási lépések után 25 μ l/cella sztreptavidin-fikoeritrin (SAPE) oldatot adtunk hozzá, és 30 percig szobahőmérsékleten, rázatva inkubáltuk. Háromszori mosás után 150 μ l/cella drive puffert adtunk a lemezhez, és az assay-t Luminex MagPix (Merck Hungary Kft., Budapest, Magyarország) készüléken olvastuk le. Ötváltozós regressziós görbét használtunk az összes analit standard görbéinek szerkesztéséhez Belysa 1.1 szoftverrel, a gyöngyök medián fluoreszcencia intenzitását elemelve. Az eredményeket pg/mg-ban adtuk meg.

3.2.6. Statisztikai értékelés

A statisztikai analízis GraphPad Prism Version 8.01 programmal történt. A légúti paraméterekre, az MPO-aktivításra és a citokinszintekre egy-, illetve két-utas varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk Bonferroni, illetve Tukey poszt teszttel. A hisztopatológiai pontozás statisztikai elemzését Kruskal-Wallis analízissel, Dunn teszttel végeztük. Minden esetben a $p < 0,05$ értéket fogadtuk el szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. A vizsgált illóolajok kémiai összetétele

Az illóolajokban előforduló komponensek százalékos arányait gázkromatográfiás analízis segítségével állapítottuk meg.

A citronellaolajban legnagyobb mennyiségben citronellál (36,2%), geraniol (25,3%) és citronellol (13,6%) voltak a főkomponensek. A fahéjolaj főkomponensének a várakozásoknak megfelelően a fahéjaldehid (74,0%), míg a szegfűszegolajnak az eugenol (88,6%) bizonyult. A fenyőolaj főbb összetevői az α -pinén (39,4%), a limonén (14,3%) és a β -pinén (11,0%) voltak. A kakukkfűolaj és a shirazi kakukkfűolaj esetében is a timol (46,3% és 53,6%) a legmagasabb arányban jelen lévő komponens, bár a kakukkfűben a *p*-cimol (22,1%), a shirazi kakukkfűolajban viszont a karvakrol (30,9%) volt még jelen nagyobb mennyiségben.

4.2. A vizsgált illóolajok inhalációjának hatása

4.2.1. A vizsgált illóolajok hatása a légzésfunkciós paraméterekre

A teljestest pletizmográf számos légzésfunkciós paraméter regisztrációjára alkalmas.

Az LPS-kezelés jelentősen csökkentette a légzés frekvenciáját, a percventillációt és a relaxációs időt, ellenben növelte a légzési térfogatot, a belégzési és kilégzési időt, valamint a kilégzési csúcsáramlást 24 órával a beadás után, miközben nem változtatta meg a belégzési csúcsáramlást. A légúti hiperreaktivitással korreláló Penh az LPS-sel kezelt egerekben már a kiindulási méréskor jelentősen megnőtt, és tovább súlyosbodott a karbakol-inhaláció által kiváltott bronchokonstriktió hatására.

A fahéj, fenyő-, kakukkfű és szegfűszegolaj belélegzése is szignifikánsan csökkentette a karbakollal kiváltott túlérzékenységet az LPS-sel kezelt egerekben a negatív kontrollként használt paraffinolajos kezeléshez képest, míg a citronella- és shirazi kakukkfűolaj tovább emelte, vagyis rontott a Penh értékein – az alapvonalnál a citronella esetében ez a változás szignifikáns is lett.

A citronella-, a fenyő- és a shirazi kakukkfűolaj szignifikánsan csökkentette a légzési térfogatot a paraffinolajjal kezelt LPS-t kapó csoporthoz képest. A többi légzési paramétert tekintve viszont bár egyes

illóolajok módosítottak bizonyos értékeket, ezek a változtatások már nem voltak szignifikánsak.

Az illóolajok inhalálása a PBS-t kapó kontrollcsoportban csupán egyetlen esetben befolyásolták szignifikánsan a légzésfunkciót: a szegfűszegolaj emelte a relaxációs időt. Ez az egyetlen illóolaj, és az egyetlen paraméter a vizsgálataink folyamán, ahol az illóolaj-inhaláció szignifikánsan befolyásolta a nem gyulladt kontrollcsoportot.

