

# **Illóolajok hatásának vizsgálata akut légúti gyulladás egérmodelljében**

Doktori (Ph.D.) értekezés



**DR. CSIKÓS ESZTER**

Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
„Biológiailag aktív anyagok izolálása és vizsgálata” Program

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Programvezető: Prof. Dr. Deli József

Témavezető: Dr. Horváth Györgyi

Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar  
Farmakognóziai Intézet

Pécs, 2023

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	4
<b>1. Bevezetés és célkitűzés</b> .....	6
<b>2. Irodalmi áttekintés</b> .....	8
2.1. Az illóolajok általános jellemzése.....	8
2.2. Illóolajok a légúti megbetegedések kezelésében.....	10
2.3. Az illóolajok lehetséges hatásmechanizmusa gyulladásban.....	13
2.4. A légúti gyulladás .....	15
2.5. A légúti gyulladás <i>in vivo</i> modelljei.....	17
2.5.1. Az akut légúti gyulladás mechanizmusmodelljei.....	17
2.5.2. A légúti gyulladás modelljeiben vizsgált illóolajok.....	18
2.6. A vizsgálatokba bevont illóolajok rövid jellemzése .....	20
2.6.1. Ceyloni citromlaj (továbbiakban: citromlaj).....	20
2.6.2. Ceyloni fahéjregolaj (továbbiakban: fahéjregolaj).....	21
2.6.3. Erdei fenyőolaj (továbbiakban: fenyőolaj) .....	21
2.6.4. Kakukkfűolaj .....	22
2.6.5. Szegfűszegolaj .....	22
2.6.6. Shirazi kakukkfűolaj.....	23
<b>3. Kísérleti modellek, vizsgálati módszerek</b> .....	24
3.1. A kísérleti modell.....	24
3.1.1. Illóolajok.....	24
3.1.2. Állatok .....	24
3.1.3. Kísérleti protokoll.....	25
3.2. Vizsgálati módszerek.....	27
3.2.1. Az illóolajok összetételének analízise.....	27
3.2.2. Légzésfunkció mérése.....	28
3.2.3. Szöveti értékelés .....	28
3.2.4. Mieloperoxidáz-aktivitás meghatározása.....	29
3.2.5. Gyulladásos citokinek meghatározása.....	30
3.2.6. Statisztikai értékelés.....	31
<b>4. Eredmények</b> .....	32
4.1. A vizsgált illóolajok kémiai összetétele .....	32
4.2. A vizsgált illóolajok inhalációjának hatása .....	33
4.2.1. A vizsgált illóolajok hatása a légzésfunkciós paraméterekre .....	33
4.2.2. A vizsgált illóolajok hatása a szöveti paraméterekre.....	36
4.2.3. A vizsgált illóolajok hatása a mieloperoxidáz-aktivitásra .....	40
4.2.4. A vizsgált illóolajok hatása a citokinexpresszióra .....	41

<b>4.3. A kakukkfűolaj inhalációjának hatása TRPA1/V1, TRPA1 knockout egerekben.....</b>	<b>43</b>
<b>4.3.1. A kakukkfűolaj hatása knockout egerek légzésfunkciós paramétereire .....</b>	<b>43</b>
<b>4.3.2. A kakukkfűolaj hatása knockout egerek szövettani paramétereire .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.3. A kakukkfűolaj hatása knockout egerek mieloperoxidáz-aktivitására.....</b>	<b>50</b>
<b>4.3.4. A kakukkfűolaj hatása knockout egerek citokinexpressziójára .....</b>	<b>51</b>
<b>5. Diszkusszió .....</b>	<b>54</b>
<b>6. Új eredmények összefoglalása, konklúzió .....</b>	<b>61</b>
<b>7. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>65</b>
<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>81</b>
<b>Publikációs lista .....</b>	<b>82</b>
<b>Az értekezés alapját képező publikációk.....</b>	<b>82</b>
<b>Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények .....</b>	<b>83</b>
<b>Konferencia előadások listája.....</b>	<b>84</b>
<b>Szóbeli.....</b>	<b>84</b>
<b>Poszter .....</b>	<b>85</b>

## Rövidítések jegyzéke

<b>BALF</b>	bronchoalveoláris mosófolyadék
<b>CD</b>	cluster of differentiation (megkülönböztetés sejtfelszíni antigének alapján)
<b>CGRP</b>	kalcitonin gén-rokon peptid
<b>COPD</b>	krónikus obstruktív tüdőbetegség
<b>COX</b>	ciklooxygenáz
<b>cPLA2</b>	citoszól foszfolipáz A2
<b>GC-MS</b>	gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrométer
<b>HE</b>	hematoxin-eozin
<b>HTAB</b>	hexadecil-trimetil-ammonium-bromid
<b>ICAM-1</b>	intercelluláris adhézios molekula-1
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon-gamma
<b>IL</b>	interleukin
<b>KC</b>	keratinocita kemoattraktáns
<b>KO</b>	knockout, génkiütött
<b>LOX</b>	lipoxigenáz
<b>LPB</b>	LPS-kötő fehérje
<b>LPS</b>	lipopoliszacharid / endotoxin
<b>MAPK</b>	mitogén-aktivált protein kináz
<b>MMP-9</b>	mátrix metalloproteináz-9
<b>MPO</b>	mieloperoxidáz
<b>MRSA</b>	meticillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	nukleáris faktor-kappa B
<b>NKA</b>	neurokinin-A
<b>NOS</b>	nitrogén-monoxid-szintáz
<b>NSAID</b>	nem-szteroid gyulladáscsökkentő
<b>OVA</b>	ovalbumin
<b>PAF</b>	vérlemezke-aktiváló faktor
<b>PAS</b>	perjódsav-Schiff
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline, foszfátpufferes sóoldat
<b>PG</b>	prostaglandin
<b>PMSF</b>	fenil-metánszulfonil-fluorid
<b>ROS</b>	reaktív oxigénszármazék

<b>SAID</b>	szteroid gyulladáscsökkentő
<b>SP</b>	P anyag
<b>SPME</b>	szilárd fázisú mikroextrakció
<b>TLR-4</b>	Toll-like receptor-4
<b>TMB</b>	tetrametil-benzidin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor nekrosis faktor alfa
<b>TRP</b>	transziens receptor potenciál (ioncsatorna)
<b>TRPA1</b>	TRP ankyrin-1
<b>TRPM2</b>	TRP melasztatin-2
<b>TRPM8</b>	TRP melasztatin-8
<b>TRPV1</b>	TRP vanilloid-1
<b>VCAM-1</b>	érsejt-adhéziós molekula-1
<b>WHO</b>	Egészségügyi Világszervezet
<b>WT</b>	vadtípusú

## 1. Bevezetés és célkitűzés

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], halálozási 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. csonttrikulás, anyagcserezavarok) 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]

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 gyulladáscsökkentő citokinek mennyiségének mérését is célul tűztük ki.

Munkámat a PTE GYTK Farmakognóziai Intézet PhD-hallgatójaként végeztem Dr. Horváth Györgyi vezetése mellett. A vizsgált illóolajok gázkromatográfiás vizsgálatát a Semmelweis Egyetem Farmakognóziai Intézetével együttműködve végeztük. Az állatkísérletes modellekként történő méréseket és az ehhez kapcsolódó teszteket Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, Dr. Csekő Kata és Dr. Kemény Ágnes támogatásával a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézettel közösen valósíthattuk meg. A szövettani kiértékeléshez a PTE ÁOK Pathológiai Intézet munkatársai is segítséget nyújtottak.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Az illóolajok általános jellemzése

Az illóolajok a növények másodlagos anyagcseretermékei, különböző vegyületek folyékony, lipofil keverékei, melyek szobahőmérsékleten – a zsíros olajokkal ellentétben – maradék nélkül elpárolognak. Illatuk és ízük jellegzetes. Komponenseik többnyire mono- és szeszkviterpének, illetve fenilpropán-származékok; funkciós csoport szerint pedig lehetnek alkoholok, aldehidek, ketonok, észterek, éterek, peroxidok vagy fenolok. Az illóolajok összetétele meglehetősen változatos, tartalmazhatnak akár több mint 300 különböző komponens is [Tisserand és Young 2014]. A komponensek minőségét, mennyiségét és arányát számos tényező befolyásolhatja, ilyen például a növény faja, a kivonásra használt növényi rész, a kivonás módja, valamint a kivonás paraméterei is. További befolyásoló tényező lehet a termőterület éghajlata, az időjárás, a talaj paraméterei és a növény fenofázisa a gyűjtés időpontjában [Masotti et al. 2003, Angioni et al. 2006, Baráthné Simkó 2014]. Éppen ezért a kutatás során rendkívül fontos az illóolaj-összetétel vizsgálata minden egyes gyűjtés/sarzs esetében.

Az illóolajok a növényekben különböző szekréciós sejtekben, járatokban halmozódnak fel. Kivonásuk leggyakoribb módja az egyes növényi részekből – pl. gyökér, szár, kéreg, rügy, levél, virág, terméshéj, mag – történő desztilláció, ami több évezredes hagyományokra tekint vissza. Különösen a hőérzékeny komponensek esetében viszont elterjedt még a sajtolás/préselés (pl. a citrusfélék esetében), a szerves oldószeres kivonás (mint akár az enfleurage/pomádés eljárás), a szuperkritikus fluid extrakció (általában szén-dioxiddal), illetve az ultrahanggal vagy mikrohullámmal kombinált kivonási eljárások [Sell 2006].

Jellegzetes illatuk, aromájuk és biológiai hatásaik miatt felhasználásuk már több területen – kozmetikai és élelmiszeripar, élelmiszer-tartósítás, növénykórtan, orvosi mikrobiológia, aromaterápia – elterjedt, antimikrobás hatásukat az antibiotikum-rezisztens baktérium- és gombatorzsek terjedése miatt előtérbe kerülő kutatások során több esetben igazolták. Számos komponensüknek bizonyították antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatását, átjutnak a vér-agy gáton, illetve kiváló biohasznosulásuk miatt könnyen alkalmazhatók inhalálással, bőrön keresztül és – megfelelő formulálással – orális adagolással, ezért agyműködési zavarok, rákos megbetegedések, szívbetegségek és az immunrendszer hanyatlásának megelőzésében is ígéretesek lehetnek. [Aruoma 1998, Burt et al. 2004, Kamatou és Viljoen 2010, Faleiro és Miguel 2013, Baser és Buchbauer 2015, Tariq et al. 2019, Wińska et al. 2019, Mihai et al. 2020,



Mutlu-Ingok et al. 2020, Álvarez-Martínez et al. 2021, Basavegowda és Baek 2021, Dawood et al. 2021, Elian et al 2022]

## 2.2. Illóolajok a légúti megbetegedések kezelésében

A hozzávetőlegesen 3000 ismert illóolajtermelő növény közül az aromaterápia körülbelül 400-at használ, bár ezek közül megközelítőleg csak 100-at rendszeresen [Tisserand és Young 2014]. A jelenleg hivatalos nyolcadik Magyar Gyógyszerkönyvben (illetve a megfelelő Európai Gyógyszerkönyv kiadásban) ezzel szemben mindössze 32 illóolaj-monográfia szerepel, bár a számuk minden kiadással nő, az Európai Gyógyszerkönyv 11. kiadásában már 47 minőségi vizsgálatokat is tartalmazó monográfia található [Ph.Hg.VIII, Ph.Eur.11]. Az Európai Gyógyszerügynökség honlapján még kevesebb, mindösszesen 16 illóolaj-monográfia szerepel indikációval, dózissal, mellékhatásokkal és kontraindikációkkal, ezek közül 2 használatát nem ajánlják komoly mellékhatások miatt [EMA 1]. Magyarországon 11 illóolaj szerepel az élelmiszerekbe, étrendkiegészítőkbe nem javasolt növények között (pl. tujon, szabinén, sztirol, szafrol tartalmuk hepatotoxikus, karcinogén, egyéb toxikus hatásaik miatt) [OGYÉI 1]; és 20 különböző illóolaj engedélyezett magisztrális gyógyszerek készítéséhez [OGYÉI 2].

Légúti megbetegedésekkel kapcsolatos indikációt az Európai Gyógyszerügynökség 5 illóolaj monográfiájában említ, minden esetben tradicionális alapon [EMA 1]:

- ánizs illóolaja megfázással összefüggő köhögés enyhítésére,
- borsmenta illóolaja köhögésben és megfázásban szenvedők tüneteinek csökkentésére,
- eukaliptusz illóolaja megfázással összefüggő köhögés enyhítésére,
- édeskömény illóolaja megfázással összefüggő köhögés enyhítésére,
- kakukkfű illóolaja megfázással összefüggő köhögés esetében köptetőként, ill. megfázással összefüggő köhögésre.

A magyar orvosi-gyógyszerészi gyakorlatban hivatalos Szabványos vényminták (Formulae Normales VIII.) gyűjteményében 8 illóolajat vagy illóolaj-komponenst tartalmazó készítmény található légzőrendszeri megbetegedések kezelésére, az illóolaj-tartalmú növények egyéb készítményei (ánizstermés és édesköménytermés – expectorans megfázással járó köhögés esetén; kamillavirág – megfázás tüneteinek kezelése; Elixirium thymi compositum – expectorans, antitussivum, carminativum, antisepticum, stomachicum, a tracheobronchialis rendszer gyulladásos folyamatai, produktív köhögés esetén) mellett:

- ánizs – antiszeptikus hatású, gyulladáscsökkentő,
- borsmenta – antiszeptikus hatású, gyulladáscsökkentő,
- erdei fenyő – enyhén izgatja a légutak nyálkahártyáját, nyákkoldó hatású,
- eukaliptusz – antiszeptikus és expectorans hatású,
- kámfor – (kámforfa illóolaj-komponense) antiphlogisticum, helyi érzéstelenítő,

- mentol (mentafajok illóolaj-komponense) – hűsítő érzést okoz, melyet analgetikus hatás követ,
- timol (kakukkfű illóolaj-komponense) – expectorans, antisepticum,
- terpin (fenyőfélék illóolaj-komponense) – bronchusszekrécíót fokozó expectorans hatással

a következő gyógyszerformákban: csepp, elixír, forrázat, főzet, inhalációs olaj és illóolaj, mellkasbedörzsölő, orrkenőcs, teakeverék, por, rázókeverék, szuszpenzió [Fo.No.VIII].

A legtöbb légúti megbetegedés esetén használható illóolajnak köptető, szekretolitikus, szekretomotorikus, bronchomukotróp hatást tulajdonítanak, közvetlenül stimulálják a hörgők nyáktermelését, így a nyák viszkozitásának csökkenésével segítik elő az ürülését, illetve serkentik a légzőrendszer ciliáris motilitását, ezért hurutos köhögés és orrdugulás esetén ajánlhatók [Csupor 2003]. Pontos hatásukat klinikai vizsgálatokkal azonban egyelőre kevésbé bizonyították, és a lezajlott vizsgálatok többsége inkább illóolaja(ka)t, illóolaj-komponens(ek)e)t is tartalmazó összetett készítményekkel, termékkel történt. Ugyanakkor eredményesnek tűnik:

- a standardizált Myrtol® (Gelomyrtol®, fő illóolaj-komponensei: 1,8-cineol, d-limonén,  $\alpha$ -pinén) akut bronchitisben [Matthys et al. 2000, Gillissen et al. 2013],
- a Vick's VapoRub® (kámfor, terpentín tengerparti fenyőből, mentol, eukaliptuszolaj) krónikus légúti obstrukcióban [Hasani et al. 2003],
- a borsmenta illóolaj disszeminált és infiltratív tüdőtuberkulózis kiegészítő terápiájában [Shkurupiï et al. 2002],
- az *Artemisia abrotanum* illóolaja és kivonata allergiás rhinitis megelőzésében és kezelésében [Remberg et al. 2004],
- a kakukkfű és a kankalin gyökérkivonat előírt kombinációja akut bronchitisben [Gruenwald 2006, Kemmerich 2007, Ludwig 2016],
- az *Eucalyptus citriodora*, *E. globulus*, *Mentha piperita*, *Origanum syriacum* és *Rosmarinus officinalis* illóolajait tartalmazó spray légúti fertőzés tüneteinek (pl. torokfájás, rekedtség, köhögés) kezelésében [Ben-Arye et al. 2011],
- a 1,8-cineollal (eukaliptol, az eukaliptusz illóolajának fő alkotóeleme) akut rhinosinusitisben [Kehrl et al. 2004] és asztmában [Worth és Dethlefsen 2012]
- a kakukkfűszirup hörghurutos köhögésben [ESCOP 2003],
- az ánizs kivonata polipok nélküli krónikus rhinosinusitisben [Vazifehkah et al. 2016],

- a *Zataria multiflora* önmagában és *Althaea officinalis* kombinációjával is akut köhögésben [Mahboubi 2018],
- a Tussivin® (*Zataria multiflora* és édeskömény illóolaja) akut köhögés kezelésében [Mahboubi 2018],
- a Puresseintiel® (rebarbara, muskátli, *Eucalyptus radiata* és niauli olaja) allergiás rhinitis esetében [Caimmi et al. 2021],
- a Teramune Bronchus® (fenyő, eukaliptusz, ravensara, ciprus, izsóp, kakukkfű, zsálya, kapor, rozmarin, babér illóolaja) a tüdő egészségének javításában [Hawkins et al. 2022].

Mindezeken túl a különböző illóolajokat tartalmazó szájvizek, szájpermetek hatását virális fertőzések megelőzésében is vizsgálják, esetenként biztató eredménnyel [Verma et al. 2021]. Ez a hatás természetesen a SARS-CoV-2 járvánnyal kapcsolatban is szóba került az illóolajok egyéb, a fertőzés és a poszt-COVID-19 megelőzésében és kezelésében lehetséges alkalmazási módjai mellett [Burton et al. 2020, Whitcroft és Hummel 2020, Wang és Yang 2021, Torres Neto et al. 2021, Hawkins et al. 2022].

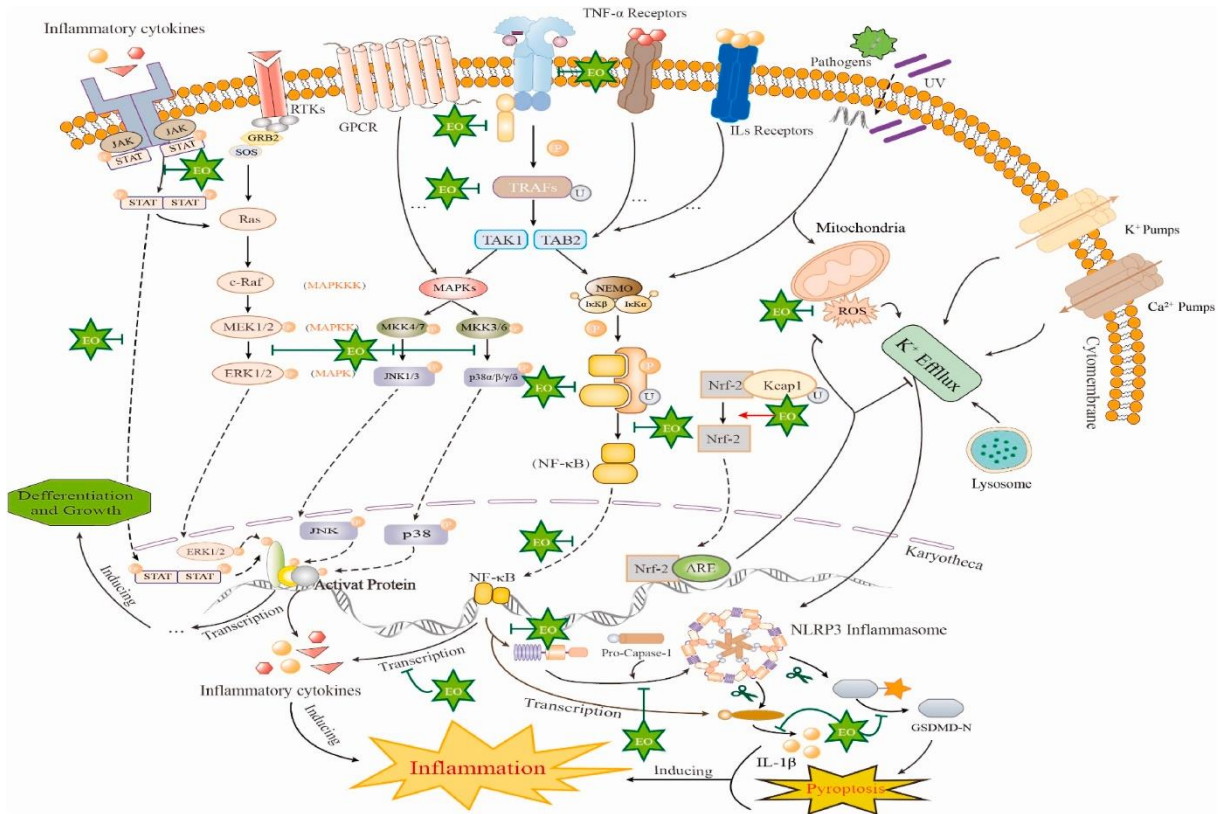
Metaanalízisek és szisztematikus review-k konklúziója szerint egyes illóolajok gyulladásgátló, antioxidáns, mucolitikus és immunszabályozó hatásmechanizmusokkal a légúti fertőzések adjuváns antibakteriális terápiájában, különböző asztmás és COPD-s állapotok, COVID-19 (pl. dyspepsia, hányinger és hányás tünetekre), szorongás vagy fejfájás adjuváns kezelésére, torokfájásban, COVID-19 után szaglászárosodásban szenvedő betegeknél a szaglás helyreállítására jó eredménnyel alkalmazhatók, és komoly mellékhatást az adott vizsgálatokban nem okoztak. Ennek ellenére – főként a lakosság körében – elterjedt használatukra, illetve a bennük rejlő lehetőségekre tekintettel további jó minőségű, nagyobb elemszámú, hosszabb vizsgálati időtartamú kutatásokból származó adatokra van szükség ahhoz, hogy rutinszerűen ajánlhatóak legyenek, és új termékek fejlesztéséhez is biztosabb alapot nyújthassanak. [Jin és Chin 2019, Her et al. 2022, Li et al. 2022]

### 2.3. Az illóolajok lehetséges hatásmechanizmusa gyulladásban

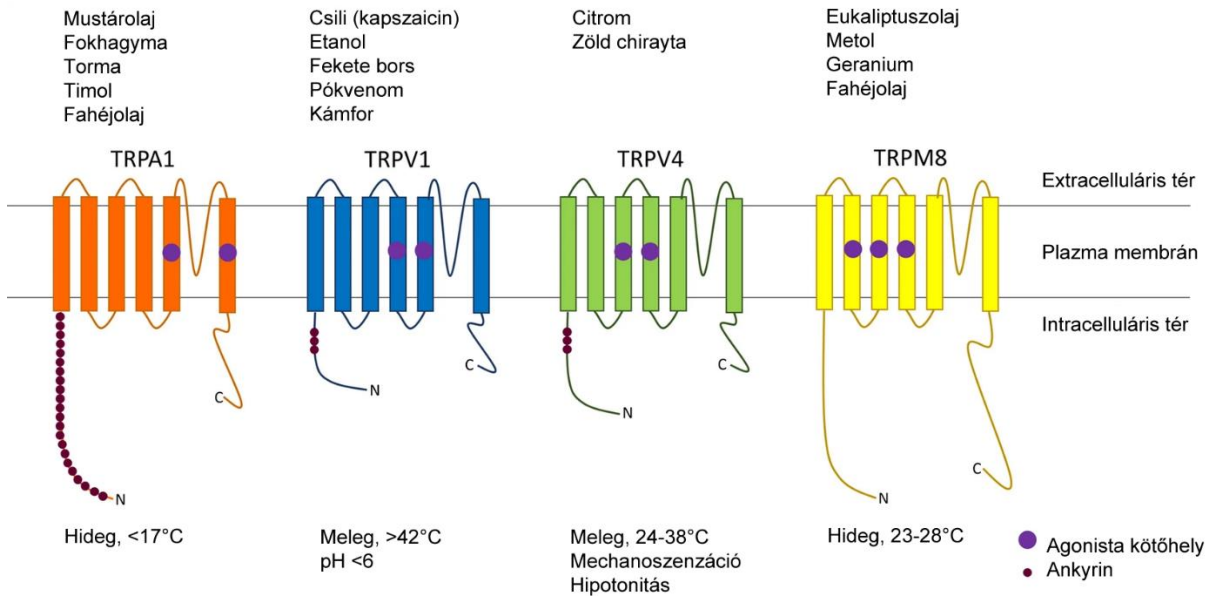
Az eddigi eredmények szerint a gyulladáscsökkentő hatású illóolajok, illóolaj-komponensek a következő utakon keresztül gátolják a gyulladást (1. ábra):

- csökkentik egyes pro-inflammatórikus citokinek, például a tumor nekrozis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 béta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8 és Th17 (IL-17) mRNS- vagy fehérjeexpresszióját, és/vagy növelik egyes anti-inflammatórikus citokinek, például az IL-10, Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12) és Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13) mRNS- és fehérjeexpresszióját [Gandhi et al. 2020, Zhao et al. 2023], amelyek pl. az nukleáris faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) és mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalban vesznek részt [Zuo et al. 2020],
- gátolják a ciklooxygenáz (COX) és lipoxigenáz (LOX) aktivitást az arachidonsav metabolikus útvonalában, és csökkentik az arachidonsav metabolitok (különösen a prosztaglandin E2 – PGE2) termelődését, így enyhítik a gyulladással kapcsolatos válasz romlását,
- gátolják az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) és tirozináz expresszióját, vagy eltávolítják a felesleges reaktív oxigén gyököket, hogy enyhítsék a szabad gyökök okozta károsodást,
- enyhítik a szöveti ödémát és elősegítik a gyulladással okozott sebek gyógyulását, valamint
- ioncsatornákon hatnak vagy más immunválaszokat befolyásolnak [Zhao et al. 2023].

Az illóolajok összetevői például a légutakban elhelyezkedő tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatornákkal is kölcsönhatásba léphetnek, amelyek szerepét számos légúti megbetegedésben feltételezik [Tisserand és Young 2014]. A TRP vanilloid-1 (TRPV1) valamint TRP ankyrin-1 (TRPA1) ioncsatornáknak a kapszaicin-szenzitív afferens idegvégződéseken, limfocitákon, makrofágokon és a légúti alveoláris és bronchális epitélisejteken történő expressziójuk révén számos szenzoros-immun-interakcióban meghatározó szerepük van. Ezen receptorok aktiválásában számos növényi eredetű anyag részt vehet, többek között a borsmentában, fahéjban, mustárban, fokhagymában, tormában, gyömbérben és erős paprikában előforduló komponensek, de az endogén gyulladással kapcsolatos mediátorok, és a reaktív oxigén gyökök is (2. ábra). A hatásmechanizmus hátterében tehát valószínűsíthető az olajok TRPV1 vagy TRPA1 ioncsatornákon keresztül kifejtett hatása is. Ennek pontosítására azonban további vizsgálatokra van szükség [Banner et al. 2011, Koivisto et al. 2022, Stinson et al. 2023].



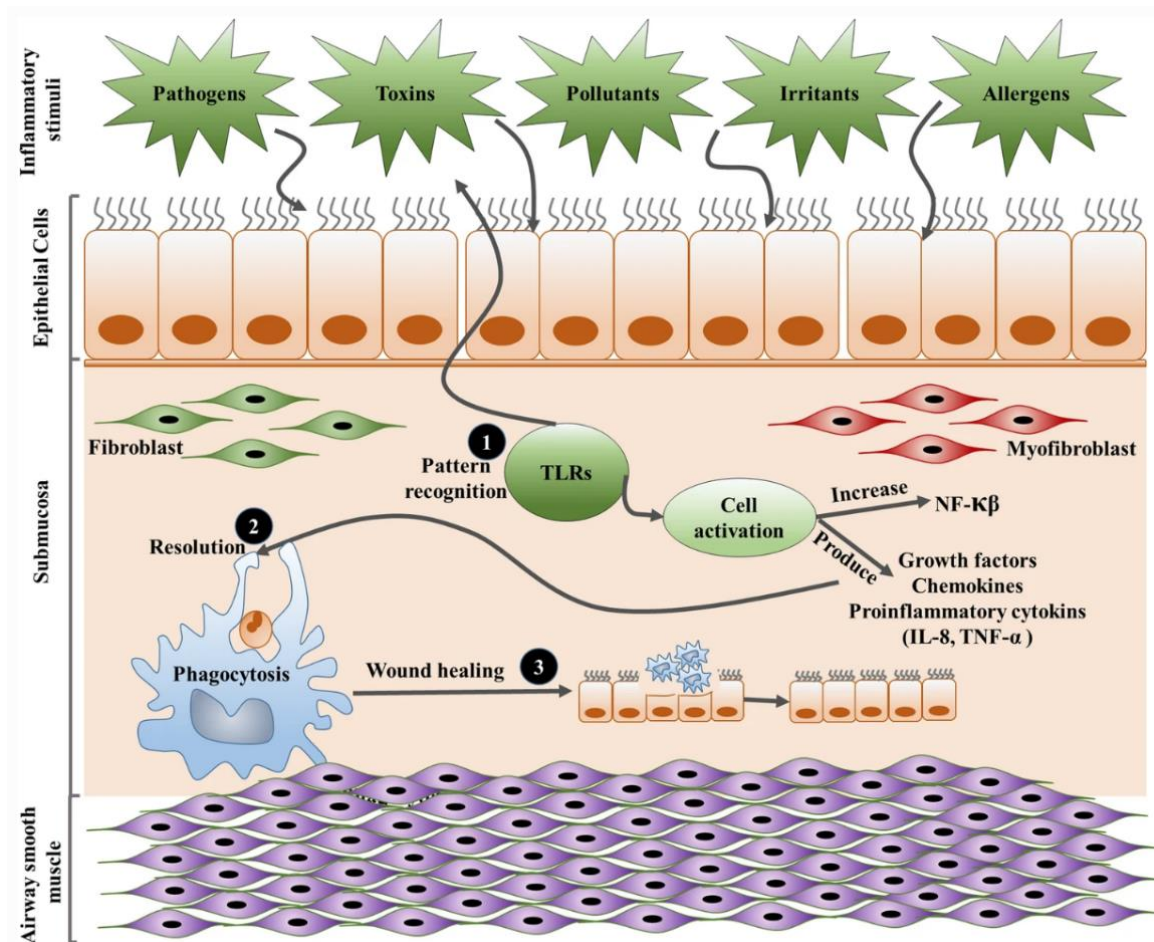
1. ábra: Az illóolajokhoz és bioaktív komponenseikhez kapcsolódó különféle jelátviteli útvonalak szisztematikus ábrázolása gyulladás esetén. [Zhao et al. 2023]



2. ábra: A köhögésben és a légúti túlérzékenységben szerepet játszó potenciális TRP-csatornák, és az őket stimuláló kémiai, mechanikai és fizikai ingerek. [Stinson et al. 2023]

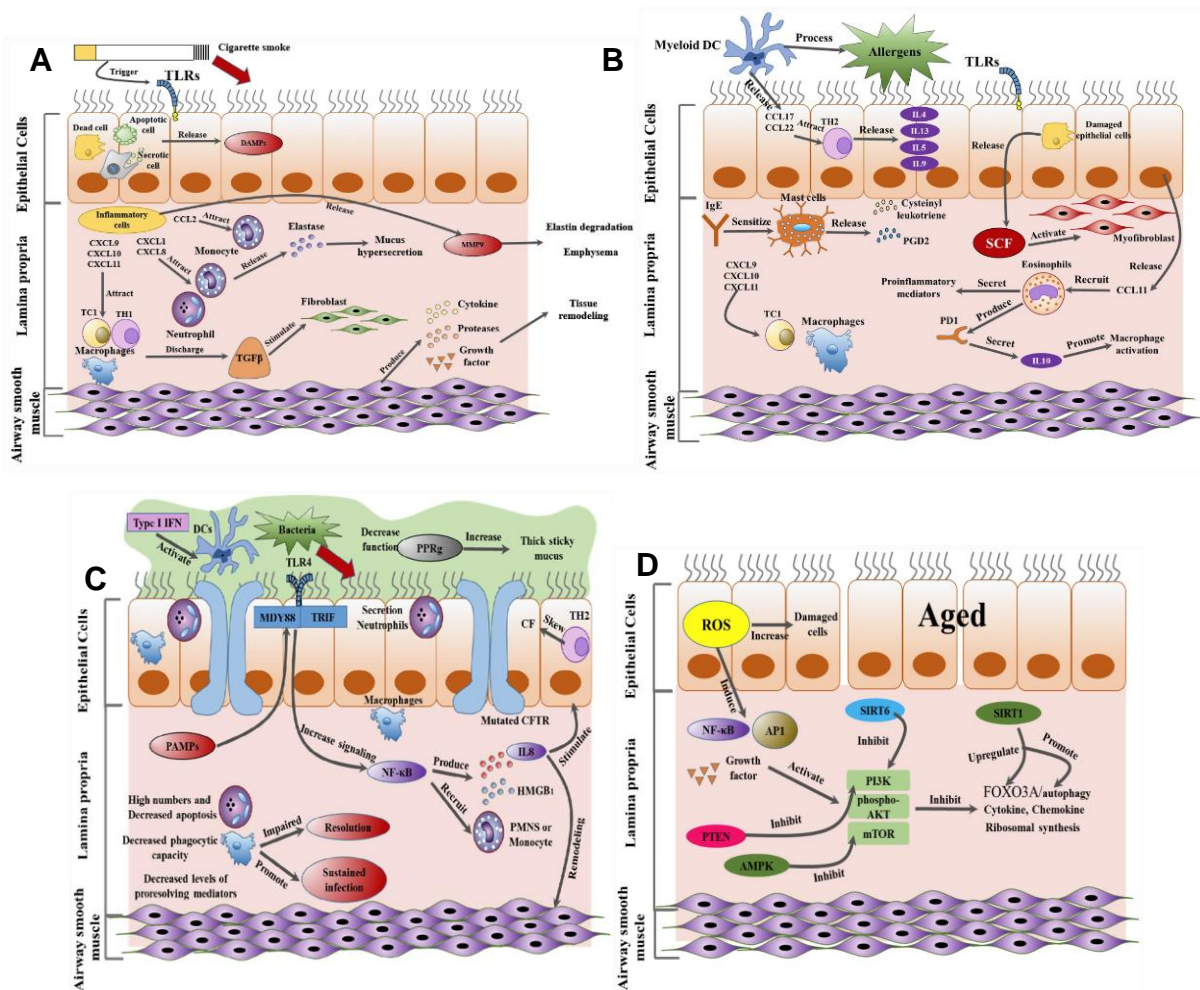
## 2.4. A légúti gyulladás

A légutak gyulladásos folyamatait általában patogének vagy toxinok, szennyező vagy irritáló anyagok, allergének okozzák [Lumb és Thomas 2020]. A Toll-like receptorok (TLR) ismerik fel a kórokozók molekuláris mintázatát (pattern recognition), és aktiválják a gyulladásos sejteket, például a NF- $\kappa$ B útvonalon, a növekedési faktorok, kemokinek, gyulladást elősegítő citokinek (pl.: IL-8 és TNF- $\alpha$ ) termelődését, hogy az aktivált sejtek fagocitálhassák a kórokozókat a sérült régióban (resolution) és megkezdhessék a sérült hámsejtek helyreállítását (tissue remodeling) [Tripathi és Aggarwal 2006]. Az IL-8 a neutrofil granulociták beszűrődését segíti elő, a TNF- $\alpha$  pedig fokozza az endothelsejt-adhéziós molekulák expresszióját a tüdőkapillárisokból [Grommes és Soehnlein 2011]. Ezen kívül számos ismert gyulladásos célfehérje csatlakozhat a légúti gyulladáshoz különböző ingerekre válaszul, mint például a mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9), az intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1), az érsejt-adhéziós molekula-1 (VCAM-1), a ciklooxygenáz-2 (COX-2) és a citoszól foszfolipáz A2 (cPLA2) is [Lee és Yang 2013]. A 3. ábra az általános gyulladásos jelátviteli útvonalakat mutatja be, kiemelve a gyulladásos mediátorok szerepét a légúti betegségekben.



3. ábra: Gyulladás általános mechanizmusa légúti betegségekben. [Aghasafari et al. 2019]

A gyulladásos folyamatok nemcsak a légutak akut vagy krónikus gyulladásos betegségeiben (pl.: laringitisz, krónikus bronchitisz, akut és krónikus bronchiolitisz stb.), hanem – akár különböző gyulladásos válaszokkal/folyamatokkal (4. ábra) – olyan összetett krónikus megbetegedésekben is szerepet játszanak, mint például az asztma egyes formái, a cisztás fibrózis, a bronchopulmonális diszplázia, és a COPD [Tiddens et al. 2000, Aghasafari et al. 2019, Lumb és Thomas 2020].



**4. ábra:** Gyulladás mechanizmusa **A:** COPD-ben, **B:** asztmában, **C:** cisztás fibrózisban, **E:** időskorban [Aghasafari et al. 2019]

Bár a gyulladás maga a szervezet természetes védekező mechanizmusa, amely eltávolíthatja a káros ingereket, például a kórokozókat, irritáló anyagokat és a sérült sejteket, és elindítja a gyógyulási folyamatot, a krónikus/hosszabb ideig fennálló, túlzott gyulladás a tüdő esetében is maradandó, vagy akár életet veszélyeztető elváltozásokhoz vezethet. Épp ezért a gyulladás és a gyulladáscsökkentő hatás közötti finom egyensúly elengedhetetlen a tüdő homeosztázisához, így a gyulladásos mechanizmusok átfogó megértése is kulcsfontosságú [Moldoveanu et al. 2009, Aghasafari et al. 2019, Lumb és Thomas 2020].



## **2.5. A légúti gyulladás *in vivo* modelljei**

A légúti gyulladással járó megbetegedések megfelelő kezelésének kidolgozásához nagy segítséget nyújthatnak a különböző – megbízható és jól reprodukálható – állatkísérletes modellek. A gyulladás és a kísérletekbe bevont tesztanyagok mechanizmusának megértéséhez a specifikus betegségmodellek (ovalbumin vagy egyes – házipor (pl. atka, csótány), növényi stb. – antigének által kiváltott asztma és allergiás tüdőgyulladás modellek [Helyes és Hajna 2012, Kianmeher et al. 2016]; krónikus cigarettafüsttel vagy elasztázokkal, LPS-sel, szervesen porral előidézett COPD modellek [Ghorani et al. 2017] stb.) mellett néhány mechanizmusmodell is rendelkezésre áll.

### **2.5.1. Az akut légúti gyulladás mechanizmusmodelljei**

A nem-allergiás légúti gyulladások állatmodelljeiben leggyakrabban használt gyulladáskeltő anyag az endotoxin (LPS), bár vannak egyéb kémiai anyagok (pl. levegőben lebegő makrorészecskék, szén nanorészecskék, kadmium, ózon) is, amelyek egy-egy specifikus mechanizmus (pl. mátrix metalloproteináz aktivitása, légúti hámsejtek oxidatív stressze, nyálkasejtek metapláziája) vizsgálatára alkalmasak [Helyes és Hajna 2012]. Az endotoxin-indukálta tüdőgyulladás mechanizmusmodell az akut légúti gyulladással járó megbetegedések esetén használható, reprodukálható állatmodell.

Az endotoxinok a Gram-negatív baktériumok sejtfalának alkotóelemei, amelyek a baktérium pusztulásával felszabadulnak, így az egész környezetben jelen vannak – pl. a házi porban, csapvízben, tejben –, és az emlősökre nézve toxikusak. Kémiaiilag lipopoliszacharidok (LPS-ek), melyek egy O-specifikus oldalláncból (O-antigén), egy oligoszacharid magból (R-mag), és egy specifikus foszfolipidből (lipid A) állnak [Rietschel et al. 1994].

