

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

***Macskák idiopátiás cisztitiszének
biokémiai háttere***

Dr. Kissné dr. Hatala Patrícia

Témavezetők: Dr. Neogrády Zsuzsanna, CSc
Dr. Mátis Gábor, PhD



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2024.

Témavezetők:

.....

Dr. Neogrády Zsuzsanna, CSc

Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály

Állatorvostudományi Egyetem, Budapest

.....

Dr. Mátis Gábor, PhD

Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály

Állatorvostudományi Egyetem, Budapest

.....

Dr. Kissné dr. Hatala Patrícia

Bevezetés

Az alsó húgyúti problémák a házimacskák (*Felis silvestris catus*) egyik leggyakoribb megbetegedései közé tartoznak. A tünetek között szerepel a hematuria, a stranguria, a dysuria, a periuria, a fájdalom és a vizelés közbeni túlérzékenység változó kombinációja. A klinikai tünetek differenciáldiagnózisa magában foglalhatja a húgykövességet, húgyúti fertőzést, neopláziát vagy egyes parazitózisokat, de vannak olyan esetek, amikor a klinikai vizsgálattal nem diagnosztizálható specifikus kiváltó ok, s ebben az esetben a betegséget macskák idiopátiás húgyhólyaggyulladásának (FIC) nevezik. A lehetséges okok és a betegség kórfejlődése széleskörűen tanulmányozott, és elmondható, hogy egy komplex, multifaktoriális kórkép, melynek kialakulásában a stressznek valószínűsíthetően fontos szerepe van. Ezért ennek a faktornak a tanulmányozása elengedhetetlen a kórkép patogenezisének pontosabb megértéséhez. Habár a betegség klinikai tünetei néhány napon belül kezelés nélkül, maguktól megszűnhetnek, azok újbóli megjelenése is nagyon gyakori. Korábbi tanulmányok alapján az akut FIC-ben szenvedő macskák akár 50%-ánál egy éven belül kiújul a betegség, ami a megváltozott stresszválasszal hozható összefüggésbe. Továbbá, a betegség mind tüneteiben, mind kórfejlődésében nagyon hasonlít a humán intersticiális cisztitiszre (IC), ezért patomechanizmusának vizsgálata nemcsak az állatorvoslásban, hanem a humán gyógyászatban is kiemelt jelentőségű, valamint a FIC az IC megfelelő állatmodelljeként is szolgálhat.

Korábbi kutatások szerint a tirozin-hidroxiláz – amely a központi idegrendszer katekolamin-termelésének fő szabályozó enzime – aktivitása emelkedést mutat a FIC-ben szenvedő macskák hipotalamuszának paraventrikuláris magjában, és a *locus coeruleus* noradrenerg magjaiban. Ennek következményeként a vérben tartósan megnövekedett noradrenalin (NE) koncentráció mérhető az érintett egyedekben. A leírt fokozott tirozin-hidroxiláz-aktivitás krónikus stresszhatásnak kitett, de egyébként egészséges macskáknál is megfigyelhető, azonban ezekben az állatokban a krónikus stresszel összefüggő emelkedett kortizoltermelés gátló hatása miatt a plazma NE-koncentrációja idővel csökken. Ez a gátló hatás FIC-ben szenvedő macskáknál hiányzik, valamint az érintett egyedek sokszor kisebb mellékvesékkel is rendelkeznek, így a kortizoltermelés alacsonyabb, mint az egészséges állatoknál. A fent leírtak következtében az NE közvetlen szerepének vizsgálata a FIC patogenezisében kiemelten fontos.

A FIC-ben szenvedő macskák húgyhólyagja funkcionális és anatómiai változásokon megy keresztül egészséges társaikhoz képest; e változások megértéséhez azonban szükséges a hólyag szerkezetének áttekintése. Az uroepitélium több sejtrétegből áll, beleértve egy bazális, egy egy-két réteg vastagságú intermedier és egy differenciált felszíni sejtréteget. Ez utóbbit az úgynevezett ernyősejtek alkotják, amelyek aszimmetrikus apikális plazmamembránnal