4.2.2. A vizsgált illóolajok hatása a szövettani paraméterekre

Az elkészített tüdőmetszetek vizsgálata és a szemikvantitatív hisztopatológiai pontozás alapján a kehelysejtek összesen csak két esetben, a paraffinolajjal és citronellaolajjal kezelt LPS-es csoportok egy-egy tagjának metszetén jelentek meg.

Az LPS beadása neutrofil granulocita és makrofág infiltrációt váltott ki, amely jelentős perivaszkuláris és peribronchiális ödéma kialakulásával járt, és egyetlen metszeten kehelysejt hiperpláziával.

Az inhalált illóolajok a szemikvantitatív hisztopatológiai értékelés egyik vizsgált paraméterének esetében sem hatottak szignifikánsan a gyulladásra – ennek oka részben az egyedek közt megfigyelhető nagy variabilitás, főként a citronella-, fenyő- és szegfűszegolaj esetében –, de látható változások előfordultak. Az LPS által kiváltott jelentős ödémaképződést megakadályozta a kakukkfű-, fenyő- és szegfűszegolaj, ezekben a csoportokban már nem növekedett szignifikánsan a megfelelő PBS-sel kezelt kontrollokhoz képest. Ugyanez elmondható a perivaszkuláris és peribronchiális granulocita infiltráció esetében a szegfűszegolajról, a makrofág akkumulációnál pedig a fahéjolajról. A szövettani elváltozások összpontszámának szignifikáns növekedését a fahéj-, kakukkfű- és szegfűszegolaj is hatékonyan megakadályozta. A citronellaolaj nem befolyásolta a pontozott hisztopatológiai elváltozások mértékét, viszont már a kontrollcsoportban (a PBS-sel kezelt csoportban) is több esetben bevérzéseket, illetve limfociták megjelenését okozta, az LPS-sel kezelt csoportjában pedig enyhe kehelysejt-hiperpláziát figyeltünk meg a metszeteken, illetve a granulocitás gyulladás mellett fokozott limfocitabeáramlást és alveoláris destrukciót. A shirazi kakukkfűolaj esetében sajnos nem történt szövettani értékelés (laborköltözés miatt a minták elvesztek).

4.2.3. A vizsgált illóolajok hatása a mieloperoxidáz-aktivitásra

Az LPS hatására a hisztopatológiai eredményeknek megfelelően megemelkedett a – granulocita és makrofág aktivitással korreláló – mieloperoxidáz-aktivitás.

Ezt a megemelkedett értéket meglepő módon egyedül a kakukkfűolaj csökkentette szignifikánsan. A fahéj- és a shirazi kakukkfűolaj inhalációja nem befolyásolta, azonban a citromella-, fenyő- és szegfűszegolaj hatására is szignifikánsan tovább emelkedett.

4.2.4. A vizsgált illóolajok hatása a citokinexpresszióra

LPS hatására kialakuló gyulladásban minden vizsgált citokin, illetve kemokin szintje szignifikánsan megemelkedett.

Az inhalált illóolajok közül a fenyőolaj szignifikánsan súlyosbította az LPS-indukálta interleukin-1béta (IL-1 β), míg a kakukkfűolaj a makrofág gyulladással összefüggő fehérje-2 szintjét (MIP-2). A fahéj esetében sajnos nem történt citokinszint mérés (laborköltözés miatt a minták elvesztek).

4.3. A kakukkfűolaj inhalációjának hatása TRPA1/V1, TRPA1 knockout egerekben

Következő lépésként a legnagyobb gyulladáscsökkentő potenciállal rendelkező illóolajat, a kakukkfűolajat választottuk ki további vizsgálatokra. A TRPA1 és TRPV1 génihiányos egerek használatával igyekeztünk megállapítani, vajon van-e szerepe a hatásban a két ioncsatorna közül legalább az egyiknek.