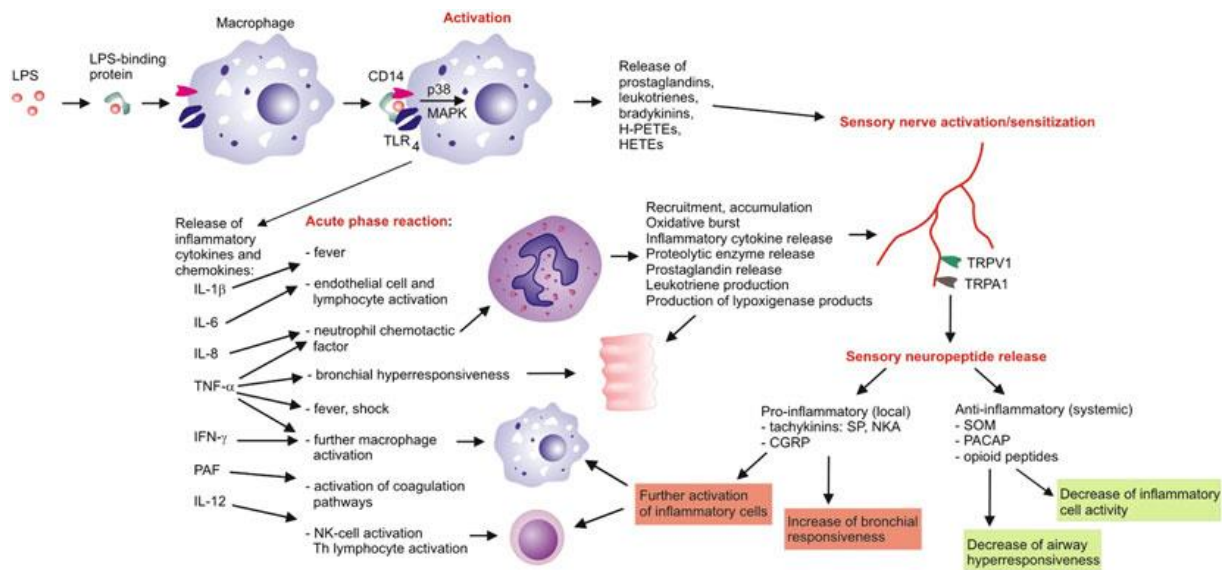
Az 5. ábra foglalja össze az LPS által kiváltott tüdőgyulladás komplex mechanizmusát és az abban szerepet játszó neuro-immun interakciókat.

A LPS a keringésbe jutva egy akut fázisú fehérjetranszporterhez, az LPS-kötő fehérjéhez (LPS-binding protein) kapcsolódik, majd a monociták és makrofágok Toll-like receptor 4 (TLR4) CD14 glikoprotein komplexéhez kötődve sejtaktivációt idéz elő. A sejtek gyulladással járó citokineket (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$ ) kezdenek termelni és bejuttatni az alveoláris térbe. Ez az adhéziós molekulák fokozott expresszióját, illetve – intranazális, intratracheális vagy aeroszolos adminisztráció esetén – a neutrofilek intenzív akkumulációját indukálja. A beszűrődött neutrofilek oxigén szabadgyökök, proteázok, citokinek és kemokinek felszabadítása révén szövetkárosodást okoznak, ami vonzza és stimulálja a mononukleáris sejteket és a limfocitákat. Mindezek a gyulladással járó és immunsejtek számos egyéb gyulladással járó mediátort (pl. leukotriének, prosztaglandinok, bradikinin) szabadítanak fel, amelyek

közvetlenül aktiválhatják a légutak szenzoros idegvégződéseit (pl. kapszaicin-érzékeny afferenseket), vagy hámkárosodást okozhatnak, ami az érzőidegek expozícióját eredményezi. Az ennek hatására felszabaduló neuropeptidek, neurogén gyulladási mediátorok – kapszaicin-érzékeny érzőideg esetében pl. P anyag (SP), a neurokinin-A (NKA) és a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) – magukon a perifériás idegvégződéseken, ill. a vaszkuláris és bronchiális epitélium, valamint a gyulladási sejtek receptorain hatva is befolyásolhatják a gyulladás folyamatát. [Helyes és Hajna 2012]

A légutaknak sűrű a kapszaicin-érzékeny beidegzése, és az ezeken található TRP ioncsatornák – pl. TRPA1, TRPV1 és melasztatin-2 (TRPM2) – szerepét is leírták már gyulladásos légúti betegségekben [Helyes és Hajna 2012, Zholos 2015, Stinson et al. 2023].

Az LPS által kiváltott egyéb hatások közé tartozik a remodeling okozta légúti alaprezisztencia növekedése, a fokozott nyáktermelés és érpermeabilitás, valamint a hörgők fokozott reakciója az inhalált muszkarinreceptor agonistákra (pl. metakolin, karbakol). Az LPS ezen hatásait csökkentik a glükokortikoidok, például a dexametazon, de a citokintermelést a p38 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) gátlása is csökkenti. [Helyes és Hajna 2012]



5. ábra: LPS hatásmechanizmusa. [Helyes és Hajna 2012]

### 2.5.2. A légúti gyulladás modelljeiben vizsgált illóolajok

Az illóolajok, illóolaj-komponensek vizsgálata már nem szokatlan a légutakkal kapcsolatos betegség – pl.  $\alpha$ -pinén (komponens pl. a fenyő illóolajában) OVA-indukálta allergiás rhinitis egérmodelljében [Nam et al. 2014]; timol (komponens pl. a kakukkfű illóolajában) [Zhou et al. 2014], *Croton zehntneri* illóolaja [Serra et al. 2019], inhalált menton

(komponens pl. a borsosmenta illóolajában) [Su és Lin 2022], és farnezol (komponens pl. a rózsa illóolajában) [Ku és Lin 2016] OVA-indukálta asztma egérmódeljében – és mechanizmusmodellekben, bár a számuk még nem túl magas.

Az LPS-sel kiváltott akut tüdőgyulladás modelljét valamivel gyakrabban alkalmazzák állatkísérletes vizsgálatokban. Kísérleti állatfajként előfordul a patkány – intraperitoneális *Pistacia integerrima* [Shirole et al. 2014] és intragasztrikus *Chimonanthus nitens* [Wan et al. 2021] illóolajának vizsgálata –, de az egértörzsek jóval népszerűbbek. Ami még fontos különbség lehet az egyes kísérletek között, az az illóolaj, illóolaj-komponens adminisztrációs módja. A leggyakoribb módszer az intraperitoneális injekció valamilyen oldat formájában [Magalhães et al. 2010, Bigliani et al. 2012, Huo et al. 2013, Kang et al. 2013, Chen et al. 2014, Shen et al. 2015, Ho et al. 2017, Jiang et al. 2017] vagy a tápba kevert, esetleg szondás beadás többnyire oldat, esetleg emulzió vagy nanokapszula formájában [Magalhães et al. 2019, Chen et al. 2017, D'Almeida et al. 2017]. Sajnos előfordul, hogy a beadási mód nem egyértelmű a kísérleti leírásokban [Zhang et al. 2018, Bittencourt-Mernak et al. 2021]. A szakirodalom áttekintése során csupán egy cikket találtam, melyben inhalációs technikát alkalmaztak ebben a modellben, 10 *Amomum* faj illóolajának vizsgálatára [Zhao et al. 2022].

**1. táblázat:** Illóolajok és illóolaj-komponensek hatásának vizsgálata LPS-indukálta tüdőgyulladás egérmódeljében

Illóolaj-komponens	Illóolaj	Beadási mód	Forrás
	<i>Schinus areira</i>	i.p.	[Bigliani et al. 2012]
anetol	pl. édeskömény	i.p.	[Kang et al. 2013]
citrál	pl. citronella	i.p.	[Shen et al. 2015]
eugenol	pl. szegfűszeg	i.p.	[Magalhães et al. 2010]
geraniol	pl. citronella	i.p.	[Jiang et al. 2017]
linalool	pl. levendula	i.p.	[Huo et al. 2013]
<i>p</i> -cimén	pl. kakukkfű	i.p.	[Chen et al. 2014]
zerumbon	pl. gyömbér	i.p.	[Ho et al. 2017]
$\alpha$ -bizabolol	pl. kamilla	p.o.	[D'Almeida et al. 2017]
$\beta$ -pacsulén	pl. pacsuli	p.o.	[Chen et al. 2017]
eugenol	pl. szegfűszeg	p.o.	[Magalhães et al. 2019]
eugenol	pl. szegfűszeg	?	[Bittencourt-Mernak et al. 2021]
<i>transz</i> -anetol	pl. édeskömény	?	[Zhang et al. 2018]
	<i>Amomum</i> sp.	inhaláció	[Zhao et al. 2022]

## 2.6. A vizsgálatokba bevont illóolajok rövid jellemzése

Illóolaj Kutatócsoportunk a PTE KK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetével kooperációban antibakteriális vizsgálatokat végez különböző – a gyakorlatban népszerű – illóolajokkal légúti fertőzésekben gyakran előforduló baktériumtörzsek (pl. *Staphylococcus aureus*, meticillin-rezisztens *S. aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*) ellen, különös tekintettel az antibiotikum-rezisztenciára. A vizsgált illóolajok közül a kakukkfű, eukaliptusz, fahéj, citronella és szegfűszeg *in vitro* baktericid, az erdei fenyő és borsmenta pedig bakteriosztatikus hatásúnak bizonyult [Ács et al. 2016, Balázs et al. 2019], ezért ezek közül válogattuk be az ígéretes gyulladáscsökkentő hatással is rendelkező illóolajokat az *in vivo* kísérletekbe. Ezen kívül bevontuk a kakukkfűhöz hasonló kémiai összetételű és felhasználású *Zataria multiflora* (shirazi kakukkfű) iráni gyógynövény illóolaját is, feltételezve, hogy a kakukkfű illóolajához hasonló hatást mutat majd.

A továbbiakban a kísérleteinkbe kiválasztott illóolajok rövid jellemzése következik.

### 2.6.1. Ceyloni citronellaolaj (továbbiakban: citronellaolaj)

Anyanövénye a pázsitfűfélék (Poaceae) családjába tartozó nárdus vagy ceyloni citronella, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle. A citronella az ázsiai konyha kedvelt fűszernövénye, a kozmetikai ipar is használja, rovarirtó szerek (főleg szúnyogriasztók) elterjedt összetevője, és a drágább orvosi citromfű (*Melissa officinalis* L. – Lamiaceae) illóolaj hamisítására is használják. A *Cymbopogon* nemzetség több fajából is nyernek ki illóolajat vízgőz-desztillációval. A ceyloni-típusú citronellaolaj monoterpénekből áll, jellemző komponensei: citronellál, geraniol, citronellol, limonén, citronellil-acetát, geranil-acetát és nerál [Bremness 2007, Hänsel és Sticher 2007, Csupor és Szendrei 2012].

Tradicionalis alkalmazás szerint főként gasztrointesztinális rendellenességek, izomfájdalmak, neuralgia, meghűlés és idegi zavarok, kimerültség kezelésére szánt kombinált készítményekben használják [Csupor és Szendrei 2012, Tibenda et al. 2022], de ma már vizsgálják anti-protozoális, antibakteriális, gyulladáscsökkentő, rákellenes, anti-nociceptív és rovarölő hatását is [Tibenda et al. 2022].

*In vitro* parazitaellenes és antimikotikus hatását is igazolták [Muhd Haffiz et al. 2013, Kpoviessi et al. 2014, De Toledo et al. 2016]. Egy magas citráltartalmú (citrál: geraniál és nerál izomerek keveréke) citronella-illóolaj pedig csökkentette a gyulladást humán bőrsejteken [Han és Parker 2017].

*In vivo* a diabéteszhez társult krónikus sebek egérmodelljében antimikotikus és gyulladáscsökkentő hatását írták le [Kandimalla et al. 2016].

### 2.6.2. Ceyloni fahéjkéregolaj (továbbiakban: fahéjolaj)

Anyanövénye a babérfélék (Lauraceae) családjába tartozó ceyloni fahéjfa, *Cinnamomum zeylanicum* Nees (syn. *C. verum* J.S. Presl.). A fahéj a legrégebbi fűszernövények egyike, az egyiptomi balzsamozás kelléke, a római és görög kultúrában fűszer és illatszer volt. A középkorban a német orvoslásban már homloküreg-gyulladás, megfázás és nátha kezelésére is használták, napjainkban gyógy- és fűszernövényként, illetve élelmiszer- és kozmetikai alapanyagként is széleskörűen használják. Az Európai Gyógyszerkönyvben is hivatalos ceyloni fahéjfa kéreg olaja (*Cinnamomi zeylanici corticis aetheroleum*) a fiatal ágakról lefejtett és az elsődleges kéregtől, valamint a pararétegtől megtisztított, szárított kéreg vízgőz-desztillációjával nyerhető tiszta, világossárga, idővel vöröses színűre változó folyadék. Az olaj fő összetevője a transz-fahéjaldehid, mellette fahéjsav,  $\beta$ -kariofillén, linalool, orto-metoxi-fahéjaldehid és számos minor komponens megtalálható. [E/S/C/O/P 2003, Ph.Hg.VIII. 2004, Bremness 2007, Csupor és Szendrei 2012, Tisserand és Young 2014, EMA 2]

Tradicionalisan enyhe görcsös gasztrointesztinális panaszok, felfűvódás és puffadás, étvágytalanság és hasmenés tüneti kezelésére alkalmas, előfordul megfázás, köhögés enyhítésére. Az ázsiai népgyógyászatban cukorbetegség, impotencia, frigiditás, szemgyulladás, fogfájás és reuma esetén is használják. Antimikrobiális, antidiabetikus, gyulladáscsökkentő, rákellenes és neuroprotektív hatását vizsgálják széleskörűen. [E/S/C/O/P 2003, Csupor és Szendrei 2012, Wang et al. 2020, Sharifi-Rad et al. 2021, Singh et al. 2021, EMA 2]

A fahéjolaj *in vitro* vizsgálatokban hatásosnak bizonyult számos baktérium, illetve gombafaj ellen; gyulladáscsökkentő hatását is igazolták szintén *in vitro*, gátolja a COX-aktivitást és a prosztaglandin-képződést [E/S/C/O/P 2003, Csupor és Szendrei 2012].

Egerekben vizsgálták a vizes kivonat gyulladáscsökkentő hatását, orálisan adva csökkentette a szérumban TNF- $\alpha$  és IL-6 gyulladást mediátorok szintjét [Hong et al. 2012], a fahéjaldehid csökkentette a mieloperoxidáz-aktivitást és gátolta az iNOS, COX-2 és NF- $\kappa$ B útvonalakat karragén indukálta ödémában [Liao et al. 2012].

### 2.6.3. Erdei fenyőolaj (továbbiakban: fenyőolaj)

Anyanövénye a fenyőfélék (Pinaceae) családjába tartozó erdei fenyő, *Pinus sylvestris* L. Az Európai Gyógyszerkönyvben az erdei fenyő tűleveleiből és ágvégeiből vízgőzdesztillálással nyert *Pini sylvestris aetheroleum* szerepel. Fő összetevői az  $\alpha$ - és  $\beta$ -pinén. A népi gyógyászat hörghurut, felső légúti megbetegedések, illetve külsőleg reumás és ízületi fájdalmak esetén alkalmazza a fenyőolajat. Antiszeptikus, köptető és vérbőséget fokozó hatása ismert. [Ph.Hg.VIII. 2004, Csupor és Szendrei 2012]

Az erdei fenyő nem tartozik a legaktívabban kutatott *Pinus* fajok közé, gyógyászati szempontból illóolajának egyelőre inkább az antimikrobiális és rákellenes hatására fókuszálnak [Motiejūnaite és Peciulyte 2004, Hoai et al. 2015], míg fő összetevői a feltételezett antikoaguláns, daganatellenes, antimikrobiális, maláriaellenes, antioxidáns, gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító, gyomorvédő, szorongásoldó, citoprotektív, görcsoldó és neuroprotektív tulajdonságaik révén is bekerültek a szakirodalomba [Salehi et al. 2019]. Az  $\alpha$ -pinén gyulladáscsökkentő hatását egér peritoneális makrofág sejtjeiben [Kim et al. 2015] és humán kondrocitákban [Rufino et al. 2014] vizsgálták.

*In vivo* a sebgyógyulást elősegítő szerepéről vannak adatok [Süntar et al. 2012].

#### **2.6.4. Kakukkfűolaj**

Anyanövénye az ajakosok (Lamiaceae) családjába tartozó kerti kakukkfű, *Thymus vulgaris* L. Illóolaja virágzó hajtásaiból állítható elő vízgőz-desztillációval, mely – a spanyol kakukkfűvel együtt – az Európai Gyógyszerkönyvben is hivatalos Thymi aetheroleum néven. Az illóolaj erőteljes, jellegzetes illatú, színtelen, sárga vagy sötét vörösesbarna folyadék. Főkomponensei a timol és a karvakrol, bár számos kemotípusa ismert, melyek a főkomponensekben, komponensek arányaiban is különbözhetnek. [Ph.Hg.VIII. 2004, Hazzit et al. 2009, Csupor és Szendrei 2012, Baráthné Simkó 2014, Patil et al. 2021, EMA 3] Kísérleteinkben a timolos kemotípust használtuk.

Etnofarmakológiai felhasználásai között szerepel a fertőzésellenes, kardioprotektív, gyomorvédő, gyulladáscsökkentő és immunmoduláló hatás is, egyéb légúti panaszok mellett a kakukkfű illóolaja leginkább köptetőként való alkalmazása miatt terjedt el, hörghurut és megfázás esetén inhalálás formájában [Raut és Karuppayil 2014, Patil et al. 2021].

Számos *in vitro* és néhány *in vivo* vizsgálatban is alátámasztották már a kakukkfű illóolajának és a timolnak gyulladáscsökkentő hatását [Salehi et al. 2018, Lorenzo et al. 2019, Patil et al. 2021, Hammoudi Halat et al. 2022].

#### **2.6.5. Szegfűszegolaj**

Anyanövénye a mirtuszfélek (Myrtaceae) családjába tartozó szegfűszeg, *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (syn. *Caryophyllus aromaticus* L.). A szegfűszeg fűszerként való alkalmazása igen népszerű, emellett a likőripar és kozmetikai ipar is felhasználja. Tiszta, sárga színű illóolaját a virág bimbójából állítják elő vízgőzdesztillációval. Az illóolaj főkomponense az eugenol, amelyet akár 70-90%-ban is tartalmazhat. Az Európai Gyógyszerkönyvben *Caryophylli floris aetheroleum* néven szerepel. [Ph.Hg.VIII. 2004, Csupor és Szendrei 2012, EMA 4]

A szegfűszeg leginkább száj- és torokfertőtlenítésre alkalmas, valamint fogfájás enyhítésére is javasolják [Jagadeesh et al. 2011, EMA 4].

Antimikrobiális hatása jelentős, ezen túl fájdalomcsillapító, érzéstelenítő, anti-nociceptív, antioxidáns, rákellenes, antiszeptikus, antidepresszáns, simaizomgörcs-oldó, és gyulladáscsökkentő hatásait vizsgálják, melyeket főként az eugenollal hoznak összefüggésbe [Barboza et al. 2018, Batiha et al. 2020, Haro-González et al. 2021, Nisar et al. 2021, Taleuzzaman et al. 2021, Ulanowska és Olas 2021].

#### **2.6.6. Shirazi kakukkfűolaj**

Anyanövénye az ajakosok (Lamiaceae) családjába tartozó *Zataria multiflora* Boiss, shirazi kakukkfű. Ez a Délkelet-Ázsiában honos növény a kakukkfűre emlékeztető illatú és felhasználású fűszer- és gyógynövény, melynek szélhajtó, serkentő, izzasztó, vizelethajtó, érzéstelenítő, görcsoldó, fájdalomcsillapító és köptető hatást tulajdonítanak. Illóolajának fő összetevői a kakukkfűhöz hasonlóan a timol és a karvakrol. [Sajed et al. 2012, Boskabady és Mhtaj 2014]

Illóolajának leginkább antimikrobiális, antioxidáns, immunmoduláló és gyulladáscsökkentő hatását vizsgálják, többek között köhögés és légúti allergiás problémák esetén [Khazdair et al. 2018, Mahboubi et al. 2018, Ghorani et al. 2022].

### 3. Kísérleti modellek, vizsgálati módszerek

#### 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.)

- citromlajot (anyanövény: *Cymbopogon nardus*, gyártási szám: E8912/1309),
- fahéjot (anyanövény: *Cinnamomum zeylanicum*, gyártási szám: H4991/1511),
- fenyőolajot (anyanövény: *Pinus sylvestris*, gyártási szám: 69543/1509),
- kakukkfűolajot (anyanövény: *Thymus vulgaris*, gyártási szám: H3981/1509),
- szegfűszegolajot (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 kakukkfűolajot (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 illóolajot 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% illóolajot tartalmazott.

##### 3.1.2. Állatok

A projektben felnőtt (10-18 hetes) nőtény egereket használtunk fel. A hím egerekben nagyobb valószínűséggel alakul ki súlyos LPS-indukálta tüdőgyulladás, a nőtények 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 génkiütött (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 ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet állatházaiban tartottuk 325\*170 \*140 mm-es ketrecekben, 24-25°C-on, 12 órás sötét-világos ciklus mellett. Standard rágszálótápot 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:

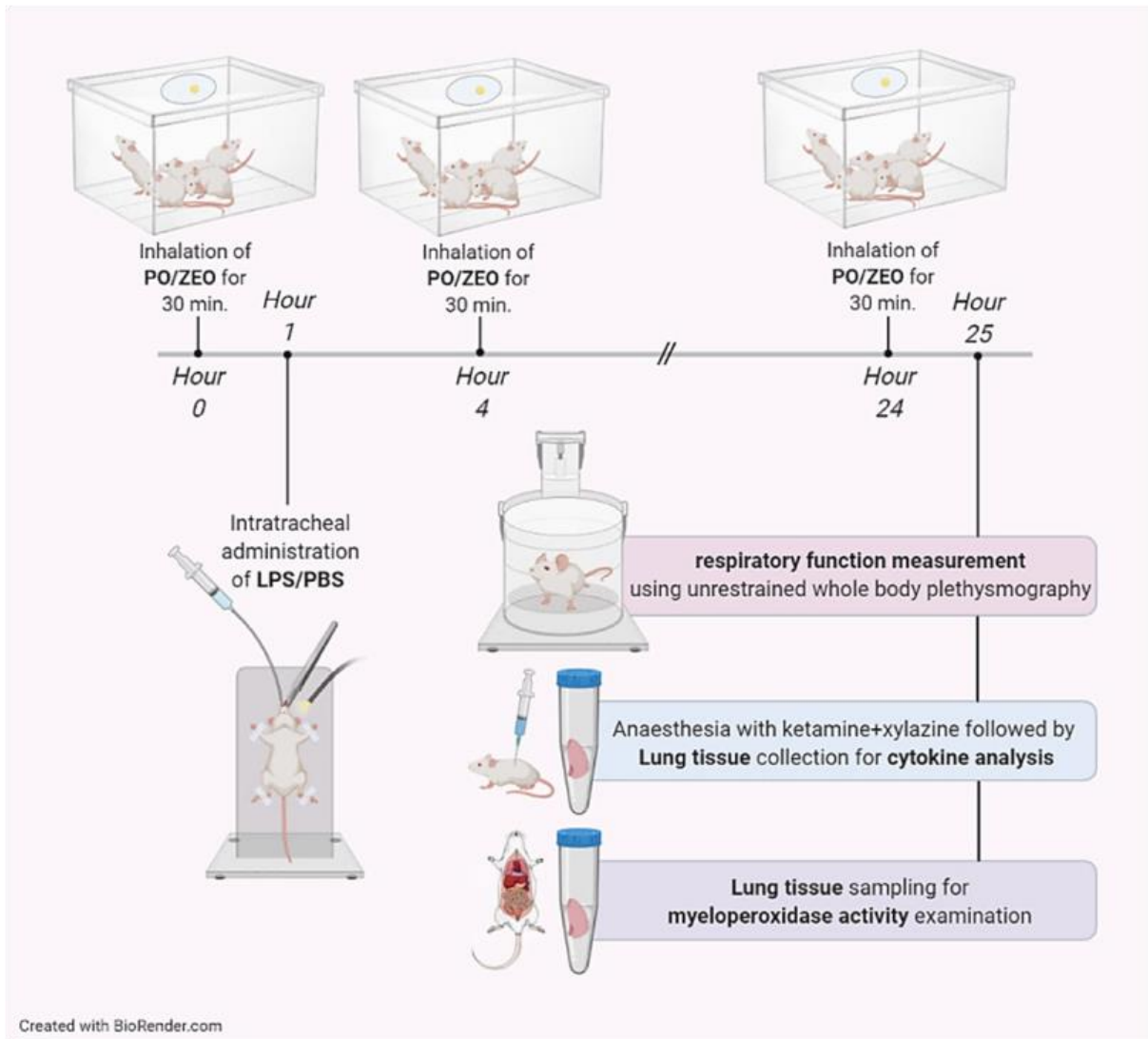
- PBS-PO: intratracheális 60 µl PBS kontroll; inhalált paraffinolaj kontroll
- LPS-PO: intratracheális 60 µl LPS / PBS; inhalált paraffinolaj kontroll
- PBS-IO: intratracheális 60 µl PBS kontroll; inhalált illóolaj
- LPS-IO: intratracheális 60 µl LPS / PBS; inhalált illóolaj

Két csoport háromszor (0., 4. és 24. órában) 30 percig a vizsgált illóolajat kapta száraz inhaláltatással, kettő kontrollként paraffinolajat. Az inhaláltatáshoz 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 (intraperitoniális 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* (083 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 kimetsztük, a baloldali tüdőlebenyt 6%-os formaldehidbe helyeztük szövettani feldolgozás céljából. A jobboldalit két darabra vágtuk, folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk, és -80°C-on tároltuk további (MPO és citokin) vizsgálatok céljából.

A protokollt a 6. ábra szemlélteti.



6. ábra: Kísérleti protokoll. [Amir Reza Ashraf]

## 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/divinil-benzol (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 retenciós adatokat és tömegspektrumokat standardok

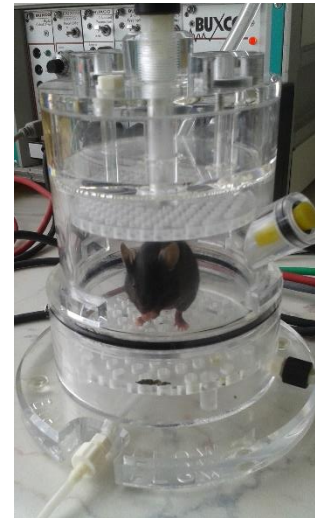
és a NIST 2.0 könyvtár adataival hasonlítottuk össze, a százalékos értékelést területnormalizációval végeztük.

### 3.2.2. Légzésfunkció mérése

A légzésfunkciós paramétereket teljesest pletizmográfal (Buxco Europe Ltd, Winchester, UK) mértük 24 órával az LPS beadása után éber, szabadon mozgó állatokon (7. ábra). A Penh méréséhez az alapvonalat 50 µl fiziológias sóoldat porlasztása közben vettük fel. A bronchokonstriktiót a kolinerg agonista karbakol oldatának (50 µl/egér, 11,0 és 22,0 mM fiziológias 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).



7. ábra: A pletizmográf kamrája.

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

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

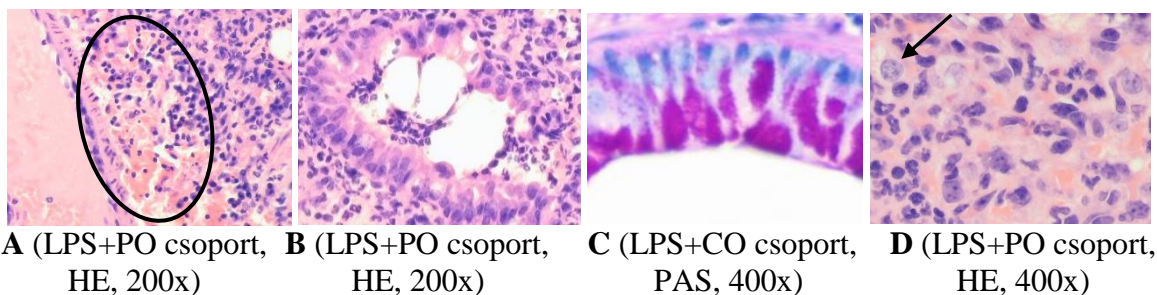
Ez az érték korrelál az elterjedt invazív technikával lélegeztetett állaton mért légúti hiperreaktivitással [Helyes et al. 2009].

### 3.2.3. Szövettani értékelés

A 6 %-os pufferolt formalinban fixált, paraffinba ágyazott tüdőmintákból mikrotómmal 5-7 µm vastagságú metszeteket készítettünk, majd hematoxilín-eozin (HE), valamint a nyáktermelő sejtek láthatóvá tételéhez perjódsvav-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) (8. ábra A),
- perivaszkuláris/peribronchiális granulocita infiltráció (0-3) (8. ábra B),
- nyáktermelő kehelysejtek (goblet-sejtek) hiperpláziája (0-2) (8. ábra C) és
- alveoláris makrofág infiltráció (0-2) (8. ábra D) [Zeldin et al. 2001].



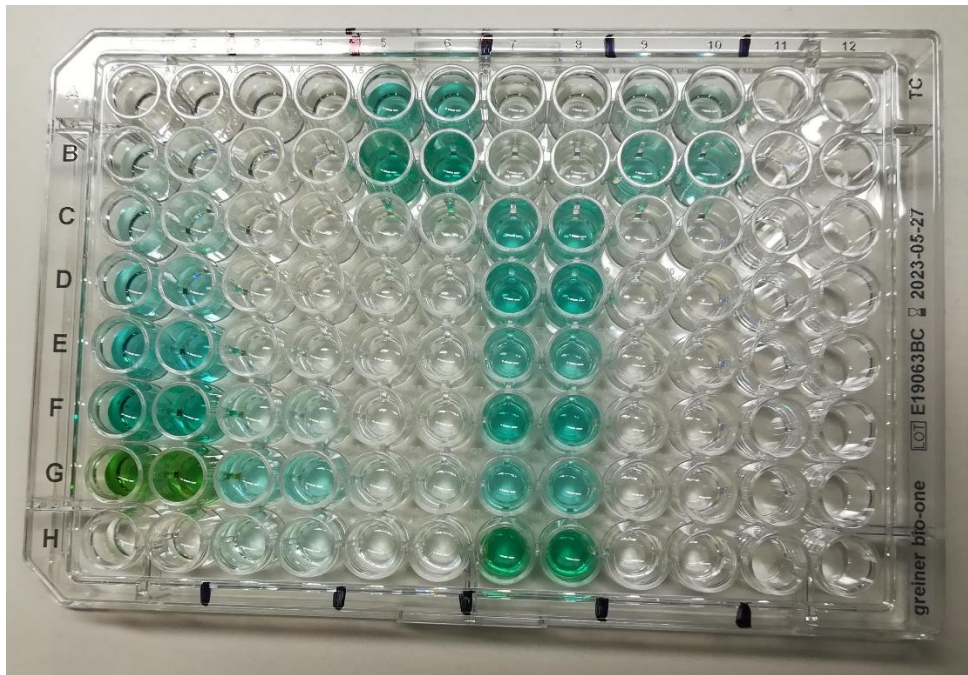
**8. ábra:** A szövettani értékelés során pontozott paraméterek.

**A:** perivaszkuláris ödéma, **B:** perivaszkuláris/peribronchiális granulocita infiltráció, **C:** nyáktermelő kehelysejtek (goblet sejtek) hiperpláziája, **D:** alveoláris makrofág infiltráció

### 3.2.4. Mieloperoxidáz-aktivitás meghatározása

A neutrofil granulociták és makrofágok akkumulációjának kvantitatív markere a mieloperoxidáz (MPO) enzim aktivitása, ennek meghatározásához a  $-80^{\circ}\text{C}$ -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 (9. ábra), 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].



**9. ábra:** 96 cellás lemez (plate) egy MPO-mérés végén.

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  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztott tüdőszövetminták másik részét felengedtük és lemértük, majd azonnal hideg PBS-be helyeztük, amely 0,01% fenil-metánszulfonil-fluorid (PMSF) proteáz inhibitorot 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 pannellel (Milliplex Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, Millipore) a következő citokinek/kemokinek fehérjekoncentrációinak meghatározásához:

- interleukin-1béta (IL-1 $\beta$ );
- 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 gyulladásoos fehérje-2 (MIP-2); és
- tumor nekrozis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ).

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  $\mu$ 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  $\mu$ l detektáló antitest oldatot adtunk hozzá, és 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk 500 fordulat/perc rázatással. A következő mosási lépések után 25  $\mu$ l/cella sztreptavidin-fikoeritrin (SAPE) oldatot adtunk hozzá, és 30 percig szobahőmérsékleten, rázatva inkubáltuk. Háromszori mosás után 150  $\mu$ 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 elemezve. Az eredményeket pg/mg-ban adtuk meg.

### 3.2.6. Statisztikai értékelés

A statisztikai analízis GraphPad Prism Version 8.01 programmal történt. Az ábrákon – a szövettani értékelést (box-plot, ábraalírásban részletezve) kivéve – az átlag  $\pm$  az átlag standard hibáját ábrázoltuk (mean  $\pm$  SEM). A légúti paraméterekre, az MPO-aktivításra és a citokinszintekre egy-, illetve két-utas varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk Bonferroni, illetve Tukey poszt tesztel. A hisztopatológiai pontozás statisztikai elemzését Kruskal-Wallis analízissel, Dunn tesztel végeztük. Minden esetben a  $p < 0,05$  értéket fogadtuk el szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

### 4.1. A vizsgált illóolajok kémiai összetétele

Az illóolajokban előforduló komponensek gázkromatográfiás analízis segítségével megállapított százalékos arányait az 2. táblázat tartalmazza. A század százaléknál kisebb mennyiségben előforduló összetevők nem kerültek feltüntetésre.

**2. táblázat: A vizsgált illóolajok összetétele (SPME-GC-MS)**

Citronellaolaj		Fahéjolaj		Fenyőolaj		Kakukkfűolaj		Szegefűszegolaj		Shirazi kakukkfűolaj	
	%		%		%		%		%		%
citronellál	36,2	fahéjaldehid	74,0	$\alpha$ -pinén	39,4	timol	46,3	eugenol	88,6	timol	53,6
geraniol	25,3	fahéj-acetát	5,3	limonén	14,3	<i>p</i> -cimol	22,1	$\beta$ -kariofillén	8,6	karvakrol	30,9
citronellol	13,6	linalool	3,8	$\beta$ -pinén	11,0	1,8-cineol	9,8	$\alpha$ -humulén	2,2	<i>p</i> -cimol	4,8
$\beta$ -kubebén	6,9	eugenol	2,7	$\alpha$ -terpineol	8,8	linalool	5,1	kariofillén-oxid	0,5	$\beta$ -kariofillén	1,7
limonén	3,5	anethol	2,3	$\beta$ -kariofillén	8,4	karvakrol	3,2			$\gamma$ -terpinén	1,6
$\beta$ -elemén	2,9	1,8-cineol	2,1	$\delta$ -3-karén	7,0	$\beta$ -kariofillén	2,5			kariofillén-oxid	1,5
geranil-acetát	2,6	$\beta$ -kariofillén	1,7	bornil-acetát	3,4	$\alpha$ -terpinén	2,2			spathulenol	1,4
elemol	2,4	$\alpha$ -terpineol	1,5	fenkon	1,1	$\beta$ -pinén	1,4			terpinén-4-ol	0,8
citronellil-acetát	2,3	limonén	1,4	kámfén	0,8	borneol	1,0			aromadendrén	0,8
eudesmol	2,3	<i>p</i> -cimol	1,2	$\alpha$ -humulén	0,8	kámfén	0,9			$\alpha$ -pinén	0,6
geraniál	2,2	$\alpha$ -pinén	0,5	kariofillén-oxid	0,7	$\alpha$ -pinén	0,9			linalool	0,4
nerál	1,0			longiferén	0,5	terpinén-4-ol	0,6			ledén	0,4
$\beta$ -cadinén	1,0					$\gamma$ -terpinén	0,3			$\alpha$ -terpinén	0,3

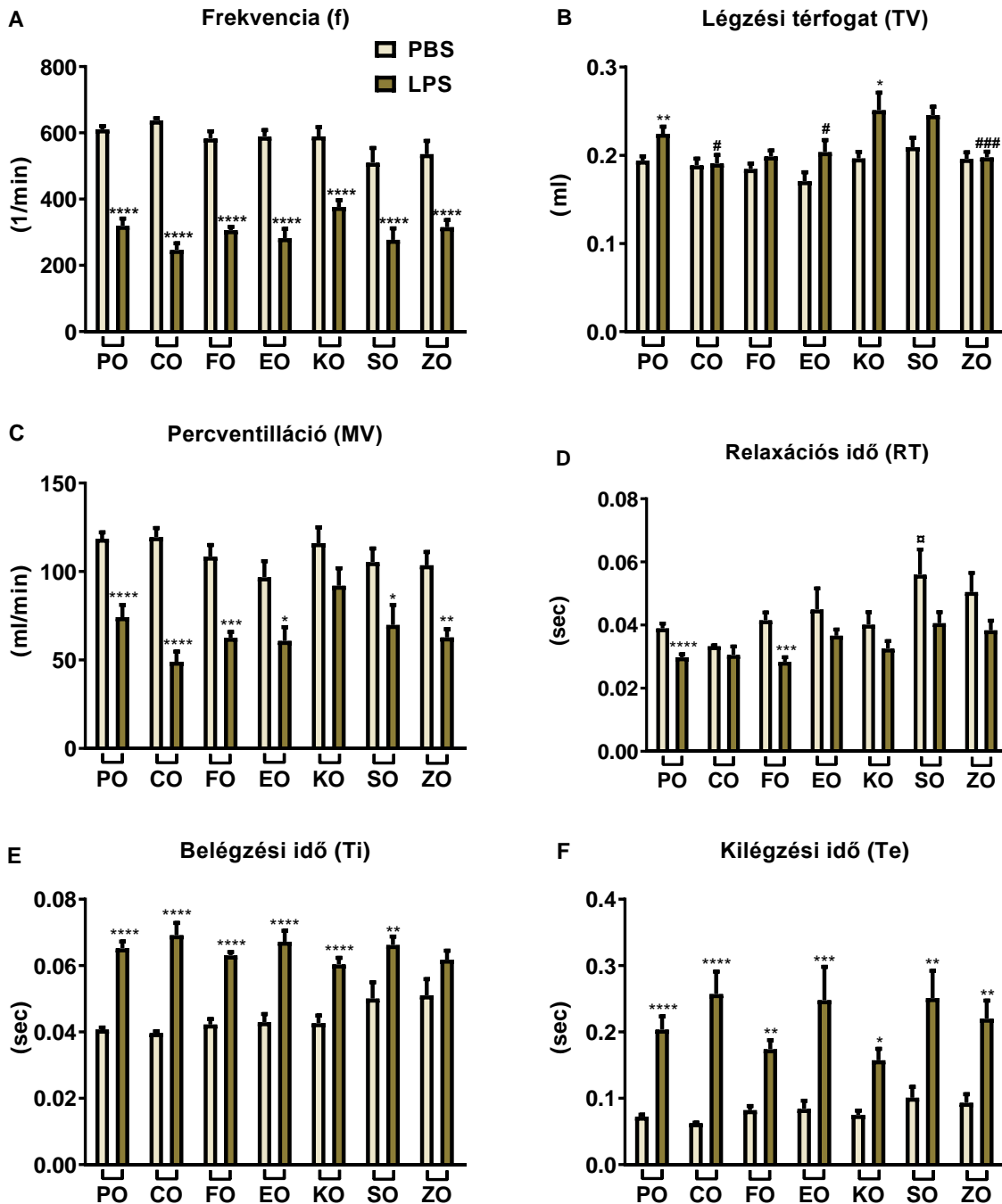
A citronellaolajban legnagyobb mennyiségben citronellál (36,2%), geraniol (25,3%) és citronellol (13,6%) voltak a főkomponensek. A fahéjolaj főkomponensének a várakozásoknak megfelelően a fahéjaldehid (74,0%), míg a szegefűszegolajnak az eugenol (88,6%) bizonyult. A fenyőolaj főbb összetevői az  $\alpha$ -pinén (39,4%), a limonén (14,3%) és a  $\beta$ -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.