rendelkeznek, és speciális uroepiteliális differenciálódási markereket, uroplakinokat tartalmaznak. Jelenlegi ismereteink szerint négyféle uroplakin létezik: Ia., Ib., II. és III., amelyek közül az uroplakin III. csak a húgyhólyag, a húgyvezeték és a vesemedence differenciált urotélsajtjeiben mutatható ki. Ennek következtében az uroplakin III. alkalmas a differenciált húgyhólyaghámsejtek jellemzésére sejtkultúrákban. Az ernyősejteket *tight junction* sejtkapcsolatok kötik össze, amelyek hatékony gátat képeznek az ion-, ammónia-, baktérium- és karbamidáramlással szemben, valamint alkalmassá teszik a hólyaghámot arra, hogy védőgátat képezzen a vizelet és a véráram között. Ezek a *tight junction* sejtkapcsolatok citoplazmatikus fehérjékből, citoszkeletális elemekből és transzmembrán fehérjékből állnak. A *tight junction* legjellemzőbb fehérjei a *zona occludens*, az okkludinok és a klaudinok, amelyek alkalmasak a hám barrierfunkciójának jelzésére. Továbbá az ernyősejtek apikális membránját glükózaminoglikán (GAG) réteg borítja, amely nemcsak a barrierfunkció javításában játszik szerepet, hanem a baktériumok megtapadását is megakadályozhatja, habár az uroepiteliális GAG-tartalom a FIC-ben szenvedő macskákban csökkent értéket mutat. Emellett a hólyagszövet elektronmikroszkópos vizsgálata során a hólyaghám elvékonyodása és a *tight junction* fehérjék módosult expressziója, eloszlási mintázata figyelhető meg, ami a hólyag vízzel, karbamiddal és különböző ionokkal szembeni fokozott áteresztőképességét eredményezi. A hólyaghám fokozott permeabilitása miatt a hipertóniás vizelet és a benne lévő citotoxikus anyagok könnyen elérhetik a hám kevésbé ellenálló, érzőidegvégződéseket tartalmazó sejtrétegeit, ezáltal neurogén gyulladást, fájdalmat okozva és a FIC tüneteit előidézve. A leírtak alapján az uroepitelsejtek barrierfunkciójának vizsgálata elengedhetetlen a FIC patogenezisének pontosabb megértéséhez.

Az uroepitelsejtek barrierintegritása mellett fontos a FIC-ben megjelenő gyulladással járó válaszmolekuláris mechanizmusainak vizsgálata is. Korábbi vizsgálatok alapján a gyulladással járó citokin interleukin-6 (IL-6) és a gyulladással járó kemokin stromasejt-eredetű faktor-1 (SDF-1) koncentrációja emelkedést mutatott a vizeletben és az uroepitél sejtekben patkányok kísérleti úton kiváltott cisztitisze esetén. Továbbá, a vérplazma emelkedett IL-6, IL-12, IL-18 és SDF-1 koncentrációja volt mérhető FIC-ben szenvedő macskákban. A gyulladással járó folyamatok és a stresszhormon felszabadulása közötti kapcsolat mellett az uroepitelsejtek redoxállapotának vizsgálata is indokolt, ugyanis a gyulladással járó folyamatok során reaktív oxigén gyökök termelődhetnek, továbbá, a gyulladással járó citokinek és kemokinek túlzott termelődése oxidatív stresszt, és ezáltal a sejtek DNS-ének, membránlipidjeinek és fehérjeinek károsodását okozhatja. Az oxidatív stressz tovább növelheti a gyulladással járó mediátorok mennyiségét, valamint a membránok károsodása miatt a sejtek permeabilitását is.

Célkitűzés

Röviden összefoglalva a PhD kutatásom fő céljai a következők voltak:

Ad 1, egy új, macska eredetű, differenciált urotélsejteket tartalmazó, primer húgyhólyaghámsejt-tenyészet létrehozása és jellemzése, ami különösen hasznos modellként szolgálhat a FIC kórfejlődésében szerepet játszó különböző faktorok hatásainak külön-külön vagy célzott kombinációban történő *in vitro* vizsgálatára.

Ad 2, az 1 órás NE kezeléssel modellezett, akut szimpatikus stressz lehetséges hatásainak *in vitro* vizsgálata primer húgyhólyaghámsejt-tenyészetben, különös tekintettel a hólyaghámsejtek metabolikus aktivitására, a gyulladásos- és oxidatív stresszválaszra, valamint az uroepitélsejtek barrierfunkciójára.

Ad 3, a 3x1 órás NE kezeléssel modellezett krónikus intermittáló stressz kórtani szerepének vizsgálata a FIC kórfejlődésében, valamint az akut és krónikus stressz hatásainak összehasonlítása az oxidatív stressz, a gyulladásos folyamatok és az uroepitél sejtek barrierintegritásának szempontjából.

A fenti célok elérése érdekében három kísérletet terveztünk a táblázatban bemutatott módon.

