



Állatorvostudományi Egyetem

Élettani és Biokémiai Tanszék

Biokémiai Osztály

**A krónikus stressz molekuláris hatásainak
vizsgálata macska eredetű primer
húgyhólyaghámsejt-tenyészetben**

Készítette: Kárpáti Karina

Témavezetők: Dr. Hatala Patrícia

PhD hallgató

Dr. Mátis Gábor

egyetemi docens

Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés	5
Célkitűzések	6
Irodalmi áttekintés	7
A húgyhólyaghám felépítése	7
A gyulladás folyamata	8
Az IL-6, SDF-1 és az oxidatív stressz szerepe a gyulladásban	9
A FIC (feline idiopathic/interstitial cystitis).....	11
<i>Kórélettani alapok</i>	11
<i>Kórfejlődés és a noradrenalin szerepe a kórképben</i>	13
<i>A FIC-re jellemző tünetek</i>	15
<i>Diagnosztika</i>	15
<i>A kezelés lehetőségei</i>	16
Az <i>in vivo</i> és az <i>in vitro</i> modellek összehasonlítása.....	17
Anyag és módszer.....	19
Kísérleti állatok	19
Reagensek.....	19
A sejtek izolálása és tenyésztése	19
A sejtenyészetek kezelése.....	20
A sejtkárosodás mértékének vizsgálata	21
A sejtek redox állapotának vizsgálata	21
IL-6 és SDF-1 gyulladásos mediátorok mennyiségi vizsgálata macskaspecifikus ELISA-tesztrel.....	22
A húgyhólyag hámsejtek barrier funkciójának vizsgálata.....	23
Statisztika	24
Eredmények	25

A sejtkárosodás mértékének vizsgálata	25
A sejtek redox állapotának vizsgálata	25
Az IL-6 és az SDF-1 gyulladásos mediátorok mennyiségi vizsgálata macskaspecifikus ELISA-teszttel	26
A húgyhólyag hámsejtek barrier funkciójának vizsgálata.....	28
Pearson's féle korrelációs teszt.....	29
Megbeszélés és következtetések.....	30
Összefoglaló	34
Irodalomjegyzék	35
Köszönetnyilvánítás	40

Rövidítések jegyzéke

ACTH = adrenocorticotropic hormone,
adrenokortikotróp hormon

CRF = corticotropin releasing factor,
kortikotropin felszabadító hormon

DMMB = 1,9-dimetil-metilénkék

EDTA = etilén-diamin-tetraecetsav

ELISA = enzyme-linked immunosorbent
assay, enzim kapcsolt immunoszorbens
vizsgálat

FBS = foetal bovine serum, magzati
borjúsérum

FIC = feline idiopathic cystitis, macskák
idiopátiás húgyhólyaggyulladás

FLUTD = feline lower urinary tract
disease, macskák alsó húgyúti
megbetegedései

FUS = feline urologic syndrome, macskák
húgyúti szindrómája

GAG = glükózaminoglikán

HEPES = N-2-hydroxyethylpiperazine-N-
2-ethane szulfonsav

HRP = horseradish peroxidase,
torma-peroxidáz

IC = intersticiális cisztitisz

IFN = interferon

IL = interleukin

LDH = laktát dehidrogenáz

LUT = lower urinary tract, alsó húgyutak

MDA = malondialdehyd

MEM = minimal essential medium

MEMO = multimodal

environmental modification,

multimodális környezeti modifikáció

M-PER = mammalian protein extraction
reagent

NE = norepinephrine, noradrenalin

NOX = nikotinamid-adenin-dinukleotid-
foszfát oxidáz

P = tévedési valószínűség

PBS = phosphate buffered saline,
foszfáttal puffertolt sóoldat

PBS = painful bladder syndrome,
hólyagfájdalom szindróma

RNS = reactive nitrogen species, reaktív
nitrogén gyök

ROS = reactive oxygen species, reaktív
oxigén gyök

SDF-1 = stromal cell-derived factor-1,
stromasejtekből származó 1-es faktor

SNS = sympathetic nervous system,
szimpatikus idegrendszer

SOD = szuperoxid dizmutáz

SP = substance P

TBS = Tris-buffered saline

Trissel puffertolt fiziológias sóoldat

TCA = triciklikus antidepresszánsok

TER = transzepitheliális elektromos
rezisztencia

TNF = tumor nekrosis faktor

UP = uroplakin

Bevezetés

Kutatásunk során a krónikus, intermittáló noradrenalinkezelés molekuláris hatásait vizsgáltuk macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészetben, a krónikus stressz FIC kórfejlődésében betöltött szerepének megismerése céljából.

Korábbi kutatások alapján valószínűsíthető, hogy a krónikus stressz, mint környezeti tényező fontos szerepet játszhat a tünetek kialakulásában és kiújulásában, ezért jelen TDK munka során vizsgálni kívántuk a noradrenalin – mint a kórkép során legfontosabb stresszhormon – FIC kórfejlődésében betöltött szerepét.

Mivel a betegség komplex kórkép, melynek kialakulásában számos faktor és szervrendszer (az idegrendszer, a hormonrendszer és a vizeletkiválasztó- és elvezető rendszer) is szerepet játszik, fontos, hogy a stressz szerepét az említett faktorok hatásától elkülönítve, célzottan vizsgáljuk, melynek megfelelő eszköze egy macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészet, mint a betegség *in vitro* modellje [90].

Célkitűzések

Célkitűzésünk a macskák alsó húgyúti megbetegedését okozó leggyakoribb kórképnek, a FIC kórfejlődésének alaposabb megismerése volt. Mivel korábbi kutatásunk során igazolódott, hogy az akut stressz hatására felszabaduló noradrenalin képes közvetlenül gyulladást, oxidatív stresszt és barrier funkció csökkenést kiváltani macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészetben, illetve mivel a betegségben érintett állatokban a tünetek gyakran egy éven belül többször kiújulnak, kíváncsiak voltunk, hogy a noradrenalin intermittáló, krónikus jelenléte hasonló molekuláris változásokat okoz-e, mint az akut jelenlét, vagy a húgyhólyaghámsejtek esetleg képesek alkalmazkodni a hormon tartós jelenlétéhez. Ezért a krónikus stressz molekuláris hatását macska eredetű primer húgyhólyaghámsejteken vizsgáltuk. Az *in vitro* modell létrehozásához uroepithel sejteket gyűjtöttünk egy végleges elaltatásra került macska húgyhólyag nyálkahártyájáról, melyeket ezután ezután a kutatócsoportunk által korábban kidolgozott protokoll alapján hat napig tenyésztettünk.