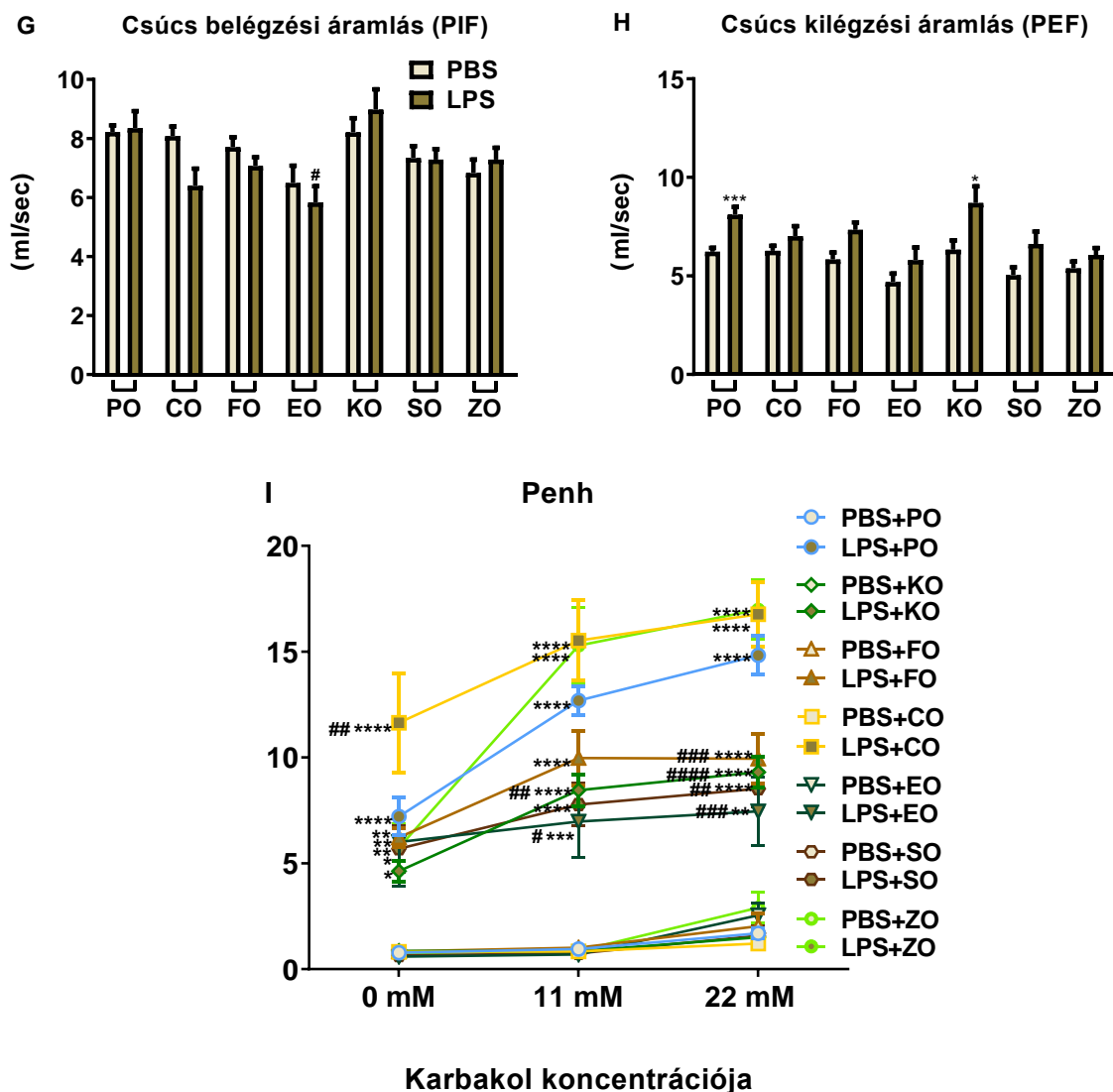


## 4.2. A vizsgált illóolajok inhalációjának hatása

### 4.2.1. A vizsgált illóolajok hatása a légzésfunkciós paraméterekre

A teljestest pletizmográf számos légzésfunkciós paraméter regisztrációjára alkalmas, eredményeinket az 10. ábra tartalmazza.





**10. ábra:** Légzésfunkciós eredmények. A citromellaolaj (CO), fahéjolaj (FO), fenyőolaj (EO), kakukkfűolaj (KO), szegfűszegolaj (SO) és shirazi kakukkfűolaj (ZO) hatása a légzésfunkciós paraméterekre a paraffinolajos (PO) negatív kontrollhoz viszonyítva PBS (kontroll – világos kitöltés) vagy LPS (gyulladt – sötét kitöltés) kezelés után.

(n = 6–10/csoport, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 vs. az adott olajat inhalált PBS-sel kezelt csoport; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, ####p<0,0001 vs. LPS+PO-val kezelt csoport; □<0,05 vs. PBS+PO-val kezelt csoport)

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 bronchokonstrikció hatására (10. ábra A-I).

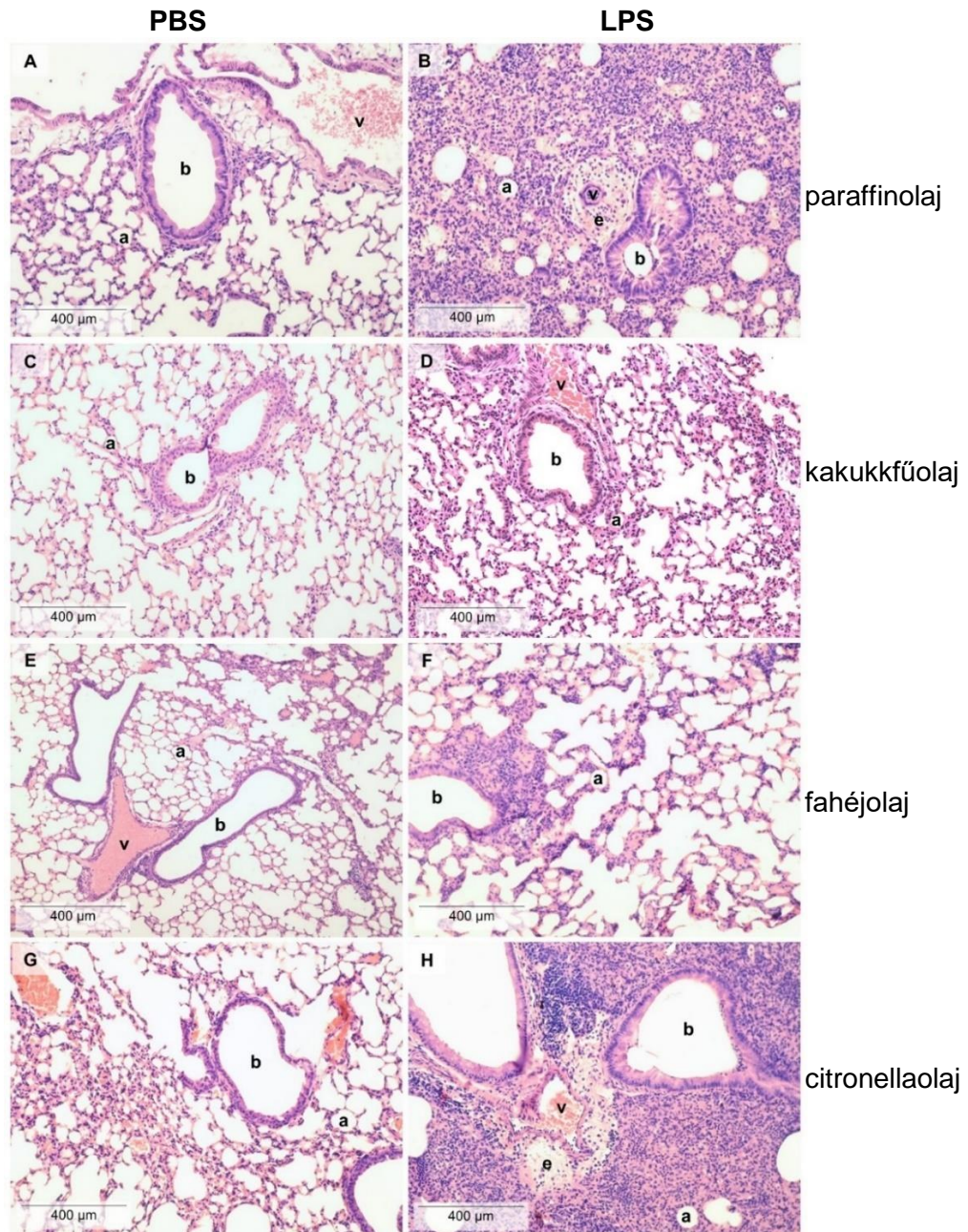
A fahéj (FO), fenyő- (EO), kakukkfű (KO) és szegfűszegolaj (SO) belélegzése is szignifikánsan csökkentette a karbakollal kiváltott túlérzékenységet az LPS-sel kezelt egerekben a negatív kontrollként használt paraffinolajos (PO) kezeléshez képest, míg a citromella- (CO) és shirazi kakukkfűolaj (ZO) tovább emelte, vagyis rontott a Penh értékein – az alapvonalnál a citromella (CO) esetében ez a változás szignifikáns is lett (10. ábra I).

A citromella- (CO), a fenyő- (EO) és a shirazi kakukkfűolaj (ZO) szignifikánsan csökkentette a légzési térfogatot a paraffinolajjal (PO) 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 (10. ábra A-H).

Az illóolajok inhalálása a PBS-t kapó kontrollcsoportban csupán egyetlen esetben befolyásolták szignifikánsan a légzésfunkciót: a szegfűszegolaj (SO) a relaxációs időt (10. ábra D). Ez az egyetlen illóolaj, és az egyetlen paraméter a vizsgálataink folyamán, ahol az illóolaj-inhaláció szignifikánsan befolyásolta a nem gyulladt kontrollcsoportot.

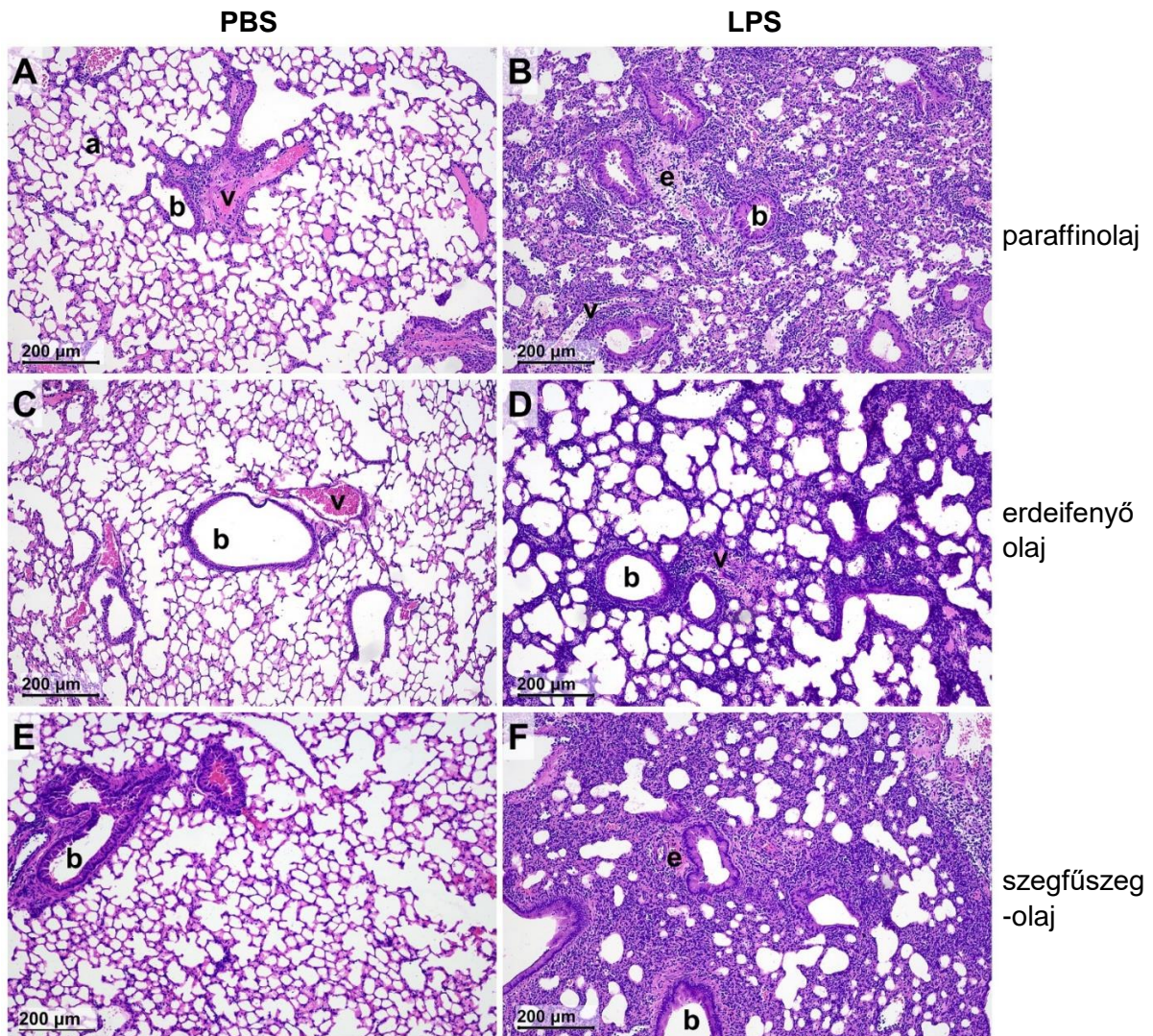
#### 4.2.2. A vizsgált illóolajok hatása a szövettani paraméterekre

A 11. és 12. ábra néhány szemléltető képet tartalmaz az elkészített tüdőmetszetekről, a 13. ábrán pedig a szemikvantitatív hisztopatológiai pontozás eredményei láthatók. Kehelysejtek összesen csak két esetben, a paraffinolajjal és citromellaolajjal kezelt LPS-es csoportok egy-egy tagjának metszetén jelentek meg, emiatt nem szerepeltettük őket külön diagrammon.

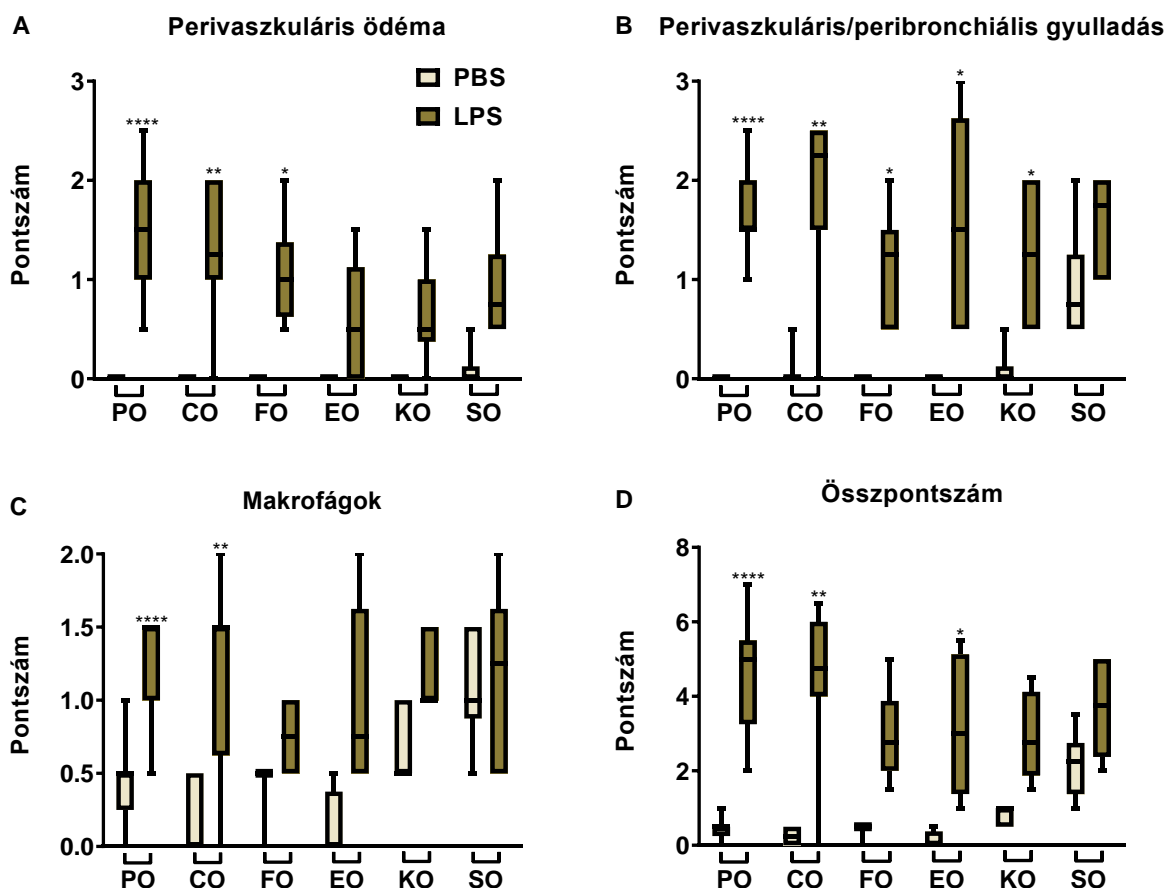


**11. ábra:** Szövettani elváltozások a tüdőben. Reprezentatív képek egerek PBS-sel (nem gyulladt) és LPS-kezelt (gyulladt) tüdőparenchymájáról kakukkfű- (KO), fahéj- (FO) és citromellaolaj (CO) inhalációja után a kontroll paraffinolajjal (PO) összehasonlítva. (A) PBS- és PO-kezelés, (B) LPS- és PO-kezelés, (C) PBS- és KO-kezelés, (D) LPS- és KO-kezelés, (E) PBS- és FO-kezelés, (F) LPS- és FO-kezelés, (G) PBS- és CO-kezelés, valamint (H) LPS- és CO-kezelés után.

a: alveolus, b: bronchiolus, v: ér, e: ödéma  
(Hematoxilin-eozin festés, 200-szoros nagyítás)



**12. ábra:** Szöveti elváltozások a tüdőben. Reprezentatív kórszöveti képek egerek PBS-sel (nem gyulladt) és LPS-kezelt (gyulladt) tüdőparenchymájáról erdeifenyő (EO) és szegfűszegolaj (SO) inhalációja után a kontroll paraffinolajjal (PO) összehasonlítva. (A) PBS- és PO-kezelés, (B) LPS- és PO-kezelés, (C) PBS- és EO-kezelés, (D) LPS- és EO-kezelés, (E) PBS- és SO-kezelés és (F) LPS- és SO-kezelés után.  
a: alveolus, b: bronchiolus, v: ér, e: ödéma  
(Hematoxilin-eozin festés, 100-szoros nagyítás)



**13. ábra:** Szemikvantitatív hisztopathológiai pontozás eredményei. A citronellaolaj (CO), fahéjolaj (FO), fenyőolaj (EO), kakukkfűolaj (KO) és szegfűszegolaj (SO) hatása a szövettani paraméterekre a paraffinolajos (PO) negatív kontrollhoz viszonyítva PBS (kontroll – világos kitöltés) vagy LPS (gyulladt – sötét kitöltés) kezelés után. A (A) perivaszkuláris és peribronchiális ödémának, (B) neutrofil granulociták felhalmozódásának, (C) makrofágoknak és (D) tüdőszövettani elváltozások összpontszámának szemikvantitatív értékelése a mediánt, a felső/alsó kvartilist és a maximum/minimum értékeket mutató box plot diagrammon. (n = 6-10/csoport, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. az adott olajat inhalált PBS-sel kezelt csoport)

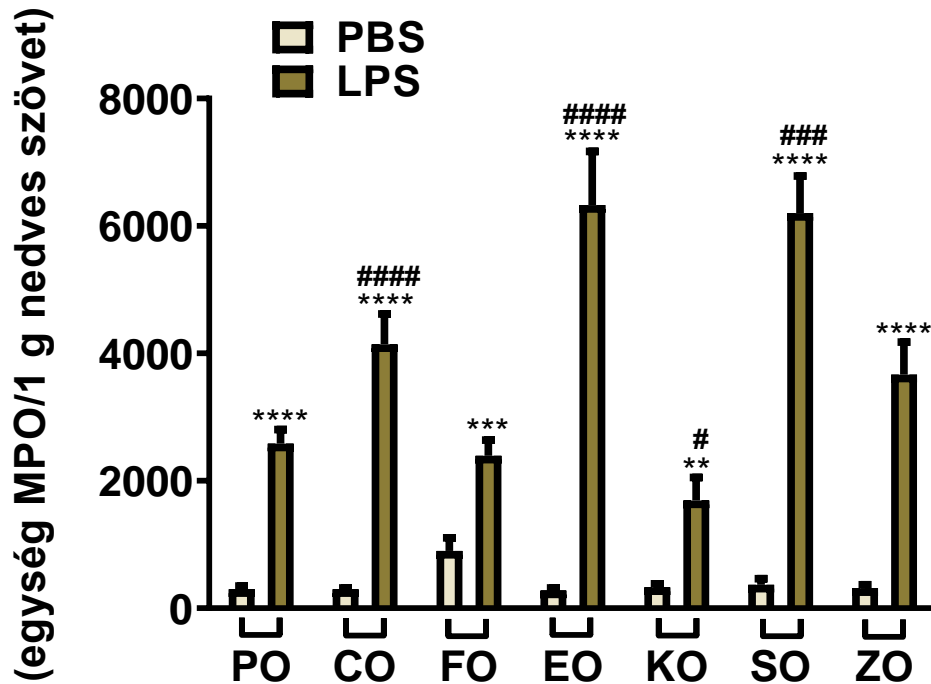
Az LPS beadása neutrofil granulocita és makrofág infiltrációt váltott ki, amely jelentős perivaszkuláris és peribronchiális ödéma kialakulásával járt (11. és 12. ábra A-B, 13. ábra), és egyetlen metszeten kehelysejt hiperpláziával.

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- (CO), fenyő- (EO) és szegfűszegolaj (SO) esetében –, de látható változások előfordultak. Az LPS által kiváltott jelentős ödémaképződést megakadályozta a kakukkfű- (KO), fenyő- (EO) és szegfűszegolaj (SO), 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 (SO), a makrofág akkumulációnál pedig a fahéjolajról (FO). A szövettani elváltozások összpontszámának szignifikáns növekedését a fahéj- (FO), kakukkfű- (KO) és szegfűszegolaj (SO) is hatékonyan megakadályozta. A citromellaolaj (CO) nem befolyásolta a pontoszt hisztopatológiai elváltozások mértékét (13. ábra), viszont már a kontrollcsoportban (a PBS-sel kezelt csoportban) is több esetben bevérzéseket, illetve limfociták megjelenését okozta (11. ábra G), az LPS-sel kezelt csoportjában pedig enyhe kehelysejt-hiperpláziát figyeltünk meg a metszeteken, illetve a granulociták gyulladás mellett fokozott limfocitabeáramlást és alveoláris destrukciót (11. ábra H). A shirazi kakukkfűolaj esetében sajnos nem történt szövettani értékelés (laborköltözés miatt a minták elvesztek).

#### 4.2.3. A vizsgált illóolajok hatása a mieloperoxidáz-aktivitásra

A mieloperoxidáz-enzimaktivitás mérésének eredményeit a 14. ábra szemlélteti.



**14. ábra:** Tüdőhomogenizátumok mieloperoxidáz-aktivitása. A citronellaolaj (CO), fahéj (FO), fenyőolaj (EO), kakukkfűolaj (KO), szegfűszegolaj (SO) és a shirazi kakukkfűolaj (ZO) hatása az enzimaktivitásra a paraffinolajos (PO) negatív kontrollhoz viszonyítva PBS (kontroll – világos kitöltés) vagy LPS (gyulladt – sötét kitöltés) kezelés után. (n = 6–10/csoport, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 vs. az adott olajat inhalált PBS-sel kezelt csoport; #p<0,05, ###p<0,001, ####p<0,0001 vs. LPS+PO-val kezelt csoport)

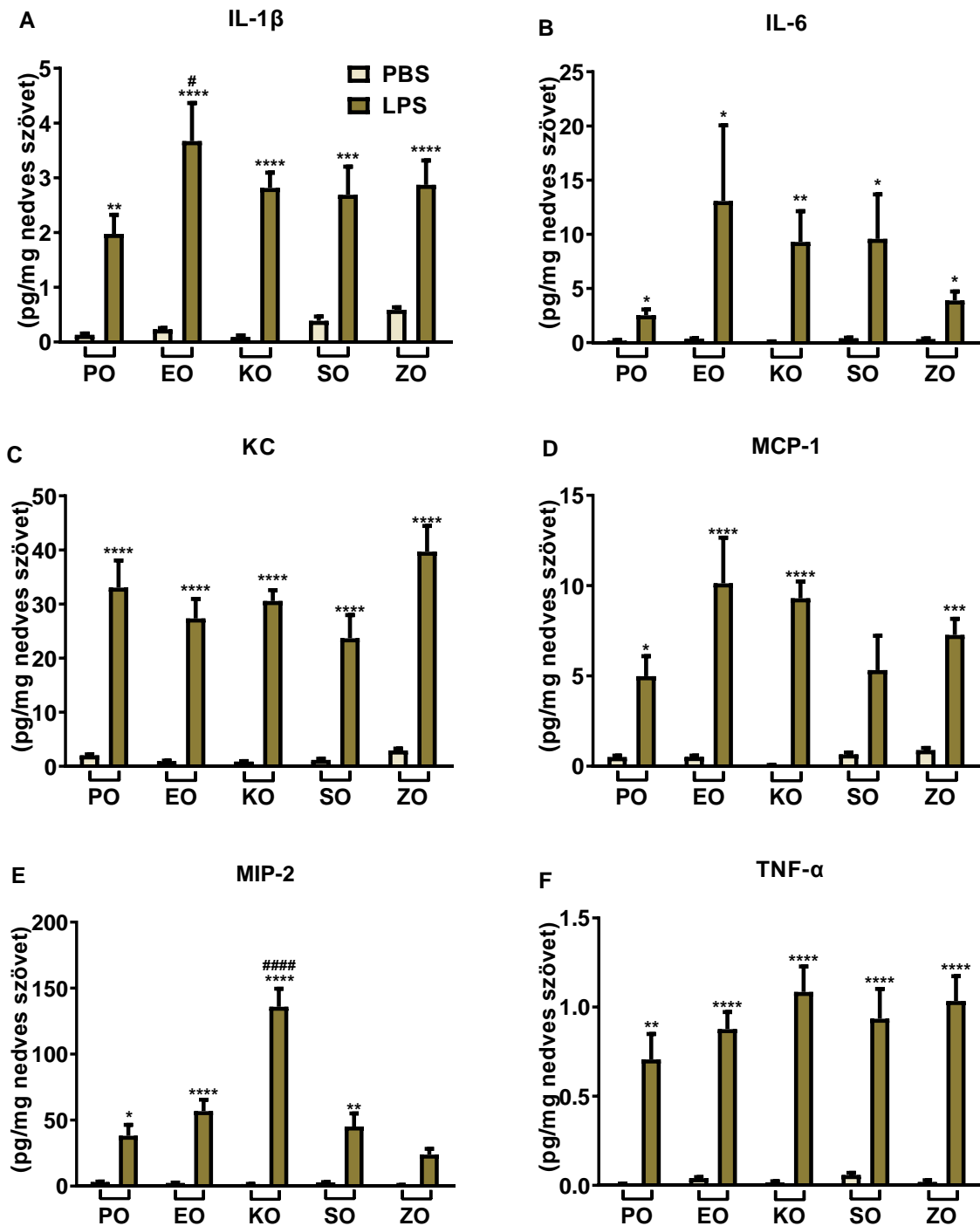
Az LPS hatására a hisztopatológiai eredményeknek megfelelően megemelkedett a – granulocita és makrofág aktivitással korreláló – mieloperoxidáz-aktivitás.

Ezt a megemelkedett értéket meglepő módon egyedül a kakukkfűolaj (KO) csökkentette szignifikánsan. A fahéj- (FO) és a shirazi kakukkfűolaj (ZO) inhalációja nem befolyásolta, azonban a citronella- (CO), fenyő- (FO) és szegfűszegolaj (SO) hatására is szignifikánsan tovább emelkedett.



#### 4.2.4. A vizsgált illóolajok hatása a citokinexpresszióra

Az 15. ábrán a mért citokin/kemokinszintek láthatók.



**15. ábra:** Tüdőhomogenizátumok citokinszintjei. A fenyőolaj (EO), kakukkfűolaj (KO), szegfűszegolaj (SO) és shirazi kakukkfűolaj (ZO) hatása a citokinszintekre a paraffinolajos (PO) negatív kontrollhoz viszonyítva PBS (kontroll – világos kitöltés) vagy LPS (gyulladt – sötét kitöltés) kezelés után.

(n = 5–8/csoport, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 vs. az adott olajat inhalált PBS-sel kezelt csoport; #p<0,05, ####p<0,0001 vs. LPS+PO-val kezelt csoport)

LPS hatására kialakuló gyulladásban minden vizsgált citokin, illetve kemokin szintje szignifikánsan megemelkedett (15. ábra).

Az inhalált illóolajok közül a fenyőolaj (EO) szignifikánsan súlyosbította az LPS-indukálta interleukin-1béta (IL-1 $\beta$ ) (15. ábra A), míg a kakukkfűolaj (KO) a makrofág gyulladásos fehérje-2 szintjét (MIP-2) (15. ábra E). A fahéjolaj esetében sajnos nem történt citokinszint mérés (laborköltözés miatt a minták elvesztek).

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

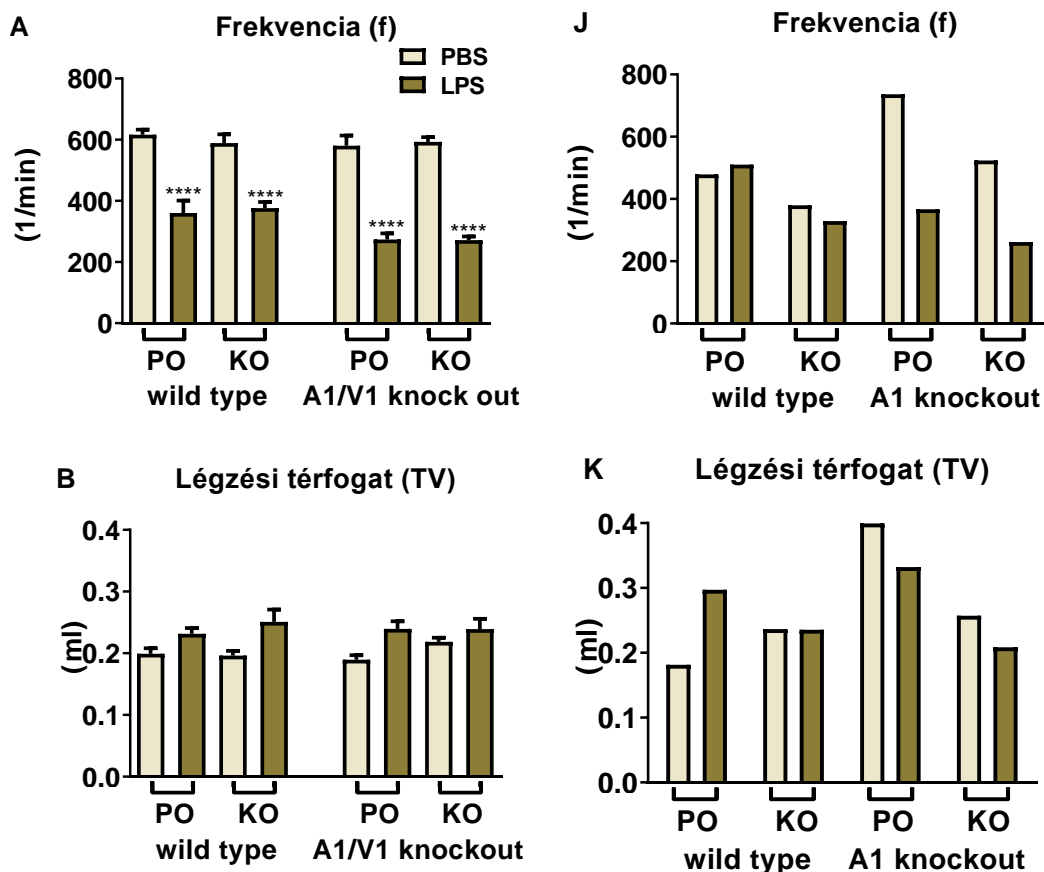
Következő lépésként a legnagyobb gyulladáscsökkentő potenciállal rendelkező illóolajat, a kakukkfűolajat választottuk ki további vizsgálatokra. A TRPA1 és TRPV1 génihiányos egerek használatával igyekeztünk megállapítani, vajon van-e szerepe a hatásban a két ioncsatorna közül legalább az egyiknek. A továbbiakban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

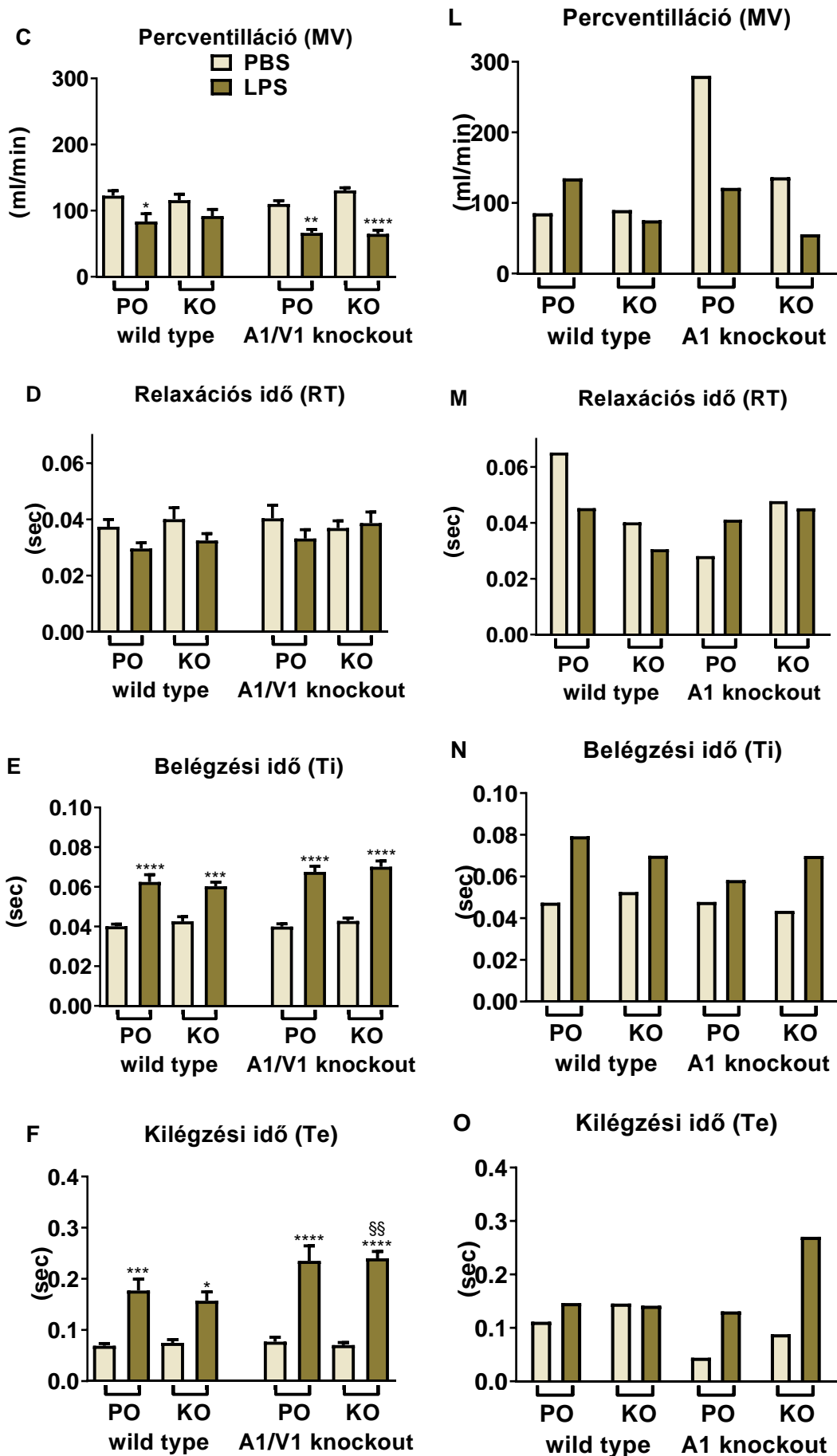
- TRPA1/V1<sup>+/+</sup> (WT, vad típus) és a TRPA1/V1<sup>-/-</sup> (KO, knockout), illetve a
- TRPA1<sup>+/+</sup> (WT, vad típus) és a TRPA1<sup>-/-</sup> (KO, knockout)

törzsekben mért eredmények ábráit – a jobb összehasonlíthatóság miatt vizsgált paraméterenként egymás mellé rendelve – szerepeltetem.

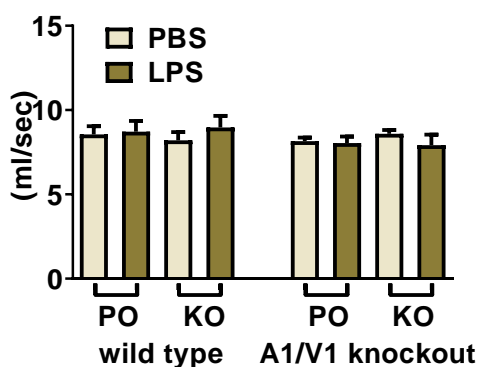
#### 4.3.1. A kakukkfűolaj hatása knockout egerek légzésfunkciós paramétereire

A következő ábrán a kakukkfűolaj hatása látható a légzésfunkcióra a különböző egértörzsek esetében, bal oldalt a TRPA1/V1 dupla knockout, jobb oldalt a szimpla TRPA1 knockout eredmények szerepelnek. Utóbbi esetben a pletizmográf készülék nem várt meghibásodása miatt sajnos csupán csoportonként egy-egy állat paramétereit sikerült regisztrálnunk. Ezekből a szimpla TRPA1 knockout légzésfunkciós eredményekből természetesen messzemenő következtetéseket levonni nem lehet, viszont szemléltetésként és a következtetésre való törekvés miatt szerepelnek a dolgozatban.

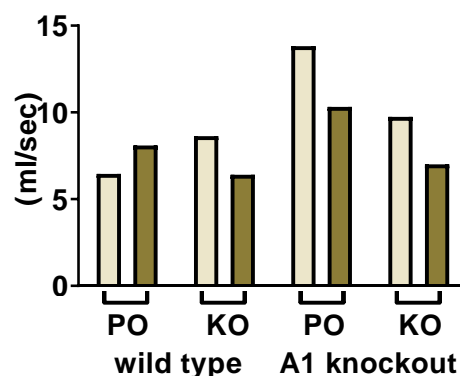




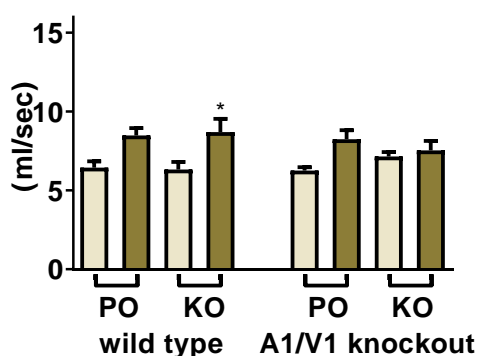
**G Csúcs belégzési áramlás (PIF)**



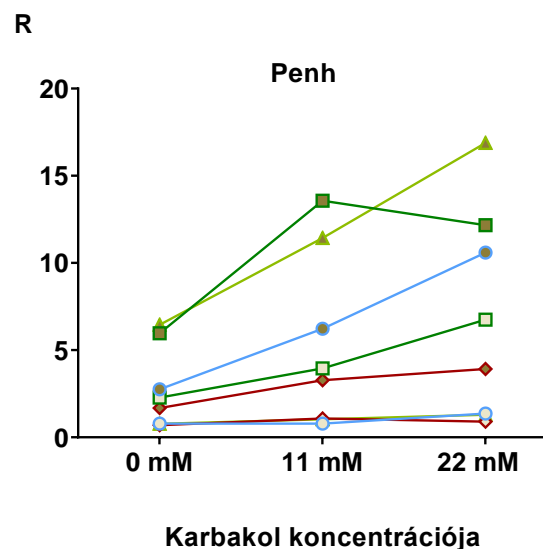
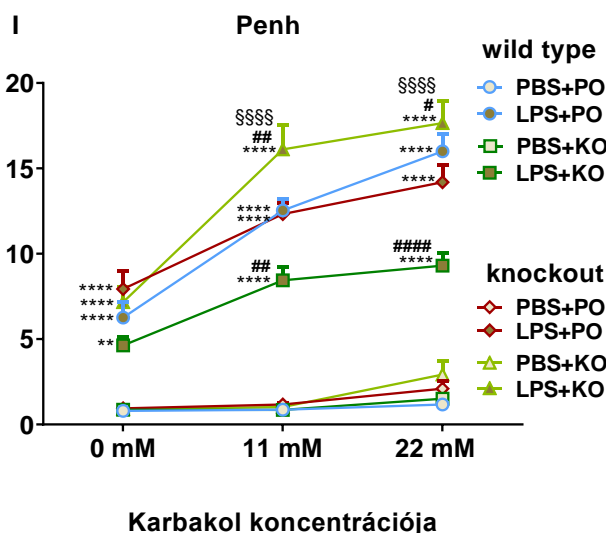
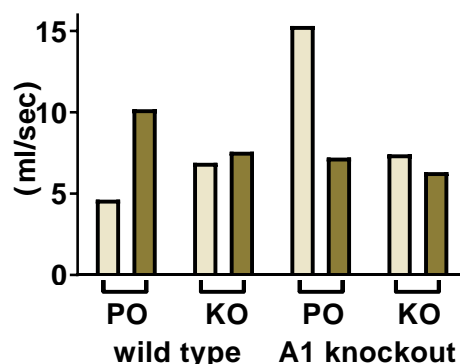
**P Csúcs belégzési áramlás (PIF)**



**H Csúcs kilégzési áramlás (PEF)**



**Q Csúcs kilégzési áramlás (PEF)**



**16. ábra:** A kakukkfűolaj (KO) hatása a légzésfunkciós paraméterekre a paraffinolajos (PO) negatív kontrollhoz viszonyítva PBS (kontroll – világos kitöltés) vagy LPS (gyulladt – sötét kitöltés) kezelés után (A-I) TRPA1/V1<sup>+/+</sup> (wild type, vad típus) és TRPA1/V1<sup>-/-</sup> (knockout, génkiütött), illetve (J-R) TRPA1<sup>+/+</sup> (wild type, vad típus) és TRPA1<sup>-/-</sup> (knockout, génkiütött) egerek esetén.