Kísérlet száma	Alkalmazott sejttenyészet és a kezelés módja	A kísérlet célja	Laboratóriumi vizsgálatok (vizsgált paraméterek)
I. kísérlet	Macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészet	Egy új, macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészet kifejlesztése és jellemzése	A tenyésztett sejtek jellemzése Giemsa- és immunfluoreszcens festéssel (pán-citokeratin és uroplakin III)
II. kísérlet	Macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészet, rövid távú (1h) NE kezelés	Az akut stressz húgyhólyaghámsejtekre kifejtett molekuláris hatásainak vizsgálata	Metabolikus aktivitás (CCK-8), extracelluláris LDH felszabadulás, redox paraméterek (MDA, PC, 8-OH-dG, GRP78), gyulladásos citokinkoncentrációk (IL-6, SDF-1), barrierfunkció paraméterei (GAG, klaudin-4, TER)
III. kísérlet	Macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészet, pulzáló (3x1h) NE kezelés	Az krónikus, intermittáló stressz húgyhólyaghámsejtekre kifejtett molekuláris hatásainak vizsgálata, és az akut és krónikus stressz hatásainak összehasonlítása a FIC kórfejlődésének szempontjából	Metabolikus aktivitás (CCK-8), extracelluláris LDH felszabadulás, redox paraméterek (MDA, H ₂ O ₂), gyulladásos citokinkoncentrációk (IL-6, SDF-1), barrierfunkció paraméterei (GAG, klaudin-4, TER)

LDH=laktát-dehidrogenáz, MDA=malondialdehid, PC=protein-karbonil, 8-OH-dG=8-hidroxi-2-dezoxi-guanozin, GRP78 = glükóz szabályozott fehérje 78, TER=transzsepiteliális elektromos rezisztencia

Anyag és módszer

Új, macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészet létrehozása és jellemzése (I. kísérlet)

Az első kísérlet során a húgyhólyaghámsejteket egy előzőleg végleges elaltatásra kerülő, húgyúti betegségektől mentes, és a tulajdonos által tudományos célra felajánlott macska hólyagjából nyertük. A hólyagot laparotómiát követően eltávolítottuk, megtisztítottuk és egy éjszakán keresztül diszpáztartalmú tápfolyadékban inkubáltuk 4°C-on. A hámsejteket egy steril sejtkaparó segítségével elválasztottuk a kötőszöveti rétegtől, majd a sejtszuspenziót 30 percen keresztül tripszin-EDTA tartalmú tápfolyadékban emésztettük, folyamatos mágneses keverővel történő kevertetés mellett 37°C-on. Ezután többlépcsős centrifugálást követően a sejteket kollagénnel bevont tenyésztőedényekre raktuk le, és 6 napig tenyésztettük. A sejttenyészeteket Giemsa- és immunfluoreszcens festéssel jellemeztük. A tenyésztett sejtek epiteliális eredetének bizonyítására eFluor-ral jelölt pán-citokeratin ellenanyagot alkalmaztunk, a differenciálódás mértékének meghatározására pedig az uroepitél sejteket specifikus, fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált uroplakin III. ellenanyaggal mutattuk ki, valamint a sejtmagokat (DNS) diamidino-fenilindol (DAPI) festéssel jelöltük.

A rövid távú (1 órás) NE-kezeléssel modellezett akut stressz molekuláris hatásainak vizsgálata az újonnan létrehozott macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészetben (II. kísérlet)

A második kísérlet célja az akut, NE kiváltotta stressz molekuláris hatásainak vizsgálata volt a létrehozott sejttenyészetben, amely *in vitro* modellként szolgál a FIC neurohumorális és biokémiai hátterének tanulmányozásához. A sejttizolálás folyamata és a tenyésztési körülmények beállítása az első kísérletben ismertetett protokoll szerint zajlott. A gyulladásos mediátorok (IL-6 és SDF-1), az oxidatív stressz paraméterek (malondialdehid [MDA], 8-hidroxi-2-dezoxiguanozin [8-OHdG], protein-karbonil [PC], glükóz szabályozott fehérje 78 [GRP78], a sejtkárosodás (laktát-dehidrogenáz [LDH]) és a GAG-koncentráció meghatározásához a sejteket 24 lyukú lemezekre raktuk le. Továbbá, 96 lyukú lemezeket alkalmaztunk a sejtek metabolikus aktivitásának mérésére (CCK-8 vizsgálat) és a barrierfunkció jellemzésére használt klaudin-4 koncentráció meghatározásához. A TER méréséhez a sejteket 24 lyukú, nagy sűrűségű poliészter membráninwertekre raktuk le. A második kísérlet során a tenyésztés 6. napján a sejteket 10, 100 és 1000 µmol/l koncentrációjú NE tartalmú keratinocita tápfolyadékkal kezeltük, 37°C-on 1 órán keresztül (n=3/csoport 24 lyukú lemezen és n=6/csoport 96 lyukú lemezen), majd 24 órás regenerációs idő következett (NE-kiegészítés nélküli tenyésztés). A fent említett faktorok és paraméterek mérésére ELISA-teszteket (IL-6, SDF-1, PC, GRP78, 8-OH-dG, klaudin-4), kolorimetriás vizsgálatokat (CCK-8, LDH, MDA, GAG) és EVOM² epithelial Volt/Ohm mérőt (TER) használtunk.