A vizsgálatban résztvevő törzsek:

- TRPA1/V1^{+/+} (WT, vadttípus) és a TRPA1/V1^{-/-} (KO, knockout)
- TRPA1^{+/+} (WT, vadttípus) és a TRPA1^{-/-} (KO, knockout)

4.3.1. A kakukkfűolaj hatása knockout egerek légzésfunkciós paramétereire

Teljestest pletizmográffal vizsgáltuk a kakukkfűolaj hatását a légzésfunkcióra a különböző egértörzsek, a TRPA1/V1 dupla knockout és a szimpla TRPA1 knockout esetében. Utóbbi esetben a pletizmográf készülék nem várt meghibásodása miatt sajnos csupán csoportonként egy-egy állapot paramétereit sikerült regisztrálnunk. Ezekből a szimpla

TRPA1 knockout légzésfunkciós eredményekből természetesen így messzemenő következtetéseket levonni nem lehet.

Az LPS-kiváltotta akut tüdőgyulladás jelentősen csökkentette a légzési frekvenciát és a percventillációt, valamint megnövelte a be- és kilégzési időt mind az A1/V1 vad típusú, mind az A1/V1 knockout egerekben. A légzési térfogat, a relaxációs idő, a maximális be- és kilégzési áramlás nem mutatott szignifikáns változást. A karbakollal kiváltott koncentrációfüggő bronchuskontrakciót a Penh-értékek szemléltetik, és ez is szignifikánsan növekedett az LPS hatására mind az alapvonali (0 mM), mind a két különböző koncentrációjú (11 és 22 mM) karbakol porlasztása esetében, az A1/V1 vad típusú és az A1/V1 knockout csoportok esetében hasonló mértékben. Az A1 csoportok esetében a csoportonkénti 1-es elemszám miatt a légzésfunkciós eredményekkel sajnos nem lehet számolni, viszont ebben az egy-egy esetben az LPS hatására csupán a be- és kilégzési időnél látszódnak hasonló változások, mint az A1/V1 csoportoknál. A Penh értékek kevésbé emelkedtek meg az A1 vad típusú csoportban, az A1 knockout egerekben pedig még kevésbé.

A kakukkfűolaj inhaláltatása nem befolyásolta szignifikánsan az LPS által kiváltott változásokat, kivéve a Penh értékeit: az A1/V1 vad típusú egerekben szignifikánsan javította, az A1/V1 génihiányos egyedekben ezzel ellentétben szignifikánsan rontotta a légúti hiperreaktivitást karbakol mellett, ami utalhat arra, hogy a kakukkfűolaj hatását a TRPA1 és/vagy a TRPV1 közvetíti, vagyis a génihiányos egerekben védő szerepe nem tud érvényesülni.

4.3.2. A kakukkfűolaj hatása knockout egerek szövettani paramétereire

A szövettani vizsgálat és a szemikvantitatív pontozás eredményei szerint, az LPS beadása perivaszkuláris ödéma kialakulását idézte elő diffúz granulocita infiltrációval, valamint perivaszkuláris és peribronchiális gyulladást és aktivált mononukleáris sejtek infiltrációját mind a A1/V1 vad típusú, mind a A1/V1 génihiányos egerekben, illetve egy-egy metszeten a kehelysejtek hiperpláziája is megfigyelhető volt. Hasonló eredményt mutattak az A1 csoportok is LPS hatására, bár az A1 knockout már a PBS-sel kezelt kontrollcsoportban is kissé emelkedett paramétereket produkált.

A kakukkfűolaj inhalációja sem a perivaszkuláris ödémában, sem a perivaszkuláris és peribronchiális gyulladásban vagy a makrofágok számában nem okozott szignifikáns változást, viszont enyhébb

kórszöveti képet eredményezett, amely a A1/V1 vad típushoz képest kevésbé volt hangsúlyos az A1/V1 knockout esetében. Ugyanez látható az A1-es csoportokban is, bár az A1 knockout csoport eredményei nagy egyedi változatosságot mutatnak, és a kakukkfű a PBS-es kontrollcsoportban is megemelte az értékeket.

4.3.3. A kakukkfűolaj hatása knockout egerek mieloperoxidáz-aktivitására

Az LPS az A1/V1 és az A1 csoportok esetében is mind a vad típusú, mind a génhíányos egerekben masszívan megnövelte a mieloperoxidáz aktivitását.

A kakukkfű az A1/V1 vad típusú egerek esetében megakadályozta az LPS által kiváltott emelkedést, ám az A1/V1 génhíányos egerekben már nem fejtette ki ezt a jótékony hatást. Az A1 csoportok esetében a vad típusban nem befolyásolta az LPS-hatást, viszont a génkiütött egerekben szignifikánsan tovább rontott az LPS által már megemelt értéken.