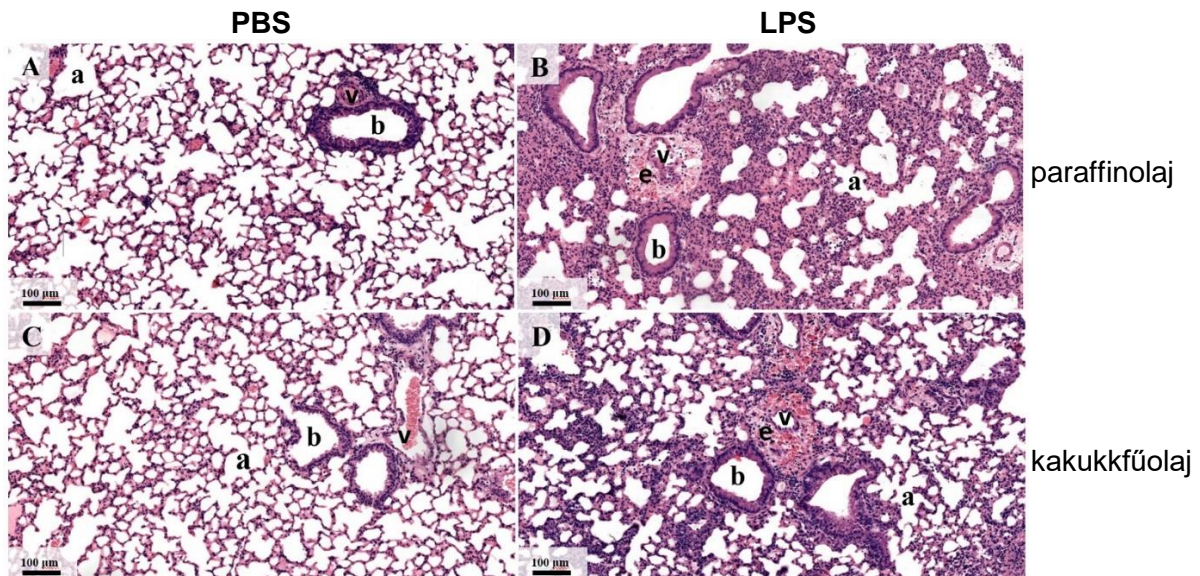
(A-I: n = 6–8/csoport, J-R: n=1/csoport), \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 vs. az adott olajat inhalált PBS-sel kezelt csoport; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,0001 vs. LPS+PO-val kezelt csoport; §§p<0,01, §§§p<0,0001 vs. azonosan kezelt vad típusú csoport)

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 alapvonal (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 (16. ábra A-I). 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 (16. ábra J-R).

A kakukkfűolaj (KO) inhaláltatása nem befolyásolta szignifikánsan az LPS által kiváltott változásokat, kivéve a Penh értékeit: az A1/V1 vad típusú egerekben szignifikánsan javította, az A1/V1 génhiányos egyedekben ezzel ellentétben szignifikánsan rontotta a légúti hiperreaktivitást karbakol mellett (16. ábra I), ami utalhat arra, hogy a kakukkfűolaj (KO) hatását a TRPA1 és/vagy a TRPV1 közvetíti, vagyis a génhiányos egerekben védő szerepe nem tud érvényesülni.

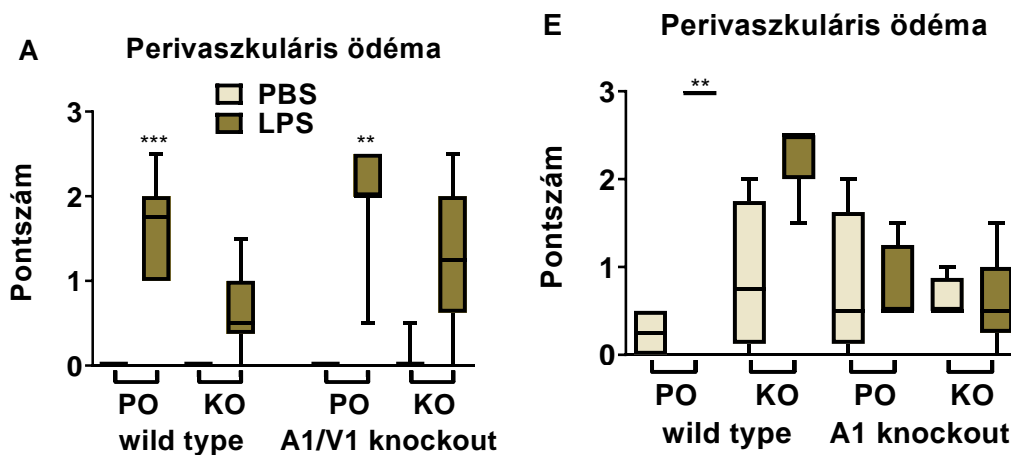
#### 4.3.2. A kakukkfűolaj hatása knockout egerek szövettani paramétereire

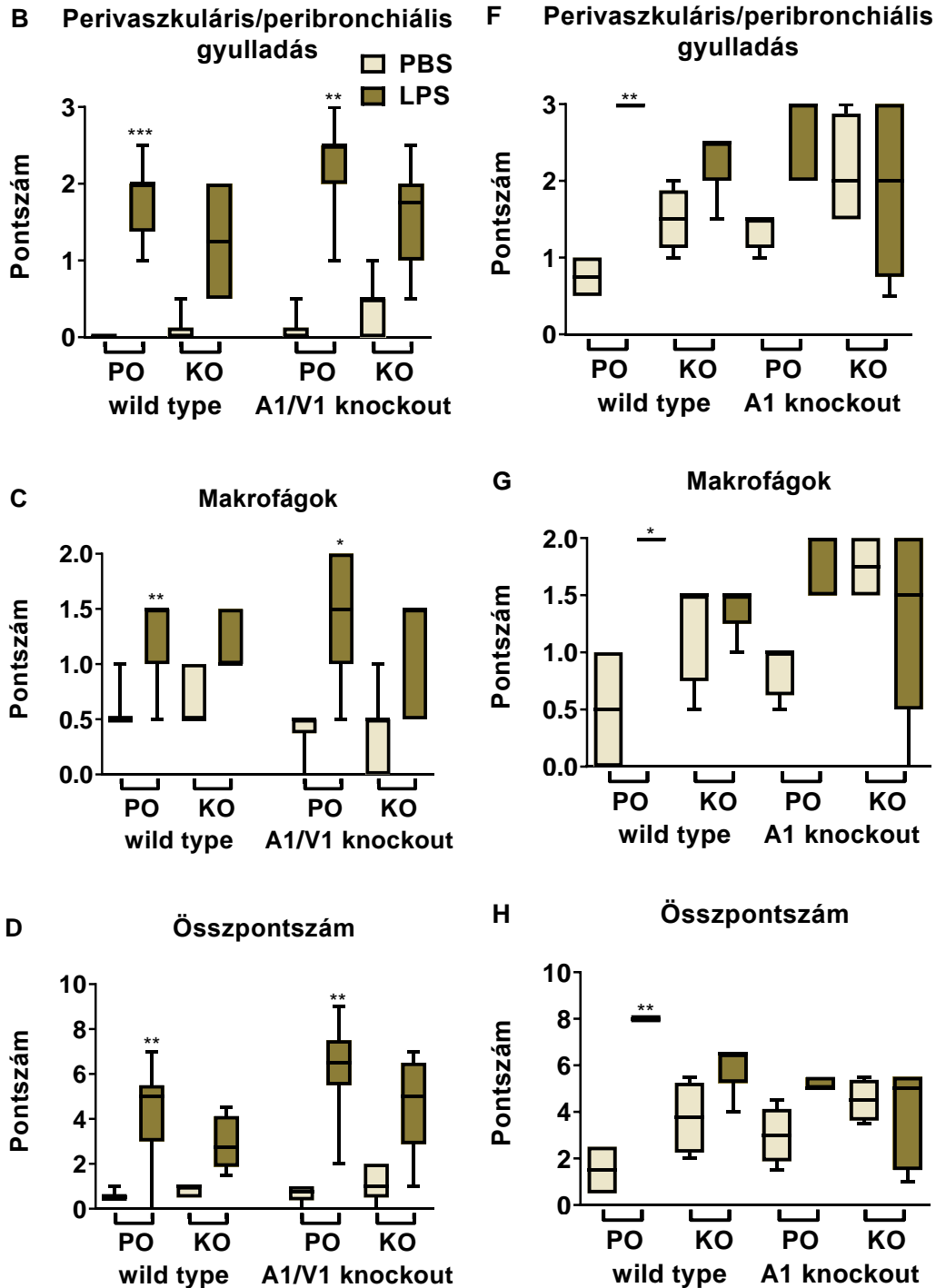
A következő két ábrán a kakukkfűolaj hatása látható a szövettani paraméterekre a különböző génekészletű egerek esetében. A 17. ábra néhány szemléltető képet tartalmaz a tüdőmetszetekről, a 18. ábrán pedig szemikvantitatív hisztopatológiai pontozás eredményei szerepelnek, bal oldalt a dupla TRPA1/V1 knockout, jobb oldalt a szimpla TRPA1 knockout egerek esetében.



**17. ábra:** Szövettani elváltozások a tüdőben. Néhány reprezentatív kórszövettani kép TRPA1/V1<sup>-/-</sup> egerek PBS-sel (nem gyulladt, kontroll) és LPS-kezelt (gyulladt) tüdőparenchymájáról kakukkfűolaj (KO) inhalációja után a kontroll paraffinolajjal (PO) összehasonlítva. (A) PBS- és PO-kezelés, (B) LPS- és PO-kezelés, (C) PBS- és KO-kezelés, (D) LPS- és KO-kezelés után.

a: alveolus, b: bronchiolus, v: ér, e: ödéma  
(Hematoxilín-eozin festés, 100-szoros nagyítás)





**18. ábra:** Szemikvantitatív hisztopaológiai pontozás eredményei a mediánt, a felső/alsó kvartilist és a maximum/minimum értékeket mutató box plot diagrammokon. A kakukkfűolaj (KO) hatása a szövettani paraméterekre a paraffinolajos (PO) negatív kontrollhoz viszonyítva PBS (kontroll – világos kitöltés) vagy LPS (gyulladt – sötét kitöltés) kezelés után (A-I) TRPA1/V1<sup>+/+</sup> (wild type, vad típus) és TRPA1/V1<sup>-/-</sup> (knockout, génkiütött), illetve (J-R) TRPA1<sup>+/+</sup> (wild type, vad típus) és TRPA1<sup>-/-</sup> (knockout, génkiütött) egerek esetén. (A-I: n = 6–10/csoport, J-R: n=4-5/csoport), \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. az adott olajat inhalált PBS-sel kezelt csoport)

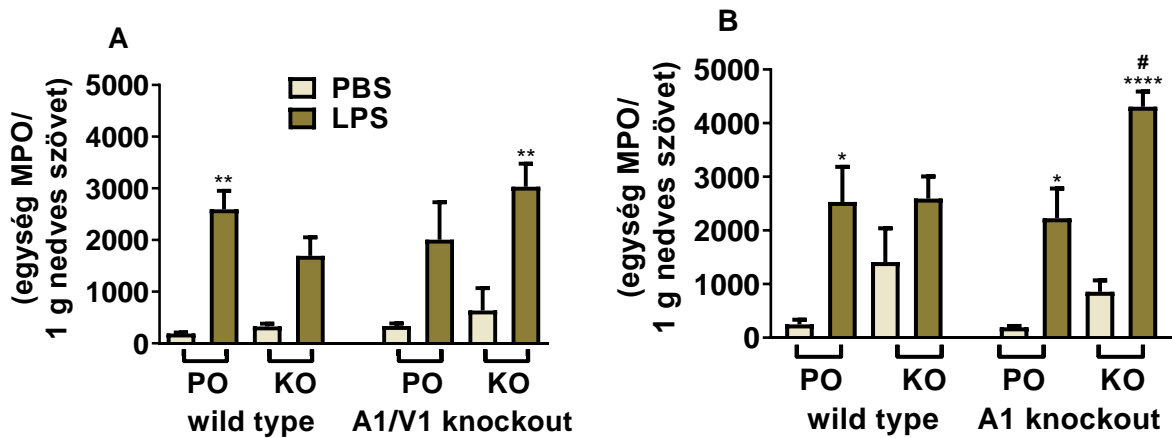


A szövettani vizsgálat és a szemikvantitatív pontozás eredményei szerint, az LPS beadása perivaszkuláris ödéma kialakulását idézte elő diffúz granulocita infiltrációval, valamint perivaszkuláris és peribronchiális gyulladást és aktivált mononukleáris sejtek infiltrációját mind az A1/V1 vad típusú, mind az A1/V1 génihiányos egerekben (18. ábra A-D), 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 (18. ábra E-H).

A kakukkfűolaj (KO) inhalációja sem a perivaszkuláris ödémában, sem a perivaszkuláris és peribronchiális gyulladásban vagy a makrofágok számában nem okozott szignifikáns változást, viszont enyhébb kórszövettani képet eredményezett, amely a A1/V1 vad típusúhoz képest kevésbé volt hangsúlyos az A1/V1 knockout esetében (18. ábra D). 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 (18. ábra E-H).

### 4.3.3. A kakukkfűolaj hatása knockout egerek mieloperoxidáz-aktivitására

A következő ábrán a kakukkfűolaj hatása látható a mieloperoxidáz enzimaktivitására a különböző egértörzsek esetében, bal oldalt a TRPA1/V1 dupla knockout, jobb oldalt a szimpla TRPA1 knockout eredmények szerepelnek.



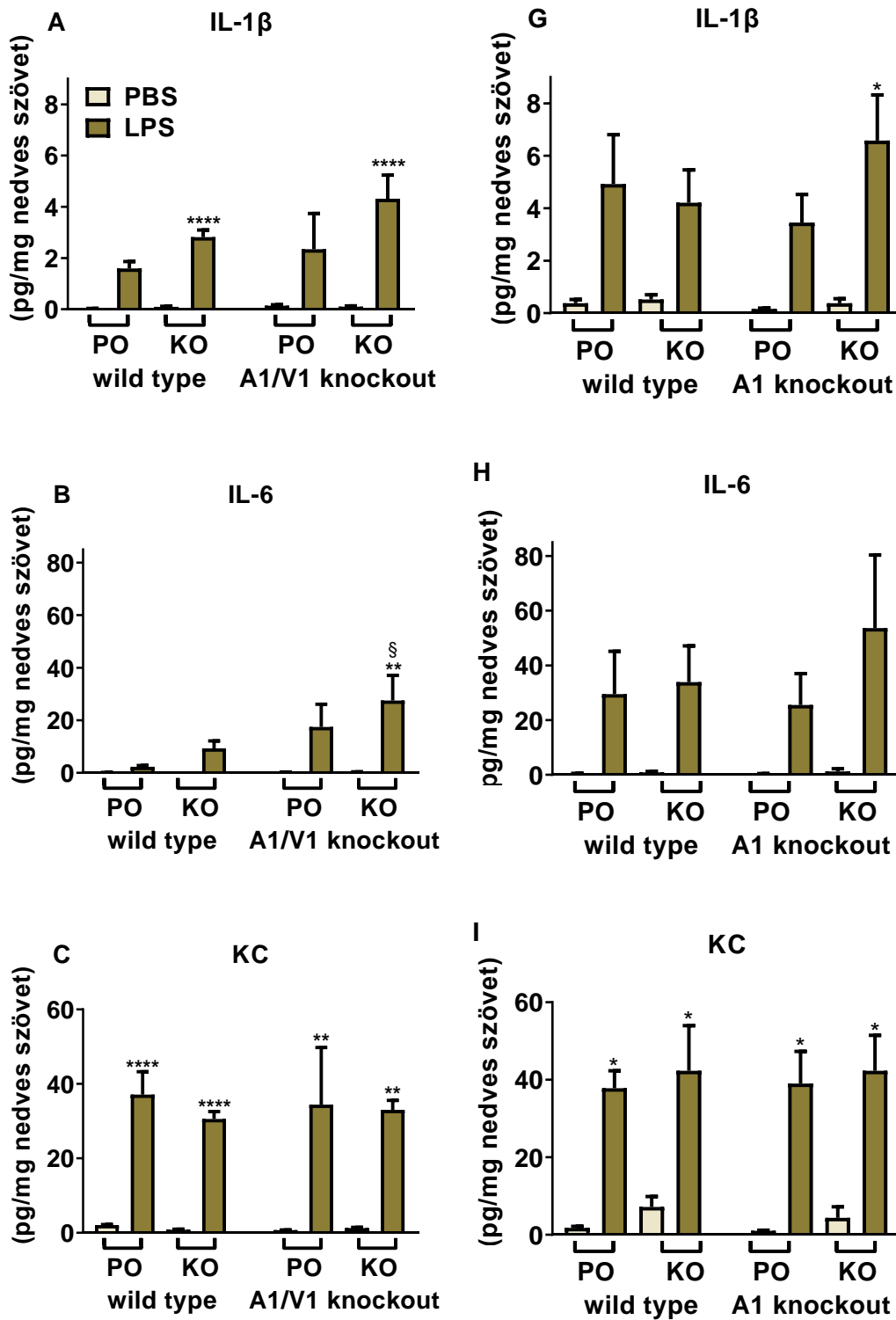
**19. ábra:** Tüdőhomogenizátumok mieloperoxidáz-aktivitása. A kakukkfűolaj (KO) hatása az enzimaktivitásra a paraffinolajos (PO) negatív kontrollhoz viszonyítva PBS (kontroll – világos kitöltés) vagy LPS (gyulladt – sötét kitöltés) kezelés után (A-I) TRPA1/V1<sup>+/+</sup> (wild type, vad típus) és TRPA1/V1<sup>-/-</sup> (knockout, génkiütött), illetve (J-R) TRPA1<sup>+/+</sup> (wild type, vad típus) és TRPA1<sup>-/-</sup> (knockout, génkiütött) egerek esetén. (A-I: n = 7–8/csoport, J-R: n=4-5/csoport), \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001 vs. az adott olajat inhalált PBS-sel kezelt csoport; #p<0,05 vs. LPS+PO-val kezelt csoport)

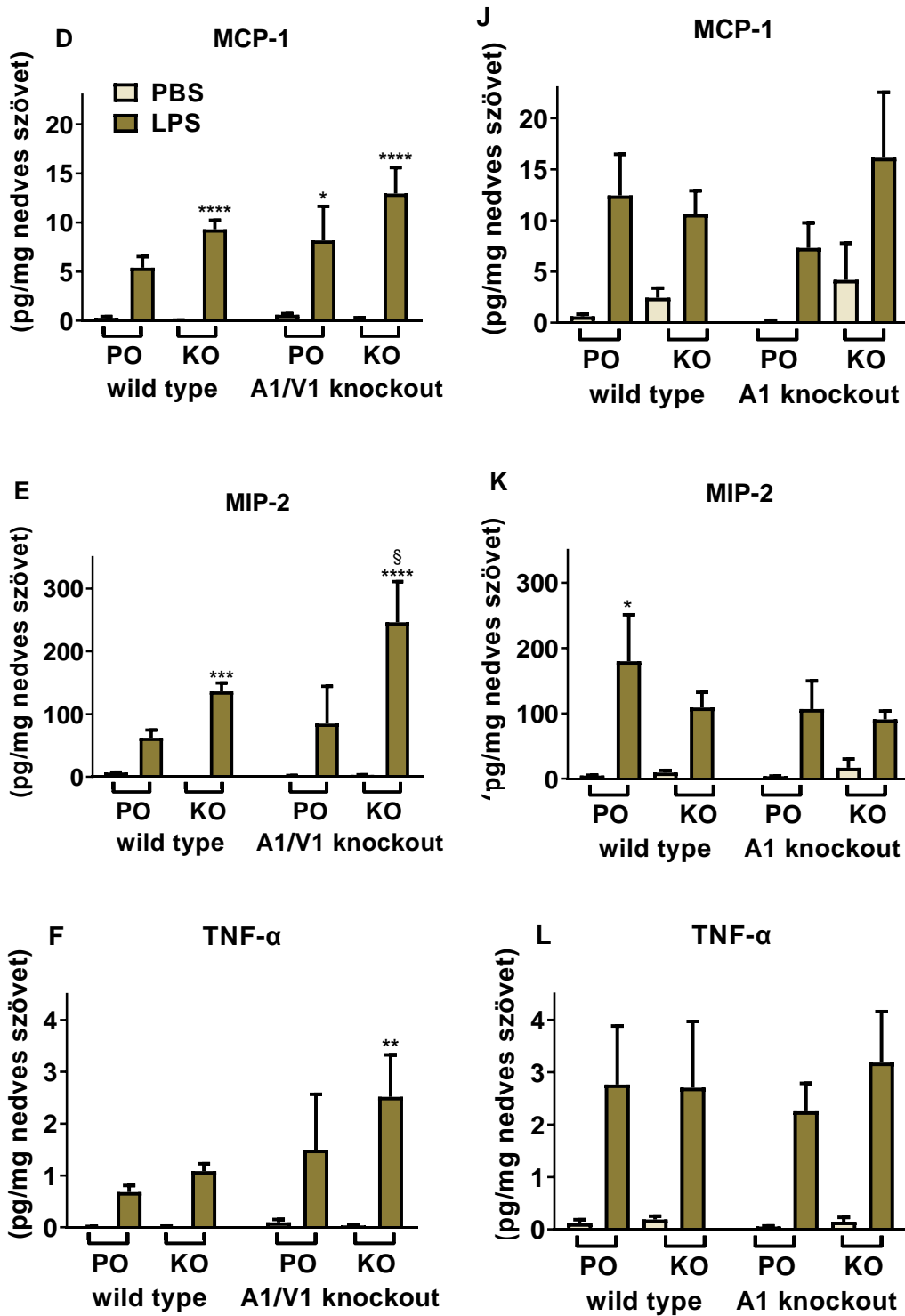
Az LPS az A1/V1 és az A1 csoportok esetében is mind a vad típusú, mind a génhányos egerekben masszívan megnövelte a mieloperoxidáz aktivitását (19. ábra).

A kakukkfű (KO) az A1/V1 vad típusú egerek esetében megakadályozta az LPS által kiváltott emelkedést, ám az A1/V1 génhányos egerekben már nem fejtette ki ezt a jótékony hatást (19. ábra A). 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 (19. ábra B).

#### 4.3.4. A kakukkfűolaj hatása knockout egerek citokinexpressziójára

A következő ábrán a kakukkfűolaj hatása látható az egyes citokinek szintjére a különböző egértörzsek esetében, bal oldalt a TRP A1/V1 dupla knockout, jobb oldalt a szimpla TRPA1 knockout eredmények szerepelnek.





**20. ábra:** Tüdőhomogenizátumok citokinszintjei. A kakukkfűolaj (KO) hatása a citokinszintekre a paraffinolajos (PO) negatív kontrollhoz viszonyítva PBS (kontroll – világos kitöltés) vagy LPS (gyulladt – sötét kitöltés) kezelés után (A-I) TRPA1/V1<sup>+/+</sup> (wild type, vad típus) és TRPA1/V1<sup>-/-</sup> (knockout, génkiütött), illetve (J-R) TRPA1<sup>+/+</sup> (wild type, vad típus) és TRPA1<sup>-/-</sup> (knockout, génkiütött) egerek esetén. (A-I: n = 3–8/csoport, J-R: n=4-5/csoport), \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 vs. az adott olajat inhalált PBS-sel kezelt csoport; §p<0,05 vs. azonosan kezelt vad típusú csoport)

Az LPS-kezelés mind a hat vizsgált gyulladási citokin, illetve kemokin szintjét megemelte mindegyik paraffinolajos kontrollcsoportban, de ez a változás csak az interleukin-1béta (IL-1 $\beta$ ), a keratinocita kemoattraktáns (KC) és a makrofág gyulladási fehérje-2 (MIP-2) esetében volt szignifikáns (20. ábra A-L).

Az A1/V1 csoportok esetében a kakukkfűolaj (KO) 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 génhányos csoportban. Ezek közül az interleukin-6 (IL-6) és a makrofág gyulladási fehérje-2 (MIP-2) szintjét is szignifikánsan jobban súlyosbította az A1/V1 génhányos egerekben, mint az A1/V1 vad típusban (20. ábra A-F). Az A1 csoportokban a kakukkfű (KO) inhalálása nem okozott jelentős különbségeket (20. ábra G-L).

## 5. Diszkusszió

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az LPS által kiváltott akut tüdőgyulladás egérmodellje megfelelő modell az illóolaj-inhaláció hatásának vizsgálatára akut légúti gyulladásban.

Az intratracheális LPS beadása az akut légúti gyulladásban várható jellegzetes gyulladásos választ váltotta ki, amely hiperreaktivitással, makrofág- és neutrofil granulocita felhalmozódással, valamint MPO-aktivitás és a vizsgált gyulladásos citokinek emelkedésével jár.

Kísérletünkben a **citronellaolaj** (főkomponens: citronellál és geraniol) inhalációja rontotta a légúti hiperreaktivitást és az MPO-aktivitást.

A citrál főkomponensű citronellaolajról leírták, hogy gátolja a neutrofilek adhézióját és aktivációját [Abe et al. 2003], az ödémaképződést és a szövettani változásokat, valamint a gyulladáskeltő citokinek szintjét [Shen et al. 2015]. A citrál gyulladásgátló tulajdonságát az is alátámasztja, hogy képes csökkenteni az LPS által kiváltott COX-2 expressziót humán makrofág U937 sejtvonalban [Katsukawa et al. 2010]. Míg egy másik makrofágokkal végzett *in vitro* vizsgálatban az alacsony dózisu (5-10 µg/cella) citronellaolajos előkezelés jelentősen megnövelte az IL-6 és IL-1β termelődést; és csak nagy dózisban (100 µg/cella) volt képes gátolni az LPS hatását. Az olaj fő összetevője, a citrál azonban hatékonyan csökkentette a citokinszintet mind előkezelésként, mind az LPS beadása után. Ezek az eredmények a citronellaolaj citrál komponensének gyulladáscsökkentő hatását hangsúlyozzák [Bachiega és Sforcin 2011]. A mi vizsgálatunkban használt citronellaolaj alacsony citrál szintet (nerál + geraniál, 3,2%) tartalmazott, ami magyarázatot adhat arra, hogy eredményeink nem támasztják alá a korábbi pozitív megállapításokat. Azonban a vizsgálatunkban használt, fő komponensként citronellált és geraniolt tartalmazó *Cymbopogon nardus* olajáról sokkal kevesebb adat áll rendelkezésre.

A *Citrus maxima* (syn. *Citrus grandis*, citronellált és citronellolt tartalmaz) illóolajáról és a citronellálról is leírták, hogy gátolják az 5-LOX aktivitását [Tsai et al. 2017]. A geraniol – a tanulmányunkban használt citronellaolajunk másik fő komponense – csökkentette az MPO-aktivitást és a gyulladáskeltő citokinek termelődését *in vivo* egy LPS által kiváltott akut tüdőgyulladás modellben [Jiang et al. 2017]. Ezen kívül a geraniol drámaian csökkentette a TLR-4 expresszióját, és megakadályozta az NF-κB aktivációt [Jiang et al. 2017]. Ezeknek ellentmondó eredményeink feltehetően az illóolaj eltérő összetételéből adódhatnak. A

vizsgálatunkban használt *Cymbopogon nardus* illóolaj egy minor komponenséről, a limonénről azonban leírták, hogy hörgőszűkületet vált ki egerekben [Larsen et al. 2000], ami megmagyarázhatja az illóolaj által kiváltott fokozott túlérzékenységet.

A **fenyőolaj** (főkomponens:  $\alpha$ -pinén) inhalációja csökkentette a gyulladásos légúti hiperreaktivitást az LPS által kiváltott akut tüdőgyulladás modelljében, és a szemikvantitatív szövettani pontszámok alapján az LPS által kiváltott jellegzetes gyulladásos elváltozásokat is (nem szignifikánsra) csökkentette. Ezekkel a funkcionális és morfológiai eredményekkel ellentétben jelentősen súlyosbította az MPO-aktivitást és több pro-inflammatorikus citokin szintjét megnövelte.

Az erdei fenyő illóolajának *in vivo* gyulladásra gyakorolt hatását bemutató vizsgálatot az irodalmi áttekintés során (a kézirat elkészültéig) egyáltalán nem találtunk. Az eredményeink viszont részben összhangban vannak azokkal a korábbi eredményekkel, amelyeket más fenyőfajok illóolajával, illetve illóolaj-összetevőivel végeztek.

Az  $\alpha$ -pinén *in vitro* a MAPK és az NF- $\kappa$ B útvonalak szuppressziójával gátolta az IL-6, TNF- $\alpha$  és NO termelést egérből izolált LPS-aktivált peritoneális makrofágokban [Kim et al. 2015]. A *Pinus heldreichii* (10,57%  $\alpha$ -pinén), a *P. peuce* (36,79%  $\alpha$ -pinén) és a *P. mugo* (21,34%  $\alpha$ -pinén) illóolajok csökkentették az IL-6 felszabadulást LPS-aktivált RAW 264.7 egér monocita/makrofág sejtvonalban, de csak magasabb koncentrációban (0,01-0,05%), az alacsonyabb koncentráció (0,002-0,005%) nem módosította vagy növelte a szekréciót [Basholli-Salih et al. 2017], ami koncentráció-függő hatásra utal. A *P. pinaster* illóolaj (62%  $\alpha$ -pinén) eközben nem gátolta az LPS által kiváltott TNF- $\alpha$  és CCL2 termelést humán monocita sejtvonalon (THP-1, leukémiás betegből származó) [Miguel et al. 2020].

Az orálisan beadott tengeri fenyő (*Pinus pinaster* Ait) illóolaj (13,5%  $\alpha$ -pinén tartalommal) nem mutatott gyulladáscsökkentő hatást a karragénnel kiváltott talp-ödémás egérmodellben [Tümen et al. 2018]. A *per os* Myrtol – illóolajok standardizált keveréke, amely elsősorban cineolt, limonént és (*Pinus* fajokból származó)  $\alpha$ -pinént tartalmaz – gátolta az LPS által kiváltott neutrofil akkumulációt, a TNF- $\alpha$  és IL-6 koncentrációt egérmodellben, viszont – eredményeinknek megfelelően – növelte az MPO-aktivitást 6 órával az LPS beadása után [Yu et al. 2016]. Ezek a részben ellentmondó adatok feltehetően az illóolaj eltérő kémiai összetételéből és/vagy a vizsgálat eltérő időtartamából fakadhatnak. Egy klinikai vizsgálatban a Myrtol javította a mukociliáris clearance-t krónikus obstruktív tüdőbetegségben szenvedő betegeknél, de nem befolyásolta a légzésfunkciókat [Dorow et al. 1987]. A fenyőolaj fő összetevője, az  $\alpha$ -pinén csökkentette a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, az ICAM és a MIP-2 szintjét,

valamint az eozinofil és hízósejt-infiltrációt az ornyálkahártyában ovalbuminnal kiváltott allergiás rhinitis egérmódeljében [Nam et al. 2014]. Ezzel szemben egy humán vizsgálatban az  $\alpha$ -pinén rövid távú expozíciója nem váltott ki akut tüdőfunkciós változásokat, de magasabb koncentrációban enyhe irritációt okozott [Falk et al. 1990]. A magas (35%)  $\delta$ -3-karén tartalmú terpentin belélegzése pedig egészséges férfiak esetében a torokban és a légutakban kellemetlen érzést okozott, és a légúti ellenállást is megnövelte [Filipsson 1996].

A **fahéjölaj** (főkomponens: fahéjaldehid) inhalációja kísérleteinkben csökkentette a gyulladással járó légúti hiperreaktivitást és a hisztopatológiai változásokat az endotoxin által kiváltott tüdőgyulladás egérmódeljében.

A fahéjaldehid gyulladáscsökkentő hatásáról bőszeges szakirodalom áll rendelkezésre, bár ezekben nem vizsgálták a funkcionális paramétereiket. Leírták, hogy a fahéjaldehid gátolja az LPS által stimulált makrofágok IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  termelését *in vitro* [Kim et al. 2010], valamint *in vivo* szisztémás gyulladással járó reakció esetén [Mendes et al. 2016]. A Rimulus fahéj vagy Guizhi illóölaj (75,26% fahéjaldehid) szintén csökkentette az IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-5, IF- $\gamma$ , MCP-1, CSF-1 és MIP-1 $\beta$  szintjét a szérumban, a neutrofil sejtszámot és a nitrogén-oxidtermelés a tüdőben intraperitoneális LPS-beadás után [Rao et al. 2018].

A **kakukkfűölaj** (főkomponens: timol és *p*-cimén) inhalációja csökkentette a gyulladással járó légúti hiperreaktivitást, a hisztopatológiai változásokat és az MPO aktivitását, viszont növelte egyes pro-inflammatorikus citokinek szintjét a tüdőhomogenizátumban.

Ezeket az eredményeket többnyire alátámasztják azok a korábbi adatok, amelyek a különböző összetételű kakukkfű illóölajok gyulladáscsökkentő potenciálját mutatják be légúti gyulladással járó modellekben. A kakukkfű- és borostyánkivonatok szignifikánsan csökkentették a leukocita infiltrációt egy hasonló, LPS által kiváltott akut tüdőgyulladás patkánymódeljében [Seibel et al. 2015]. Egy ovalbumin-indukált krónikus asztma egérmódeljében a timol jelentős gyulladáscsökkentő hatást fejtett ki a gyulladással járó sejtek akkumulációjának gátlásával és a pro-inflammatorikus citokinek koncentrációjának csökkentésével, mindezeket túl javította a légúti hiperreaktivitást és a tüdő hisztopatológiai elváltozásait is [Zhou et al. 2014]. Karragénnel kiváltott mellhártyagyulladás patkánymódeljében a kakukkfűölaj (főkomponens: karvakrol) és a karvakrol csökkentette a leukocita migrációt, míg a timol önmagában nem okozott ilyen változást. Viszont mind a timolnak, mind a karvakrolnak is erős ödémaellenes hatása volt [Fachini-Queiroz et al. 2012]. A kakukkfűölaj a mi eredményeink szerint is szignifikánsan csökkentette az ödémaképződést, de nem csökkentette a gyulladással járó sejtek infiltrációját. Ez a



vizsgált kakukkfűolaj eltérő összetételével magyarázható, az általunk alkalmazott mindössze 3,2% karvakrolt tartalmazott. A *p*-cimén gyulladáscsökkentő hatására is vannak már adatok, amelyek szerint szignifikánsan enyhítette az LPS által kiváltott akut tüdőgyulladást, ödémát, a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  és IL-6 termelődését [Chen et al. 2014, Zhong et al. 2013].

A **szegfűszegolaj** (főkomponens: eugenol) inhalációja csökkentette a gyulladással kapcsolatos légúti hiperreaktivitást, és kisebb mértékben a szövettani elváltozásokat is. A funkcionális és morfológiai eredményekkel ellentétben viszont jelentősen súlyosbította az MPO-aktivitást és számos gyulladással kapcsolatos citokin szintjét is megemelte.

A szegfűszeg esetében fontos megjegyezni, hogy a legtöbb rendelkezésre álló adat a fő összetevőre, az eugenolra, vagy a vizes kivonatra összpontosít, nem a növény illóolajára.

A szegfűszegolaj nem befolyásolta a fagocitózist, szignifikánsan növelte az iNOS expresszióját, viszont csökkentette az IL-6 termelést LPS-aktivált RAW 264.7 sejtekben [Lang et al. 2019].

A szegfűszeg i.p. vizes kivonata szignifikánsan csökkentette a MMP-2 és -9 aktivitását, a neutrofilek számát és a fehérje beszűrődést a bronchoalveoláris mosófolyadékba (BALF) egy LPS-indukált gyulladással egérmódelben. Ezen kívül forbol-mirisztát-acetáttal stimulált humán neutrofilekben koncentráció-függően csökkentette az MPO aktivitását [Chniguir et al. 2019]. Ugyancsak a vizes kivonat csökkentette a karragénnel kiváltott talpödémát és a máj szukcinát-dehidrogenáz és xantin-oxidáz aktivitását patkányban [Ahmad et al. 2012].

Az eugenol az egyik legalaposabban tanulmányozott illóolaj-komponens a gyulladással kapcsolatban [Chainy et al. 2000, Kim et al. 2003, Raghavenra et al. 2006, Chniguir et al. 2019]. Az eugenol nem befolyásolta az LPS által kiváltott légzési változásokat, de csökkentette a tüdőödémát, a gyulladással kapcsolatos sejteket, valamint az IL-6 és IL-1 $\beta$  szintjét a bronchoalveoláris mosófolyadékban, valamint a gyulladással kapcsolatos sejtek infiltrációját [Bittencourt-Mernak et al. 2021]. Egy másik tanulmányban az i.p. eugenol csökkentette az LPS által kiváltott tüdőgyulladást, javította a tüdőfunkciót, valamint jelentősen csökkentette a neutrofilek és makrofágok számát és a TNF- $\alpha$  szintet [Magalhães et al. 2010]. Egy másik kísérletben az eugenol gátolta a tüdőmechanikában bekövetkező változásokat, a tüdőgyulladást és a dízelpártecskék által kiváltott alveoláris összeesést [Zin et al. 2012]. Az utóbbi két tanulmány adataival ellentétben az eugenol okozhat különböző káros reakciókat emberben, beleértve a bőrirritációt, gyulladást, fekélyképződést, bőrgyulladást vagy lassú gyógyulást [Fuentes et al. 2021].

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.

A shirazi kakukkfűolaj, a timol és a karvakrol szignifikánsan csökkentette az iNOS és NADH-oxidáz aktivitását LPS-stimulált egér makrofágokban, míg a *p*-cimén nem mutatott antioxidáns aktivitást [Kavoosi et al. 2012].

A *Zataria multiflora* p.o. vizes-alkoholos kivonata csökkentette az IL-8 szérumszintjét, az összfehérvérsejt- és az eozinofilszámot a vérben, ill. a legmagasabb vizsgált koncentrációban (1,6 mg/ml) csökkentette a neutrofil- és növelte a limfocitaszámot [Boskabady és Gholami Mhtaj 2014], (a vizes-alkoholos kivonat és a karvakrol önmagában) javította a trachea válaszkészségét és az emfizémát [Gholami Mahtaj et al. 2015] COPD tengeri malac modelljében. Valamint javította a trachea válaszkészségét, összfehérje, foszfolipáz-A2 és hisztamin szérumszintjét ovalbumin által kiváltott asztma tengerimalac modelljében [Boskabady et al. 2014]. A vizes-alkoholos kivonatot randomizált kettősvak klinikai vizsgálatban is tanulmányozták. Az egyikben a mustárgáznak kitett betegekben csökkentette az IL-2, IL-6, IL-8, illetve megemelte az IL-10 és IFN- $\gamma$  szérumszintjét és a maximáli kilégzési áramlást [Khazdair et al. 2020], egy másikban pedig asztmás betegek tüdőfunkcióját javította, és emelte az IL-10 és IFN- $\gamma$  szérumszintet [Alavinezhad et al. 2022].

A növény illóolajával kapcsolatban nem áll túl sok adat a rendelkezésre, viszont a növény vizes kivonatának, valamint az illóolaj összetevőinek, a timol és a karvakrol – lásd: kakukkfűolaj –, biztató irodalmi adatai alapján feltételezett gyulladáscsökkentő hatást nem sikerült megerősítenünk.

Mint az az irodalmi adatok, illetve a saját eredményeink (főként a kakukkfű- és a shirazi kakukkfű esetében) is mutatják, a **komplex** illóolajok alkalmazása esetén az összetétel jelentősen befolyásolhatja a biológiai hatást, és az illóolajok valamennyi komponense kölcsönhatásba léphet egymással, ezért koránt sem elég a főkomponensek hatásának ismerete.