A pulzáló (3x1 órás) NE-kezeléssel modellezett krónikus, intermittáló stressz molekuláris hatásainak vizsgálata macska eredetű primer húgyhólyghámsejt-tenyészetben (III. kísérlet)

A harmadik kísérlet során, a sejtizolálás folyamata és a tenyésztési körülmények beállítása az első- és második kísérletben ismertetett protokoll szerint zajlott. A sejteket a második kísérlettel megegyező koncentrációjú (10, 100 és 1000 $\mu\text{mol/l}$) NE tartalmú keratinocita tápfolyadékkal kezeltük, 37°C-on, azonban az 1 órán keresztül tartó kezelés helyett az NE tartalmú oldatot 3x1 órán át alkalmaztuk, ezzel modellezve a krónikus, visszatérő stresszt ($n=3/\text{csoport}$ 24 lyukú lemezekon és $n=6/\text{csoport}$ 96 lyukú lemezekon). A pulzáló NE kezelések között NE kiegészítés nélküli keratinocita tápfolyadékot alkalmaztunk 1-1 órán keresztül 37°C-on. Az utolsó dózis NE kezelést 24 órás regenerációs idő követte (NE-kiegészítés nélküli tenyésztés). Az NE molekuláris hatásait a sejtek metabolikus aktivitásának (CCK-8) mérésével, valamint az IL-6 és SDF-1 gyulladásos mediátorok, az oxidatív stresszmarker MDA és H_2O_2 tápfolyadékban és a sejtlizátumban mérhető koncentrációinak meghatározásával vizsgáltuk. A stressz barrierfunkcióra gyakorolt hatását a klaudin-4 mennyiségének, a tápfolyadék GAG koncentrációjának, valamint a tenyésztett sejtek TER értékének mérésével vizsgáltuk NE-kezelést követően. A fent említett faktorok és paraméterek mérésére ELISA-teszteket (IL-6, SDF-1, klaudin-4), kolorimetriás (CCK-8, LDH, MDA, GAG) és fluorimetriás (H_2O_2) vizsgálatokat alkalmaztunk, továbbá a TER értékeket EVOM² epithelial Volt/Ohm mérővel mértük.

Statisztika

A statisztikai elemzéshez az R 4.2.2 verziójú szoftvert használtuk (R Core Team, 2022). Az átlagok közötti különbségeket egyváltozós ANOVA segítségével határoztuk meg, és Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztuk a páronkénti összehasonlításokhoz. Az adatok normális eloszlását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. A különbségeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$ -nek bizonyult.

Eredmények és megbeszélés

Új, macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészet létrehozása és jellemzése (I. kísérlet)

Jelen PhD kutatás első kísérlete során sikeresen létrehoztunk és jellemeztünk egy új, macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészetet, amely hasznos modellként szolgálhat a FIC biokémiai hátterének *in vitro* vizsgálatára. Jelenlegi tudásunk szerint a létrehozott sejtmodell az első macska eredetű húgyhólyaghámsejt-tenyészet, amely uroplakin III. kimutatása által igazolva, bizonyítottan tartalmaz differenciált húgyhólyaghámsejteket. Mivel az uroplakinok specifikus uroteliális differenciálódási markerek, ezért az uroplakin III. alkalmas a differenciált húgyhólyaghámsejtek sejt kultúrákban történő jellemzésére. A citokeratinok a hámsejtekre jellemző intermedier sejtfilamentumok, ezért a pozitivitás megerősíti a tenyésztett sejtek epiteliális eredetét. A pán-citokeratin-pozitivitás már a lerakást követő első napon kimutatható volt; az uroplakin-pozitivitás azonban csak 6 nappal a lerakás után jelentkezett, ami arra utal, hogy a tenyésztett húgyhólyaghámsejteknek szükségük van néhány napra a differenciálódáshoz.