TDK munkám egyik központi kérdése a noradrenalin krónikus intermittáló jelenlétének gyulladásban betöltött szerepe. Ennek vizsgálatára a létrehozott sejttenyészeteket 10, 100 és 1000 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú noradrenalin oldatokkal kezeltük háromszor egy órán keresztül, majd vizsgáltuk az IL-6 és SDF-1 gyulladást közvetítő mediátorok mennyiségét mind a sejtek lizátumában, mind a sejttenyészetek tápfolyadékában enzim kapcsolt immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) módszerének segítségével. Ezen kívül vizsgáltuk a noradrenalin redox folyamatokra gyakorolt hatását a sejtek MDA és hidrogén-peroxid termelésének meghatározásával, illetve sejtingegritásra kifejtett hatását GAG, claudin-4 koncentrációk nyomon követésével és TER mérések segítségével. A kezelés által kiváltott sejtkárosodás kizárásának céljából a tápfolyadék laktát-dehidrogenáz (LDH) enzimaktivitását határoztuk meg.

Irodalmi áttekintés

A húgyhólyaghám felépítése

A húgyszervek feladata a vizelet kiválasztása, tárolása és a szervezetből való eltávolítása, ezáltal a szervezet homeosztázisának fenntartása. A vizelet kiválasztásáért felelős szerv a vese, míg az exkrétum összegyűjtésének és elvezetésének feladatát a vesemedence, a húgyvezetők, a húgyhólyag és a húgycső látja el. A húgyhólyag (*vesica urinaria*) a vizelet időszakos gyűjtésére szolgáló, nyálkahártyával bélelt, tágulékony falú szerv [1]. Nyálkahártyája az urothelium, vagy uroepithelium, mely egy különleges átmeneti hám [2]. Az uroepithelium, mint vizelettel érintkező felület barriert képez a húgyhólyag lumene és a submucosalis szövetek között. Ez a magas ellenállású barrier az ionok, oldott anyagok, toxikus metabolitok, víz szabad áramlásának gátat vet, és a különböző patogének bejutását is megakadályozza. Uroepithelium béleli ezen kívül a vesemedencét, a húgyvezetékét, a húgycső felső harmadát és a prosztatata mirigyes csatornáit [3]. Ez a speciális hám három rétegből áll: a kötőszövethez (*lamina propria*) kapcsolódó, egy sejtréteg vastagságú, kis méretű bazális sejtek rétege, ezt követi a lumen felé haladva az átmeneti sejtekből álló intermedier réteg, mely egy vagy több rétegben tartalmaz körte alakú, piriform sejteket, végül pedig apikálisan az esernyősejtek rétege [4]. Az esernyősejtek nagy méretű, jellegzetes hexagonális alakú sejtek melyek a bazális membránhoz vékony nyúlványok formájában képesek kapcsolódni [5]. Ezek a sejtek jellegzetes, sejtmembránban integrált fehérjékkel rendelkeznek, ezek az uroplakinok (UP) melyek négy fő családba sorolhatók [6]. Funkciójukat tekintve az uroplakinoknak fontos szerepe van az uroepithelium fizikai integritásának, illetve barrier funkciójának fenntartásában [7].

Az esernyősejtek között szoros sejtösszeköttetések találhatóak, melyeket *tight junction*-nak nevezünk, és amelyek a paracelluláris ion és molekula transzport gátlásával fontos szerepet töltenek be a húgyhólyaghám barrier funkciójában [8]. A *tight junction* kapcsolatok transzmembrán fehérjék, citoplazmatikus fehérjék és citoskeletális komponensek sűrű hálózatából állnak [9]. Ilyen transzmembrán fehérjék a claudinok is, melyek a *tight junction* permeabilitás specificitását szabályozzák. Ezek a fehérjék a kisméretű ionok átjutását teszik lehetővé úgy, hogy funkcionálisan töltés szelektív ioncsatornákként működnek [10]. Méretüket tekintve a claudinok 20 és 27 kD tömegűek, és négy transzmembrán alegységből épülnek fel [11]. Irodalmi adatok alapján emlősökben a fehérjecsaládot 27 féle transzmembrán protein alkotja [12]. Egy korábbi kutatás eredményei alapján elmondható, hogy a húgyhólyag szöveteiben megtalálható claudinok közül a

legfontosabbak a claudin -4, -8, és -12, melyek az esernyősejtek barrier funkciójáért is felelnek [9].

A hámszövetek - így az uroepithelium is - képes változtani saját paracelluláris permeabilitását fiziológiai szükségleteinek és patológiai állapotának megfelelően. Ezt a permeabilitási fokot tudjuk a traszepitheliális elektromos rezisztencia (TER) mérésének segítségével meghatározni [13], amely meghatározási mód igen elterjedt és könnyen kivitelezhető azon *in vitro* kísérletek esetében, melyek az epithelialis sejtek kapcsolódásának szorosságára irányulnak [14]. Az uroepithelium az egyik legellenállóbb, fiziológiás körülmények között legmagasabb ($70.000 \Omega\text{cm}^2$) TER értékkel rendelkező hámtípus, és ebben többek között a szerv belső felszínét borító glükózaminoglikán (GAG) rétegnek is fontos szerepe van [15].