4.3.4. A kakukkfűolaj hatása knockout egerek citokinexpressziójára

Az LPS-kezelés mind a hat vizsgált gyulladáscitokin, illetve kemokin szintjét megemelte mindegyik paraffinolajos kontrollcsoportban, de ez a változás csak az interleukin-1béta (IL-1 β), a keratinocita kemoattraktáns (KC) és a makrofág gyulladáscitokin fehérje-2 (MIP-2) esetében volt szignifikáns.

Az A1/V1 csoportok esetében a kakukkfűolaj a keratinocita kemoattraktáns (KC) kívül minden mért érték szintjét tovább emelte az A1/V1 vad csoportban, és ez a hatás még inkább megfigyelhető az A1/V1 génhíányos csoportban. Ezek közül az interleukin-6 (IL-6) és a makrofág gyulladáscitokin fehérje-2 (MIP-2) szintjét is szignifikánsan jobban súlyosbította az A1/V1 génhíányos egerekben, mint az A1/V1 vad típusban. Az A1 csoportokban a kakukkfű inhalálása nem okozott jelentős különbségeket.

5. Új eredmények összefoglalása, konklúzió

Napjainkban az illóolajok, illóolaj-tartalmú készítmények, mint a gyógyszeres terápia lehetséges kiegészítői, illetve egyes esetekben önálló terápiás szerként is egyre népszerűbbek a lakosság körében. Az illóolajokat elsősorban párologtatással belélegezve enyhe légúti megbetegedések, megfázás tüneteinek enyhítésére ajánlják. Illékonyáguknak köszönhetően könnyen eljutnak a légutakba, és komplex összetételük miatt több támadásponton (antibakteriális, köptető, köhögéscsillapító és gyulladáscsökkentő) is hathatnak. Fontos azonban kiemelni, hogy az illóolajok alkalmazása jelenleg elsősorban a tradicionális használat, népi gyógyászat ismeretein alapszik, ezért nem minden esetben rendelkezünk pontos ismeretekkel hatásuk, illetve lehetséges mellékhatásaik (pl. allergia, bronchusgörcs) tekintetében. Épp ezért a komponenseik meghatározása és önálló vizsgálata mellett maguknak az illóolajoknak a vizsgálata is elengedhetetlen. Az evidencia-alapú gyógyítás érdekében tehát célul tűztük ki a gyakorlatban is elterjedt, a szakirodalom alapján ígéretes illóolajok *in vivo* gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálatát. Az illóolajok kémiai összetételét gázkromatográfias módszerrel határoztuk meg, a gyulladást befolyásoló hatásukat LPS-sel kiváltott akut légúti gyulladás egérmódeljében vizsgáltuk.

Az 1. és 2. táblázatban összefoglalt eredményeink alapján az LPS által kiváltott akut tüdőgyulladás egérmódelj megfelelő modell az illóolaj-inhaláció hatásának vizsgálatára. A ceyloni citromella citromellál és geraniol túlsúlyú illóolajának használata számos gyulladással járó megbetegedések esetén. A shirazi kakukkfűolaj bár nem gyakorolt szignifikáns hatást a gyulladásra, valamivel rontott a légúti válaszkészségen, így gyulladással járó légúti megbetegedésekben óvatossággal használandó. A fenyőolajra és a szegfűszegolajra jellemző, hogy javítják a légutak működését, viszont fokoznak bizonyos gyulladással járó paramétereket. Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek az illóolajok előnyösek lehetnek bizonyos funkcionális légzési rendellenességek esetén, de óatosan kell alkalmazni őket gyulladással járó légúti állapotok esetén. A fahéjolaj, illetve a timol és *p*-cimén túlsúlyú kakukkfűolaj a tüdőgyulladás kiegészítő terápiájára alkalmas lehet – és bár az eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a kakukkfűolaj hatása a TRPV1 ioncsatornához kapcsolódik –, azonban

biztonságos gyógyászati felhasználásukat illetően természetesen további vizsgálatok szükségesek.