A rövid távú (1 órás) NE-kezeléssel modellezett akut stressz molekuláris hatásainak vizsgálata az újonnan létrehozott macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészetben (II. kísérlet)

A második kísérletben vizsgáltuk, hogy van-e közvetlen molekuláris kapcsolat az NE jelenléte és a FIC-ben szenvedő macskák hólyagjában megjelenő elváltozások között. Annak érdekében, hogy megtudjuk, az alkalmazott kezelés képes-e gyulladást, oxidatív stresszt és a barrierfunkció károsodását előidézni a hólyaghámsejtekben, megerősítve ezzel az NE közvetlen szerepét a betegség patogenezisében, vizsgáltuk az akut NE kezelés molekuláris hatásait *in vitro*, az általunk létrehozott macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészetben. Az akut NE expozíciót követően fokozott metabolikus sejtaktivitást, továbbá emelkedett extracelluláris IL-6 és SDF-1 koncentrációkat mértünk, ami az NE közvetlen gyulladást okozó szerepére utal az uroepitél sejtek stresszválasza során. Ezen kívül vizsgáltuk az NE moduláló hatását a tenyésztett sejtek oxidatív állapotára is, és emelkedett PC koncentrációt mértünk; az MDA, a GRP78 és a 8-OHdG koncentrációja azonban nem mutatott szignifikáns növekedést. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az akut NE-kezelés a fehérjék oxidatív károsodása révén oxidatív stresszt idézhet elő anélkül, hogy lipidperoxidációt, endoplazmatikus retikulum stresszt vagy DNS károsodást váltana ki. Vizsgáltuk továbbá az NE uroepitél sejtek barrierfunkciójában betöltött szerepét, és eredményeink alapján elmondható, hogy az akut NE-kezelés képes volt csökkenteni a húgyhólyaghámsejtek *tight junction* sejt-kapcsolatainak kladin-4 fehérjemennyiségét, a tápfolyadék GAG koncentrációját (100 µmol/l NE kezelés esetén) és a tenyésztett sejtek TER értékét (100 és 1000 µmol/l NE kezelés

esetén), utalva arra, hogy az akut NE kezelés csökkentheti az uroepiteliális sejtek barrierintegritását.

A pulzáló (3x1 órás) NE-kezeléssel imitált krónikus, intermittáló stressz molekuláris hatásainak vizsgálata macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészetben (III. kísérlet)

Mivel FIC-es macskákban a tünetek ismétlődő stressz hatására nagyon gyakran kiújulnak, vizsgáltuk, hogy ezek megjelenése összefügg-e az NE ismételt emelkedett jelenlétével, vagy esetleg az uroepitel sejtek képesek alkalmazkodni a krónikus stresszhez. A szakirodalomban számos tanulmány fellelhető, amely leírja, hogy bizonyos sejtípusok hatékonyan adaptálódnak különböző stresszorok tartós jelenlétéhez, például a hepatociták sikeresen alkalmazkodnak a hőstresszhez, vagy az endotélsejtek a mechanikai stresszhez. Korábbi vizsgálatokban leírták, hogy mind az akut, mind a krónikus NE-expozíció képes oxidatív stresszt és emelkedett gyulladásos citokin expressziót előidézni patkány szívizomsejtekben, azonban eddig nem találtunk információt az NE krónikus jelenlétének uroepitel sejtek adaptációjára gyakorolt hatásáról.

Ezért a harmadik kísérletben az időszakosan visszatérő stressz hatásait vizsgáltuk a tenyésztett húgyhólyaghámsejteken, amelyet 3x1 órás NE kezeléssel modelleztünk. Eredményeinket tekintve az ismételt stresszhatásnak kitett sejtek molekuláris válasza hasonló volt az akut kezelés következményeihez: a 3x1 órás NE expozíció megnövekedett extracelluláris SDF-1 termelést eredményezett, azonban az akut kezeléssel ellentétben az IL-6 koncentrációja változatlan maradt, ami arra utal, hogy a FIC krónikus eseteiben az SDF-1 fontosabb szerepet tölthet be a betegség progressziójában, mint az IL-6. Ezen kívül a pulzáló NE-kezelés oxidatív stresszt idézett elő a H₂O₂-termelés fokozásával, és képes volt csökkenteni a húgyhólyaghámsejt-tenyészet barrierintegritását is, a tenyészetek GAG-koncentrációjának, klaudin-4-tartalmának és TER-értékeinek csökkentésén keresztül. Elmondható továbbá, hogy – az akut kezeléssel ellentétben – már az alacsonyabb NE-koncentrációk is képesek voltak csökkenteni a GAG-koncentrációt és a TER-értékeket, ami arra enged következtetni, hogy a tenyésztett uroepitel sejtek érzékenyebbek az ismételt NE-expozícióra, mint az egyszeri akut kezelésre.