Például az 1,8-cineolnak (minor komponens a fahéj- és kaukkfűolajban) van bizonyos hörgőtágító hatása tengerimalacokban és patkányokban [Bastos et al. 2009, Nascimento et al. 2009], gyulladáscsökkentő hatását és mukolitikus hatását ráadásul humán vizsgálatban is igazolták [Juergens et al. 2003]. A linalool (minor komponens a fahéj-, a kakukkfű- és a shirazi kakukkfűolajban) pedig az általunk alkalmazott hasonló modellben csökkentette a kórszöveti változásokat és a citokintermelést [Huo et al. 2012]. Számos illóolaj-komponens

viszont épp a kedvezőtlen hatásairól ismert. Minden összetevő, és az összetevők közti kölcsönhatások, együtt hatások mind hozzájárulhatnak a hatáshoz.

Figyelembe véve számos illóolaj-komponens, mint például a timol, a fahéjaldehyd, a karvakrol és a linalool jól dokumentált agonista hatásait a **TRP** ioncsatorna család tagjaira [Ohkawara et al. 2010, Premkumar 2014, Mihara és Shibamoto 2015], ezeknek a vegyületeknek a hatásait potenciálisan a TRPV1 vagy TRPA1 ioncsatornák közvetíthetik. A TRPA1 és a TRPV1 expresszálódik és gyakran együtt lokalizálódik a tüdő sűrűn beidegző kapszaicin-érzékeny peptiderg afferenseken [Nassenstein et al. 2008], valamint a hörgő simaizomsejtjein, a bronchális és alveoláris epitélsejteken, a limfocitákon és a makrofágokon is [McGarvey et al. 2014, Nassini et al. 2012, Bertin et al. 2017, Kun et al. 2017]. Gyulladásban betöltött szerepükre számos bizonyíték utal, például az LPS által kiváltott fájdalom és akut vaszkuláris reakciók, a neurogén gyulladás elsősorban a nociceptív szenzoros neuronok TRPA1 aktivációján keresztül alakul ki [Meseguer et al. 2014, Hajna et al. 2020]. A tüdő szenzoros neuronjain együtt expresszálódó TRPA1 és TRPV1 gyakran egymással kölcsönhatásban befolyásolják a légúti gyulladásos folyamatokat [Lee et al. 2015], és mindkettő esetében vannak adatok arról, hogy – többek között gyulladásgátló és simaizom-relaxáns neuropeptidek felszabadítása révén – védelmet nyújtanak az LPS által kiváltott akut tüdőkárosodás modelljében az LPS hatásaival szemben, a légúti hiperszenzitivitás kivédésében [Elekes et al. 2007, Helyes et al. 2007, Nassini et al. 2012, Hajna et al. 2020, Stinson et al. 2023]. Ezért tartottuk célszerűnek a rendelkezésre álló TRPA1/V1, illetve biztató eredmény esetén TRPA1 génkiütött egerekben megismételni a kísérletet a legígéretesebb illóolajjal a hatásmechanizmus felderítése végett.

Mind a légzésfunkciós, mind az MPO-aktivitás esetében azt találtuk, hogy a **kakukkfű** védő hatása megszűnik, ha az LPS-es gyulladást TRPA1/V1 knockout egerekben váltjuk ki, és a legtöbb mért pro-inflammatorikus citokin esetében is magasabb szinteket mértünk a kettős knockout csoportban. A TRPA1 knockout egerek esetében nem figyeltünk meg egyértelmű tendenciát a kakukkfű hatásában. Mindez arra utal, hogy a kakukkfű illóolajának hatása – legalábbis részben – TRP-csatornákon keresztül valósulhat meg, feltételezhetően a TRPV1 közvetítésével. Ennek bizonyítására további vizsgálatok szükségesek.

Ahogy sok más illóolaj-komponensről, úgy a kakukkfűolaj több összetevőjéről is igazolták már, hogy aktiválnak bizonyos TRP-csatornákat, például a timol, 1,8-cineol, karvakrol TRPA1-et, a karvakrol a TRPV4-et, a timol, az 1,8-cineol (eukaliptol) és a linalool a TRP melasztatin-8-at (TRPM8) [Xu et al. 2006, Lee et al. 2008, Ortar et al. 2012, Mihara és

Shibamoto 2015, Caceres et al. 2017, Nazırođlu 2020, Wang et al. 2020, Becker et al. 2021], viszont a miénkhez hasonló *in vivo* vizsgálatot egyelőre nem találtunk a szakirodalomban.

## 6. 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. Illékonyságuknak 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 gázkromatográfiás módszerrel határoztuk meg, a gyulladást befolyásoló hatásukat LPS-sel kiváltott akut légúti gyulladás egérmódeljében vizsgáltuk.

A 3. és 4. táblázatban összefoglalt eredményeink alapján az LPS által kiváltott akut tüdőgyulladás egérmódelj megfelelő modell az illóolaj-inhaláció hatásának vizsgálatára. A ceyloni citromellal és geraniol túlsúlyú illóolajának használata számos gyulladási paraméterre kedvezőtlen hatásúnak bizonyult, így kerülendő lehet a légúti gyulladással járó megbetegedések esetén. A shirazi kakukkfűolaj bár nem gyakorolt szignifikáns hatást a gyulladásra, valamivel rontott a légúti válaszkészségen, így gyulladási légúti megbetegedésekben óvatossággal használandó. A fenyőolajra és a szegfűszegolajra jellemző, hogy javítják a légutak működését, viszont fokoznak bizonyos gyulladási 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 **fahéj** (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:  $\alpha$ -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.

**3. 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	kakukkfű- olaj	szegfűszeg- olaj	shirazi kakukkfű- olaj
<b>Légúti paraméterek</b>	Penh	↑ ↑	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓	↑ ↑
<b>Hisztopatológia</b>	perivaszkuláris ödéma	–	–	↓	↓	↓	nincs adat
	perivaszkuláris/ peribronchiális gyulladás	–	–	–	–	↓	nincs adat
	makrofágok	–	↓	–	–	–	nincs adat
	összpontszám	–	↓	–	↓	↓	nincs adat
<b>MPO aktivitás</b>		↑ ↑	–	↑ ↑	↓ ↓	↑ ↑	–
<b>Citokinszintek</b>	IL-1β	–	nincs adat	↑ ↑	–	–	–
	MIP-2	–	nincs adat	–	↑ ↑	–	–

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

Paraméter		kakukkfűolaj			
		TRPA1/V1 <sup>+/+</sup> (vadtípus)	TRPA1/V1 <sup>-/-</sup> (knockout)	TRPA1 <sup>+/+</sup> (vadtípus)	TRPA1 <sup>-/-</sup> (knockout)
<b>Légúti paraméterek</b>	Penh	↓↓	↑↑	nincs adat	nincs adat
<b>Hisztopatológia</b>	perivaszkuláris ödéma	↓	–	↓	–
	perivaszkuláris/ peribronchiális gyulladás	–	–	↓	–
	makrofágok	–	–	↓	–
	összpontszám	↓	–	↓	–
<b>MPO aktivitás</b>		↓	↑	–	↑↑
<b>Citokinszintek</b>	IL-6	↑	↑↑	–	–
	MIP-2	↑	↑↑	–	–



## 7. Irodalomjegyzék

1. Abe, S. *et al.* Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils. *Mediators Inflamm* **12**, 323–328 (2003).
2. Ács, K., Bencsik, T., Böszörményi, A., Kocsis, B. & Horváth, G. Essential Oils and Their Vapors as Potential Antibacterial Agents against Respiratory Tract Pathogens. *Nat Prod Commun* **11**, 1709–1712 (2016).
3. Aghasafari, P., George, U. & Pidaparti, R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflamm Res* **68**, 59–74 (2019).
4. Ahmad, T., Shinkafi, T. S., Routray, I., Mahmood, A. & Ali, S. Aqueous Extract of Dried Flower Buds of *Syzygium aromaticum* Inhibits Inflammation and Oxidative Stress. *J Basic Clin Pharm* **3**, 323–327 (2012).
5. Alavinezhad, A., Ghorani, V., Rajabi, O. & Boskabady, M. H. *Zataria multiflora* extract influenced asthmatic patients by improving respiratory symptoms, pulmonary function tests and lung inflammation. *J Ethnopharmacol* **285**, 114888 (2022).
6. Álvarez-Martínez, F. J., Barrajon-Catalán, E., Herranz-López, M. & Micol, V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine* **90**, 153626 (2021).
7. Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S. & Cabras, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J Agric Food Chem* **54**, 4364–4370 (2006).
8. Aruoma, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* **75**, 199–212 (1998).
9. Bachiega, T. F. & Sforcin, J. M. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. *J Ethnopharmacol* **137**, 909–913 (2011).
10. Balázs, V. L. *et al.* Anti-Haemophilus Activity of Selected Essential Oils Detected by TLC-Direct Bioautography and Biofilm Inhibition. *Molecules* **24**, 3301 (2019).
11. Banner, K. H., Igney, F. & Poll, C. TRP channels: emerging targets for respiratory disease. *Pharmacol Ther* **130**, 371–384 (2011).
12. Baráthné Simkó, H. Óshonos Thymus (kakukkfű) taxonok kémiai diverzitásának, valamint termesztési lehetőségének értékelése. in 15–16 (Doktori értekezés, 2014).
13. Barboza, J. N., da Silva Maia Bezerra Filho, C., Silva, R. O., Medeiros, J. V. R. & de Sousa, D. P. An Overview on the Anti-inflammatory Potential and Antioxidant Profile of

- Eugenol. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, 3957262 (2018).
14. Basavegowda, N. & Baek, K.-H. Synergistic Antioxidant and Antibacterial Advantages of Essential Oils for Food Packaging Applications. *Biomolecules* **11**, 1267 (2021).
  15. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Second Edition*. (CRC Press, 2015). doi:10.1201/b19393.
  16. Basholli-Salihi, M. *et al.* Phytochemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxic effects of essential oils from three Pinus spp. *Pharm Biol* **55**, 1553–1560 (2017).
  17. Bastos, V. P. D. *et al.* Inhibitory effect of 1,8-cineole on guinea-pig airway challenged with ovalbumin involves a preferential action on electromechanical coupling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**, 1120–1126 (2009).
  18. Batiha, G. E.-S. *et al.* Syzygium aromaticum L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. *Biomolecules* **10**, 202 (2020).
  19. Becker, V. *et al.* Linalool inhibits the angiogenic activity of endothelial cells by downregulating intracellular ATP levels and activating TRPM8. *Angiogenesis* **24**, 613–630 (2021).
  20. Ben-Arye, E. *et al.* Treatment of upper respiratory tract infections in primary care: a randomized study using aromatic herbs. *Evid Based Complement Alternat Med* **2011**, 690346 (2011).
  21. Bertin, S. *et al.* The TRPA1 ion channel is expressed in CD4+ T cells and restrains T-cell-mediated colitis through inhibition of TRPV1. *Gut* **66**, 1584–1596 (2017).
  22. Bigliani, M. C. *et al.* Chemical compositions and properties of Schinus areira L. essential oil on airway inflammation and cardiovascular system of mice and rabbits. *Food Chem Toxicol* **50**, 2282–2288 (2012).
  23. Bindu, S., Mazumder, S. & Bandyopadhyay, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol* **180**, 114147 (2020).
  24. Bittencourt-Mernak, M. I. *et al.* Effects of Eugenol and Dehydrodieugenol B from Nectandra leucantha against Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Experimental Acute Lung Inflammation. *J Nat Prod* **84**, 2282–2294 (2021).
  25. Boskabady, M. H. & Gholami Mhtaj, L. Effect of the Zataria multiflora on systemic inflammation of experimental animals model of COPD. *Biomed Res Int* **2014**, 802189 (2014).
  26. Boskabady, M. H., Jalali, S., Farkhondeh, T. & Byrami, G. The extract of Zataria

- multiflora affect tracheal responsiveness, serum levels of NO, nitrite, PLA2, TP and histamine in sensitized Guinea pigs. *J Ethnopharmacol* **156**, 301–308 (2014).
27. Bremness, L. *Fűszer- és gyógynövények*. (Panemex, 2007).
  28. Buchanan, W. W. & Bellamy, N. NSAIDs: Clinical efficacy and toxicity. *Inflammopharmacology* **1**, 115–133 (1991).
  29. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol* **94**, 223–253 (2004).
  30. Burton, M. J. *et al.* Antimicrobial mouthwashes (gargling) and nasal sprays administered to patients with suspected or confirmed COVID-19 infection to improve patient outcomes and to protect healthcare workers treating them. *Cochrane Database Syst Rev* **9**, CD013627 (2020).
  31. Caceres, A. I. *et al.* Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 8 channels mediate the anti-inflammatory effects of eucalyptol. *Br J Pharmacol* **174**, 867–879 (2017).
  32. Caimmi, D. *et al.* Effect of the Use of Intranasal Spray of Essential Oils in Patients with Perennial Allergic Rhinitis: A Prospective Study. *Int Arch Allergy Immunol* **182**, 182–189 (2021).
  33. Chainy, G. B., Manna, S. K., Chaturvedi, M. M. & Aggarwal, B. B. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-kappaB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. *Oncogene* **19**, 2943–2950 (2000).
  34. 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).
  35. Chen, L., Zhao, L., Zhang, C. & Lan, Z. Protective effect of p-cymene on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Inflammation* **37**, 358–364 (2014).
  36. Chen, X.-Y. *et al.*  $\beta$ -Patchoulene from patchouli oil protects against LPS-induced acute lung injury via suppressing NF- $\kappa$ B and activating Nrf2 pathways. *Int Immunopharmacol* **50**, 270–278 (2017).
  37. Chniguir, A. *et al.* Eugenol prevents fMLF-induced superoxide anion production in human neutrophils by inhibiting ERK1/2 signaling pathway and p47phox phosphorylation. *Sci Rep* **9**, 18540 (2019).
  38. Chniguir, A., Zioud, F., Marzaioli, V., El-Benna, J. & Bachoual, R. *Syzygium aromaticum* aqueous extract inhibits human neutrophils myeloperoxidase and protects mice from LPS-induced lung inflammation. *Pharm Biol* **57**, 56–64 (2019).
  39. Csupor, D. Megfázásos betegségek fitoterápiája. *Családorvosi Fórum* 40–45 (2003).

40. Csupor, D. & Szendrei, K. *Gyógynövénytar – Útmutató a korszerű gyógynövény-alkalmazáshoz.* (Medicina Könyvkiadó, 2012).
41. D’Almeida, A. P. L. *et al.*  $\alpha$ -bisabolol-loaded lipid-core nanocapsules reduce lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice. *Int J Nanomedicine* **12**, 4479–4491 (2017).
42. Dawood, M. A. O. *et al.* Antiparasitic and Antibacterial Functionality of Essential Oils: An Alternative Approach for Sustainable Aquaculture. *Pathogens* **10**, 185 (2021).
43. De Toledo, L. G. *et al.* Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. *Int J Mol Sci* **17**, 1252 (2016).
44. Dorow, P., Weiss, T., Felix, R. & Schmutzler, H. [Effect of a secretolytic and a combination of pinene, limonene and cineole on mucociliary clearance in patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Arzneimittelforschung* **37**, 1378–1381 (1987).
45. Elekes, K. *et al.* Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory neuropeptides in endotoxin-induced airway inflammation and consequent bronchial hyperreactivity in the mouse. *Regul Pept* **141**, 44–54 (2007).
46. Elian, C. *et al.* Biobased polymer resources and essential oils: a green combination for antibacterial applications. *J Mater Chem B* **10**, 9081–9124 (2022).
47. EMA 1. Medicines. *European Medicines Agency*  
[https://www.ema.europa.eu/en/medicines/field\\_ema\\_web\\_categories%253Aname\\_field/Herbal](https://www.ema.europa.eu/en/medicines/field_ema_web_categories%253Aname_field/Herbal). (2023.02.02.)
48. EMA 2. *Cinnamomi corticis aetheroleum*. *European Medicines Agency*  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/cinnamomi-corticis-aetheroleum> (2021). (2023.02.02.)
49. EMA 3. *Thymi aetheroleum*. *European Medicines Agency*  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/thymi-aetheroleum> (2021). (2023.02.02.)
50. EMA 4. *Caryophylli floris aetheroleum*. *European Medicines Agency*  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/caryophylli-floris-aetheroleum> (2021). (2023.02.02.)
51. ESCOP. *E/S/C/O/P Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products.* (European Scientific Cooperative on Phytotherapy, 2003).
52. Fachini-Queiroz, F. C. *et al.* Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evid Based Complement Alternat Med* **2012**, 657026 (2012).

53. 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).
54. Falk, A. A., Hagberg, M. T., Löf, A. E., Wigaeus-Hjelm, E. M. & Wang, Z. P. Uptake, distribution and elimination of alpha-pinene in man after exposure by inhalation. *Scand J Work Environ Health* **16**, 372–378 (1990).
55. Filipsson, A. F. Short term inhalation exposure to turpentine: toxicokinetics and acute effects in men. *Occup Environ Med* **53**, 100–105 (1996).
56. Fo.No.VIII. *Formulae Normales VIII. – Szabványos vényminták VIII. kiadás.* (OGYÉI, 2020).
57. Fuentes, C., Fuentes, A., Barat, J. M. & Ruiz, M. J. Relevant essential oil components: a minireview on increasing applications and potential toxicity. *Toxicol Mech Methods* **31**, 559–565 (2021).
58. Gandhi, G. R. *et al.* Essential oils and its bioactive compounds modulating cytokines: A systematic review on anti-asthmatic and immunomodulatory properties. *Phytomedicine* **73**, 152854 (2020).
59. Gholami Mahtaj, L., Boskabady, M. H. & Mohamadian Roshan, N. The Effect of Zataria multiflora and its Constituent, Carvacrol, on Tracheal Responsiveness and Lung Pathology in Guinea Pig Model of COPD. *Phytother Res* **29**, 730–736 (2015).
60. Ghorani, V., Beigoli, S., Khazdair, M. R. & Boskabady, M. H. The effect of Zataria multiflora on respiratory allergic and immunologic disorders, experimental and clinical evidence: A comprehensive review. *Phytother Res* **36**, 1135–1155 (2022).
61. Ghorani, V., Boskabady, M. H., Khazdair, M. R. & Kianmeher, M. Experimental animal models for COPD: a methodological review. *Tob Induc Dis* **15**, 25 (2017).
62. Gillissen, A., Wittig, T., Ehmen, M., Krezdorn, H. G. & de Mey, C. A multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial on the efficacy and tolerability of GeloMyrtol® forte in acute bronchitis. *Drug Res (Stuttg)* **63**, 19–27 (2013).
63. Grommes, J. & Soehnlein, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med* **17**, 293–307 (2011).
64. Gruenwald, J., Graubaum, H.-J. & Busch, R. Evaluation of the non-inferiority of a fixed combination of thyme fluid- and primrose root extract in comparison to a fixed combination of thyme fluid extract and primrose root tincture in patients with acute bronchitis. A single-blind, randomized, bi-centric clinical trial. *Arzneimittelforschung* **56**, 574–581 (2006).

65. Hajna, Z. *et al.* Complex Regulatory Role of the TRPA1 Receptor in Acute and Chronic Airway Inflammation Mouse Models. *Int J Mol Sci* **21**, 4109 (2020).
66. Hammoudi Halat, D., Krayem, M., Khaled, S. & Younes, S. A Focused Insight into Thyme: Biological, Chemical, and Therapeutic Properties of an Indigenous Mediterranean Herb. *Nutrients* **14**, 2104 (2022).
67. Han, X. & Parker, T. L. Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) essential oil demonstrated anti-inflammatory effect in pre-inflamed human dermal fibroblasts. *Biochim Open* **4**, 107–111 (2017).
68. Hänsel, R. & Sticher, O. *Pharmakognosie – Phytopharmazie*. (Springer Medizin Verlag, 2007).
69. Haro-González, J. N., Castillo-Herrera, G. A., Martínez-Velázquez, M. & Espinosa-Andrews, H. Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. *Molecules* **26**, 6387 (2021).
70. Hasani, A., Pavia, D., Toms, N., Dilworth, P. & Agnew, J. E. Effect of aromatics on lung mucociliary clearance in patients with chronic airways obstruction. *J Altern Complement Med* **9**, 243–249 (2003).
71. Hawkins, J., Hires, C., Keenan, L. & Dunne, E. Aromatherapy blend of thyme, orange, clove bud, and frankincense boosts energy levels in post-COVID-19 female patients: A randomized, double-blinded, placebo controlled clinical trial. *Complement Ther Med* **67**, 102823 (2022).
72. Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A. R., Faleiro, M. L. & Miguel, M. G. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry* **116**, 714–721 (2009).
73. 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).
74. Helyes, Z. *et al.* Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**, L1173–L1181 (2007).
75. 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).
76. Her, L., Kanjanasilp, J., Chaiyakunapruk, N. & Sawangjit, R. Efficacy and Safety of

- Eucalyptus for Relieving Cough: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Integr Complement Med* **28**, 218–226 (2022).
77. Ho, Y.-C. *et al.* Zerumbone reduced the inflammatory response of acute lung injury in endotoxin-treated mice via Akt-NF $\kappa$ B pathway. *Chem Biol Interact* **271**, 9–14 (2017).
  78. Hoai, N. T., Duc, H. V., Thao, D. T., Orav, A. & Raal, A. Selectivity of *Pinus sylvestris* extract and essential oil to estrogen-insensitive breast cancer cells *Pinus sylvestris* against cancer cells. *Pharmacogn Mag* **11**, S290-295 (2015).
  79. Hong, J.-W. *et al.* Anti-inflammatory activity of cinnamon water extract in vivo and in vitro LPS-induced models. *BMC Complement Altern Med* **12**, 237 (2012).
  80. Horváth, G. & Ács, K. Essential oils in the treatment of respiratory tract diseases highlighting their role in bacterial infections and their anti-inflammatory action: a review. *Flavour Fragr J* **30**, 331–341 (2015).
  81. Huo, M. *et al.* Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. *J Surg Res* **180**, e47-54 (2013).
  82. Jagadeesh Babu, A., Rupa Sundari, A., Indumathi, J., Srujan, R. V. & Sravanthi, M. Study on the antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration of essential oils of spices. *Veterinary World* 311–316 (2011).
  83. Jäger, W. *et al.* Pharmacokinetic studies of the fragrance compound 1,8-cineol in humans during inhalation. *Chem Senses* **21**, 477–480 (1996).
  84. Jiang, K. *et al.* Geraniol alleviates LPS-induced acute lung injury in mice via inhibiting inflammation and apoptosis. *Oncotarget* **8**, 71038–71053 (2017).
  85. Jin, A. J. & Chin, C. J. Complementary and Alternative Medicine in Chronic Rhinosinusitis: A Systematic Review and Qualitative Analysis. *Am J Rhinol Allergy* **33**, 194–202 (2019).
  86. 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).
  87. Juergens, U. R. *et al.* Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respir Med* **97**, 250–256 (2003).
  88. Kamatou, G. P. P. & Viljoen, A. M. A Review of the Application and Pharmacological Properties of  $\alpha$ -Bisabolol and  $\alpha$ -Bisabolol-Rich Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **87**, 1–7 (2010).
  89. Kandimalla, R. *et al.* Chemical Composition and Anti-Candidiasis Mediated Wound Healing Property of *Cymbopogon nardus* Essential Oil on Chronic Diabetic Wounds.

- Front Pharmacol* **7**, 198 (2016).
90. Kang, P., Kim, K. Y., Lee, H. S., Min, S. S. & Seol, G. H. Anti-inflammatory effects of anethole in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Life Sci* **93**, 955–961 (2013).
  91. Katsukawa, M. *et al.* Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  and suppresses COX-2 expression. *Biochim Biophys Acta* **1801**, 1214–1220 (2010).
  92. Kavooosi, G., Teixeira da Silva, J. A. & Saharkhiz, M. J. Inhibitory effects of Zataria multiflora essential oil and its main components on nitric oxide and hydrogen peroxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Pharm Pharmacol* **64**, 1491–1500 (2012).
  93. Kehrl, W., Sonnemann, U. & Dethlefsen, U. Therapy for acute nonpurulent rhinosinusitis with cineole: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Laryngoscope* **114**, 738–742 (2004).
  94. Kemmerich, B. Evaluation of efficacy and tolerability of a fixed combination of dry extracts of thyme herb and primrose root in adults suffering from acute bronchitis with productive cough. A prospective, double-blind, placebo-controlled multicentre clinical trial. *Arzneimittelforschung* **57**, 607–615 (2007).
  95. Kenia, P., Houghton, T. & Beardsmore, C. Does inhaling menthol affect nasal patency or cough? *Pediatr Pulmonol* **43**, 532–537 (2008).
  96. Khazdair, M. R., Ghorani, V., Alavinezhad, A. & Boskabady, M. H. Pharmacological effects of Zataria multiflora Boiss L. and its constituents focus on their anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects. *Fundam Clin Pharmacol* **32**, 26–50 (2018).
  97. Khazdair, M. R., Ghorani, V., Alavinezhad, A. & Boskabady, M. H. Effect of Zataria multiflora on serum cytokine levels and pulmonary function tests in sulfur mustard-induced lung disorders: A randomized double-blind clinical trial. *J Ethnopharmacol* **248**, 112325 (2020).
  98. Kianmeher, M., Ghorani, V. & Boskabady, M. H. Animal Model of Asthma, Various Methods and Measured Parameters: A Methodological Review. *Iran J Allergy Asthma Immunol* **15**, 445–465 (2016).
  99. Kim, B. H., Lee, Y. G., Lee, J., Lee, J. Y. & Cho, J. Y. Regulatory effect of cinnamaldehyde on monocyte/macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm* **2010**, 529359 (2010).
  100. Kim, D.-S. *et al.* Alpha-Pinene Exhibits Anti-Inflammatory Activity Through the Suppression of MAPKs and the NF- $\kappa$ B Pathway in Mouse Peritoneal Macrophages. *Am*



- J Chin Med* **43**, 731–742 (2015).
101. Kim, S. S. *et al.* Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Life Sci* **73**, 337–348 (2003).
  102. Koivisto, A.-P., Belvisi, M. G., Gaudet, R. & Szallasi, A. Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. *Nat Rev Drug Discov* **21**, 41–59 (2022).
  103. Kpoviessi, S. *et al.* Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *J Ethnopharmacol* **151**, 652–659 (2014).
  104. Ku, C.-M. & Lin, J.-Y. Farnesol, a sesquiterpene alcohol in essential oils, ameliorates serum allergic antibody titres and lipid profiles in ovalbumin-challenged mice. *Allergol Immunopathol (Madr)* **44**, 149–159 (2016).
  105. Kun, J. *et al.* TRPA1 receptor is upregulated in human oral lichen planus. *Oral Dis* **23**, 189–198 (2017).
  106. Lang, M. *et al.* Evaluation of immunomodulatory activities of essential oils by high content analysis. *J Biotechnol* **303**, 65–71 (2019).
  107. Larsen, S. T. *et al.* Effects of R-(+)- and S-(-)-limonene on the respiratory tract in mice. *Hum Exp Toxicol* **19**, 457–466 (2000).
  108. Lee, I.-T. & Yang, C.-M. Inflammatory signalings involved in airway and pulmonary diseases. *Mediators Inflamm* **2013**, 791231 (2013).
  109. Lee, L.-Y., Hsu, C.-C., Lin, Y.-J., Lin, R.-L. & Khosravi, M. Interaction between TRPA1 and TRPV1: Synergy on pulmonary sensory nerves. *Pulm Pharmacol Ther* **35**, 87–93 (2015).
  110. Lee, S. P. *et al.* Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. *Br J Pharmacol* **153**, 1739–1749 (2008).
  111. Li, J. *et al.* Pharmacologic effects approach of essential oils and their components on respiratory diseases. *J Ethnopharmacol* **304**, 115962 (2022).
  112. Liao, J.-C. *et al.* Anti-Inflammatory Activities of *Cinnamomum cassia* Constituents In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med* **2012**, 429320 (2012).
  113. Lorenzo, J. M. *et al.* Understanding the potential benefits of thyme and its derived products for food industry and consumer health: From extraction of value-added compounds to the evaluation of bioaccessibility, bioavailability, anti-inflammatory, and antimicrobial activities. *Crit Rev Food Sci Nutr* **59**, 2879–2895 (2019).
  114. Ludwig, S., Stier, H. & Weykam, S. Evaluation of Blood Alcohol Concentrations after

- Oral Administration of a Fixed Combination of Thyme Herb and Primrose Root Fluid Extract to Children with Acute Bronchitis. *Drug Res (Stuttg)* **66**, 69–73 (2016).
115. Lumb, A. B. & Thomas, C. R. *Nunn's Applied Respiratory Physiology eBook*. (Elsevier Health Sciences, 2020).
  116. Magalhães, C. B. *et al.* The anti-inflammatory and anti-oxidative actions of eugenol improve lipopolysaccharide-induced lung injury. *Respir Physiol Neurobiol* **259**, 30–36 (2019).
  117. Magalhães, C. B. *et al.* In vivo anti-inflammatory action of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Appl Physiol (1985)* **108**, 845–851 (2010).
  118. Mahboubi, M. Management of acute cough by *Zataria multiflora* Boiss as an alternative treatment. *J Integr Med* **16**, 20–25 (2018).
  119. Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J. M. & Viano, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J Agric Food Chem* **51**, 7115–7121 (2003).
  120. Matthys, H. *et al.* Efficacy and tolerability of myrtol standardized in acute bronchitis. A multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled parallel group clinical trial vs. cefuroxime and ambroxol. *Arzneimittelforschung* **50**, 700–711 (2000).
  121. McGarvey, L. P. *et al.* Increased expression of bronchial epithelial transient receptor potential vanilloid 1 channels in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* **133**, 704-712.e4 (2014).
  122. Mendes, S. J. F. *et al.* Cinnamaldehyde modulates LPS-induced systemic inflammatory response syndrome through TRPA1-dependent and independent mechanisms. *Int Immunopharmacol* **34**, 60–70 (2016).
  123. Meseguer, V. *et al.* TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nat Commun* **5**, 3125 (2014).
  124. Miguel, M. G., da Silva, C. I., Farah, L., Castro Braga, F. & Figueiredo, A. C. Effect of Essential Oils on the Release of TNF- $\alpha$  and CCL2 by LPS-Stimulated THP-1 Cells. *Plants (Basel)* **10**, 50 (2020).
  125. Mihai, A. D., Chircov, C., Grumezescu, A. M. & Holban, A. M. Magnetite Nanoparticles and Essential Oils Systems for Advanced Antibacterial Therapies. *Int J Mol Sci* **21**, 7355 (2020).
  126. Mihara, S. & Shibamoto, T. The role of flavor and fragrance chemicals in TRPA1 (transient receptor potential cation channel, member A1) activity associated with allergies. *Allergy Asthma Clin Immunol* **11**, 11 (2015).

127. Moldoveanu, B. *et al.* Inflammatory mechanisms in the lung. *J Inflamm Res* **2**, 1–11 (2008).
128. Motiejūnaite, O. & Peciulyte, D. Fungicidal properties of *Pinus sylvestris* L. for improvement of air quality. *Medicina (Kaunas)* **40**, 787–794 (2004).
129. Muhd Haffiz, J. *et al.* Chemical composition and in vitro antitrypanosomal activity of fractions of essential oil from *Cymbopogon nardus* L. *Trop Biomed* **30**, 9–14 (2013).
130. Mutlu-Ingok, A., Devecioglu, D., Dikmetas, D. N., Karbancioglu-Guler, F. & Capanoglu, E. Antibacterial, Antifungal, Antimycotoxigenic, and Antioxidant Activities of Essential Oils: An Updated Review. *Molecules* **25**, 4711 (2020).
131. Nam, S.-Y. *et al.* The therapeutic efficacy of  $\alpha$ -pinene in an experimental mouse model of allergic rhinitis. *Int Immunopharmacol* **23**, 273–282 (2014).
132. Nascimento, N. R. F. *et al.* 1,8-Cineole induces relaxation in rat and guinea-pig airway smooth muscle. *J Pharm Pharmacol* **61**, 361–366 (2009).
133. Nassenstein, C. *et al.* Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs. *J Physiol* **586**, 1595–1604 (2008).
134. Nassini, R. *et al.* Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation. *PLoS One* **7**, e42454 (2012).
135. Nazıroğlu, M. A novel antagonist of TRPM2 and TRPV4 channels: Carvacrol. *Metab Brain Dis* **37**, 711–728 (2022).
136. Nisar, M. F. *et al.* Pharmacological Properties and Health Benefits of Eugenol: A Comprehensive Review. *Oxid Med Cell Longev* **2021**, 2497354 (2021).
137. OGYÉI 1. Az élelmiszerekben (beleértve az étrend-kiegészítőket is) alkalmazásra nem javasolt növények listája. *Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet* [https://ogyei.gov.hu/etrend\\_kiegeszitokben\\_felhasznalasra\\_nem\\_javasolt\\_gyogynovenyek\\_es\\_ertekelesuk](https://ogyei.gov.hu/etrend_kiegeszitokben_felhasznalasra_nem_javasolt_gyogynovenyek_es_ertekelesuk). (2023.02.02.)
138. OGYÉI 2. Magisztrális gyógyszerek készítéséhez felhasználható gyógyszeranyagok listája. *Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet* [https://ogyei.gov.hu/egyeb\\_nyilvantartasok\\_listak](https://ogyei.gov.hu/egyeb_nyilvantartasok_listak). (2023.02.02.)
139. Ohkawara, S., Tanaka-Kagawa, T., Furukawa, Y., Nishimura, T. & Jinno, H. Activation of the human transient receptor potential vanilloid subtype 1 by essential oils. *Biol Pharm Bull* **33**, 1434–1437 (2010).
140. Ortar, G. *et al.* Modulation of thermo-transient receptor potential (thermo-TRP) channels by thymol-based compounds. *Bioorg Med Chem Lett* **22**, 3535–3539 (2012).
141. Patil, S. M., Ramu, R., Shirahatti, P. S., Shivamallu, C. & Amachawadi, R. G. A

- systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of *Thymus vulgaris* Linn. *Heliyon* **7**, e07054 (2021).
142. Ph.Eur.11. *European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 11th Edition*. (EDQM, 2023).
  143. Ph.Hg.VII. *Pharmacopoea Hungarica VII. – VII. Magyar Gyógyszerkönyv*. (Medicina Könyvkiadó, 1993).
  144. Ph.Hg.VIII. *Pharmacopoea Hungarica VIII. – VIII. Magyar Gyógyszerkönyv*. (Medicina Könyvkiadó, 2004).
  145. Premkumar, L. S. Transient receptor potential channels as targets for phytochemicals. *ACS Chem Neurosci* **5**, 1117–1130 (2014).
  146. Raghavenra, H., Diwakr, B. T., Lokesh, B. R. & Naidu, K. A. Eugenol--the active principle from cloves inhibits 5-lipoxygenase activity and leukotriene-C4 in human PMNL cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **74**, 23–27 (2006).
  147. Rao, Z. *et al.* Protective effects of essential oils from *Rimulus cinnamon* on endotoxin poisoning mice. *Biomed Pharmacother* **101**, 304–310 (2018).
  148. Remberg, P., Björk, L., Hedner, T. & Sterner, O. Characteristics, clinical effect profile and tolerability of a nasal spray preparation of *Artemisia abrotanum* L. for allergic rhinitis. *Phytomedicine* **11**, 36–42 (2004).
  149. Rietschel, E. T. *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* **8**, 217–225 (1994).
  150. Rufino, A. T. *et al.* Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)- $\alpha$ -pinene: structural and enantiomeric selectivity. *J Nat Prod* **77**, 264–269 (2014).
  151. Sajed, H., Sahebkar, A. & Iranshahi, M. *Zataria multiflora* Boiss. (Shirazi thyme)--an ancient condiment with modern pharmaceutical uses. *J Ethnopharmacol* **145**, 686–698 (2013).
  152. Salehi, B. *et al.* Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytother Res* **32**, 1688–1706 (2018).
  153. Salehi, B. *et al.* Therapeutic Potential of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules* **9**, 738 (2019).
  154. Schäcke, H., Döcke, W. D. & Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* **96**, 23–43 (2002).
  155. Seibel, J. *et al.* Bronchipret® syrup containing thyme and ivy extracts suppresses bronchoalveolar inflammation and goblet cell hyperplasia in experimental bronchoalveolitis. *Phytomedicine* **22**, 1172–1177 (2015).
  156. Sell, C. S. *The Chemistry of Fragrances: From Perfumer to Consumer*. (Royal Society

- of Chemistry, 2006).
157. Serra, D. S., Gomes, M. D. M., Cavalcante, F. S. Á. & Leal-Cardoso, J. H. Essential oil of *Croton Zehntneri* attenuates lung injury in the OVA-induced asthma model. *J Asthma* **56**, 1–10 (2019).
  158. Sharifi-Rad, J. *et al.* Cinnamomum Species: Bridging Phytochemistry Knowledge, Pharmacological Properties and Toxicological Safety for Health Benefits. *Front Pharmacol* **12**, 600139 (2021).
  159. Shen, Y., Sun, Z. & Guo, X. Citral inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury by activating PPAR- $\gamma$ . *Eur J Pharmacol* **747**, 45–51 (2015).
  160. Shirole, R. L., Shirole, N. L., Kshatriya, A. A., Kulkarni, R. & Saraf, M. N. Investigation into the mechanism of action of essential oil of *Pistacia integerrima* for its antiasthmatic activity. *J Ethnopharmacol* **153**, 541–551 (2014).
  161. Shkurupii, V. A. *et al.* [Efficiency of the use of peppermint (*Mentha piperita* L) essential oil inhalations in the combined multi-drug therapy for pulmonary tuberculosis]. *Probl Tuberk* 36–39 (2002).
  162. Singh, N. *et al.* Phytochemical and pharmacological review of *Cinnamomum verum* J. Presl-a versatile spice used in food and nutrition. *Food Chem* **338**, 127773 (2021).
  163. Stinson, R. J., Morice, A. H. & Sadofsky, L. R. Modulation of transient receptor potential (TRP) channels by plant derived substances used in over-the-counter cough and cold remedies. *Respir Res* **24**, 45 (2023).
  164. Su, Y.-H. & Lin, J.-Y. Menthone Inhalation Alleviates Local and Systemic Allergic Inflammation in Ovalbumin-Sensitized and Challenged Asthmatic Mice. *Int J Mol Sci* **23**, 4011 (2022).
  165. Süntar, I., Tumen, I., Ustün, O., Keleş, H. & Akkol, E. K. Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of *Pinus* species by in vivo and in vitro experimental models. *J Ethnopharmacol* **139**, 533–540 (2012).
  166. Taleuzzaman, M., Jain, P., Verma, R., Iqbal, Z. & Mirza, M. A. Eugenol as a Potential Drug Candidate: A Review. *Curr Top Med Chem* **21**, 1804–1815 (2021).
  167. Tariq, S. *et al.* A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb Pathog* **134**, 103580 (2019).
  168. Tibenda, J. J., Yi, Q., Wang, X. & Zhao, Q. Review of phytomedicine, phytochemistry, ethnopharmacology, toxicology, and pharmacological activities of *Cymbopogon* genus.

- Front Pharmacol* **13**, 997918 (2022).
169. Tiddens, H., Silverman, M. & Bush, A. The role of inflammation in airway disease: remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, S7–S10 (2000).
  170. Tisserand, T. & Young, R. *Essential Oil Safety – A Guide for Health Care Professionals*. (Churchill Livingstone Elsevier, 2014).
  171. Torres Neto, L., Monteiro, M. L. G., Galvan, D. & Conte-Junior, C. A. An Evaluation of the Potential of Essential Oils against SARS-CoV-2 from In Silico Studies through the Systematic Review Using a Chemometric Approach. *Pharmaceuticals (Basel)* **14**, 1138 (2021).
  172. Tripathi, P. & Dubey, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rooting of fruit and vegetables. *Postharvest biology and technology* (2004).
  173. Tripathi, P. & Aggarwal, A. NF- $\kappa$ B transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current Science* **90**, 519–531 (2006).
  174. Tsai, M.-L. *et al.* Composition and Bioactivity of Essential Oil from Citrus grandis (L.) Osbeck ‘Mato Peiyu’ Leaf. *Molecules* **22**, 2154 (2017).
  175. Tümen, İ., Akkol, E. K., Taştan, H., Süntar, I. & Kurtca, M. Research on the antioxidant, wound healing, and anti-inflammatory activities and the phytochemical composition of maritime pine (Pinus pinaster Ait). *J Ethnopharmacol* **211**, 235–246 (2018).
  176. Ulanowska, M. & Olas, B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol-A Review. *Int J Mol Sci* **22**, 3671 (2021).
  177. Vazifehkah, S. *et al.* Evaluation of a novel natural drop for treatment of chronic rhinosinusitis without nasal polyps: a single blind randomized trial. *Int Forum Allergy Rhinol* **6**, 943–949 (2016).
  178. Verma, S. K., Dev Kumar, B., Chaurasia, A. & Dubey, D. Effectiveness of mouthwash against viruses: 2020 perspective. A systematic review. *Minerva Dent Oral Sci* **70**, 206–213 (2021).
  179. Vigo, E., Cepeda, A., Gualillo, O. & Perez-Fernandez, R. In-vitro anti-inflammatory effect of Eucalyptus globulus and Thymus vulgaris: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. *J Pharm Pharmacol* **56**, 257–263 (2004).
  180. Wan, M. *et al.* Chimonanthus nitens Oliv. essential oil mitigates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Food Chem Toxicol* **156**, 112445 (2021).
  181. Wang, J. *et al.* Traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of the genus Cinnamomum (Lauraceae): A review. *Fitoterapia* **146**, 104675 (2020).