GAG réteg borítja az alsó húgyutak (lower urinary tract, LUT) luminális felszínét, fontos szerepe van a húgyhólyag és a húgycső védelmében, sérülése pedig már önmagában, anatómiai sérülés nélkül is rendkívüli mértékben növeli a húgyhólyaghám permeabilitását [16]. Ezek a makromolekulák védelmi funkcióval rendelkeznek és a GAG réteg alatt található húgyhólyag uroepitheliumot védik a bakteriális fertőzésektől, a relatív magas só, ion és kristály koncentrációktól [17]. Mennyiségének és minőségének változása egyaránt hajlamosító tényező lehet különböző húgyszervi megbetegedésekben, mint a humán intersticiális cisztitisz vagy akár a macskák idiopatikuss húgyhólyaggyulladás (feline idiopathic cystitis, FIC) [18].

Ezen információk ismeretében elmondható, hogy a vizelet és a szervezet közötti védelmi gát legfontosabb komponensei az esernyősejtek közötti *tight junction* kapcsolatok, az uroplakin fehérjék, illetve a poliszacharidokból álló GAG réteg, melyek együttes jelenléte a húgyszervekben útját állja a vizelet toxikus komponenseinek és különféle mikroorganizmusok szervezetbe jutásának, karcinogének terjedésének és az ezek által okozott kórképek kialakulásának [19].

A gyulladás folyamata

A gyulladás a szervezet fontos védőmechanizmusa, melynek célja a szövetsérülés helyreállítása és a kórokozó mikroorganizmusok káros hatásának elszigetelése, megszüntetése. Klinikai jellemzői a gyulladt szövet kipirulása, melegsége, duzzanata, fájdalma és ezáltal az adott szerv funkcióvesztése. Kialakulásában mind a veleszületett mind az adaptív immunrendszer szerepet játszik, de alapvetően a veleszületett immunrendszer reakciója. A gyulladásos válasznak két típusát különítjük el, az akut és a krónikus gyulladást.

Az akut gyulladást vaszkuláris és celluláris eseményekre oszthatjuk. A vaszkuláris folyamatok rövidesen a szövetsérülést illetve mikrobiális fertőzést követően megindulnak, és vazodilatációhoz illetve következményes permeabilitás fokozódáshoz vezetnek. Ez a folyamat okozza a gyulladt terület ödémás duzzanatát [20]. A celluláris események legfontosabb feladata a leukocyták gyulladás helyére való eljuttatása, hogy azok a nekrotikus szöveteket és fertőző ágenseket elpusztíthassák [21]. Az immunsejtek kilépnek a fokozott áteresztőképességű érfalon és a gyulladás helyére vándorolnak, ahol bekövetkezik aktivációjuk. A gyulladás önkorlátozó folyamat. Amennyiben a gyulladást kiváltó ok nem szűnik meg, a gyulladás állandósul és krónikus gyulladás jön létre. A veleszületett immunrendszer indítja meg az akut gyulladást immunválaszt és citokintermelés révén stimulálja az adaptív immunitás effektor sejtjeit [22].

A citokinek kisméretű, fehérje természetű molekulák melyeknek a sejtek közötti interakciókban és kommunikációban van fontos szerepük. Fontosabb citokinek például az interferonok (IFN), a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF-alfa), és az interleukinek (IL). Utóbbiak leginkább a fehérvérsejtekben termelődnek és azokon is hatnak [23]. A citokinek családjába tartoznak a kemokinek is, melyek a celluláris migráció irányításáért felelős fehérjék. A kemotaktikus citokin elnevezés is utal funkciójukra, ami az immunsejtek vándorlásának megindítása gyulladás vagy sérülés helyszínére [24].

Az IL-6, SDF-1 és az oxidatív stressz szerepe a gyulladásban

Az IL-6 a gyulladás helyén termelődik és kulcsfontosságú szerepet tölt be a gyulladás akut fázisának kialakításában. Hatására keletkeznek az akut fázis fehérjék, szerepe van a láz kiváltásában és segíti az antigén specifikus limfociták differenciálódását [25]. Az IL-6 szolubilis receptorával, az sIL-6R-alfával komplexet képezve képes az akut gyulladást krónikus jellegűvé alakítani. Ezt a hatást azáltal éri el, hogy megváltoztatja az erekből kilépő gyulladást exsudátum összetételét és az akut fázisra jellemző polimorfonukleáris neutrofil granulocytá helyett a krónikus fázisra jellemző monocytá és makrofág túlsúlyt eredményez [26]. Befolyásolja a szérumban cink és vas koncentrációját ezek transzportereinek kontrollálásával [27]. Az IL-6 a csontvelőben is kifejti hatását, promótálja a megakaryocyták érését és növeli a vérlemezke számot [28]. Ezek a hematológia és biokémiai eltérések a vérképben gyulladásra utaló jelek a rutin klinikai laboratóriumi vizsgálatok során [29]. A gyulladást folyamatok jelenlétéről közvetlenül az IL-6 koncentrációjának mérésével is információt nyerhetünk.

A stromasejtekből származó 1-es faktor (stromal cell-derived factor, SDF-1) vagy más néven CXCL12 egy pro-inflammatorikus citokin ami kemotaktikus szerepet tölt be. Legismertebb feladata a hemopoetikus őssejtek migrációjának elősegítése a csontvelőbe és ezáltal az ott képződő immunsejtek fejlődésének biztosítása [30]. Az SDF-1 receptora a kemokin receptor 4 (CXCR4), ami egy hét transzmembrán alegységből álló, G-protein kapcsolt receptor [31]. Mind az SDF-1, mind a receptora létfontosságúak a megfelelően funkcionáló B-sejtek kialakulásában [32]. Emellett az említett kemokin *in vivo* és *in vitro* körülmények között vizsgálva angiogenetikus aktivitással is rendelkezik [33, 34].