Következtetések

A jelen doktori értekezés eredményeit összefoglalva megállapítható, hogy az akut stresszt modellező 1 órás NE kezelés képes volt gyulladásos választ és oxidatív stresszt előidézni, valamint csökkentette a tenyésztett húgyhólyaghámsejtek barrierintegritását. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a stresszel összefüggő NE-felszabadulás fontos közvetítő szerepet játszhat a FIC kórfejlődésében. Továbbá, a krónikus, ismétlődő NE kezelés

is gyulladásszerű választást váltott ki, bár az akut stressz-expozícióhoz képest eltérő gyulladásszerű citokinprofilal; valamint az alkalmazott pulzáló NE kezelés a húgyhólyaghámsejtek oxidatív állapotát és barrierfunkcióját is kedvezőtlenül befolyásolta. Ez alapján megállapítható, hogy a húgyhólyaghámsejtek képtelenek voltak alkalmazkodni az NE tartós jelenlétéhez, ezáltal igazolva, hogy az NE kulcsszerepet játszhat a betegség kórfejlődésében mind az akut, mind a krónikusan visszatérő esetekben is. Továbbá elmondható, hogy a FIC-ben érintett macskák szervezetében mérhető emelkedett NE koncentráció jelenléte közvetlen hatással lehet a hólyagban bekövetkező, tünetekben megnyilvánuló változások kialakulására.

A jelen PhD tanulmány által szolgáltatott új tudományos eredmények hozzájárulnak a FIC patogenezisének és biokémiai hátterének pontosabb megértéséhez; valamint az újonnan létrehozott, macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészet a jövőben hasznos modellként szolgálhat nemcsak a FIC patomechanizmusának, hanem a macskák egyéb húgyúti rendellenességeinek *in vitro* vizsgálatára is.

Új tudományos eredmények

Ad 1,

Sikeresen létrehoztunk, és jellemeztünk egy macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészetet, amely igazoltan tartalmaz differenciált húgyhólyaghámsejteket. A tenyészet jellemzéséhez Giemsa és immunfluoreszcens festést alkalmaztunk. Az újonnan létrehozott sejtenyészet hasznos eszközként szolgál a FIC, és más, húgyhólyagot érintő betegségek biokémiai hátterének *in vitro* tanulmányozására.

Ad 2,

A rövid távú (1 órás) NE kezeléssel modellezett akut stressz képes volt növelni a tenyésztett uroepiteliális sejtek metabolikus aktivitását, továbbá emelte különböző gyulladási mediátorok, mint az IL-6 és az SDF-1 extracelluláris koncentrációját, megerősítve, hogy az NE képes gyulladási választ kiváltani az uroepitéliumban. Az NE kezelés növelte az oxidatív stresszmarker PC mennyiségét, míg az MDA, 8-OHdG és GRP78 koncentráció nem nőtt, ami arra utal, hogy az NE a fehérjék oxidatív károsodását okozhatja lipidperoxidáció, DNS-károsodás vagy endoplazmatikus retikulum stressz nélkül. Továbbá, az akut NE kezelés a csökkent TER értékek alapján csökkentheti az uroepiteliális sejtek barrierfunkcióját, a GAG koncentráció és a klaudin-4 fehérjeexpresszió csökkentésén keresztül. Így elmondható, hogy a betegség során felszabaduló NE valószínűleg fontos szabályozó szerepet tölt be a betegség kórfejlődésében.

Ad 3,

A pulzáló (3x1 órás) NE-kezeléssel modellezett krónikus intermittáló stressz szintén képes volt gyulladási választ és oxidatív stresszt kiváltani az uroepitel sejtekben az SDF-1 és a H₂O₂ koncentrációnak növelésén keresztül. Emellett az akut stressz-expozícióhoz hasonlóan az NE növelte az uroepitélium permeabilitását, amire a csökkent GAG-koncentráció, klaudin-4 mennyiség és TER-értékek utalnak. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a hólyaghámsejtek nem képesek alkalmazkodni az ismétlődően emelkedett NE jelenlétéhez, ami tovább erősíti az NE fontos szerepét a FIC patogenezisében.

Saját tudományos közlemények

Az értekezés témájában megjelent tudományos közlemények

Hatala, P., Lajos, A.; Orbán, K., Kulcsár, A.; Mátis, G.; Neogrády, Zs.: **Neurohumoral and biochemical background of feline idiopathic cystitis.** *Magyar Állatorvosok Lapja* 142:367–376, 2020. (Impakt faktor: 0,143)

Hatala, P.; Lajos, A.; Mackei, M.; Sebők, C.; Tráj, P.; Vörösházi, J.; Neogrády, Z.; Mátis, G.: **Feline Uroepithelial Cell Culture as a Novel Model of Idiopathic Cystitis: Investigations on the Effects of Norepinephrine on Inflammatory Response, Oxidative Stress, and Barrier Function.** *Veterinary Sciences*, 10, 132. 2023. (Impakt faktor: 2,4)