182. Wang, W. *et al.* Thymol activates TRPM8-mediated Ca<sup>2+</sup> influx for its antipruritic effects and alleviates inflammatory response in Imiquimod-induced mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **407**, 115247 (2020).
183. Wang, Z. & Yang, L. Chinese herbal medicine: Fighting SARS-CoV-2 infection on all fronts. *J Ethnopharmacol* **270**, 113869 (2021).
184. Whitcroft, K. L. & Hummel, T. Olfactory Dysfunction in COVID-19: Diagnosis and Management. *JAMA* **323**, 2512–2514 (2020).
185. 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.)
186. Wińska, K. *et al.* Essential Oils as Antimicrobial Agents-Myth or Real Alternative? *Molecules* **24**, 2130 (2019).
187. Worth, H. & Dethlefsen, U. Patients with asthma benefit from concomitant therapy with cineole: a placebo-controlled, double-blind trial. *J Asthma* **49**, 849–853 (2012).
188. Xu, H., Delling, M., Jun, J. C. & Clapham, D. E. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci* **9**, 628–635 (2006).
189. Yu, P.-J. *et al.* Standardized myrtol attenuates lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice. *Pharm Biol* **54**, 3211–3216 (2016).
190. 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).
191. Zhang, S. *et al.* Fennel main constituent, trans-anethole treatment against LPS-induced acute lung injury by regulation of Th17/Treg function. *Mol Med Rep* **18**, 1369–1376 (2018).
192. Zhao, K. *et al.* Protective effect of Amomum Roxb. essential oils in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice and its metabolomics. *J Ethnopharmacol* **290**, 115119 (2022).
193. Zhao, Q., Zhu, L., Wang, S., Gao, Y. & Jin, F. Molecular mechanism of the anti-inflammatory effects of plant essential oils: A systematic review. *J Ethnopharmacol* **301**, 115829 (2023).
194. Zholos, A. V. TRP Channels in Respiratory Pathophysiology: the Role of Oxidative, Chemical Irritant and Temperature Stimuli. *Curr Neuropharmacol* **13**, 279–291 (2015).
195. Zhong, W. *et al.* p-Cymene modulates in vitro and in vivo cytokine production by inhibiting MAPK and NF-κB activation. *Inflammation* **36**, 529–537 (2013).

196. Zhou, E. *et al.* Thymol attenuates allergic airway inflammation in ovalbumin (OVA)-induced mouse asthma. *Fitoterapia* **96**, 131–137 (2014).
197. Zin, W. A. *et al.* Eugenol attenuates pulmonary damage induced by diesel exhaust particles. *J Appl Physiol (1985)* **112**, 911–917 (2012).
198. Zuo, X. *et al.* A Systematic Review of the Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Properties of 16 Essential Oils of Herbs. *Evid Based Complement Alternat Med* **2020**, 8878927 (2020).



## **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 Önböli Gyulánának, Szentes Nikolettnek, Draskóczi 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 segítségével, 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!

## Publikációs lista

### 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 Draskóczi, 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**

## 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 Szente, 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)

## Konferencia előadások listája

### Szóbeli

**Csikós Eszter**, Ashraf Amir Reza: Fahéj és citronella hatásainak vizsgálata endotoxinnal kiváltott akut légúti gyulladás egérmódeljében. Házi TDK Konferencia PTE ÁOK. 2016. április 14-16. Pécs, Magyarország (különdíjas előadás)

**Csikós Eszter**, Ashraf Amir Reza: Fahéj és citronella hatásainak vizsgálata endotoxinnal kiváltott akut légúti gyulladás egérmódeljében. A Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoportja 289. szakülése. 2017. március 22.

**Csikós Eszter**, Ashraf Amir Reza: Fahéj és citronella hatásainak vizsgálata endotoxinnal kiváltott akut légúti gyulladás egérmódeljében. XXXIII. Országos TDK Konferencia. 2017. április 18-21. Pécs, Magyarország. Abstract in: Orvostudományok 2017; 2:432

**Csikós Eszter**, Ashraf Amir Reza, Csekő Kata, Helyes Zsuzsanna, Kemény Ágnes, Böszörményi Andrea, Kereskai László, Kocsis Béla, Horváth Györgyi: Kakukkfű-illóolaj gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata in vivo módelben. Doktoranduszok a klinikai kutatásokban konferencia. 2017. október 28. Pécs, Magyarország

**Csikós Eszter**, Ashraf Amir Reza, Fard Shima, Kemény Ágnes, Kereskai László, Böszörményi Andrea, Helyes Zsuzsanna, Horváth Györgyi, Csekő Kata: The mode of action of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil in an endotoxin-induced acute airway inflammation in vivo model. 16th Congressus Pharmaceuticus Hungaricus (CPH2020). 2020. szeptember 10-12. online Abstract in: Acta Pharmaceutica Hungarica 2020, 90: 87-88 (poszter és flash előadás)

**Csikós Eszter**: Levendulaolaj és linalool hatásának vizsgálata endotoxin-indukálta légúti gyulladás egérmódeljében. Gyógyszerésztudományok Fóruma 2021. április 4. online

**Csikós Eszter**: Levendulaolaj és linalool hatásának vizsgálata endotoxin-indukálta légúti gyulladás egérmódeljében. ÚNKP Konferencia. 2021. május 19. online

**Eszter Csikós**, Kata Csekő, Amir Reza Ashraf, Shima Fard, Ágnes Kemény, László Kereskai, Béla Kocsis, Zsuzsanna Helyes, Györgyi Horváth: The pharmacological effect of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil in an endotoxin-induced acute airway inflammation mouse model. 11th ISCTICO – HUPHAR – IUPHAR – Conference. 2021. október 27-30. Pécs, Magyarország

**Csikós Eszter**, Ashraf Amir Reza, Shima Fard, Csekő Kata, Helyes Zsuzsanna, Kemény Ágnes, Böszörményi Andrea, Kereskai László, Horváth Györgyi: Illóolajok hatásvizsgálata endotoxin-

indukálta akut légúti gyulladás egérmodelljében. Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma 2022. június 17. Budapest, Magyarország

### **Poszter**

**Eszter Csikós**, Amir Reza Ashraf, Kamilla Ács, Andrea Böszörményi, László Kereskai, Ágnes Kemény, Kata Csekő, Zsuzsanna Helyes, Györgyi Horváth: Effect of cinnamon and citronella essential oils in endotoxin-evoked acute airway inflammation mouse model. 47th International Symposium on Essential Oils (ISEO2016). 2016. szeptember 11-14. Nice, Franciaország

Amir Reza Ashraf, **Eszter Csikós**, Kamilla Ács, Andrea Böszörményi, László Kereskai, Ágnes Kemény, Kata Csekő, Zsuzsanna Helyes, Györgyi Horváth: Thyme essential oil inhalation decreases endotoxin-induced acute airway inflammation and hyperreactivity in a mouse model. 47th International Symposium on Essential Oils (ISEO2016). 2016. szeptember 11-14. Nice, Franciaország

**Csikós Eszter**, Ashraf Amir Reza, Shima Mohammedi Fard, Csekő Kata, Kemény Ágnes, Böszörményi Andrea, Kereskai László, Kocsis Béla, Helyes Zsuzsanna, Horváth Györgyi: Illóolajok hatásainak vizsgálata akut légúti gyulladás modelljében. Gyógyszer Innováció 2018 Konferencia. 2018. április 9-11. Velence, Magyarország

**Eszter Csikós**, Kata Csekő, Amir Reza Ashraf, Ágnes Kemény, László Kereskai, Béla Kocsia, Andrea Böszörményi, Zsuzsanna Helyes, Györgyi Horváth: Effects of scots pine essential oil in an endotoxin-induced acute airway inflammation mouse model. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia. 2018. május 17-19. Pécs, Magyarország

**Eszter Csikós**, Kata Csekő, Amir Reza Ashraf, Ágnes Kemény, László Kereskai, Béla Kocsia, Andrea Böszörményi, Zsuzsanna Helyes, Györgyi Horváth: The effect of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oil in an endotoxin-induced acute airway inflammation mouse model. 49th International Symposium on Essential Oils (ISEO2018). 2018. szeptember 13-16. Niš, Szerbia

Kata Csekő, **Eszter Csikós**, Amir Reza Ashraf, Shima Fard, Lilla Draskóczi, Ágnes Kemény, László Kereskai, Andrea Böszörményi, Györgyi Horváth, Zsuzsanna Helyes: Thyme essential oil inhalation decreases endotoxin-induced acute airway inflammation in a mouse model via TRPA1/V1 ion channels. 22nd International Symposium on Regulatory Peptides. 2018. szeptember 22-25. Acapulco, Mexikó

**Eszter Csikós, Shima Fard, Ágnes Kemény, László Kereskai, Zsuzsanna Helyes, Andrea Böszörményi, Györgyi Horváth, Kata Csekó:** The effect of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil in endotoxin-induced acute airway inflammation model of knock-out mice. 50th International Symposium on Essential Oils (ISEO2019). 2019. szeptember 9-12. Bécs, Ausztria

**Eszter Csikós, Amir Reza Ashraf, Shima Fard, Ágnes Kemény, László Kereskai, Zsuzsanna Helyes, Györgyi Horváth, Kata Csekó:** The mechanism of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil in an endotoxin-induced acute airway inflammation. 6th World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human and Animal Welfare (WOCMAP VI). 2019. november 13-17. Famagusta, Észak-Ciprus

**Csikós Eszter, Ashraf Amir Reza, Fard Shima, Kemény Ágnes, Kereskai László, Böszörményi Andrea, Helyes Zsuzsanna, Horváth Györgyi, Csekó Kata:** The mode of action of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil in an endotoxin-induced acute airway inflammation in vivo model. 16th Congressus Pharmaceuticus Hungaricus (CPH2020). 2020. szeptember 10-12. online Abstract in: Acta Pharmaceutica Hungarica 2020, 90: 87-88 (poszter és flash előadás)

**Eszter Csikós, Viktória L. Balázs, Andrea Böszörményi, Béla Kocsis, Erika Kerekes, Dorina Osbáth, Ágnes Kemény, Györgyi Horváth:** *Helichrysum italicum* oil degraded bacterial biofilm but aggravated inflammatory parameters. ISEO 52st International Symposium on Essential Oils (ISEO2022). 2022. november 12-14. Wrocław, Lengyelország

Article

# 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

Eszter Csikós<sup>1,†</sup>, Kata Csekő<sup>2,3,†</sup>, Amir Reza Ashraf<sup>1</sup>, Ágnes Kemény<sup>2,3,4</sup>, László Kereskai<sup>5</sup>, Béla Kocsis<sup>6</sup>, Andrea Böszörményi<sup>7</sup>, Zsuzsanna Helyes<sup>2,3,8</sup> and Györgyi Horváth<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; csikos.eszter@gytk.pte.hu (E.C.); amirreza@gmail.com (A.R.A.)

<sup>2</sup> Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; csekoe.kata@gmail.com (K.C.); agnes.kemeny@aok.pte.hu (Á.K.); zsuzsanna.helyes@aok.pte.hu (Z.H.)

<sup>3</sup> Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary

<sup>4</sup> Department of Medical Biology and Central Electron Microscope Laboratory, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary

<sup>5</sup> Department of Pathology, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; kereskai.laszlo@pte.hu

<sup>6</sup> Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; kocsis.bela@pte.hu

<sup>7</sup> Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Semmelweis University, H-1085 Budapest, Hungary; boszormenyi.andrea@pharma.semmelweis-univ.hu

<sup>8</sup> PharmInVivo Ltd., H-7629 Pécs, Hungary

\* Correspondence: horvath.gyorgyi@gytk.pte.hu; Tel.: +36-72-503650-28823

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editors: Giuseppe Caruso, Nicolò Musso and Claudia Giuseppina Fresta

Received: 20 July 2020; Accepted: 30 July 2020; Published: 4 August 2020



**Abstract:** Thyme (TO), cinnamon (CO), and Ceylon type lemongrass (LO) essential oils (EOs) are commonly used for inhalation. However, their effects and mechanisms on inflammatory processes are not well-documented, and the number of in vivo data that would be important to determine their potential benefits or risks is low. Therefore, we analyzed the chemical composition and investigated the activity of TO, CO, and LO on airway functions and inflammatory parameters in an acute pneumonitis mouse model. The components of commercially available EOs were measured by gas chromatography–mass spectrometry. Airway inflammation was induced by intratracheal endotoxin administration in mice. EOs were inhaled during the experiments. Airway function and hyperresponsiveness were determined by unrestrained whole-body plethysmography on conscious animals. Myeloperoxidase (MPO) activity was measured by spectrophotometry from lung tissue homogenates, from which semiquantitative histopathological scores were assessed. The main components of TO, CO, and LO were thymol, cinnamaldehyde, and citronellal, respectively. We provide here the first evidence that TO and CO reduce inflammatory airway hyperresponsiveness and certain cellular inflammatory parameters, so they can potentially be considered as adjuvant treatments in respiratory inflammatory conditions. In contrast, Ceylon type LO inhalation might have an irritant effect (e.g., increased airway hyperresponsiveness and MPO activity) on the inflamed airways, and therefore should be avoided.

**Keywords:** thyme; lemongrass; cinnamon; essential oil; endotoxin; airway inflammation; mouse model; airway hyperresponsiveness; myeloperoxidase activity; perivascular edema

## 1. Introduction

Essential oils (EOs) are made up of secondary metabolites by plants. They are liquid mixtures of various compounds (such as terpenoids and phenylpropane derivatives) that evaporate at room temperature. Their most common extraction method is distillation. Due to their characteristic aroma and biological effects, EOs are commonly used for different purposes in the fields of aromatherapy, food preservation, plant pathology and medical microbiology. The application of EOs is increasing among patients as a single or adjuvant treatment for respiratory diseases and inflammations based on traditional use and empirical evidence.

Inflammatory lung diseases affect a large population at every age worldwide, and they also appear on the list of the top 10 causes of death [1]. These diseases are associated with acute or chronic inflammation and deteriorate the patients' quality of life.

The advantages of EOs are that they can easily reach the respiratory tract via inhalation due to their volatility, and because of their complex composition they can exert multiple actions through the modification of lipoxygenase, cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase function as well as the inhibition of the inflammatory mediator production [2,3]. Recent studies have proved the anti-inflammatory effects of eucalyptus and lavender EOs, 1,8-cineole (eucalyptol), and menthol [2,4–6].

Thyme (TO), cinnamon (CO) and lemongrass (LO) EOs are commonly used via inhalation. Their components have been shown to reduce inflammatory cytokine production and some inflammatory parameters [7–15]. However, the results of previous studies are poorly comparable and not conclusive, because the studies used EOs of different sources, purity and compositions, mainly certain isolated components are studied, moreover, the experimental paradigms, investigated parameters and the outcomes greatly differ from each other. Furthermore, there are only few in vivo data and airway function results are even more scarcely available, which would be important to determine their potential clinical benefits and risks, particularly under inflammatory conditions.

TO is extracted from the fresh flowering aerial parts of *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) and other *Thymus* species via steam distillation. *Thymus vulgaris* has several chemotypes containing different main components such as thymol, carvacrol, linalool, and geraniol. The most prevalent use of TO is by inhalation as an expectorant in bronchitis and common cold [16,17].

We used the EO of *Cinnamomum verum* J.S. Presl. (Lauraceae) as CO, isolated by steam distillation from the bark of the shoots with *trans*-cinnamaldehyde, as the main component. In medieval times, CO was used against frontal sinusitis and common cold, but nowadays, it is more commonly used for the treatment of gastrointestinal problems [18].

LO is obtained by steam distillation from the fresh or partially dried aerial parts of *Cymbopogon* species. We used the EO of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (Poaceae, Ceylon type). Characteristic components are citronellal, geraniol, citronellol, limonene, citronellyl acetate, geranyl acetate and neral. The treatment of common cold is among the traditional uses of LO [19,20].

The endotoxin (lipopolysaccharide: LPS)-induced acute airway inflammation mouse model is the most commonly used, well-reproducible mechanism model for the study of EOs in acute respiratory inflammation [10,13,15,21]. LPS is a compound of the Gram-negative bacterial cell wall that causes interstitial pneumonitis and acute respiratory obstruction with a well-defined mechanism by activating Toll-like receptor-4 on macrophages, resulting in the release of several inflammatory mediators and consequent neutrophil activation after intranasal or intratracheal administration [22].

Here, we analyzed the chemical composition of TO, CO and LO, and investigated their effects on airway functions and inflammatory parameters in the endotoxin-induced acute pneumonitis mouse model, which is a characterized pathophysiological mechanism model relevant to several conditions of human lung inflammation.



## 2. Results

### 2.1. Chemical Analysis of EOs

Chemical analysis of EOs was conducted using gas chromatography with a flame-ionization detector (GC-FID) and GC-MS. The main components of TO were thymol (46.3%) and *p*-cymene (22.1%); cinnamaldehyde was the main component (74.0%) in CO; whereas citronellal (36.2%) and geraniol (25.3%) were present in the highest concentrations in LO (Table 1). Other significant identified compounds included 1,8-cineole (9.8%), linalool (5.1%), and carvacrol (3.2%) in TO; cinnamyl acetate (5.3%) and linalool (3.9%) in CO; and citronellol (13.6%), limonene (3.6%) in LO.

**Table 1.** The chemical composition of the investigated essential oils in percentage from 3 parallel measurements (main components in bold).

Compound	tR (min)	Thyme (%)	Cinnamon (%)	Lemongrass (%)
$\alpha$ -Pinene	5.8	0.9	0.9	–
Camphene	6.1	0.9	–	–
$\beta$ -Myrcene	6.3	0.7	–	–
$\beta$ -Pinene	6.7	1.4	0.5	–
$\alpha$ -Terpinene	7.0	2.2	–	–
<i>o</i> -Cymene	7.0	0.3	–	–
<i>p</i> -Cymene	7.4	<b>22.1</b>	1.2	–
Limonene	7.5	–	1.4	3.6
1,8-Cineole	7.9	9.8	2.1	–
$\gamma$ -Terpinene	8.6	0.3	–	–
Linalool	10.2	5.1	3.9	–
Citronellal	10.4	–	–	<b>36.2</b>
Terpinen-4-ol	11.7	0.6	–	–
$\alpha$ -Terpineole	11.8	0.2	1.6	–
Citronellol	11.9	–	–	13.6
Camphore	12.1	0.5	–	–
Neral	12.2	–	–	1.0
Geraniol	12.4	–	–	<b>25.3</b>
Borneol	12.4	1.5	–	–
Geranial	12.8	–	–	2.2
Cinnamaldehyde	12.9	–	<b>74.0</b>	–
Anethol	13.1	–	4.5	–
Thymol	13.2	<b>46.3</b>	–	–
Carvacrol	13.3	3.2	–	–
Citronellyl acetate	14.1	–	–	2.3
Eugenol	14.2	–	2.7	–
Geranyl acetate	14.5	–	–	2.6
$\beta$ -Elemene	14.7	0.4	–	2.9
$\beta$ -Caryophyllene	15.4	2.5	1.7	–
$\alpha$ -Humulene	15.6	0.5	–	–
$\beta$ -Cubebene	15.7	–	–	2.9
Cinnamyl acetate	15.8	–	5.3	–
$\alpha$ -Muurolene	16.6	–	–	1.6
$\beta$ -Cadinene	16.9	–	–	3.2
Elemol	17.4	–	–	2.4
Caryophyllene oxide	18.0	0.5	–	–
Eudesmol	18.3	–	–	2.3
Total		99.5	99.8	99.8

### 2.2. Respiratory Functions

LPS treatment significantly reduced the frequency, minute ventilation and relaxation time and increased tidal volume, time of inspiration and expiration, as well as peak expiratory

flow 24 h after administration, whereas it did not alter peak inspiratory flow (Figure 1A–H, Figures S1 and S2). Penh correlating with airway hyperresponsiveness was remarkably increased already at baseline measurement and was further aggravated upon carbachol inhalation-induced bronchoconstriction in LPS-treated mice. CO and TO inhalation significantly reduced the carbachol-induced hyperresponsiveness in LPS-treated mice compared to paraffin oil (PO) inhalation used as a negative control, whereas LO significantly deteriorated baseline Penh (Figure 1I and Figure S1). Regarding the other basal respiratory parameters, tidal volume was significantly reduced by LO compared to the PO-treated LPS-administered group, but this seemingly ameliorating effect could be the result of the lowest frequency and minute ventilation measured in all groups.

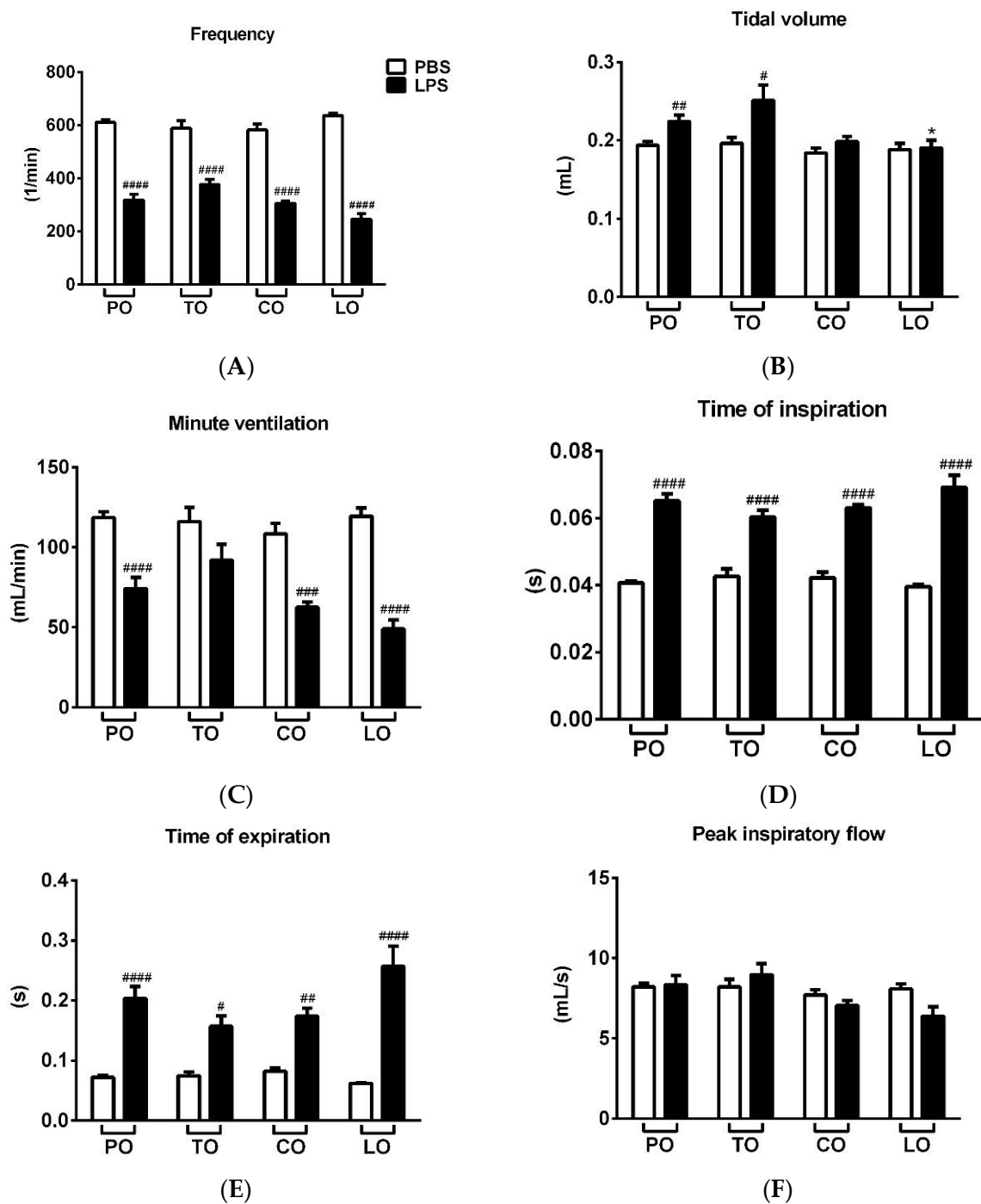
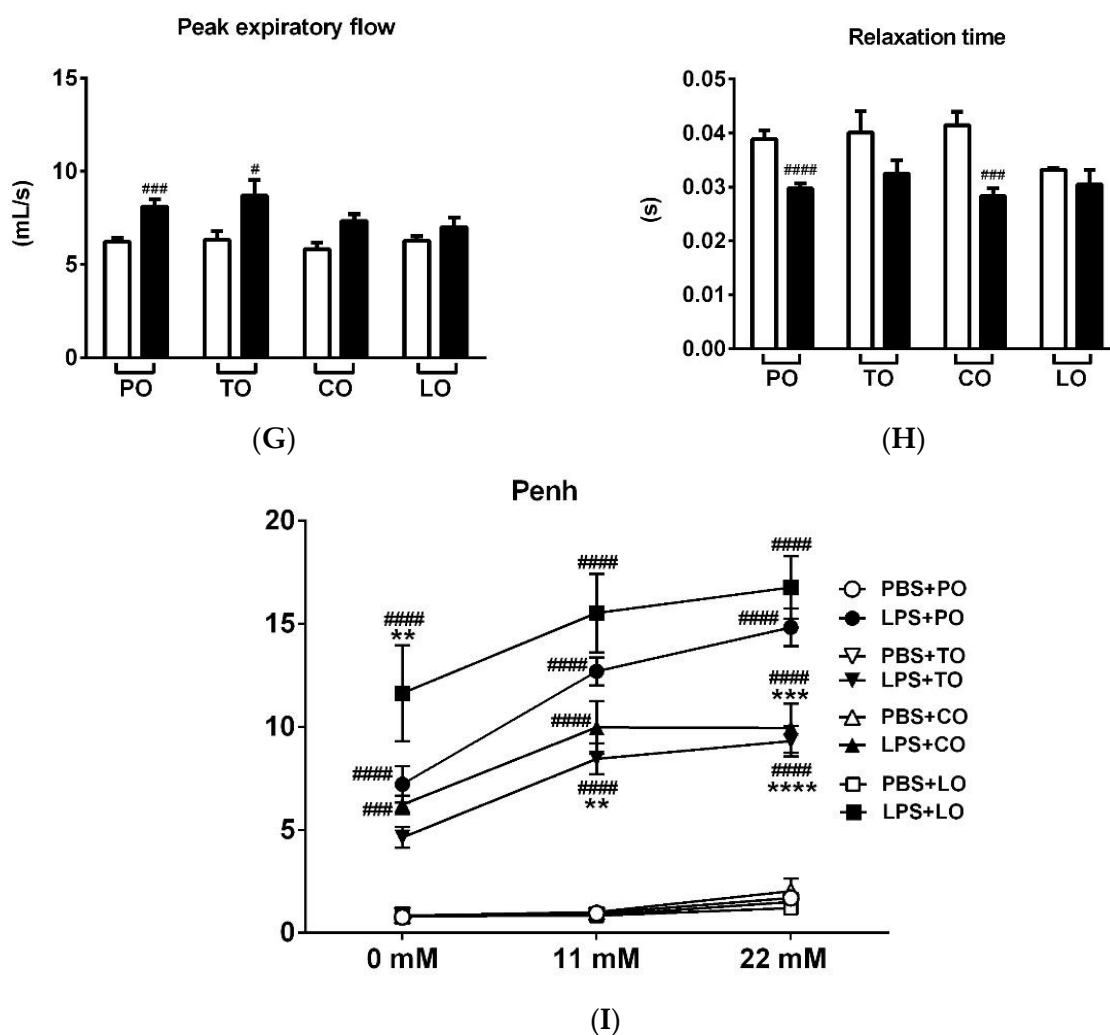


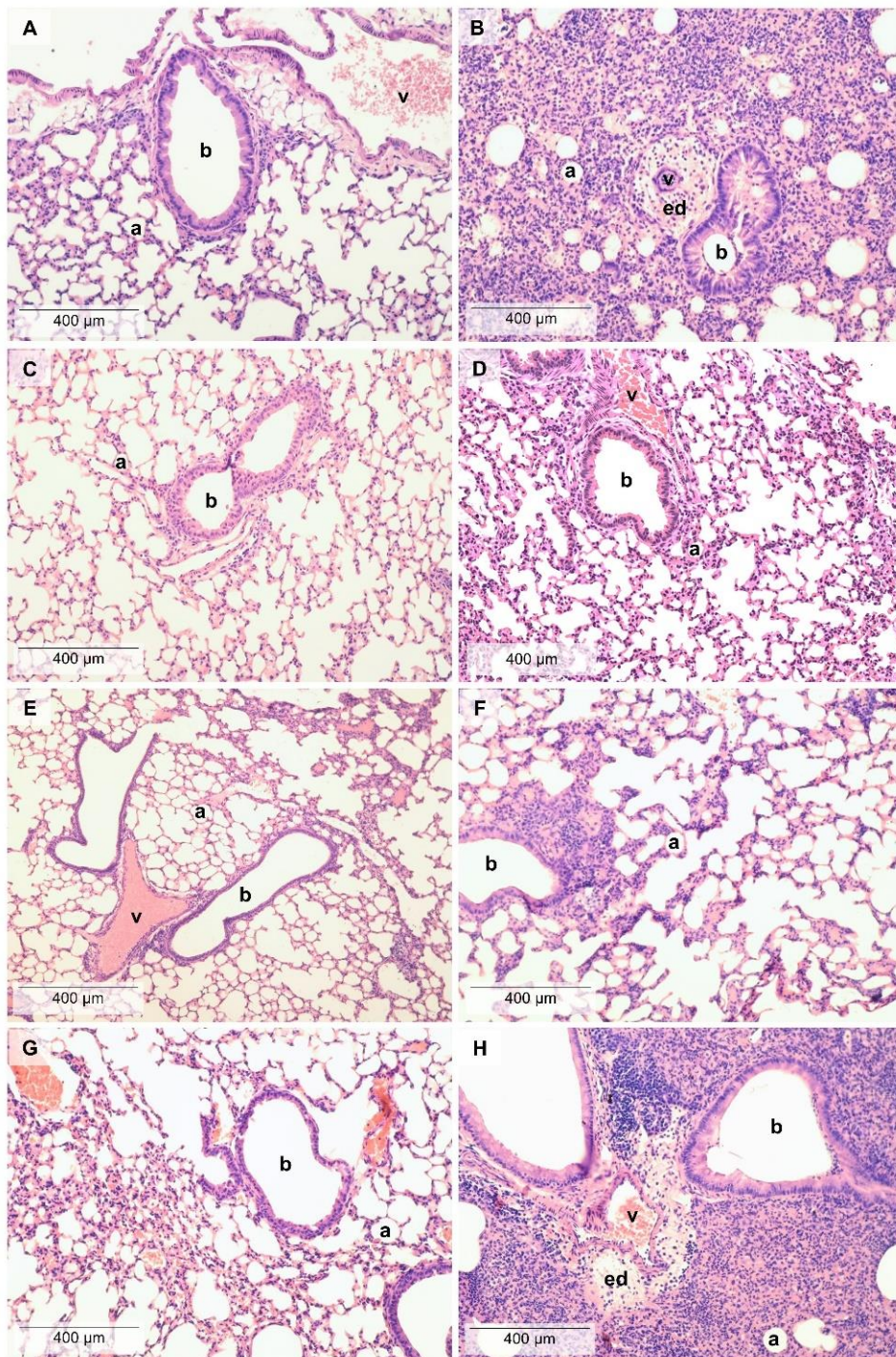
Figure 1. Cont.



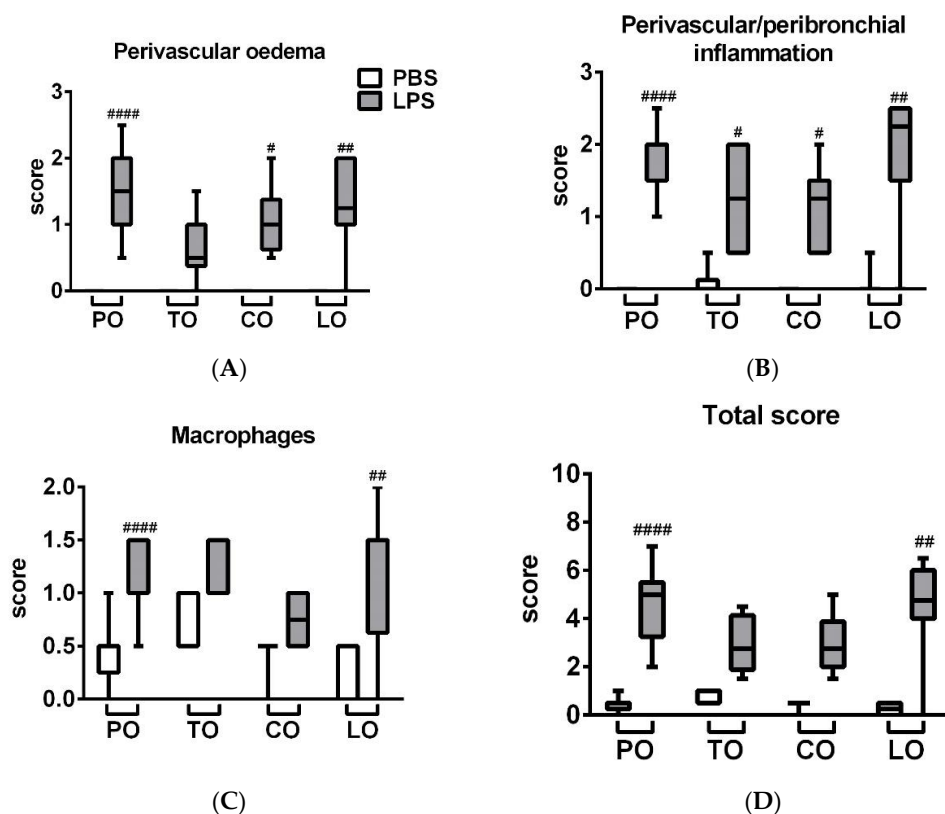
**Figure 1.** Effects of thyme (TO), cinnamon (CO) and lemongrass (LO) essential oils on (A) breathing frequency, (B) tidal volume, (C) minute ventilation, (D) time of inspiration, (E) time of expiration, (F) peak inspiratory flow, (G) peak expiratory flow, (H) relaxation time and (I) Penh compared to the negative control paraffin oil (PO), after lipopolysaccharide (LPS - black columns)/phosphate-buffered saline (PBS - white columns) treatment. ( $n = 8-10/\text{group}$ , #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.005$ , ###  $p < 0.0005$ , ####  $p < 0.0001$  vs. respective PBS-treated group, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. LPS-PO-treated mice).

### 2.3. Lung Histopathological Evaluation

LPS administration induced a massive inflammatory infiltration in the lung composed of neutrophil granulocytes and macrophages associated with a remarkable perivascular and peribronchial edema formation (Figure 2). LPS-induced edema formation was decreased by TO, which was not significantly increased compared to its respective phosphate-buffered saline (PBS)-treated control. Regarding macrophage infiltration and total score, neither TO nor CO were significantly increased compared to their PBS-treated controls. LO did not influence the extent of histopathological alterations (Figure 3), although we found mild goblet cell hyperplasia, similarly to the LPS-treated group, and focal lymphocyte follicles after LO inhalation (data not shown).



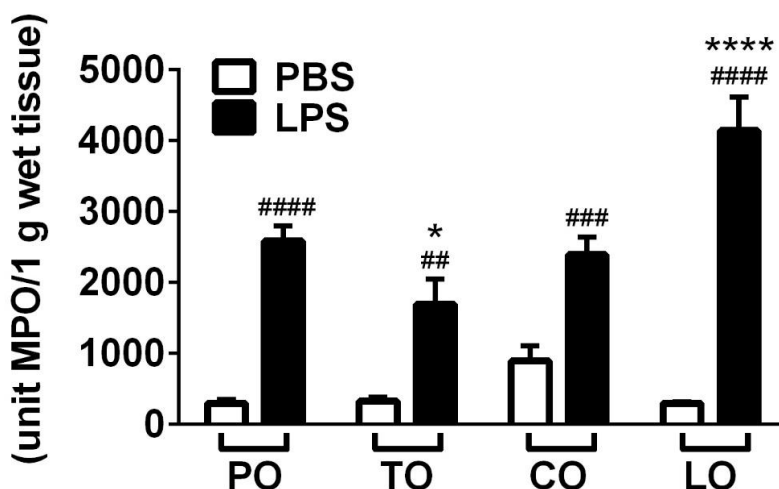
**Figure 2.** Histopathological alterations in the lung. Representative pictures of lung parenchyma after (A) PBS and PO treatment, (B) LPS and PO treatment, (C) PBS and TO treatment, (D) LPS and TO treatment, (E) PBS and CO treatment, (F) LPS and CO treatment, (G) PBS and LO treatment, and (H) LPS and LO treatment. (Hematoxylin–eosin staining, 200 × magnification; a: alveolus, b: bronchiole, v: vessel, ed: edema).



**Figure 3.** Semiquantitative evaluation of (A) perivascular and peribronchial edema, (B) accumulation of neutrophil granulocytes, (C) macrophages and (D) total score of lung histopathological alterations ( $n = 8-10/\text{group}$ , #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.005$ , ####  $p < 0.000$  vs. respective PBS-treated group) are demonstrated in box plots showing the median, upper/lower quartile, and maximum/minimum values.

#### 2.4. Myeloperoxidase (MPO) Activity

MPO activity—correlating with the number of activated granulocytes and macrophages—significantly increased after LPS treatment in the lung homogenates in accordance with the histopathological findings. TO decreased but, surprisingly, LO inhalation further increased enzyme activity in the LPS-treated animals, while CO had no significant effect on this parameter (Figure 4).



**Figure 4.** Results of myeloperoxidase (MPO) activity measurements. ( $n = 8-10/\text{group}$ , ##  $p < 0.005$ , ###  $p < 0.0005$ , ####  $p < 0.0001$  vs. respective PBS-treated group, \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. LPS-PO-treated).

### 3. Discussion

We provide here the first evidence that TO (with thymol and *p*-cymene as main compounds) and CO (with cinnamaldehyde as main component) inhalation decrease inflammatory airway hyperresponsiveness and histopathological alterations in the endotoxin-induced pneumonitis mouse model. Furthermore, TO, but not CO, decreases MPO activity, as a parameter of inflammatory cell activation as well. In contrast, LO (with citronellal and geraniol as main components) aggravates airway responsiveness and MPO activity.

These findings are supported by earlier data showing the anti-inflammatory potential of TO with different compositions in other airway inflammation models. Thyme and ivy extracts significantly reversed leukocyte infiltration in a similar LPS-induced acute lung inflammation rat model [23]. In an ovalbumin-induced chronic asthma mouse model thymol exerted a significant anti-inflammatory effect by inhibiting inflammatory cell accumulation and reducing pro-inflammatory cytokine concentrations, as well as ameliorating airway hyperresponsiveness and histopathological alterations in the lungs [12]. In a carrageenan-induced pleurisy rat model TO (with carvacrol as main component) and carvacrol, but not thymol reduced leukocyte migration. However, both thymol and carvacrol had a potent anti-edema effect [9]. We also found that TO significantly reduced edema formation, but not inflammatory cell infiltration. This virtually contradictory result could be explained by the different composition of TO used in our study with thymol and *p*-cymene as main components and only 3.2% carvacrol content. Recent data demonstrated the anti-inflammatory effect of *p*-cymene as well, significantly alleviating LPS-induced acute lung inflammation, edema, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 production [10,11].