Azt is fontos megemlíteni, hogy az *in vivo* állatmodellekből származó eredmények nem extrapolálhatóak közvetlenül az emberre, de így is értékes adatokkal szolgálnak. Az illóolajok, illetve komponenseik hatékony tagjai lehetnek a légúti megbetegedések adjuváns kezelésének akár önmagukban, bár még ígéretesebb lehet a fő és minor komponenseik közti kölcsönhatások, a hozzájuk kapcsolódó új gyógyszercélpontok, mint a TRP ioncsatornák szerepének további kutatása egyedi összetételű, hatékonyabb készítmények fejlesztéséhez.

Új eredményeink:

- A **citronellaolaj** (főkomponens: citronellál és geraniol) inhalációja rontja a légúti hiperreaktivitást és az MPO-aktivitást endotoxinnal kiváltott tüdőgyulladás egérmodelljében.
- A **fahéjolaj** (főkomponens: fahéjaldehid) inhalációja csökkenti a gyulladásos légúti hiperreaktivitást és a hisztopatológiai változásokat az endotoxin által kiváltott tüdőgyulladás egérmodellben.
- Munkánk az első olyan vizsgálat, amely bemutatja a fenyőolaj *in vivo* gyulladásra gyakorolt hatását. A **fenyőolaj** (főkomponens: α -pinén) inhalációja csökkenti a gyulladásos légúti hiperreaktivitást és a szövettani elváltozásokat, ellenben jelentősen súlyosbítja az MPO-aktivitást és több gyulladásos citokin szintjét is megnöveli az LPS által kiváltott akut tüdőgyulladás modelljében.
- A **kakukkfűolaj** (főkomponens: timol és p-cimén) inhalációja csökkenti a gyulladásos légúti hiperreaktivitást, a hisztopatológiai változásokat és az MPO-aktivitást, viszont enyhén megemeli egyes citokinek szintjét az endotoxin által kiváltott tüdőgyulladás egérmodellben.
- A **szegfűszegolaj** (főkomponens: eugenol) inhalációja csökkenti a gyulladásos légúti hiperreaktivitást és a szövettani elváltozásokat, ellenben jelentősen súlyosbítja az MPO-aktivitást és több gyulladásos citokin szintjét is megnöveli az LPS által kiváltott akut tüdőgyulladás modelljében.
- A **shirazi kakukkfűolaj** (főkomponens: timol és karvakrol) inhalációja enyhén tovább rontott az LPS által megnövelt légúti hiperreaktivitáson, viszont sem erre, sem az MPO-aktivitásra

vagy a vizsgált citokinek szintjére nem gyakorolt szignifikáns hatást endotoxin által kiváltott tüdőgyulladás egérmodellben.

- A kísérleti körülményeink között a citronella-, fahéj-, fenyő-, kakukkfű- és shirazi kakukkfűolaj sem okozott szignifikáns hatást a légzésfunkcióra, a szövettani paraméterekre, az MPO-aktivitásra vagy a mért citokinek szintjére PBS kontrollal kezelt, egészséges állatokban.
- Először vizsgáltuk a kakukkfűolaj *in vivo* hatásmechanizmusát **TRP** knockout egerek LPS-el kiváltott tüdőgyulladás modelljében. A kakukkfűolaj védő hatása ebben a modellben feltehetően – legalább részben – TRPV1-csatorna közvetítésével valósul meg.

1. táblázat: C57Bl/6 vad típusú egerekkel végzett kísérleteinkből származó új eredményeink táblázatos formában összegezve (↑ : LPS hatását tovább rontotta, ↓ : LPS hatását csökkentette, –: nincs egyértelmű hatás)

Paraméter		citronella-olaj	fahéj-olaj	fenyő-olaj	kakukkfűolaj	szegfűszeg-olaj	shirazi kakukkfűolaj
Légúti paraméterek	Penh	↑↑	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↑↑
Hisztopatológia	perivaszkuláris ödéma	–	–	↓	↓	↓	nincs adat
	perivaszkuláris/ peribronchiális gyulladás	–	–	–	–	↓	nincs adat
	makrofágok	–	↓	–	–	–	nincs adat
	összpontszám	–	↓	–	↓	↓	nincs adat
MPO aktivitás		↑↑	–	↑↑	↓↓	↑↑	–
Citokinszintek	IL-1β	–	nincs adat	↑↑	–	–	–
	MIP-2	–	nincs adat	–	↑↑	–	–