Oxidatív stressznek nevezzük azt a jelenséget, mikor felborul az intracelluláris egyensúly a szabadgyökök és reaktív metabolitok keletkezése, illetve antioxidánsok általi eliminációja között. Ez az imbalansz különböző biomolekulák, sejtek és szövetek károsodásához vezet. Ezek a prooxidánsnak vagy reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species, ROS) nevezett molekulák a normál sejt metabolizmusa során keletkeznek aerob körülmények között többek közt a mitokondriális légzési láncban. Ilyen molekulák például szuperoxid-anion (O_2^-), a hidrogén-peroxid (H_2O_2) és a hidroxilgyök ($OH^\bullet$) [35]. Hypoxiás körülmények között a mitokondrium membránrendszerén nitrogén-monoxid keletkezik, ami kiindulási molekulája a reaktív nitrogén gyökök képződésének (reactive nitrogen species, RNS) [36]. A ROS és RNS eliminációját és neutralizációját olyan protektív enzimek végzik, mint a szuperoxid-dizmutáz, a kataláz, glutation-peroxidáz de hasonló szerepe van bizonyos vitaminoknak és fehérjéknek is [37].

Oxidatív stressz hatására károsodások keletkeznek a fehérjékben, lipidekben illetve az örökítőanyagban is, és ezek a változások károsíthatják a sejtek struktúráját és funkcióját, emellett sejthalálhoz vezethetnek [38]. A gyulladás és az oxidatív stressz közötti kapcsolat megismerésére már számos kutatás irányult, és e kutatások során bebizonyosodott, hogy az oxidatív stressz patogenetikus szerepet tölt be a krónikus gyulladások kialakulásában [39]. A gyulladás során a makrofágok és neutrofil granulocyták nagy mennyiségben termelnek olyan reaktív oxigén származékokat, mint a hidrogén-peroxid (H_2O_2). A hidrogén-peroxid intracellulárisan, a NADPH-oxidáz (NOX) hatására keletkezik ezekben az immunsejtekben [40]. Oxigén jelenlétében a mitokondriumban található NADPH-oxidáz enzimek a molekuláris oxigént szuperoxiddá (O_2^-) alakítják, miközben a NADPH-ből oxidáció során $NADP^+$ keletkezik [41]. A molekuláris oxigénből egy elektron felvételével keletkezett szuperoxid ezután gyorsan átalakul hidrogén-peroxiddá szuperoxid-dizmutáz 1 (SOD1) és 2 (SOD2) enzimek által [42]. A keletkezett H_2O_2 fém kationokkal (Fe^{2+}) reagálva hidroxilgyökké alakul, amely telítetlen zsírsavaktól elektronok elvonására képes, ezáltal

pedig beindítja a lipidperoxidáció sejtkárosító láncreakcióját [43]. A lipidperoxidáció során malondialdehid (MDA) keletkezik a többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációjának végtermékeként. Ez a molekula az oxidatív stressz mérésének egyik fontos markere [44].

A FIC (feline idiopathic/interstitial cystitis)

Kórélettani alapok

A macskák ismeretlen oktanú húgyhólyaggyulladás a társállatként tartott macskafélék széleskörben előforduló megbetegedése. Az alsó húgyúti megbetegedések (feline lower urinary tract disease, FLUTD) családjába tartozó tünetegyüttes gyakran fordul elő kisállatklinikák pácienseinek körében és a macskatartók számára kellemetlen tünetei miatt a menhelyre vagy eutanáziára kerülő állatok számát is jelentősen növeli egyes kutatások alapján [45]. A gyakori előfordulása és az elhagyott macskák számának jelentős növekedése miatt régóta kutatott megbetegedés a mai napig sok állatorvost és kutatót foglalkoztató téma. Korábban, a hetvenes években minden alsó húgyúti szervet érintő betegségre, így az idiopathiás húgyhólyaggyulladásra is a macskák húgyúti szindrómájaként (feline urologic syndrome, FUS) hivatkoztak [46]. Emellett a szakirodalomban Pandora-szindrómaként is említik, hiszen egyéb szervrendszerekhez kapcsolódó (gasztrointesztinális traktus, keringés, központi idegrendszer, endokrin rendszer, bőr), komplex klinikai tünetekben manifesztálódhat, illetve viselkedésbeli rendellenességeket is okozhat [47].

A húgyutak alsó hányadának betegségei macskákban olyan jellegzetes tüneteket produkálnak, mint a fájdalmas, nehezített vizeletürítés (stranguria), véres vizelet (hematuria), alomtálcán kívülre vizelés (periuria) és többször kis mennyiségű vizelet ürítése (pollakisuria). Hasonló tüneteket olyan egyéb kóroki tényezők is okozhatnak, mint például a húgykőesség, bakteriális húgyúti fertőzések, anatómiai rendellenességek vagy neoplasztikus növedékek. Amennyiben diagnosztikai eljárások ezeket az egyéb kórokokat nem igazolják, kizárásos diagnózis révén igazolódik be a FIC gyanúja [48].

Ez a kórkép az alsó húgyúti betegségben szenvedő állatok közel kétharmadát érinti [49]. A FIC-el analóg humán megbetegedés, az intersticiális cisztitisz (IC) vagy hólyagfájdalom szindróma (painful bladder syndrome, PBS), leggyakrabban nőket érintő kórkép, ami fájdalmas, nehezített és gyakori vizeletürítési gondokkal jár. Az IC és a macskák húgyhólyaggyulladásának klinikai hasonlósága miatt a FIC a rágcsálókkal szemben preferált modell erre a betegségre [50]. A kórkép gyanúja esetén végzett cisztoszkópiai vizsgálattal látható karakterisztikus, petechiális vérzések a submucosában beigazolnák a macskák intersticiális húgyhólyaggyulladását, ám ezt a vizsgálati módszert ritkán végzik el FIC-ben

szenvedő állatok esetén [51]. Habár az elmúlt harminc évben végzett kutatások nem találtak konzisztens okot a gyulladás kialakulására, az érintett macskák biopsziás mintáinak kórszövettani vizsgálatai nagyban segítették a kórkép megismerését. Ép szerkezetű epithelium, submucosalis ödéma és vazodilatáció látható ezekben a mintákban a gyulladásos filtrátum pedig hízósejtekben gazdag. Emellett az elvégzett biopsziák gyakran derítenek fényt C-rostok és fájdalom érzékelő receptorok (substance P receptorok) nagyszámú jelenlétére [52].