Hatala P., Sebők C, Mackei M, Kárpáti K, Gálfi P, Neogrády Z, Mátis G. **Molecular effects of intermittent stress on primary feline uroepithelial cell culture as an *in vitro* model of feline idiopathic cystitis.** *Frontiers in Veterinary Science*, 6;10:1258375, 2023. (Impakt faktor: 3,471)

Nemzetközi konferencián történő részvétel (előadás vagy poszter prezentáció formájában)

Hatala, P.; Lajos, A.; Orbán, K.; Mátis, G. and Neogrády, Zs. **Investigating the inflammatory effect of noradrenaline in a feline urinary bladder cell culture.** Clinical/Research Abstracts Poster Presentation at ISFM European Feline Congress, Cavtat, Croatia 2019.

Magyarországi konferencián történő részvétel (előadás vagy poszter)

Hatala Patrícia, Lajos Andrea, Mackei Máté, Orbán Kata, Kulcsár Anna, Neogrády Zsuzsanna, Mátis Gábor: **Macskák ismeretlen oktanú cisztitiszének biokémiai háttere**, MTA Akadémiai beszámoló, 2019. január, Budapest

Hatala Patrícia, Kárpáti Karina, Sebők Csilla, Mackei Máté, Mátis Gábor és Neogrády Zsuzsanna: **Az intermittáló stressz molekuláris hatásainak vizsgálata macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészetben**, MTA Akadémiai beszámoló, 2024. január, Budapest

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó tudományos közlemények

Mátis Gábor, Hatala Patrícia, Kulcsár Anna, Kulcsárné Petrilla Janka, Neogrády Zsuzsanna **A Kupffer-sejtek szerepe a máj gyulladásos és metabolikus folyamatainak szabályozásában: Irodalmi áttekintés: Role of Kupffer-cells in the regulation of hepatic inflammatory and metabolic processes** *Magyar Állatorvosok Lapja* 137:(9) pp. 569-575, 2015.

Nemzetközi konferencián történő részvétel (előadás vagy poszter prezentáció formájában)

Anna Kulcsár, Dénes Dudás, Gábor Mátis, Patrícia Hatala, Hedvig Fébel, Zsuzsanna Neogrády **The effect of age and diet type on the hepatic and intestinal CYP activity in broiler chicken** XVth European Poultry Conference, Dubrovnik, Horvátország, 2018.

Gábor Mátis, Anna Kulcsár, Patrícia Hatala, Máté Mackei, Zsuzsanna Neogrády **Investigations on the effects of heat stress on hepatic cell culture models of chicken origin** XVth European Poultry Conference, Dubrovnik, Horvátország, 2018.

Magyarországi konferencián történő részvétel (előadás vagy poszter)

Kulcsár Anna, Sebők Csilla, Mátis Gábor, Talapka Petra, Hatala Patrícia, Petrilla Janka, Fébel Hedvig, Neogrády Zsuzsanna **Az inzulin és a glukagon jelpálya különböző takarmányozási faktorok segítségével történő szabályozása brojlercsirkében** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2018.

Mátis Gábor, Kulcsár Anna, Hatala Patrícia, Tóth Adrienn, Mackei Máté, Neogrády Zsuzsanna **A T-2 toxin sejtkárosító hatásainak összehasonlító vizsgálata csirke primer bélhámsejt- és májsejttenyészetben** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2018.

Mátis Gábor, Kulcsár Anna, Kulcsárné Petrilla Janka, Hatala Patrícia, Kővágó Csaba, Neogrády Zsuzsanna **Bakteriális lipopoliszacharidok által kiváltott gyulladás vizsgálata sertés hepatocita – Kupffer-sejt ko-kultúra modellen** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2015.

Mátis Gábor, Kulcsár Anna, Kulcsárné Petrilla Janka, Hatala Patrícia, K_vágó Csaba, Csikó György, Neogrády Zsuzsanna **A Kupffer-sejtek arányának meghatározása sertés primer májsejttenyészetben** MTA Akadémiai Beszámoló, Budapest, Hungary, 2014.

Diplomamunka témavezetés

Sebők Csilla: **Egyes takarmányozási faktorok inzulin jelpályára gyakorolt hatásának vizsgálata brojlercsirkében** TDK dolgozat, témavezetők: Kulcsár Anna, Hatala Patrícia, Budapest, 2017.