2. táblázat: A knockout egerekkel végzett kísérleteinkből származó új eredményeink táblázatos formában összegezve
 (↑ : LPS hatását tovább rontotta, ↓ : LPS hatását csökkentette, –: nincs egyértelmű hatás)

Paraméter		kakukkfűolaj			
		TRP-A1/V1 ^{+/+} (vad-típus)	TRP-A1/V1 ^{-/-} (knock-out)	TRP-A1 ^{+/+} (vad-típus)	TRP-A1 ^{-/-} (knock-out)
Légúti paraméterek	Penh	↓↓	↑↑	nincs adat	nincs adat
Hisztopatológia	peri-vaszkuláris ödéma	↓	–	↓	–
	peri-vaszkuláris/ peri-bronchiális gyulladás	–	–	↓	–
	makrofágok	–	–	↓	–
	összpontszám	↓	–	↓	–
MPO aktivitás		↓	↑	–	↑↑
Citokin-szintek	IL-6	↑	↑↑	–	–
	MIP-2	↑	↑↑	–	–

6. Irodalomjegyzék

- Bindu, S., Mazumder, S. & Bandyopadhyay, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol* **180**, 114147 (2020).
- Buchanan, W. W. & Bellamy, N. NSAIDs: Clinical efficacy and toxicity. *Inflammopharmacology* **1**, 115–133 (1991).
- Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol* **94**, 223–253 (2004).
- Chen, H., Bai, C. & Wang, X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. *Expert Rev Respir Med* **4**, 773–783 (2010).
- Faleiro, M. L. & Miguel, M. G. Use of essential oils and their components against multidrug-resistant bacteria. in *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components* (eds. Rai, M. K. & Kon, K. V.) (Elsevier, 2013).
- Helyes, Z. *et al.* Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13088–13093 (2009).
- Helyes, Zs. & Hajna, Zs. Endotoxin-induced airway inflammation and asthma models. in *TRP Channels in Drug Discovery. Methods in Pharmacology and Toxicology* (eds. Szállási, Á. & Bíró, T.) (Springer Sciences+Business Media, 2012).
- Josephy, P. D., Eling, T. & Mason, R. P. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *J Biol Chem* **257**, 3669–3675 (1982).
- Li, J. *et al.* Pharmacologic effects approach of essential oils and their components on respiratory diseases. *J Ethnopharmacol* **304**, 115962 (2022).
- Ph.Hg.VII. *Pharmacopoea Hungarica VII. – VII. Magyar Gyógyszerkönyv.* (Medicina Könyvkiadó, 1993).
- Schäcke, H., Döcke, W. D. & Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* **96**, 23–43 (2002).
- WHO. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. (2023.01.27.)
- Zeldin, D. C. *et al.* Airway inflammation and responsiveness in prostaglandin H synthase-deficient mice exposed to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**, 457–465 (2001).

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel és hálával tartozom Prof. Dr. Deli Józsefnek, korábbi intézetigazgatónak, hogy munkámat a Farmakognóziai Intézet munkatársainak irányításával elkezdhettem; témavezetőmnek Dr. Horváth Györgyinek, hogy szakmai kérdésekben bármikor számíthattam a segítségére; a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet munkatársainak, Dr. Csekő Katának, Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának, Dr. Kemény Ágnesnek a szakmai és Ömböli Gyulánének, Szentes Nikolettnek, Draskóczy Lillának, Hírné Perkecz Anikónak a laboratóriumi munkában nyújtott áldozatos segítségükért; a Pathológiai Intézet két munkatársának, Dr. Kereskai László klinikai főorvos úrnak a szövettani minták patológiai értékelésében nyújtott segítségéért, valamint Kneif Józsefnének a metszetek elkészítéséért; Dr. Böszörményi Andreának (SE GYTK Farmakognóziai Intézet) a gázkromatográfiás vizsgálatok elvégzéséért; Dr. Kocsis Béla tanár úrnak, hogy az állatkísérletekhez az LPS-t rendelkezésünkre bocsátotta; illetve két lelkes gyógyszerészhallgatónak: Amir Reza Ashrafnak és Shima Mohammadi Fardnak, akikkel az állatkísérletek során dolgoztunk együtt. Mindannyiuknak nagyon szépen köszönöm az eddigi közös munkát!