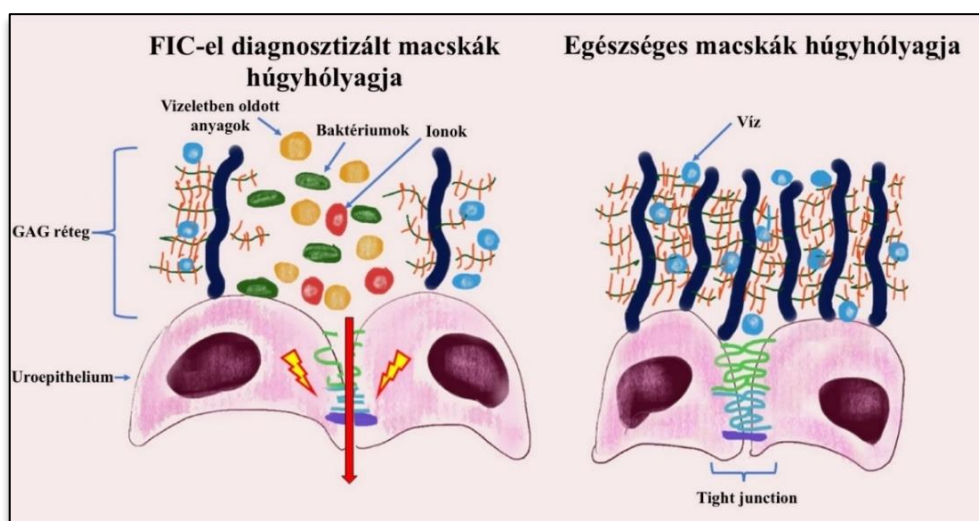
A FIC-nek két formája ismeretes: az obstruktív, húgyutak elzáródásával járó és a nem obstruktív forma. Utóbbi a domináns, gyakoribb formája a kórképnek és három formában nyilvánulhat meg. Egy egyszeri, akut, látszólag önmagát limitáló epizódként, ez az esetek 80%-ra jellemző. Annak ellenére, hogy a FIC-es macskák által produkált klinikai tünetek pár nappal a jelentkezésüket követően, önkorlátozó módon, kezelés nélkül elmúlnak a tünetek visszatérése nagyon gyakori. Korábbi kutatások bebizonyították, hogy az akut kórformában szenvedő egyedek 50%-nál ismételt stressz hatására egy éven belül visszaesés jelentkezik, ami a beteg állatok stresszel szembeni megváltozott válaszkészségére vezethető vissza [53]. A másik két típus ritkábban, csupán az esetek 2-15%-ban jelentkezik, ezek pedig gyakran visszatérő epizódok, illetve perzisztens formák lehetnek [54].

A FIC-re hajlamosító tényezők megismerésére irányuló kutatások szerint a leggyakrabban érintett csoport a hím, középkorú (2-7 éves), túlsúlyos macskák [55–57]. Fontos rizikó faktorok a kórkép kialakulásában a megváltozott környezeti tényezők, az étrend, a macskák életvitele és tartásmódja mellett a stressz jelenléte az érintett egyedek életében [58, 59]. Amennyiben a vizsgált macskák rövid vagy hosszú távon szokatlan, kiszámíthatatlan, stresszorként szolgáló környezeti ingereknek voltak kitéve a FIC előfordulása megnövekedett [60]. Több vizsgálat során is beigazolódott az a feltételezés, hogy az ivartalanításon átesett macskák körében nagyobb valószínűséggel alakul ki a FIC [61, 62, 63], de olyan összefüggéseket is publikáltak már a kórképpel kapcsolatban, hogy a hosszú szőr vagy éppen a fajtatiszta tenyésztés is hajlamosító tényező lehet [59, 64, 65]. Továbbá azok a macskák, akik nagyobb arányban vagy kizárólag száraz tápot fogyasztottak, esetleg kevesebb ivóvizet ittak, nagyobb arányban mutattak FIC tüneteket a kontrol csoporthoz képest [53]. Ezenkívül egyes kutatások pozitív korrelációt találtak az alacsony alomtálca szám, ezek csökkenő elérhetősége, az egy háztartáson belüli macskák növekvő száma, illetve a kizárólag benti tartású állatok és a kórkép előfordulása között [53, 63, 65]. Emellett azok az egyedek, akik más macskákkal, egyéb állatokkal együtt élnek, közös itató vagy etetőtálon osztoznak is gyakrabban szenvednek FIC-ben, amennyiben az állatok között

fennálló konfliktusok tartósak [53, 62]. Ezen hajlamosító tényezők ismerete segítheti mind az állatorvosok, mind a macskatulajdonosok munkáját abban, hogy a potenciális stresszorok számának redukálásával vagy megszüntetésével menedzselhessék a FIC okozta tüneteket, illetve megelőzhessék a kórkép kialakulását [66].

Kórfejlődés és a noradrenalin szerepe a kórképben

Habár a pontos oka a FIC kialakulásának mai napig ismeretlen, a meglévő kutatások alapján gyanítható, hogy a betegség hátterében több, szimultán jelentkező ok áll. A jelenleg elfogadott elmélet szerint a FIC kialakulásának okait két csoportra oszthatjuk: a lokális, húgyhólyag eredetű abnormalitások és a neuroendokrin változások csoportjára [67]. Lokális intrinsic elváltozásoknak nevezzük azokat az abnormalitásokat, amik magukban az alsó húgyutak szerveiben következnek be [18]. Az egészséges húgyhólyagban található ép glükózaminoglikán réteg megakadályozza vizelet átjutását az uroepitheliumon. Amennyiben ez a barrier sérül, a vizeletben oldott anyagok átjutnak az epitheliális rétegen és kifejtik káros hatásaikat (**1. ábra**).