Lajos Andrea: **A noradrenalin gyulladáskeltő hatásának vizsgálata macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészetben** TDK dolgozat, témavezetők: Hatala Patrícia, Mátis Gábor, Budapest, 2018

Kárpáti Karina: **A krónikus stressz molekuláris hatásainak vizsgálata macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészetben** TDK dolgozat, témavezetők: Hatala Patrícia, Mátis Gábor, Budapest, 2023

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném kifejezni legnagyobb köszönetemet és őszinte elismerésemet témavezetőimnek, **Dr. Neogrády Zsuzsannának**, minden segítségéért, motivációjáért és a közös munkánk során belém vetett hihetetlen és kitartó bizalmáért, valamint **Dr. Mátis Gábornak**, aki az egyik legokosabb és legkedvesebb ember, akit ismerek, aki TDK témavezetőként már egyetemi éveim alatt bevezetett a kutatómunka szépségeibe, minden segítségéért és reális szemléletéért a közös munkánk során. Különösen hálás vagyok az évek során töretlen, abszolút türelmükért és pozitív energiájukért.

Köszönetet szeretnék mondani kollégáimnak és valamennyi korábbi munkatársamnak a Biokémiai Osztályon, akik nélkülözhetetlen módon segítettek az elmúlt évek során: **Dr. Kulcsár Annának**, aki sokat tanított nekem a statisztikáról, valamint számos, a manuális laboratóriumi munkában hasznos gyakorlatot segített elsajátítani; **Dr. Mackei Máténak**, akivel mindig öröm volt együtt dolgozni, legyen szó laboratóriumi munkáról vagy a PhD képzés előadásairól, és akinek mindig volt ideje egy kis brainstormingra velem; **Dr. Papp-Sebők Csillának**, amiért remek csapattárs volt nemcsak kollégaként, hanem már TDK hallgatóként is egyetemi éveim alatt, valamint a statisztikai elemzésben nyújtott segítségéért; **Dr. Orbán Katának**, **Vörösházi Júliának**, **Dr. Tráj Patriknak** és **Dr. Márton Regének** a laboratóriumi mérésekben nyújtott kedves, nélkülözhetetlen segítségükért.

Nagyon hálás vagyok asszisztenseinknek, **Tolnainé Hinka Mártának** és **Petrovics Gabriellának**, elengedhetetlen segítségükért a laboratóriumi eszközök és háttérmunka terén, valamint titkárnőnknek, **Seprődi Júliának** az adminisztratív munkáért, és azért, hogy mindig kedves, bátorító szavakkal fordult hozzám.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Bartha Tibornak**, hogy bekapcsolódhattam a Tanszék kutatómunkájába. Külön köszönet illeti **Szikora Zsuzsannát**, aki mindig tudta, mi hol van és mi hogy működik, illetve mindig gyors és professzionális segítséget nyújtott.

Az extracelluláris hidrogén-peroxid koncentráció fluorimetriás méréseihez a Victor X2 olvasót, valamint a transzepiteliális elektromos ellenállás méréseihez az EVOM² epithelium Volt/Ohm mérőt a Gyógyszertani- és Méregtani Tanszék biztosította számunkra. Nagyra értékelem a tanszék kollégáinak kedves segítségét a kutatási projekt minden fázisában. Név szerint szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Gálfi Péternek**, **Dr. Farkas Orsolyának** és **Dr. Kóvágó Csabának**.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Palavet Állatorvosi Rendelőnek, név szerint **Dr. Pallagi Attilának** és **Dr. Kántás Zsófiának** a közreműködésükért, rugalmasságukért és szakmai segítségükért.

Külön köszönetet szeretnék mondani tudományos diákköri hallgatóimnak: **Dr. Lajos Andreának**, aki nemcsak a diákom volt munkánk során, hanem barátommá is vált, és **Kárpáti Karinának** a kemény munkájukért és lelkesedésükért.

Nagyon hálás vagyok középiskolai tanáraimnak is, kémia tanáromnak, **Dr. Borissza Endrének**, aki miatt beleszerettem a biokémiába, valamint osztályfőnökömnek és biológia tanáromnak, **Czédulás Katalinnak**, akitől kritikus, realiztikus, független gondolkodást tanultam.

Végül, végtelen hálám fejezem ki családomnak és barátaimnak, különösen férjemnek, **Dr. Kiss Bencének**, aki mellettem állt a legnehezebb időkben, bátorított, támogatott és gondoskodott gyönyörű gyermekeinkről, nyugalmat biztosítva nekem a disszertációírás hosszú órái alatt, valamint csodálatos gyermekeimnek, akik mindig felvidítottak és délutánonként békésen aludtak, segítve ezzel a munkámat.

Ezt a tanulmányt a Magyar Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal NKFIH támogatta, az 124586-os számú pályázat keretében; továbbá a munka létrejöttéhez az OTKA-FK, 134940-es számú pályázata is hozzájárult. A projekt részben az Állatorvostudományi Egyetem, IK-UK-2017, 49P11AIO3-as számú pályázatának finanszírozásával készült.