There is abundant literature on the anti-inflammatory effect of cinnamaldehyde, the main component of CO, but these studies did not investigate functional parameters. It has been described that cinnamaldehyde inhibits the IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production of macrophages stimulated by LPS in vitro [7], as well as in systemic inflammatory response syndrome in vivo [14]. The EO of *Rimulus cinnamom* or *Guizhi* (75.26% cinnamaldehyde) also decreased IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-5, IF- $\gamma$ , MCP-1, CSF-1 and MIP-1 $\beta$  in the serum, neutrophil cell count and nitric oxide production in the lung after intraperitoneal LPS administration [24].

LO with citral as main constituent has been described to suppress neutrophil adhesion and activation [25], edema formation and histopathological changes, as well as pro-inflammatory cytokine levels [13]. The anti-inflammatory property of citral is also supported by its ability to suppress LPS-induced cyclooxygenase-2 expression in the human macrophage-like U937 cell line [26]. In another in vitro study with macrophages LO pre-treatment in low doses significantly elevated IL-6 and IL-1 $\beta$  production; moreover, LO was only able to inhibit LPS effect in high doses. However, its main component, citral, effectively reduced cytokine levels both in pre-treatment and after LPS activation. These findings highlight the anti-inflammatory effect of the citral component of LO [8]. LO used in this study contained low levels of citral (neral + geraniol), which can explain our results not supporting these earlier findings. However, much fewer data are available regarding the *Cymbopogon nardus* oil used in our study with citronellal and geraniol as main components. The EO of *Citrus maxima* (syn. *Citrus grandis*, contains citronellal and citronellol) and citronellal have been described to inhibit 5-lipoxygenase activity [27]. Geraniol, the other main component of LO used in our study, reduced MPO activity and pro-inflammatory cytokines production in vivo in an LPS-evoked acute lung injury model [15]. Moreover, geraniol dramatically reduced the expression of Toll-like receptor 4 and prevented nuclear factor- $\kappa$ B activation [15]. Our contradictory findings might also be due to the different EO composition. Limonene, for instance, a minor component in *Cymbopogon nardus* was used in our study and has been described to induce bronchoconstriction in mice [28], which could explain the increased hyperresponsiveness elicited by our EO.

Therefore, when using the complex EOs instead of the individual components, the composition can significantly influence their biological effects and all components can interact with each other. For instance, 1,8-cineol, the minor TO and CO component, has some bronchodilator effects in

guinea-pigs and rats [29,30], which can contribute to the improvement of respiratory parameters. The anti-inflammatory effect (steroid-sparing effect) and mucolytic potential of 1,8-cineol have also been proven in humans [31]. Myrtilol, a standardized mixture of EOs containing cineole, limonene (minor components of CO and LO) and  $\alpha$ -pinene (minor component of TO and CO) inhibited LPS-induced neutrophil accumulation, TNF- $\alpha$ , IL-6 and MPO activity increase in mice [32]. Furthermore, linalool, the minor component of TO and CO, attenuated histopathological changes and cytokine production in a similar model [21].

Airway inflammation is commonly accompanied by bacterial infections, therefore, the antibacterial and antifungal effects of EOs can also be beneficial in these conditions, particularly considering the spread of multiresistant bacteria and fungi [33–37]. We previously demonstrated the bactericidal effects of the vapor phase of TO, CO and LO, similarly to clove and eucalyptus EOs; as well as the bacteriostatic properties of Scots pine and peppermint EO against bacteria most common in respiratory infections including *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and *Pseudomonas aeruginosa* [38].

Despite the fact that our results provide useful information regarding the potential benefits and risks of EO inhalation in airway inflammation, a limitation of our experimental design is that we could not measure the exact EO concentration in the inhalation box but could only calculate its maximum value.

Considering the well-documented agonistic effects of thymol, cinnamaldehyde, carvacrol and linalool on members of the Transient Receptor Potential (TRP) ion channel family [39,40], the effects of these compounds might potentially be mediated by the Vanilloid 1 (TRPV1) or Ankyrin 1 (TRPA1) ion channels. TRPA1 and TRPV1 are expressed and often co-localized on the capsaicin-sensitive peptidergic afferents densely innervating the lung [41], as well as on pulmonary epithelial cells lymphocytes and bronchial smooth muscle cells [42,43]. TRPA1 and TRPV1 have been reported to be protective against the LPS-induced acute lung injury model [44–46]. The potential interactions of these essential oil components with the TRP ion channels in the LPS-induced acute lung injury model might open future drug developmental perspectives worth investigating.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. EO Samples and the Gas Chromatographic Analysis of Their Composition

Cinnamon bark (*Cinnamomum zeylanicum* Nees. syn. *Cinnamomum verum* J.Presl), thyme (*Thymus vulgaris* L.), and lemongrass (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle) essential oils were bought from Aromax Ltd. (Budapest, Hungary). Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS, Agilent 6890 N/5973 N GC-MSD, Santa Clara, CA, USA) was used to analyze the chemical composition of the EO samples. The percentage composition of the EOs was evaluated with a flame ionization detector (FID). Compounds were identified based on retention times and spectral data of standard compounds, and the NIST 05 mass spectral library was also applied as previously described [38,47].

### 4.2. Animals

In the animal experiments, 10–18 week old female C57BL/6J mice [22] were used weighing  $20.8 \pm 0.26$  g (Mean  $\pm$  SEM) at the beginning of the experiment (Table S1). In order to avoid age-related differences, the age distribution of the mice was similar in each group. They were bred and kept in the Laboratory Animal House of the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy at the University of Pécs. Optimal parameters were provided for all the animals (e.g.,  $325 \times 170 \times 140$  mm cages, 12 h light/dark cycle, 24–25 °C, mouse chow, water).

During the experiments, the following regulations were taken into account: European legislation (Directive 2010/63/EU) and Hungarian Government regulation (40/2013., II. 14.) on the protection of animals used for scientific purposes, and the recommendations of the International Association for the Study of Pain. The study design was approved by the Ethics Committee on Animal Research of the University of Pécs (license No.: BA02/2000-26/2018, 21 June 2018).

#### 4.3. Induction of Acute Airway Inflammation and Groups of Animals

Animals received *Escherichia coli* (serotype: 083) LPS intratracheal (i.t.) (100 µg LPS dissolved in 60 µL phosphate-buffered saline (PBS)) to induce acute airway inflammation. The endotoxin was isolated and purified in the Department of Microbiology, University of Pécs. During the administration of LPS, the animals were put under ketamine (100 mg/kg i.p.) and xylazine (5 mg/kg i.p.) anesthesia. Control mice received the same volume of sterile PBS [25]. Animals were treated with EO inhalation 1 h prior to and 4 and 23 h following LPS/PBS administration. Paraffin oil (PO) was used as negative control. Two oil drops (0.05 mL) were applied to a filter paper taped to the top of a box (33.5 × 19 × 12 cm) where mice were placed during the 30-min-long inhalation periods. The maximum concentration of the EOs was calculated as 6.55 µL/L. Mice were randomized into eight groups: (1) the control group treated with PBS i.t. and PO inhalation, (2) mice treated with LPS i.t. and PO inhalation, (3) PBS i.t. and TO inhalation, (4) LPS i.t. and TO inhalation, (5) PBS i.t. and CO inhalation, (6) LPS i.t. and CO inhalation, (7) PBS i.t. and LO inhalation, and (8) LPS i.t. and LO inhalation ( $n = 8\text{--}10/\text{group}$ ).

#### 4.4. Pulmonary Function Measurement

Respiratory functions were determined by unrestrained whole-body plethysmography (WBP) (PLY3211, Buxco Europe Ltd., Winchester, UK) in conscious and spontaneously breathing animals 24 h after PBS/LPS administration [48]. Baseline measurements were registered for 5 min with aerosolized saline to determine the respiratory parameters, such as breathing frequency, tidal volume, minute ventilation, time of inspiration and expiration, peak inspiratory and expiratory flow, and relaxation time after 2 min of acclimation period. Enhanced pause (Penh), a calculated parameter ((expiratory time/relaxation time)/(max. expiratory flow/max. inspiratory flow)) correlating with airway hyperresponsiveness [48] was measured for 15–15 min after bronchoconstriction evoked by increasing concentrations (11 and 22 mm) of aerosolized carbachol (carbamyl choline; Sigma, St. Louis, MO, USA; dissolved in saline, 50 µL per mouse). Airway function parameters were registered every 10 s and averaged by the BioSystem XA Software for Windows (Buxco Research Systems, Wilmington, NC, USA).

#### 4.5. Histopathological Assessment and Semiquantitative Scoring

Mice were anaesthetized, and their lungs were harvested after airway function measurements. Left lungs were fixed in 4% formaldehyde, embedded in paraffin, sectioned with a microtome (5–7 µm), and stained with hematoxylin-eosin, as well as periodic acid–Schiff reaction for the visualization of the mucus-producing goblet cells. Inflammatory alterations were assessed by an expert pathologist in a blinded manner with semiquantitative histopathological scoring. Scoring parameters included the extent of perivascular edema (0–3), perivascular/peribronchial neutrophil accumulation (0–3), infiltration of activated macrophages/mononuclear cells in the alveolar spaces (0–2), and goblet cell hyperplasia of the bronchioles (0–2), as previously described [49,50]. A total inflammatory score was also assessed ranging between 0 and 10 by adding the subscores of the individual histopathological parameters.

#### 4.6. Spectrophotometric Measurement of Myeloperoxidase (MPO) Activity

The activity of MPO enzyme correlates with the inflammatory infiltration of neutrophils and macrophages and this biochemical marker refers to the inflammation. Spectrophotometric measurement was made from the lung homogenates using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and the MPO activity was compared to a human standard MPO preparation as described earlier [48]. All reagents were obtained from Sigma-Aldrich Ltd. (St. Louis, MO, USA).



#### 4.7. Statistical Analysis of Data

Respiratory parameters and MPO activity are expressed as mean  $\pm$  SEM and analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey post-test. Penh was analyzed with two-way ANOVA followed by Tukey post-test. Composite histopathological inflammatory score values were evaluated by Kruskal–Wallis analysis followed by Dunn’s post-test. In all cases,  $p < 0.05$  was accepted as significant. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism v6 software.

### 5. Conclusions

We conclude that the LPS-induced acute lung inflammation mouse model is an appropriate mechanism model to investigate the effect of EO inhalation. TO and CO can be considered as potential adjuvant treatment in airway inflammation, but the Ceylon type of LO use should be avoided.

**Supplementary Materials:** The Supplementary Materials are available online. Figure S1: Percentage changes of respiratory parameters measured by unrestrained whole body plethysmography, Figure S2: Tidal volume and minute ventilation normalized to body weight, Table S1: Body weights of the mice.

**Author Contributions:** Conceptualization, Z.H. and G.H.; methodology, E.C., K.C., A.R.A., Á.K., L.K., B.K., and A.B.; formal analysis, E.C., K.C., and Á.K.; investigation, E.C., K.C., A.R.A., Á.K., L.K., and A.B.; resources, K.C., Á.K., Z.H., and G.H.; writing—original draft preparation, E.C. and K.C.; writing—review and editing, Z.H. and G.H.; visualization, E.C. and K.C.; supervision, Z.H. and G.H.; funding acquisition, K.C., Á.K., Z.H., and G.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Z.H. and K.C. were supported by the EFOP-3.6.2-16-2017-00008, and GINOP-2.3.2 STAY ALIVE. K.C. was also supported by the New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities ÚNKP-19-3-III-PTE-211. We hereby state that no financial or other relationships exist which might lead to conflicts of interest. Á. Kemény was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

### References

1. WHO. The Top 10 Causes of Death. Available online: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed on 16 July 2020).
2. Baser, K.H.C.; Buchbauer, G. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Application*; CRC Press (Taylor & Francis Group): Boca Raton, FL, USA, 2010.
3. 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*; Rai, M.K., Kon, K.V., Eds.; Elsevier: San Diego, CA, USA, 2013.
4. Jäger, W.; Nasel, B.; Nasel, C.; Binder, R.; Stimpfi, T.; Vycudilik, W.; Buchbauer, G. Pharmacokinetic studies of the fragrance compound 1, 8-cineol in humans during inhalation. *Chem. Senses* **1996**, *21*, 477–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Horváth Gy Ács, K. Essential oils in the treatment of respiratory tract diseases highlighting their role in bacterial infections and their anti-inflammatory action: A review. *Flavour Fragr. J.* **2015**, *30*, 331–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kenia, P.; Houghton, T.; Beardsmore, C. Does inhaling menthol affect nasal patency or cough? *Pediatr. Pulmonol.* **2008**, *43*, 532–537. [[CrossRef](#)]
7. Kim, B.H.; Lee, Y.G.; Lee, J.; Lee, J.Y.; Cho, J.Y. Regulatory effect of cinnamaldehyde on monocyte/macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm.* **2010**, *2010*, 529359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bachiega, T.F.; Sforcin, J.M. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 909–913. [[CrossRef](#)]

9. Fachini-Queiroz, F.C.; Kummer, R.; Estevao-Silva, C.F.; de Barros Carvalho, M.D.; Cunha, J.M.; Grespan, R.; Bersani-Amado, C.A.; Cuman RK, N. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.* **2012**, *2012*, 657026. [[CrossRef](#)]
10. Chen, L.; Zhao, L.; Zhang, C.; Lan, Z. Protective effect of p-cymene on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Inflammation* **2014**, *37*, 358–364. [[CrossRef](#)]
11. Zhong, W.; Chi, G.; Jiang, L.; Soromou, L.W.; Chen, N.; Hou, M.; Guo, W.; Deng, X.; Feng, H. p-Cymene modulates in vitro and in vivo cytokine production by inhibiting MAPK and NF- $\kappa$ B activation. *Inflammation* **2013**, *36*, 529–537. [[CrossRef](#)]
12. Zhou, E.; Fu, Y.; Wei, Z.; Yu, Y.; Zhang, X.; Yang, Z. Thymol attenuates allergic airway inflammation in ovalbumin (OVA)-induced mouse asthma. *Fitoterapia* **2014**, *96*, 131–137. [[CrossRef](#)]
13. Shen, Y.; Sun, Z.; Gua, X. Citral inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury by activating PPAR- $\gamma$ . *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *747*, 45–51. [[CrossRef](#)]
14. Mendes, S.J.F.; Sousa, F.I.A.B.; Pereira, D.M.S.; Ferro, T.A.F.; Pereira, I.C.P.; Silva, B.L.R.; Pinheiro, A.J.M.C.R.; Mouchrek, A.Q.S.; Monteiro-Neto, V.; Costa, S.K.P.; et al. Cinnamaldehyde modulates LPS-induced systemic inflammatory response syndrome through TRPA1-dependent and independent mechanisms. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *34*, 60–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Jiang, K.; Zhang, T.; Yin, N.; Ma, X.; Zhao, G.; Wu, H.; Qiu, C.; Deng, G. Geraniol alleviates LPS-induced acute lung injury in mice via inhibiting inflammation and apoptosis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 71038–71053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Salehi, B.; Mishra, A.P.; Shukla, I.; Sharifi-Rad, M.; del Mar Conteras, M.; Segura-Carretero, A.; Fathi, H.; Nasrabadi, N.N.; Kobarrfard, F.; Sharifi-Rad, J. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytother. Res.* **2018**, *32*, 1688–1706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Satyal, P.; Murray, B.L.; McFeeters, R.L.; Setzer, W.N. Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods* **2016**, *5*, 70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. ESCOP. *ESCOP Monographs—The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products*; European Scientific Cooperative on Phytotherapy: Stuttgart, Germany, 2003; pp. 92–97.
19. Clement, Y.N.; Baksh-Comeau, Y.S.; Seaforth, C.E. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Trinidad. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2015**, *11*, 67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Suroowan, S.; Mahomoodally, M.F. A comparative ethnopharmacological analysis of traditional medicine used against respiratory tract diseases in Mauritius. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *177*, 61–80. [[CrossRef](#)]
21. 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.* **2012**, *180*, E47–E54. [[CrossRef](#)]
22. Helyes, Z.; Hajna, Z. Endotoxin-induced airway inflammation and asthma models. In *TRP Channels in Drug Discovery; Methods in Pharmacology and Toxicology*; Szállási, Á., Bíró, T., Eds.; Springer Sciences+Business Media: Berlin, Germany, 2012; pp. 301–342.
23. Seibel, J.; Pergola, C.; Werz, O.; Kryshen, K.; Wosikowski, K.; Lehner, M.D.; Haunschild, J. Bronchipret<sup>®</sup> syrup containing thyme and ivy extracts suppresses bronchoalveolar inflammation and goblet cell hyperplasia in experimental bronchoalveolitis. *Phytomedicine* **2015**, *22*, 1172–1177. [[CrossRef](#)]
24. Rao, Z.; Xu, F.; Wen, T.; Wang, F.; Sang, W.; Zeng, N. Protective effects of essential oils from *Rimulus cinnamom* on endotoxin poisoning mice. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *101*, 304–310. [[CrossRef](#)]
25. Abe, S.; Maruyama, N.; Hayama, K.; Ishibashi, H.; Inoue, S.; Oshima, H.; Yamaguchi, H. Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils. *Mediat. Inflamm.* **2003**, *12*, 323–328. [[CrossRef](#)]
26. Katsukawa, M.; Nakata, R.; Takizawa, Y.; Hori, K.; Takashi, S.; Inoue, H. Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  and suppresses COX-2 expression. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1801*, 1214–1220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Tsai, M.L.; Lin, C.D.; Khoo, K.A.; Wang, M.Y.; Kuan, T.K.; Lin, W.C.; Zhang, Y.N.; Wang, Y.Y. Composition and bioactivity of essential oil from *Citrus grandis* (L.) Osbeck ‘Mato Peiyu’ leaf. *Molecules* **2017**, *22*, 2154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Larsen, S.T.; Hougaard, K.S.; Hammer, M.; Alarie, Y.; Wolkoff, P.; Clausen, P.A.; Wilkins, C.K.; Nielsen, G.D. Effects of R-(+)- and S(-)-limonene on the respiratory tract in mice. *Hum. Exp. Toxicol.* **2000**, *19*, 457–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Bastos, V.P.D.; Brito, T.S.; Lima, F.J.B.; Pinho, J.P.M.; Lahlou, S.; Matos, F.J.A.; Santos, A.A.; Magalhaes, P.J.C. Inhibitory effect of 1,8-cineole on guinea-pig airway challenged with ovalbumin involves a preferential action on electromechanical coupling. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2009**, *36*, 1120–1126. [[CrossRef](#)]
30. Nascimento, N.R.F.; Refosco, R.M.D.C.; Vasconcelos, E.C.F.; Kerntopf, M.R.; Santos, C.F.; Batista, F.J.A.; Sousa, C.M.D.; Fonteles, M.C. 1,8-Cineole induces relaxation in rat and guinea-pig airway smooth muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* **2009**, *61*, 361–366. [[CrossRef](#)]
31. Juergens, U.R.; Dethlefsen, U.; Steinkamp, G.; Gillisen, A.; Repges, R.; Vetter, H. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: A double-blind placebo-controlled trial. *Respir. Med.* **2003**, *97*, 250–256. [[CrossRef](#)]
32. Yu, P.J.; Wan, L.M.; Wan, S.H.; Chen, W.Y.; Xie, H.; Meng, D.M.; Zhang, J.J.; Xiao, X.L. Standardized myrtle attenuates lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 3211–3216. [[CrossRef](#)]
33. Buru, A.S.; Pichika, M.R.; Neela, V.; Mohandas, K. *In vitro* antibacterial effects of *Cinnamomum* extracts on common bacteria found in wound infections with emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *153*, 587–595. [[CrossRef](#)]
34. Burt, S. Essential oils: Antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223–253. [[CrossRef](#)]
35. Celik, A.; Aydinlik, N.; Arslan, I. Phytochemical constituents and inhibitory activity towards methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on *Eryngium* species (Apiaceae). *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 454–459. [[CrossRef](#)]
36. Stamenic, M.; Vulic, J.; Dijlas, M.; Tadic, V.; Petrovic, S.; Zizovic, I. Free-radical scavenging activity and antibacterial impact of Greek oregano isolates obtained by SFE. *Food Chem.* **2014**, *165*, 307–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Tripathi, P.; Dubey, N.K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* **2004**, *32*, 235–245. [[CrossRef](#)]
38. Ács, K.; Bencsik, T.; Böszörményi, A.; Kocsis, B.; Horváth, G. Essential oils and their vapors as potential antibacterial agents against respiratory tract pathogens. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 1709–1712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Mihara, S.; Shibamoto, T. The role of flavor and fragrance chemicals in TRPA1 (transient receptor potential cation channel, member A1) activity associated with allergies. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2015**, *11*, 11. [[CrossRef](#)]
40. Premkumar, L.S. Transient receptor potential channels as targets for phytochemicals. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 1117–1130. [[CrossRef](#)]
41. Nassenstein, C.; Kwong, K.; Taylor-Clark, T.; Kollarik, M.; MacGlashan, D.M.; Braun, A.; Undem, B.J. Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs. *J. Physiol.* **2008**, *586*, 1595–1604. [[CrossRef](#)]
42. McGarvey, L.P.; Butler, C.A.; Stokesberry, S.; Polley, L.; McQuaid, S.; Abdullah, H.; Ashraf, S.; McGahon, M.K.; Curtis, T.M.; Arron, J.; et al. Increased expression of bronchial epithelial transient receptor potential vanilloid 1 channels in patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *133*, 704–712. [[CrossRef](#)]
43. Nassini, R.; Pedretti, P.; Moretto, N.; Fusi, C.; Carnini, C.; Facchinetti, F.; Viscomi, A.R.; Pisano, A.R.; Stokesberry, S.; Brunmark, C.; et al. Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e42454. [[CrossRef](#)]
44. Hajna, Z.; Csekő, K.; Kemény, Á.; Kereskai, L.; Kiss, T.; Perkecz, A.; Szitter, I.; Kocsis, B.; Pintér, E.; Helyes, Z. Complex regulatory role of the TRPA1 receptor in acute and chronic airway inflammation mouse models. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4109. [[CrossRef](#)]
45. Elekes, K.; Helyes, Z.; Németh, J.; Sándor, K.; Pozsgai, G.; Kereskai, L.; Börzsei, R.; Pintér, E.; Szabó, Á.; Szolcsányi, J. Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory neuropeptides in endotoxin-induced airway inflammation and consequent bronchial hyperreactivity in the mouse. *Regul. Pept.* **2007**, *141*, 44–54. [[CrossRef](#)]

46. Helyes, Z.; Elekes, K.; Németh, J.; Pozsgai, G.; Sándor, K.; Kereskai, L.; Börzsei, R.; Pintér, E.; Szab, Á.; Szolcsányi, J. Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2007**, *292*, 1173–1181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ács, K.; Balázs, V.L.; Kocsis, B.; Bencsik, T.; Böszörményi, A.; Horváth, G. Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complement. Altern. Med.* **2018**, *18*, 227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Helyes, Z.; Pintér, E.; Sándor, K.; Elekes, K.; Bánvölgyi, A.; Keszthelyi, D.; Szőke, E.; Tóth, D.M.; Sándor, Z.; Kereskai, L.; et al. Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13088–13093. [[CrossRef](#)]
49. Helyes, Z.; Elekes, K.; Sándor, K.; Szitter, I.; Kereskai, I.; Pintér, E.; Kemény, Á.; Szolcsányi, J.; McLaughlin, L.; Vasiliou, S.; et al. Involvement of preprotachykinin A gene-encoded peptides and the neurokinin 1 receptor in endotoxin-induced murine airway inflammation. *Neuropeptides* **2010**, *44*, 399–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Zeldin, D.C.; Wohlford-Lenane, C.; Chulada, P.; Bradbury, J.A.; Scarborough, P.E.; Roggli, V.; Langenbach, R.; Schwarz, D.A. Airway inflammation and responsiveness in prostaglandin H synthase-deficient mice exposed to bacterial lipopolysaccharide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2001**, *25*, 457–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]


**Sample Availability:** Samples of the compounds are not available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Article

# *Pinus sylvestris* L. and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry Essential Oils Inhibit Endotoxin-Induced Airway Hyperreactivity despite Aggravated Inflammatory Mechanisms in Mice

Eszter Csikós <sup>1</sup>, Kata Csekő <sup>2,3</sup>, Ágnes Kemény <sup>2,3,4</sup>, Lilla Draskóczi <sup>2,3</sup>, László Kereskai <sup>5</sup>, Béla Kocsis <sup>6</sup>, Andrea Böszörményi <sup>7</sup>, Zsuzsanna Helyes <sup>2,3,8</sup> and Györgyi Horváth <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pecs, H-7624 Pecs, Hungary; csikos.eszter@gytk.pte.hu

<sup>2</sup> Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pecs, H-7624 Pecs, Hungary; cseko.kata@pte.hu (K.C.); kemeny.agnes@pte.hu (Á.K.); lilla.draskoczi@gmail.com (L.D.); zsuzsanna.helyes@aok.pte.hu (Z.H.)

<sup>3</sup> Szentágotthai Research Centre, University of Pecs, H-7624 Pecs, Hungary

<sup>4</sup> Department of Medical Biology and Central Electron Microscope Laboratory, Medical School, University of Pecs, H-7624 Pecs, Hungary

<sup>5</sup> Department of Pathology, Medical School, University of Pecs, H-7624 Pecs, Hungary; kereskai.laszlo@pte.hu

<sup>6</sup> Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pecs, H-7624 Pecs, Hungary; kocsis.bela@pte.hu

<sup>7</sup> Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Semmelweis University, H-1085 Budapest, Hungary; boszormenyi.andrea@pharma.semmelweis-univ.hu

<sup>8</sup> PharmInVivo Ltd., H-7629 Pecs, Hungary

\* Correspondence: horvath.gyorgyi@gytk.pte.hu; Tel.: +36-72-503650-28823



**Citation:** Csikós, E.; Csekő, K.; Kemény, Á.; Draskóczi, L.; Kereskai, L.; Kocsis, B.; Böszörményi, A.; Helyes, Z.; Horváth, G. *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*, 3868. <https://doi.org/10.3390/molecules27123868>

Academic Editor: William Setzer

Received: 26 May 2022

Accepted: 11 June 2022

Published: 16 June 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Scots pine (SO) and clove (CO) essential oils (EOs) are commonly used by inhalation, and their main components are shown to reduce inflammatory mediator production. The aim of our research was to investigate the chemical composition of commercially available SO and CO by gas chromatography–mass spectrometry and study their effects on airway functions and inflammation in an acute pneumonitis mouse model. Inflammation was evoked by intratracheal endotoxin and EOs were inhaled three times during the 24 h experimental period. Respiratory function was analyzed by unrestrained whole-body plethysmography, lung inflammation by semiquantitative histopathological scoring, myeloperoxidase (MPO) activity and cytokine measurements.  $\alpha$ -Pinene (39.4%) was the main component in SO, and eugenol (88.6%) in CO. Both SO and CO significantly reduced airway hyperresponsiveness, and prevented peak expiratory flow, tidal volume increases and perivascular edema formation. Meanwhile, inflammatory cell infiltration was not remarkably affected. In contrast, MPO activity and several inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , KC, MCP-1, MIP-2, TNF- $\alpha$ ) were aggravated by both EOs. This is the first evidence that SO and CO inhalation improve airway function, but enhance certain inflammatory parameters. These results suggest that these EOs should be used with caution in cases of inflammation-associated respiratory diseases.

**Keywords:** clove; Scots pine; essential oil; endotoxin; airway inflammation; mouse model; airway hyperresponsiveness; myeloperoxidase activity; perivascular edema; cytokine

## 1. Introduction

Essential oils (EOs) are volatile liquids containing mainly terpenoids (mono-, sesqui- and diterpenes) and phenylpropane derivatives, which completely evaporate at room temperature. They can be extracted by distillation from various plant parts and are becoming more and more popular in different fields, e.g., aromatherapy, food preservation, plant pathology and medical microbiology. Inflammatory lung diseases are among the leading

causes of death worldwide [1] and they can substantially deteriorate patients' quality of life. Due to the volatile character of EOs, they can enter the respiratory tract via inhalation. Therefore, patients willingly apply EOs as a single or adjuvant treatment for respiratory diseases and inflammations based on traditional use and empirical evidence. Another favorable characteristic of EOs is that by containing several components they can exert pleiotropic effects through a broad range of targets, such as lipoxygenase, cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase, as well as different receptors, transporters and ion channels [2,3]. The anti-inflammatory effects of eucalyptus, lavender, thyme and cinnamon EOs, 1,8-cineole (eucalyptol), and menthol in the airways have already been proved by our research group [4], as well as others [2,5–7].

Scots pine (SO) and clove (CO) EOs are among the most popular oils and are commonly used via inhalation. Their main components,  $\alpha$ -pinene and eugenol, have been shown to reduce inflammatory cytokine production and some inflammatory parameters [8–12]. However, these previous in vitro results describe the effect of only one EO component and focus only on certain selected inflammatory parameters; therefore, they are not conclusive and difficult to compare. There are only few in vivo data available, especially on airway function analysis, data which would be important to determine their potential clinical benefits and risks, particularly under inflammatory conditions.

SO is obtained by steam distillation of the fresh needles (leaves) and twigs of *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae). The traditional uses of SO include treating respiratory infections based on its antibacterial, anti-inflammatory, expectorant and analgesic potentials [13]. CO is obtained by the same method from the dried flower buds of *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill et L. M. Perry (Myrtaceae). According to the European Medicines Agency monograph on clove oil, it is a traditional herbal medicinal product for the symptomatic treatment of oral cavity or pharyngeal minor inflammations and for the temporary relief of toothache due to cavity [14,15]. We selected these two EOs based on their frequent use and presence in different traditional herbal medicinal products administered by inhalation.

The endotoxin (lipopolysaccharide: LPS)-induced acute airway inflammation mouse model is the most frequently applied, well-reproducible mechanism model for the study of EOs in acute respiratory inflammation [4,16–19]. LPS is a component of the Gram-negative bacterial cell wall, which induces interstitial pneumonitis and acute respiratory obstruction by a well-defined Toll-like receptor-4 activation on macrophages, resulting in the release of several inflammatory mediators and consequent neutrophil activation [20].

In our experiments, we aimed to analyze the chemical composition of SO and CO, and perform a complex investigation on their effects related to airway functions and a range of inflammatory parameters in the endotoxin-induced acute pneumonitis mouse model.

## 2. Results

### 2.1. Chemical Analysis of EOs

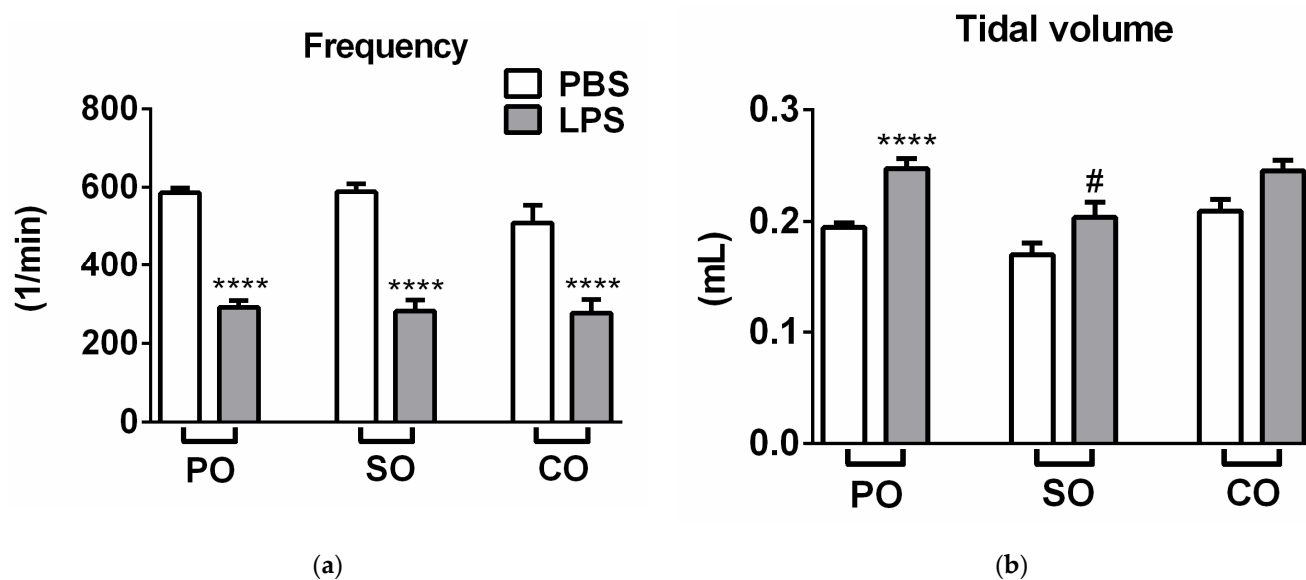
The chemical composition of commercially available SO and CO EOs was measured by gas chromatography with a flame-ionization detector (GC-FID) and mass spectrometry (GC-MS). The main components in SO and CO were  $\alpha$ -pinene (39.4%) and eugenol (88.6%), respectively (Table 1). In SO, limonene (14.3%),  $\beta$ -pinene (11.0%),  $\alpha$ -terpineol (8.8%),  $\beta$ -caryophyllene (8.4%),  $\delta$ -3-carene (7.0%), bornyl acetate (3.4%), and fenchone (1.1%) were also present, while in CO,  $\beta$ -caryophyllene (8.6%), and  $\alpha$ -humulene (2.2%) were present in higher concentrations.

**Table 1.** The chemical composition of the investigated essential oils in percentage from 3 parallel measurements (RI: retention index).

Compound	RI	Scots Pine (%)	Clove (%)
$\alpha$ -Pinene	959	39.4	-
Camphene	977	0.8	-
Fenchone	982	1.1	-
$\beta$ -Pinene	1005	11.0	-
$\delta$ -3-Carene	1036	7.0	-
Limonene	1055	14.3	-
$\alpha$ -Terpineol	1216	8.8	-
Bornyl acetate	1300	3.4	-
Eugenol	1372	-	88.6
Longifolene	1429	0.5	-
$\beta$ -Caryophyllene	1435	8.4	8.6
$\alpha$ -Humulene	1471	0.8	2.2
Caryophyllene oxide	1594	0.7	0.5
Total		96.2	99.9

## 2.2. Respiratory Functions

LPS treatment significantly reduced breathing frequency and minute ventilation, and increased tidal volume, time of inspiration and expiration, and peak expiratory flow 24 h after administration. Meanwhile, it did not alter peak inspiratory flow and relaxation time (Figure 1a–h). Both EOs significantly alleviated carbachol-induced airway hyperresponsiveness and inhibited LPS-induced peak expiratory flow increase (Figure 1h,i). SO inhalation also significantly reduced tidal volume (Figure 1b) compared to the LPS-PO-treated group, but had no other observable effect on other airway parameters.

**Figure 1.** Cont.

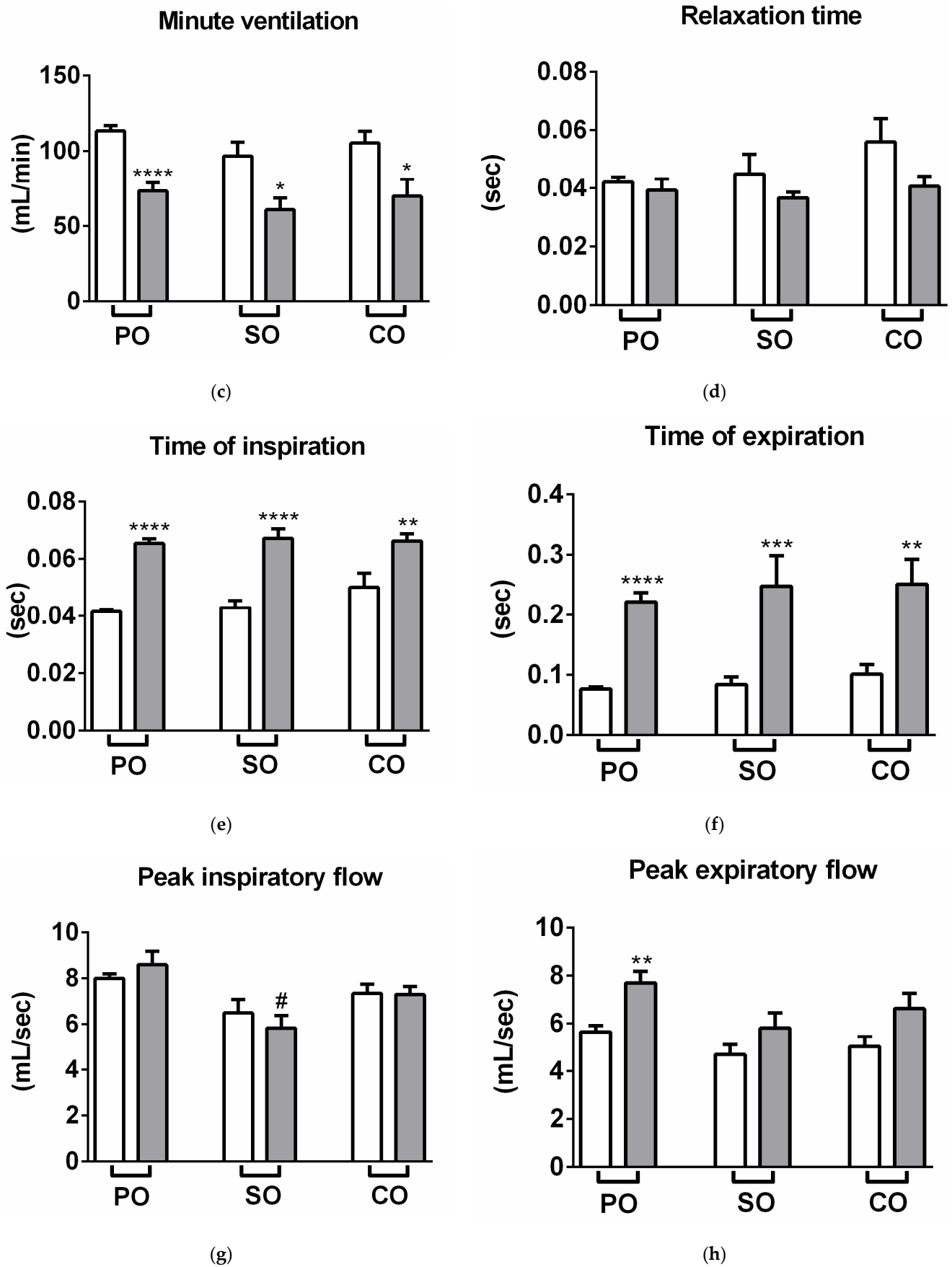
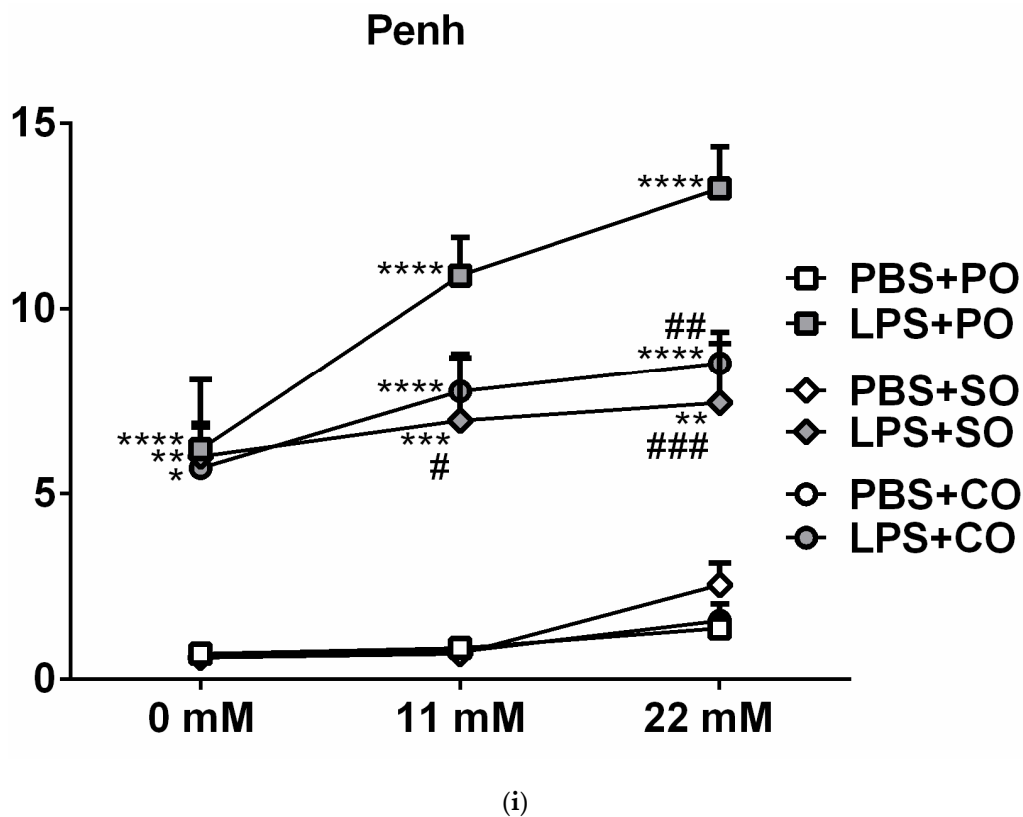


Figure 1. Cont.