1. ábra: Egészséges és FIC-el diagnosztizált macskák húgyhólyagjának összehasonlítása. FIC=feline idiopathic cystitis, GAG=glükózaminoglikán. Forrás: saját ábra

A legirritálóbb hatású, vizeletben oldott anyag a kálium, ami az uroepitheliumon átjutva depolarizációt okoz az éritett terület szenzoros idegrostjain, izomsejtjein és a terület szövetkárosodását okozza [68]. Ezek az érző neuronok C típusú, myelinhüvely nélküli, fájdalomérző rostok, melyek a submucosában helyezkednek el. Amennyiben ezeket a rostokat stimuláció éri, akciós potenciálok sorozata jut el a gerincvelőbe és a stimulus medencetájéki fájdalomként válik érzékelhetővé [69]. A fájdalom hatására az agyban megnő egy neurotranszmitter, a substance P (SP) leadásának mértéke, ami lokálisan potenciózza a

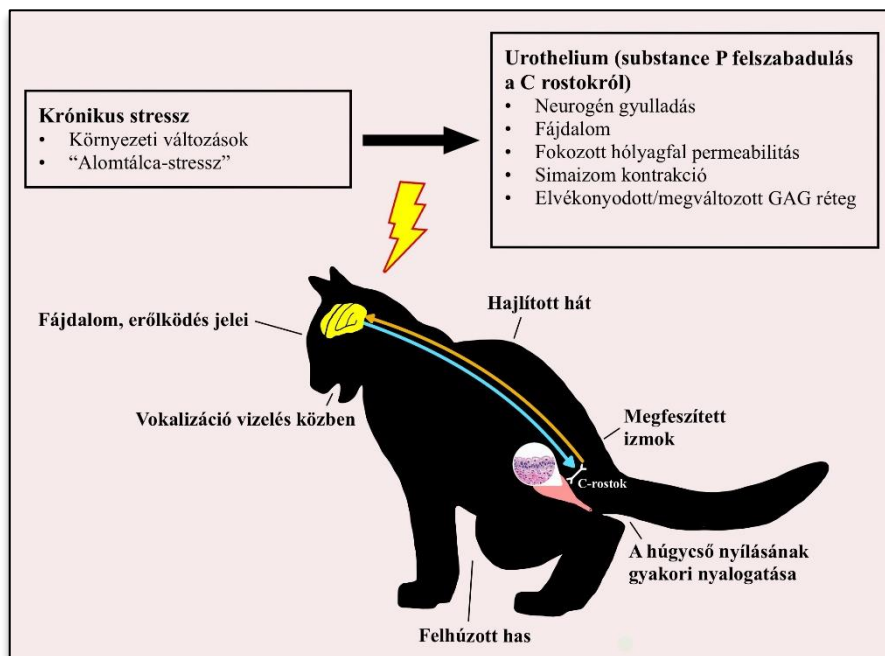
kialakult neurogén gyulladást, illetve receptoraihoz kapcsolódva a hólyag simaizomzatának kontrakcióját hozza létre, ezáltal vizeletürítési elégtelenséget okoz. FIC-cel diagnosztizált macskák vizsgálata során mind a SP, mind a receptorának expressziója jelentős emelkedést mutatott [18].

Számos kutatásban dokumentálásra került már, hogy a FIC-ben szenvedő macskák esetében a fiziológiásnál alacsonyabb GAG szint mérhető, ami következményesen a permeabilitás fokozódását vonja maga után [70, 71]. Az ürített vizelet térfogatának csökkenése, és a vizeletürítés gyakoriságának változása tovább komplikálhatja ezt a kórképet, hiszen megnöveli a kontakt időt az erősen koncentrált vizelet és a sérült uroepitheliális réteg között. Ez a jelenség leggyakrabban olyan környezeti faktorok hatására következik be, mint a csökkenő vízfogyasztás (nem megfelelő víz hőmérséklet vagy elérhetőség a macska számára), a mozgás hiánya (betegség, arthritis, elhízás), macskák közötti agresszió vagy az „alomtálca-stressz”. Ez utóbbi adódhat az alomtálca elérhetőségének kieséséből, illetve annak higiéniai elégtelenségéből is [67].

Ezek mellett a stressznek kiemelkedő szerepet tulajdonítanak számos krónikus gyulladással járó betegség kialakulásában, így a FIC-ben is [72, 73]. A kortikotropin felszabadító hormon (corticotropin releasing factor, CRF) központi szerepet tölt be stresszre adott neuroendokrin válaszban [74]. Krónikus stressz hatására a hypothalamusban CRF szabadul fel, ami az agyalapi mirigy elülső lebenyéből adrenokortikotróp hormon (adrenocorticotropic hormone, ACTH) leadását eredményezi, és a *locus coeruleus* stimulációjával a szimpatikus idegrendszer (sympathetic nervous system, SNS) izgalmát alakítja ki. A *locus coeruleus* területén a tirozin-hidroxiláz enzim fokozott aktivitását is kimutatták FIC-ben érintett macskák esetében, aminek a katekolaminok, így a noradrenalin (norepinephrine, NE) és az adrenalin szintézisében van fontos szerepe [75, 76]. A tengely másik ágán tovább haladva, a fokozott ACTH szint miatt, egészséges macskák esetében, megnövekedett mellékvese aktivitást és emelkedett kortizol szintre számítnak, ám a FIC-el diagnosztizált egyedekben nem ez a fiziológiás reakció figyelhető meg. Habár az ACTH leadás fokozott mértékű, a beteg egyedek kortizol szintje nem növekszik ezzel párhuzamosan [77]. A FIC-ben szenvedő macskák esetében szignifikánsan csökkent méretű, tömegű és gyenge reakciókészséggel rendelkező mellékvesék tanúskodnak arról, hogy ezek az állatok primer adrenokortikális elégtelenségben is szenvednek [78]. Az alacsony kortizol szint következményeként a hormon nem fejt ki negatív feedback hatást a katekolamin szintézisre, így az érintett egyedekben tartósan magas noradrenalin koncentráció mérhető [79].