8. Publikációs jegyzék

8.1. Az értekezés alapját képező publikációk

Eszter Csikós*, Kata Csekő*, Amir Reza Ashraf, Ágnes Kemény, László Kereskai, Béla Kocsis, Andrea Böszörményi, Zsuzsanna Helyes Györgyi Horváth: Effects of *Thymus vulgaris* L., *Cinnamomum verum* J.Presl and *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle essential oils in the endotoxin-induced acute airway inflammation mouse model. *Molecules* 2020, 25(15): 3553; <https://doi.org/10.3390/molecules25153553>

*megosztott első szerző, **IF: 4,412**

Eszter Csikós, Kata Csekő, Ágnes Kemény, Lilla Draskóczy, László Kereskai, Béla Kocsis, Andrea Böszörményi, Zsuzsanna Helyes, Györgyi Horváth: *Pinus sylvestris* L. and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry Essential Oils Inhibit Endotoxin-Induced Airway Hyperreactivity despite Aggravated Inflammatory Mechanisms in Mice. *Molecules* 2022, 27(12): 3868. <https://doi.org/10.3390/molecules27123868>

IF: 4,927

8.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

Ács Kamilla, Kocsis Béla, Balázs Viktória Lilla, Kerekes Erika, **Csikós Eszter**, Varga Adorján, Krisch Judit, Vágvölgyi Csaba, Horváth Györgyi: Illóolajok, illóolaj-komponensek és antibiotikumok együttes alkalmazásának lehetőségei légúti infekciók esetén. *Gyógyszerészet* 2018, 62(2): 73-79.

Györgyi Horváth, **Eszter Csikós**, Eichertné Violetta Andres, Tímea Bencsik, Anikó Takátsy, Gergely Gulyás-Fekete, Erika Turcsi, József Deli, Éva Szőke, Ágnes Kemény, Maja Payrits, Lajos Sente, Marianna Kocsis, Péter Molnár: Analyzing the Carotenoid Composition of Melilot (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.) Extracts and the Effects of Isolated (all-*E*)-lutein-5,6-epoxide on Primary Sensory Neurons and Macrophages. *Molecules* 2021, 26(2): 503. <https://doi.org/10.3390/molecules26020503>

IF: 4,927

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 and on behalf of the OEMONOM: Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia by Natural Drugs. *Molecules* 2021, 26, 7141. <https://doi.org/10.3390/molecules26237141>

IF: 4,927

Jana Pourová, Patrícia Dias, Milan Pour, Silvia Bittner Fialová, Szilvia Czigle, Milan Nagy, Jaroslav Tóth, Viktória Lilla Balázs, Adrienn Horváth, **Eszter Csikós**, Ágnes Farkas, Györgyi Horváth, and Přemysl Mladěnka: Suggested mechanisms of action of plant drugs and their active constituents in the treatment of cough: overview. *PeerJ* (kézirat beadás alatt)

Balázs Viktória Lilla, Ágnes Farkas, **Eszter Csikós**, Adrienn Horváth, Kamilla Ács, Marianna Kocsis, Martin Doseděl, Silvia Bittner Fialová, Szilvia Czigle, Milan Nagy, Jaroslav Tóth, Michele Protti, Laura Mercolini, Přemysl Mladěnka, Györgyi Horváth, and on behalf of the OEMONOM: Herbal drugs in chronic venous disease treatment: an update. *Plos One* (kézirat beadás alatt)

Györgyi Horváth, Adrienn Horváth, Balázs Viktória Lilla, **Eszter Csikós**, Kamilla Ács, Marianna Kocsis, Jana Pourová, Přemysl Mladěnka, Silvia Bittner Fialová, Szilvia Czigle, Milan Nagy, Jaroslav Tóth, Michele Protti, Laura Mercolini, Ágnes Farkas, and on behalf of the OEMONOM: Natural drugs in hypertension. (kézirat összeállítása folyamatban)

A konferenciaszereplések összefoglalását a disszertáció tartalmazza.