**Figure 1.** Effects of Scots pine (SO) and clove (CO) essential oils on (a) breathing frequency, (b) tidal volume, (c) minute ventilation, (d) relaxation time, (e) time of inspiration, (f) time of expiration, (g) peak inspiratory flow, (h) peak expiratory flow and (i) Penh compared to the negative control paraffin oil (PO), after lipopolysaccharide (LPS-black columns)/phosphate-buffered saline (PBS-white columns) treatment ( $n = 6-8/\text{group}$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. respective PBS-treated group, #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.005$ , ###  $p < 0.0005$  vs. LPS-PO-treated mice; two-way ANOVA followed by Tukey post-test).

### 2.3. Lung Histopathological Evaluation

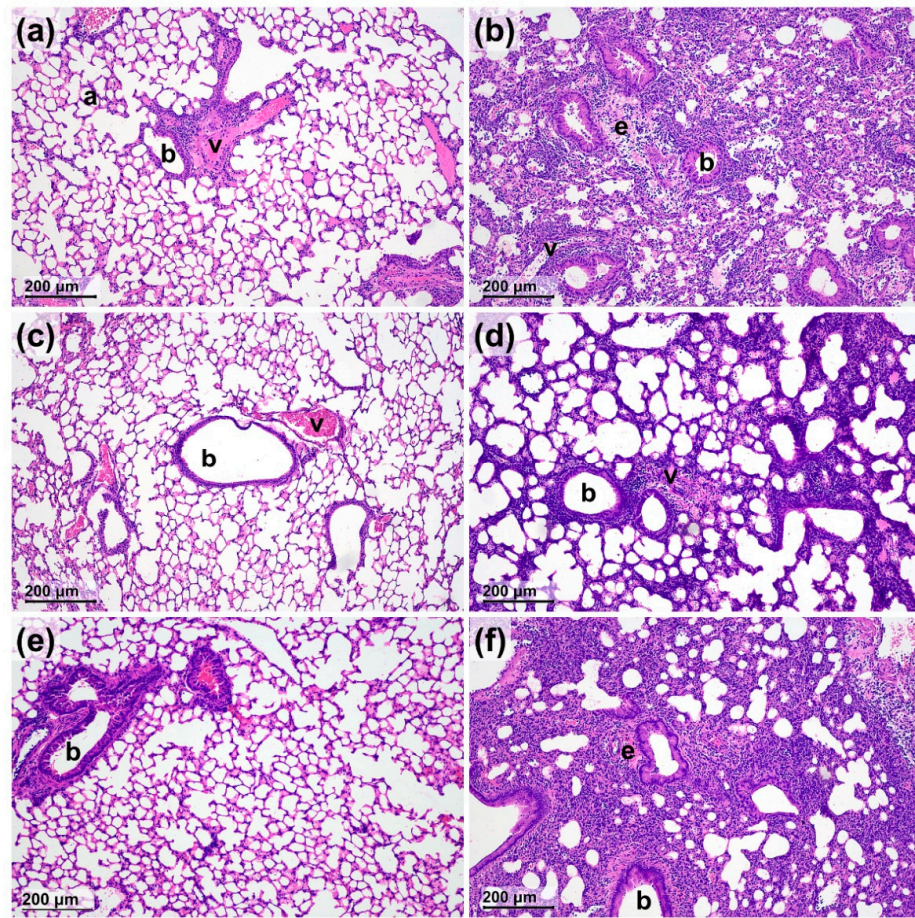
LPS administration induced neutrophil granulocyte and macrophage infiltration associated with a remarkable perivascular and peribronchial edema formation (Figures 2 and 3). Neither SO nor CO significantly altered any LPS-induced histopathological parameters, partially due to the great interindividual variation of the semiquantitative score values. However, in contrast to the PO-treated controls, none of the observed inflammatory markers were significantly increased in the CO-treated group, and edema as well as macrophage infiltration did not significantly elevate in the SO-treated group either, showing anti-inflammatory actions of the investigated EOs (Figure 3).

### 2.4. LPS-Induced Lung Myeloperoxidase (MPO) Activity Was Aggravated by SO and CO Inhalation

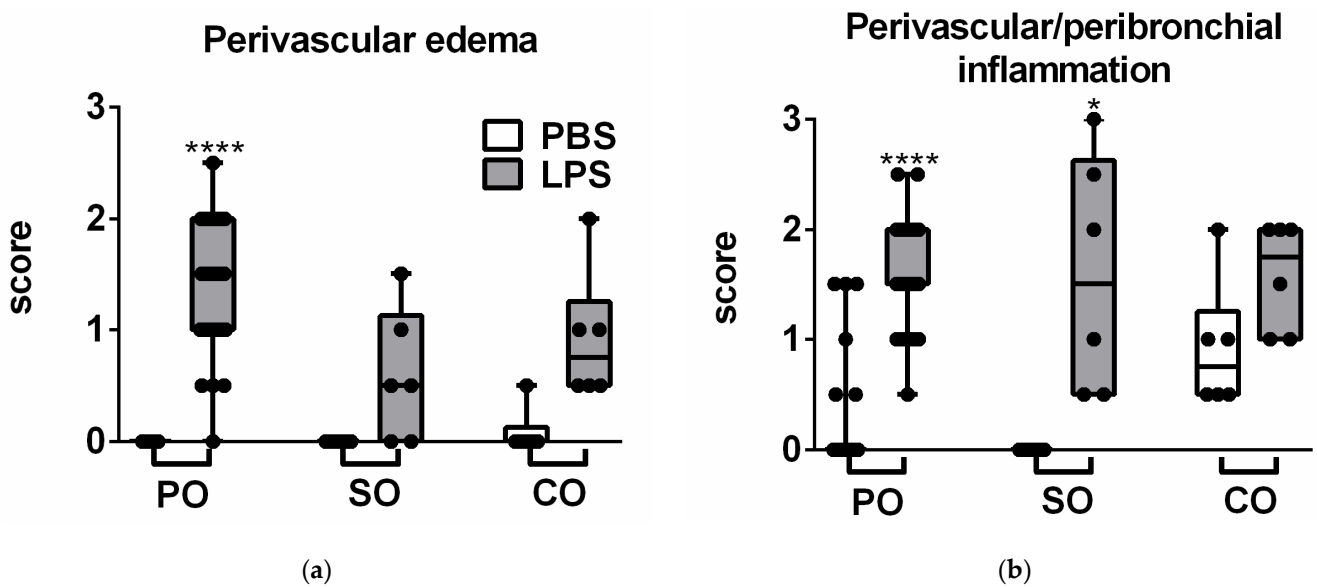
MPO production correlating with granulocyte and macrophage activity was measured from the lung homogenates. LPS treatment significantly increased MPO activity, and surprisingly both SO and CO treatments induced an approximately 2-fold further elevation of this inflammatory parameter (Figure 4).

### 2.5. SO and CO Aggravated LPS-Evoked Inflammatory Cytokine Concentrations of the Lung

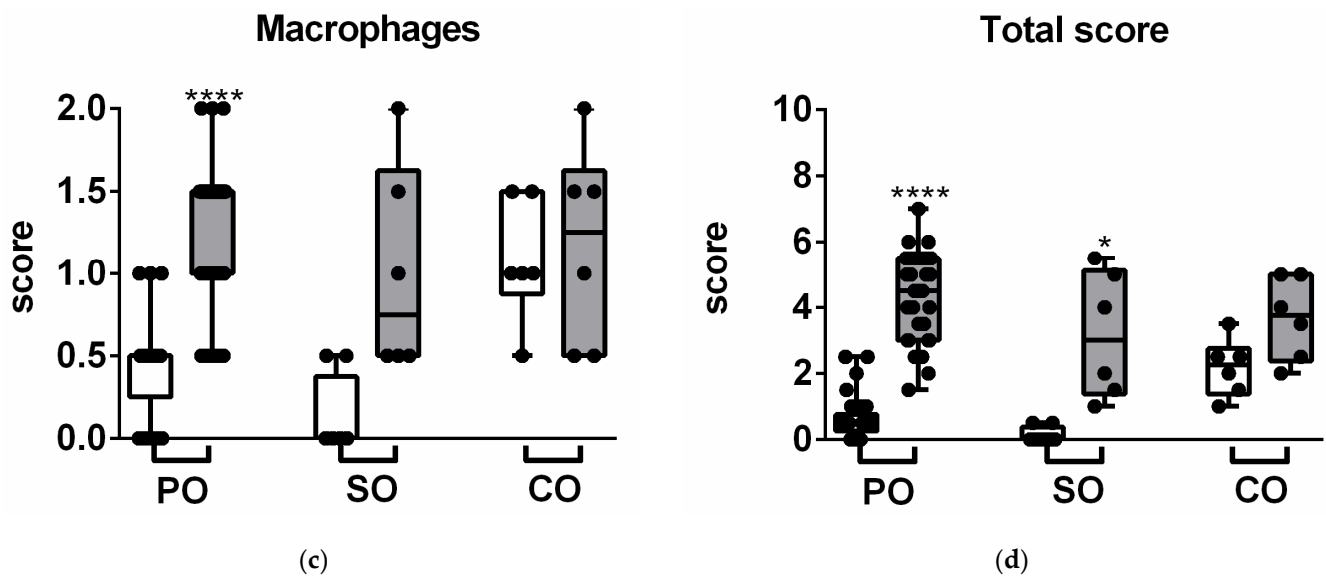
SO significantly aggravated LPS-induced interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ), keratinocyte chemoattractant (KC), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), while CO significantly enhanced interleukin-1 (IL-6), and KC (Figure 5).



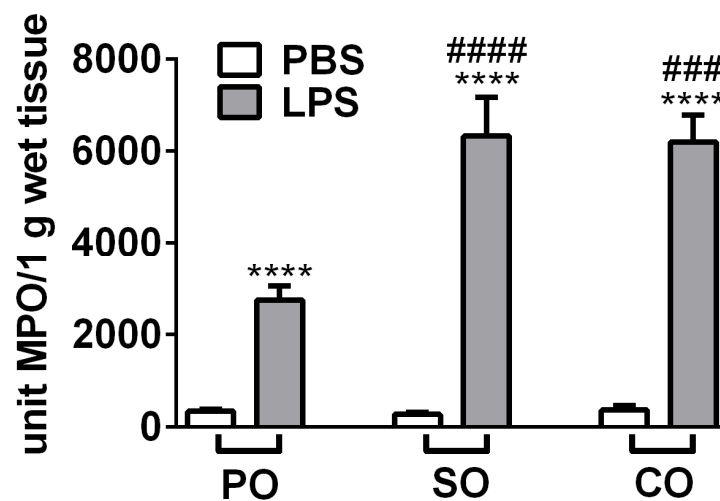
**Figure 2.** Representative histopathological pictures of non-inflamed PBS-treated and LPS-treated inflamed lung parenchyma of mice after Scots pine (SO) and clove oil (CO) inhalation in comparison with the control paraffin oil (PO). (a) PBS and PO treatment, (b) LPS and PO treatment, (c) PBS and SO treatment, (d) LPS and SO treatment, (e) PBS and CO treatment, and (f) LPS and CO treatment (hematoxylin–eosin staining, 100× magnification; a: alveolus, b: bronchiole, v: vessel, e: edema).



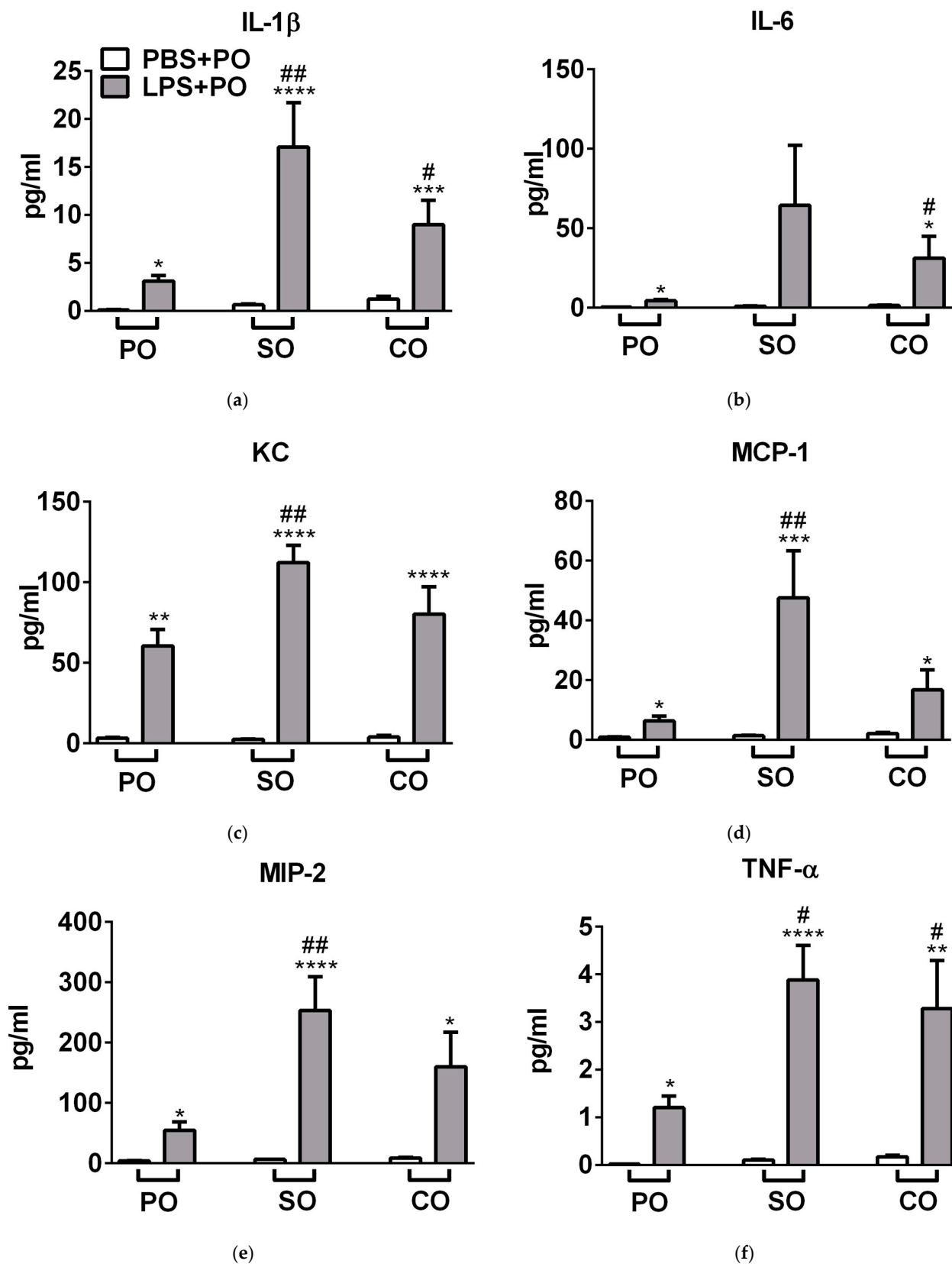
**Figure 3.** Cont.



**Figure 3.** Semiquantitative evaluation of (a) perivascular and peribronchial edema, (b) accumulation of neutrophil granulocytes, (c) macrophages and (d) total score of lung histopathological alterations. Individual data points ( $n = 6-8$  mice/treatment groups and 29 in the control groups) are demonstrated with the medians and the SEM (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. respective PBS-treated mice; Kruskal–Wallis analysis followed by Dunn’s post-test).



**Figure 4.** Myeloperoxidase (MPO) activity of the lung homogenates. Columns represent the means  $\pm$  SEM of  $n = 6-8$  mice/group (\*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. respective PBS-treated group, ###  $p < 0.0005$ , #####  $p < 0.0001$  vs. LPS-PO-treated mice; two-way ANOVA followed by Tukey post-test).



**Figure 5.** Cytokine levels of the lung homogenates. Columns represent the means  $\pm$  SEM of  $n = 6-8$  mice/group (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. respective PBS-treated group, #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.005$  vs. LPS-PO-treated mice; two-way ANOVA followed by Tukey post-test).

### 3. Discussion

Since the *in vivo* effects of SO and CO EOs are not convincingly demonstrated in the literature, and the data are partially contradictory, we therefore focused on testing the effect of these EOs in an endotoxin-induced acute pneumonitis mouse model. Our study provides here the first evidence that both SO and CO (with  $\alpha$ -pinene and eugenol as main components, respectively) inhalation decrease inflammatory airway hyperresponsiveness in the LPS-induced acute lung injury model. Neither EO induced histopathological changes in the non-inflamed lung, but in the case of both treatments, LPS-induced characteristic inflammatory alterations as shown by the semiquantitative scores were not significant. Surprisingly, in contrast to these functional and morphological results, MPO activity and several inflammatory cytokines were remarkably aggravated by both EOs.

The novelty of our work is emphasized by the fact that this is the first study demonstrating the *in vivo* effects of SO on inflammation. Our findings are partially consistent with previous results obtained with components of SO and EOs of other pine species.

Orally administered maritime pine (*Pinus pinaster* Ait) EO (with 13.5%  $\alpha$ -pinene content) did not show anti-inflammatory effects in the carrageenan-induced hind paw edema mouse model [21].

Myrtol, a standardized mixture of EOs primarily containing cineole, limonene and  $\alpha$ -pinene (from *Pinus* species) administered orally, inhibited LPS-induced neutrophil accumulation, TNF- $\alpha$  and IL-6 concentrations, but, in agreement with our results, increased MPO activity 6 h after LPS administration in the mouse [22]. These partially contradictory data might be due to the different EO composition and the duration of the study. In a clinical study, Myrtol improved mucociliary clearance in patients with chronic obstructive pulmonary disease, but did not affect respiratory functions [23]. Short-term exposure of  $\alpha$ -pinene did not evoke acute lung function changes, but caused mild irritation in higher concentrations [24]. However, the inhalation of turpentine with high (35%)  $\delta$ -3-carene content increased airway resistance, besides causing discomfort in the throat and airways of healthy men [25].

$\alpha$ -Pinene, the main component of SO, decreased TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM), and macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) levels, as well as eosinophil and mast cell infiltration in the nasal mucosa in an ovalbumin-sensitized allergic rhinitis mouse model [26]. It inhibited IL-6, TNF- $\alpha$  and NO productions in LPS-activated isolated mouse peritoneal macrophages by suppressing the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and the nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) pathways [11]. EOs obtained from *P. heldreichii* ( $\alpha$ -pinene 10.57%), *P. peuce* ( $\alpha$ -pinene 36.79%) and *P. mugo* ( $\alpha$ -pinene 21.34%) reduced IL-6 secretion from the LPS-activated RAW 264.7 mouse monocyte/macrophage-like cell line only in higher concentrations, but did not modify or even increased secretion in lower concentrations [27], suggesting clear concentration-dependent effects.

Meanwhile, *P. pinaster* EO ( $\alpha$ -pinene 62%) did not inhibit LPS-induced TNF- $\alpha$  and CCL2 production in human acute monocytic leukemia cells (THP-1) [28].

Regarding *Syzygium aromaticum*, it is important to note that most available data refer to the aqueous extract but not the EO of the plant, or focused only on the main component, eugenol. The aqueous extract of clove (*i.p.*) significantly reduced matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 activities, neutrophil count and protein leakage into bronchoalveolar lavage fluid in an LPS-induced inflammation mouse model. Furthermore, it also decreased MPO activity concentration-dependently in phorbol myristate acetate-stimulated human neutrophils [29]. The same extract reduced carrageenan-induced hind paw edema and liver succinate dehydrogenase and xanthine oxidase activities in the rat [30].

CO did not affect phagocytosis. It significantly increased the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), but reduced IL-6 production in LPS-activated RAW 264.7 cells [31].

Eugenol, the main component of CO, is the most thoroughly studied substance in relation to inflammation [8–10,12]. Eugenol did not affect LPS-induced respiratory changes, but reduced lung edema, inflammatory cells, and IL-6 and IL-1 $\beta$  levels in the bronchoalveolar lavage fluid, as well as inflammatory cell infiltration [32].

In another study, i.p. eugenol reduced LPS-induced pulmonary inflammation, improving lung function as well as significantly reducing neutrophil and macrophage counts and TNF- $\alpha$  level [33]. Similar to this finding, eugenol inhibited changes in lung mechanics, pulmonary inflammation, and alveolar collapse elicited by diesel particles [34]. In contrast to these experimental data, eugenol may cause different adverse reactions in humans, including skin irritation, inflammation, ulcer formation, dermatitis, or slow healing [35].

These controversial findings with both SO and CO are likely to be due to the different compositions of the aqueous extracts and the EOs, the different effects of the main components by themselves as compared to the complexes, the differences between the ways of administration and concentration, and the mechanisms of the inflammatory processes. Despite the fact that our results provide useful information regarding the potential benefits and risks of EO inhalation in airway inflammation, a limitation of our experimental design is that we could not measure the exact EO concentration in the inhalation box, but could only calculate its maximum value.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. EO Samples and the Gas Chromatographic Analysis of Their Composition

Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry syn. *Eugenia caryophyllata* Thunb.) EOs were bought from Aromax Ltd. (Budapest, Hungary). To analyze the chemical composition of the EO samples, gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS, Agilent 6890 N/5973 N GC-MSD, Santa Clara, CA, USA) was used. The percentage compositions of the EOs were evaluated by a flame ionization detector (FID). Compounds were identified based on retention data and spectral data of standard compounds, and the NIST 05 mass spectral library was also applied as previously described [36,37].

##### 4.2. Animals

In the animal experiments, 10–18-week-old female C57BL/6J mice [20] weighing  $21.7 \pm 0.30$  g (mean  $\pm$  SEM) at the beginning of the experiment were used. The age distribution of the mice was similar in each group to avoid age-related differences. They were bred and kept in the Laboratory Animal House of the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy at the University of Pécs. Optimal parameters were provided for all the animals (e.g.,  $325 \times 170 \times 140$  mm cages, 12 h light/dark cycle, 24–25 °C, mouse chow, water).

During the experiments, the following regulations were considered: European legislation (Directive 2010/63/EU) and Hungarian Government regulation (40/2013., II. 14.) on the protection of animals used for scientific purposes, and the recommendations of the International Association for the Study of Pain. The study design was approved by the Ethics Committee on Animal Research of the University of Pécs (license No.: BA02/2000-26/2018, 21 June 2018).

##### 4.3. Induction of Acute Airway Inflammation and Groups of Animals

Animals received 100  $\mu$ g *Escherichia coli* (serotype: 083) LPS intratracheal (i.t.) dissolved in 60  $\mu$ L phosphate-buffered saline (PBS) to induce acute airway inflammation. The endotoxin was isolated and purified in the Department of Microbiology, University of Pécs. The animals were put under ketamine (100 mg/kg i.p.; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and xylazine (5 mg/kg i.p.; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) anesthesia during the administration of LPS. Control mice received the same volume of sterile PBS [38]. Animals were treated with 30 min EO inhalation 1 h prior to and 4 and 23 h following LPS/PBS administration as previously described [4]. The negative control of the EOs was paraffin oil (PO). The maximum concentration of the EOs was calculated as 6.55  $\mu$ L/L. Mice were randomized into six groups: (1) the control group treated with PBS i.t. and PO inhalation, (2) mice treated with LPS i.t. and PO inhalation, (3) PBS i.t. and SO inhalation,

(4) LPS i.t. and SO inhalation, (5) PBS i.t. and CO inhalation, (6) LPS i.t. and CO inhalation ( $n = 6-8$ /group).

#### 4.4. Pulmonary Function Measurement

Respiratory functions were determined in conscious and spontaneously breathing animals by unrestrained whole-body plethysmography (WBP) (PLY3211, Buxco Europe Ltd., Winchester, UK) 24 h after PBS/LPS administration [39]. Baseline measurements were registered with aerosolized saline to determine the respiratory parameters, such as breathing frequency, tidal volume, minute ventilation, relaxation time, time of inspiration and expiration, peak inspiratory and expiratory flow. The enhanced pause (Penh; calculated as: (expiratory time/relaxation time)/(max. expiratory flow/max. inspiratory flow)) correlating with airway hyperresponsiveness [39] was measured after carbachol (11 and 22 mm; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)-induced bronchoconstriction as previously described [4]. Airway function parameters were registered and averaged by the BioSystem XA Software for Windows (Buxco Research Systems, Wilmington, NC, USA).

#### 4.5. Histopathological Assessment and Semiquantitative Scoring

After airway function measurements, the mice were anaesthetized, and their lungs were harvested. Left lungs were fixed in 4% formaldehyde, embedded in paraffin, sectioned with a microtome (5–7  $\mu\text{m}$ ), and stained with hematoxylin–eosin. Semiquantitative histopathological scoring was performed by an expert pathologist in a blinded manner. Perivascular edema (0–3), perivascular/peribronchial neutrophil accumulation (0–3), and infiltration of macrophages/mononuclear cells in the alveolar spaces (0–2) were scored as previously described [40,41]. The total inflammatory score was assessed (0–8) by adding the subscores of the individual histopathological parameters.

#### 4.6. Spectrophotometric Measurement of Myeloperoxidase (MPO) Activity

Lung inflammation was further characterized by MPO enzyme activity assessment correlating with activated neutrophil and macrophage infiltration. Spectrophotometric measurement was performed from the right lung homogenates using  $\text{H}_2\text{O}_2$ -3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ), and MPO activity was compared to a human standard MPO preparation as described earlier [39]. All reagents were obtained from Sigma-Aldrich Ltd. (St. Louis, MO, USA).

#### 4.7. Measurement of Inflammatory Cytokine Concentration Using Luminex xMAP Technology

The excised and frozen lung tissue samples were thawed and weighed, then immediately placed in cold PBS containing 0.01% phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSE, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, P7626) protease inhibitor, and were homogenized on ice with a Micra D-9 Digitronic device (Art-moderne Labortechnik, Germany). Homogenates were centrifuged for 20 min (4 °C, 4000 rpm) and clear supernatants were collected and stored at –80 °C until the measurement. With a customized Milliplex Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (MCYTOMAG-70K), Luminex Multiplex Immunoassay was performed to determine the protein concentrations of the following cytokines/chemokines: interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ); interleukin-6 (IL-6); chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), also called keratinocyte chemoattractant (KC); chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), also called monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1); chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), also called macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2); and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). The six analytes were detected simultaneously in a 96-well plate. All samples were tested undiluted in a blind fashion and in duplicate. Based on the instructions, a mixture of the six antibody-coated bead population was added to the plate at 25  $\mu\text{L}$ /well together with standards and controls to the designated wells. Following overnight incubation at 4 °C, the plate was washed three times using a handheld magnetic plate. After washing, 25  $\mu\text{L}$ /well of detection antibody solution was added and incubated for 60 min at RT with shaking at 500 rpm. After subsequent washing steps, 25  $\mu\text{L}$ /well of

streptavidin–phycoerythrin (SAPE) solution was added and incubated for 30 min at RT shaking at 500 rpm. After washing three times, 150  $\mu\text{L}$ /well of drive buffer was added to the plate and the assay was read on a MAGPIX Luminex (TermoFisher, Budapest, Hungary) instrument. Five-PL regression curves were used to plot the standard curves for all analytes by the Belysa 1.1 software (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) analyzing the bead median fluorescence intensity. Results are given in pg/mL and were normalized to the total protein concentration of the sample.

#### 4.8. Statistical Analysis of Data

Statistical analysis was performed in GraphPad Prism v6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Unless noted otherwise, all data represent the mean  $\pm$  SEM. Respiratory parameters and MPO activity were analysed with two-way ANOVA followed by Tukey post-test. Composite histopathological inflammatory score values were evaluated by Kruskal–Wallis analysis followed by Dunn’s post-test. In all cases,  $p < 0.05$  was accepted as significant.

## 5. Conclusions

This study provides the first evidence that SO and CO inhalation improve airway function, but enhance certain inflammatory parameters. Therefore, we conclude that these EOs could be beneficial for certain functional respiratory disorders, but should be used with caution in cases of inflammation-associated airway conditions.

**Author Contributions:** Conceptualization, Z.H. and G.H.; methodology, E.C., K.C., Á.K., L.D., L.K., B.K. and A.B.; formal analysis, E.C., K.C. and Á.K.; investigation, E.C., K.C., Á.K., L.D., L.K. and A.B.; resources, K.C., Á.K., Z.H. and G.H.; writing—original draft preparation, E.C. and K.C.; writing—review and editing, Z.H. and G.H.; visualization, E.C. and K.C.; supervision, Z.H. and G.H.; funding acquisition, E.C., Z.H. and K.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** E.C. was supported by the ÚNKP-20-3-II New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development and Innovation Fund. Project nos. TKP2021-EGA-13 and TKP2021-EGA-16 have been implemented with the support provided from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the EGA-13 and EGA-16 funding scheme. We hereby state that no financial or other relationships exist which might lead to conflicts of interest.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study design was approved by the Ethics Committee on Animal Research of the University of Pécs (license No.: BA02/2000-26/2018, 21 June 2018).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

**Sample Availability:** Samples of the compounds are not available from the authors.

## References

1. The Top 10 Causes of Death. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed on 25 February 2022).
2. Baser, K.H.C.; Buchbauer, G. *Handbook Of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*; CRC Press (Taylor & Francis Group): Boca Raton, FL, USA, 2010; ISBN 978-1-4200-6315-8.
3. Faleiro, M.L.; Miguel, M. Use of Essential Oils and Their Components against Multidrug-Resistant Bacteria. In *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*; Elsevier: San Diego, CA, USA, 2013; pp. 65–94. ISBN 978-0-12-398539-2.



4. Csikós, E.; Csekő, K.; Ashraf, A.R.; Kemény, Á.; Kereskai, L.; Kocsis, B.; Böszörményi, A.; Helyes, Z.; Horváth, G. 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*, 3553. [CrossRef] [PubMed]
5. Jäger, W.; Nasel, B.; Nasel, C.; Binder, R.; Stimpfl, T.; Vycudilik, W.; Buchbauer, G. Pharmacokinetic Studies of the Fragrance Compound 1,8-Cineol in Humans during Inhalation. *Chem. Senses* **1996**, *21*, 477–480. [CrossRef] [PubMed]
6. Kenia, P.; Houghton, T.; Beardsmore, C. Does Inhaling Menthol Affect Nasal Patency or Cough? *Pediatr. Pulmonol.* **2008**, *43*, 532–537. [CrossRef] [PubMed]
7. Horváth, G.; Ács, K. Essential Oils in the Treatment of Respiratory Tract Diseases Highlighting Their Role in Bacterial Infections and Their Anti-Inflammatory Action: A Review. *Flavour Fragr. J.* **2015**, *30*, 331–341. [CrossRef]
8. Chainy, G.B.; Manna, S.K.; Chaturvedi, M.M.; Aggarwal, B.B. Anethole Blocks Both Early and Late Cellular Responses Transduced by Tumor Necrosis Factor: Effect on NF-KappaB, AP-1, JNK, MAPKK and Apoptosis. *Oncogene* **2000**, *19*, 2943–2950. [CrossRef] [PubMed]
9. Kim, S.S.; Oh, O.-J.; Min, H.-Y.; Park, E.-J.; Kim, Y.; Park, H.J.; Nam Han, Y.; Lee, S.K. Eugenol Suppresses Cyclooxygenase-2 Expression in Lipopolysaccharide-Stimulated Mouse Macrophage RAW264.7 Cells. *Life Sci.* **2003**, *73*, 337–348. [CrossRef]
10. Raghavenra, H.; Diwakar, B.T.; Lokesh, B.R.; Naidu, K.A. Eugenol—The Active Principle from Cloves Inhibits 5-Lipoxygenase Activity and Leukotriene-C4 in Human PMNL Cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Acids* **2006**, *74*, 23–27. [CrossRef]
11. 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. [CrossRef]
12. Chniguir, A.; Pintard, C.; Liu, D.; Dang, P.M.-C.; El-Benna, J.; Bachoual, R. Eugenol Prevents FMLF-Induced Superoxide Anion Production in Human Neutrophils by Inhibiting ERK1/2 Signaling Pathway and P47phox Phosphorylation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18540. [CrossRef]
13. Allenspach, M.; Valder, C.; Flamm, D.; Grisoni, F.; Steuer, C. Verification of Chromatographic Profile of Primary Essential Oil of *Pinus sylvestris* L. Combined with Chemometric Analysis. *Molecules* **2020**, *25*, 2973. [CrossRef]
14. EMA Caryophylli Flos. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/caryophylli-flos> (accessed on 25 February 2022).
15. EMA Caryophylli Floris Aetheroleum. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/caryophylli-floris-aetheroleum> (accessed on 25 February 2022).
16. 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. [CrossRef] [PubMed]
17. Chen, L.; Zhao, L.; Zhang, C.; Lan, Z. Protective effect of p-cymene on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Inflammation* **2014**, *37*, 358–364. [CrossRef] [PubMed]
18. Shen, Y.; Sun, Z.; Guo, X. Citral Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Activating PPAR- $\gamma$ . *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *747*, 45–51. [CrossRef] [PubMed]
19. Jiang, K.; Zhang, T.; Yin, N.; Ma, X.; Zhao, G.; Wu, H.; Qiu, C.; Deng, G. Geraniol Alleviates LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice via Inhibiting Inflammation and Apoptosis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 71038–71053. [CrossRef]
20. Helyes, Z.; Hajna, Z. Endotoxin-Induced Airway Inflammation and Asthma Models. In *TRP Channels in Drug Discovery: Volume I*; Szallasi, A., Bíró, T., Eds.; Methods in Pharmacology and Toxicology; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2012; pp. 301–342. ISBN 978-1-62703-077-9.
21. Tümen, İ.; Akkol, E.K.; Taştan, H.; Süntar, I.; Kurtca, M. Research on the Antioxidant, Wound Healing, and Anti-Inflammatory Activities and the Phytochemical Composition of Maritime Pine (*Pinus pinaster* Ait). *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *211*, 235–246. [CrossRef]
22. Yu, P.-J.; Wan, L.-M.; Wan, S.-H.; Chen, W.-Y.; Xie, H.; Meng, D.-M.; Zhang, J.-J.; Xiao, X.-L. Standardized Myrtol Attenuates Lipopolysaccharide Induced Acute Lung Injury in Mice. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 3211–3216. [CrossRef]
23. Dorow, P.; Weiss, T.; Felix, R.; Schmutzler, H. Effect of a secretolytic and a combination of pinene, limonene and cineole on mucociliary clearance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Arzneimittelforschung* **1987**, *37*, 1378–1381.
24. Falk, A.A.; Hagberg, M.T.; Löf, A.E.; Wigaeus-Hjelm, E.M.; Wang, Z.P. Uptake, Distribution and Elimination of Alpha-Pinene in Man after Exposure by Inhalation. *Scand. J. Work. Environ. Health* **1990**, *16*, 372–378. [CrossRef]
25. Filipsson, A.F. Short Term Inhalation Exposure to Turpentine: Toxicokinetics and Acute Effects in Men. *Occup. Environ. Med.* **1996**, *53*, 100–105. [CrossRef]
26. Nam, S.-Y.; Chung, C.; Seo, J.-H.; Rah, S.-Y.; Kim, H.-M.; Jeong, H.-J. The Therapeutic Efficacy of  $\alpha$ -Pinene in an Experimental Mouse Model of Allergic Rhinitis. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *23*, 273–282. [CrossRef]
27. Basholli-Salihi, M.; Schuster, R.; Hajdari, A.; Mulla, D.; Viernstein, H.; Mustafa, B.; Mueller, M. Phytochemical Composition, Anti-Inflammatory Activity and Cytotoxic Effects of Essential Oils from Three *Pinus* spp. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 1553–1560. [CrossRef] [PubMed]
28. Miguel, M.G.; da Silva, C.I.; Farah, L.; Castro Braga, F.; Figueiredo, A.C. Effect of Essential Oils on the Release of TNF- $\alpha$  and CCL2 by LPS-Stimulated THP-1 Cells. *Plants* **2020**, *10*, 50. [CrossRef] [PubMed]

29. Chniguir, A.; Zioud, F.; Marzaioli, V.; El-Benna, J.; Bachoual, R. *Syzygium aromaticum* Aqueous Extract Inhibits Human Neutrophils Myeloperoxidase and Protects Mice from LPS-Induced Lung Inflammation. *Pharm. Biol.* **2019**, *57*, 56–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Ahmad, T.; Shinkafi, T.S.; Routray, I.; Mahmood, A.; Ali, S. Aqueous Extract of Dried Flower Buds of *Syzygium aromaticum* Inhibits Inflammation and Oxidative Stress. *J. Basic Clin. Pharm.* **2012**, *3*, 323–327. [[CrossRef](#)]
31. Lang, M.; Ferron, P.-J.; Bursztyka, J.; Montjarret, A.; Duteil, E.; Bazire, A.; Bedoux, G. Evaluation of Immunomodulatory Activities of Essential Oils by High Content Analysis. *J. Biotechnol.* **2019**, *303*, 65–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bittencourt-Mernak, M.I.; Pinheiro, N.M.; da Silva, R.C.; Ponci, V.; Banzato, R.; Pinheiro, A.J.M.C.R.; Olivo, C.R.; Tibério, I.F.L.C.; Lima Neto, L.G.; Santana, F.P.R.; et al. Effects of Eugenol and Dehydrodieugenol B from *Nectandra leucantha* against Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Experimental Acute Lung Inflammation. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 2282–2294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Magalhães, C.B.; Riva, D.R.; DePaula, L.J.; Brando-Lima, A.; Koatz, V.L.G.; Leal-Cardoso, J.H.; Zin, W.A.; Faffe, D.S. In Vivo Anti-Inflammatory Action of Eugenol on Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury. *J. Appl. Physiol.* **2010**, *108*, 845–851. [[CrossRef](#)]
34. Zin, W.A.; Silva, A.G.L.S.; Magalhães, C.B.; Carvalho, G.M.C.; Riva, D.R.; Lima, C.C.; Leal-Cardoso, J.H.; Takiya, C.M.; Valença, S.S.; Saldiva, P.H.N.; et al. Eugenol Attenuates Pulmonary Damage Induced by Diesel Exhaust Particles. *J. Appl. Physiol.* **2012**, *112*, 911–917. [[CrossRef](#)]
35. Fuentes, C.; Fuentes, A.; Barat, J.M.; Ruiz, M.J. Relevant Essential Oil Components: A Minireview on Increasing Applications and Potential Toxicity. *Toxicol. Mech. Methods* **2021**, *31*, 559–565. [[CrossRef](#)]
36. Ács, K.; Bencsik, T.; Böszörményi, A.; Kocsis, B.; Horváth, G. Essential Oils and Their Vapors as Potential Antibacterial Agents against Respiratory Tract Pathogens. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 1709–1712. [[CrossRef](#)]
37. Ács, K.; Balázs, V.L.; Kocsis, B.; Bencsik, T.; Böszörményi, A.; Horváth, G. Antibacterial Activity Evaluation of Selected Essential Oils in Liquid and Vapor Phase on Respiratory Tract Pathogens. *BMC Complement. Altern. Med.* **2018**, *18*, 227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Abe, S.; Maruyama, N.; Hayama, K.; Ishibashi, H.; Inoue, S.; Oshima, H.; Yamaguchi, H. Suppression of Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Neutrophil Adherence Responses by Essential Oils. *Mediat. Inflamm.* **2003**, *12*, 323–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Helyes, Z.; Pintér, E.; Sándor, K.; Elekes, K.; Bánvölgyi, A.; Keszthelyi, D.; Szoke, E.; Tóth, D.M.; Sándor, Z.; Kereskai, L.; et al. Impaired Defense Mechanism against Inflammation, Hyperalgesia, and Airway Hyperreactivity in Somatostatin 4 Receptor Gene-Deleted Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13088–13093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Helyes, Z.; Elekes, K.; Sándor, K.; Szitter, I.; Kereskai, L.; Pintér, E.; Kemény, A.; Szolcsányi, J.; McLaughlin, L.; Vasiliou, S.; et al. Involvement of Preprotachykinin A Gene-Encoded Peptides and the Neurokinin 1 Receptor in Endotoxin-Induced Murine Airway Inflammation. *Neuropeptides* **2010**, *44*, 399–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Zeldin, D.C.; Wohlford-Lenane, C.; Chulada, P.; Bradbury, J.A.; Scarborough, P.E.; Roggli, V.; Langenbach, R.; Schwartz, D.A. Airway Inflammation and Responsiveness in Prostaglandin H Synthase-Deficient Mice Exposed to Bacterial Lipopolysaccharide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2001**, *25*, 457–465. [[CrossRef](#)]