A FIC-re jellemző tünetek

Az idiopátikus húgyhólyaggyulladás legfőbb tünetei a stranguria, dysuria, makroszkópikus hematuria, periuria, pollakisuria, illetve obstruktív forma esetén anuria is bekövetkezhet [18]. A betegségnek ritkán olyan klinikai megjelenései is lehetnek, mint a letargia, hányás, hasmenés, illetve anorexia, de járhat kóros aluszékonysággal és lázzal is [80]. Ezen kívül a FIC-ben szenvedő macskák viselkedése is megváltozhat: nyugtalanság vizeletürítés előtt, vokalizáció, erőlködés és megfeszült izomzat ürítés közben, illetve a vizelések közötti időszakban gyakori tisztálkodás és a húgycső nyílásának nyalogatása [81]. A tünetek 2-5 (7) napon belül maguktól is elmúlhatnak, ám gyakran rövid időn belül vissza is térnek [67] (2. ábra).



2. ábra: A FIC okozta viselkedésváltozás főbb tünetei és a kórkép patogenezisének alapjai. FIC=feline idiopathic cystitis, GAG=glükózaminoglikán. Forrás: saját ábra.

Diagnosztika

A FIC kórfejlődése mai napig nem tisztázott teljesen, és a klinikai használatban sincsen olyan teszt, ami specifikusan és szenzitíven jelezné a betegséget. A kórkép felismerése tehát a kizárásos diagnosztika módszerével történik úgy, hogy az egyéb LUT-hoz kapcsolható elváltozásokat különböző diagnosztikai eljárások segítségével kizárjuk [82]. A FIC diagnózisa elsődlegesen a klinikai tünetek alapján lehetséges, amihez kulcsfontosságú a részletes kórelőzmény felvétele, de a rizikócsoporthoz is segítheti a helyes diagnózis felállítását. Egyes országokban kérdőív segítségével próbálják segíteni a

diagnosztikai munkát, melyben potenciális stresszorokra, környezeti változásokra kérdeznek rá a tulajdonosoknál és az állat alapos vizeletürítési történetét is tudják rögzíteni [83].

A laboratóriumi vizsgálatoknak elsősorban a FIC-hez hasonló kórképek kizárásában van jelentősége. A rutin hematológiai, illetve biokémiai eredmények általában nem mutatnak jelentős eltérést a fiziológiás értékekhez képest, ezért a vizelet üledékének mikroszkópos vizsgálata és a vizelet tesztsíkkal történő analízise javasolt [84].

A kezelés lehetőségei

FIC esetén fontos, hogy a beteg tulajdonosa megértse azt, hogy a gyógykezelés célja nem a teljes gyógyulás, hanem az epizódok gyakoriságának és súlyosságának csökkentése [69]. A FIC menedzsmentje három kategóriát ölel fel: a stressz csökkentése, a diéta módosítása és a gyógyszeres kezelés. Az állatot érő stressz redukálásának kiváló módszere a multimodális környezeti modifikáció (multimodal environmental modification, MEMO). Ez egy ígéretes kiegészítő terápia, ami az adott macska természetéhez illő környezetgazdagítást jelent. Ennek nagy jelentősége több macskás háztartásokban, illetve benti tartás esetén lehetséges [85]. Az alomtálcák számának, tisztaságának és elhelyezésének fontosságáról már a korábbiakban is esett szó, hiszen a vizeletürítéssel kapcsolatos stressz csökkentése kiemelkedően fontos FIC-es macskák esetén [86]. Általános szabály több macska tartása esetén, hogy az alomtálcák száma mindig eggyel több legyen a macskák számánál [87]. A diétát tekintve fontos a nedves tápok előnyben részesítése a száraz formákkal szemben, vagy amennyiben az állat nem fogadja el a nedves diétát magas só koncentrációjú száraz táp is szóba jöhet, hiszen ez közvetetten növeli a vízfelvételt is [86].

A gyógyszeres kezelés szercsoportjai a simaizom-görcsoldók, a fájdalomcsillapítók, GAG tartalmú táplálékkiegészítők és a triciklikus antidepresszánsok (TCA). Utóbbiak alkalmazása csak igen súlyos és gyakran visszatérő esetekben javallott viselkedésterápiával kiegészítve [86]. Amennyiben akut ellátásra van szükség a húgycső elzáródása miatt katéterezés és azt követő hospitalizáció szükséges az életet veszélyeztető krízis kezelésére [88].

Az *in vivo* és az *in vitro* modellek összehasonlítása

In vivo kísérleteknek azokat a vizsgálatokat nevezzük, amelyeket élő szervezeteken végeznek. E modellek használatával a szervezet egészének reakcióját tudjuk vizsgálni az adott kísérlet során, továbbá előnyös, hogy a nem várt mellékhatásokról is tudomást szerezhethünk segítségükkel. Az *in vivo* modellek alkalmazását erősen korlátozzák különböző hatályban lévő állatvédelmi szempontok és további nehézséget jelent az is, hogy elkülönült vizsgálatok végzésére nem alkalmasak a szervezet folyamatainak összetettsége miatt. Az *in vitro* modell ezzel szemben lehetővé teszi a szervezet jól elkülönült mechanizmusainak vizsgálatát. Célja, hogy a szervezeten kívül, laboratóriumi körülmények között tegye vizsgálhatóvá egy adott szerv vagy szövet egy részletét, illetve tenyésztett és izolált sejteken lehessen kísérleteket végezni. Az *in vitro* kísérletekkel ilyen módon meghatározható, hogy az adott külső hatásra bekövetkezett válasz a szövet vagy szerv saját, autonóm sajátossága-e. Az *in vitro* kísérletek célja, hogy a kapott eredményeket élő szervezeteken tegyék alkalmazhatóvá ám ehhez szükséges ez eredmények extrapolálhatósága is, melynek bizonyításához *in vivo* vizsgálatok szükségesek.

Mivel a FIC egy több szervrendszert érintő komplex betegség, ezért az egyes faktorok külön-külön, illetve célzott kombinációban történő vizsgálata különösen nagy jelentőséggel bír a betegség kórfejlődésének pontos megismerése szempontjából, ezért a FIC patomechanizmusának *in vitro* vizsgálatához hasznos eszköznek bizonyult a kutatócsoportunk által korábban létrehozott, bizonyítottan differenciált húgyhólyaghámsejteket tartalmazó macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészet [89].

Anyag és módszer

Kísérleti állatok

Kísérletünkhöz egy olyan, 2 éves, hímváru végleges elaltatásra került házimacska húgyhólyagját használtuk fel, mely nem szenvedett húgyszervet érintő betegségben. Az állat a Primavet Állatorvosi Rendelőben került elaltatásra, és a tetemét a tulajdonos kutatási célokra ajánlotta fel. A budapesti Állatorvostudományi Egyetem Állatjóléti Bizottsága megerősítette, hogy etikai engedély nem szükséges a kísérletek elvégzéséhez, hiszen az állat már korábban, a kutatásunktól független okokból elaltatásra került.

Reagensek

A kísérlet során felhasznált vegyszerek a feltüntetett kivételektől eltekintve mind a Merck KGaA (Darmstadt, Németország) vállalatától kerültek megvásárlásra.

A sejtek izolálása és tenyésztése

A kísérlethez felhasznált eszközök sterilizálását követően az állat hasfalán medián bemetszést ejtve kiemeltük a húgyhólyagot és felnyitottuk azt. Következő lépésként a szervet pH 7,4 Krebs-Ringer oldattal (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) mostuk át, ami 11,1 mmol/l glükózzal került kiegészítésre. Ezt követte egy egész éjszakán át tartó inkubáció 4°C-on, diszpázt tartalmazó steril minimal essential medium-ban (MEM). A tápfolyadék kiegészítésként 2,5 mg/ml diszpázt, 1% penicillin/sztreptomycin/fungizone-t és 20 mmol/l HEPES-t tartalmazott. A további lépések steril fülke alatt zajlottak. Az uroepithel sejteket egy steril sejtkaparó segítségével eltávolítottuk az alatta található kötőszövetről és 0,25% tripszin és 1 mmol/l EDTA tartalmú oldatban inkubáltuk 37°C-on, fél órán keresztül, közben mágneses keverővel lassan keverve az oldatot. Ezt követően az oldatot 3 réteg gézlapon keresztül egy 50 ml-es centrifugacsőbe töltöttük, majd a sejteket 5% magzati borjúsérum (foetal bovine serum, FBS) tartalmú MEM-mel egészítettük ki 50 ml-re. Az így kapott sejtuszpenziót 5 percen keresztül 1000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk, majd a felülúszó óvatos leszívását követően a sejteket reszuszpéndáltuk 20 ml FBS tartalmú tápfolyadékban. A centrifugálást és az azt követő reszuszpenziót kétszer ismételtük meg. Ezt követően a sejteket 20 ml Defined Keratinocyte Medium-mal (keratinocytá médium, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) mostuk, ami 0,5% hozzáadott gentamicint és 1% fungizone-t tartalmazott. Az utolsó centrifugálást végül ebben az oldatban végeztük el. A sejtek életképességének vizsgálatát tripánkékes festéssel ellenőriztük. A módszer elve, hogy a sérült sejtmembránú sejtekbe képes a festék behatolni és kékre színezi azokat. A

sejtszuspenzióhoz 200 µl tripánkéket keverve elkülöníthetővé váltak az élő és élettelen sejtek, illetve ezek egymáshoz viszonyított aránya is meghatározhatóvá vált. A sejtek számlálását fénymikroszkóp és Bürker-kamra segítségével végeztük. Amennyiben az élő sejtek aránya az élettelenekhez képest a 90%-ot meghaladta, azt tenyésztésre alkalmasnak minősítettük és a további mérésekhez felhasználtuk őket. A sejtek koncentrációja ebben az esetben 700 000-800 000 sejt/ml közé esett. Az így kapott sejtszuspenziót IV. típusú kollagénnel bevont tenyésztőedényekre vittük fel majd 5% szén-dioxid jelenlétében 37°C-on hat napig tenyésztettük. A tápfolyadék cseréjére kétnaponta került sor.

24 lyukú tenyésztőedényeket (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) alkalmaztunk a pro-inflammatorikus mediátorok, mint az IL-6 és SDF-1 vizsgálata céljából csakúgy, mint az oxidatív stressz mértékét jelző MDA és hidrogén-peroxid és a sejtkárosodás mértékét mutató LDH esetében. Ezekbe a tenyésztőedényekbe 0,6 ml sejtszuspenzió került lyukanként. Ezzel szemben a 96 lyukú edényekbe (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) 0,2 ml sejtszuspenzió/lyuk került bemérésre, melyekben a claudin-4 mennyiségének monitorozása történt. A transzepitheliális elektromos rezisztencia (TER) mérésének érdekében a sejteket 24 lyukú nagy sűrűségű poliészter membráninzertereket (0,4 µm-es pórusméret) tartalmazó tenyésztőedényekbe (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) mértük (0,2 ml sejtszuspenzió a felső kamrában, 0,4 ml Defined Keratinocyte Medium az alsóban).

A sejtenyészetek kezelése

A krónikus, visszatérő stressz hatásainak imitálására a tenyésztés hatodik napján az epithelsejteket mind a 24, mind a 96 lyukú edényekben noradrenalinval kezeltük. A kezeléshez 37°C hőmérsékletű, 10, 100 és 1000 µmol/l koncentrációjú noradrenalinval tartalmú keratinocita médiumot használtunk. A kezelő oldatok 3x1 óra időtartamban voltak a sejtenyészeteken. A pulzatív noradrenalinvalos kezeléseket között noradrenalinmentes keratinocita médium került a tenyészetekre egy órán keresztül, 37°C-on. A noradrenalinvalos kezelés utolsó dózisát követően 24 órás regenerációs idő következett. Csoportonként 3 párhuzamos lyukat (24 lyukú lemezek) és 6 párhuzamos lyukat (96 lyukú lemezek) kezeltünk, a kontroll csoportra noradrenalinvalal nem kiegészített keratinocita médiumot mértünk. A kezelést és a regenerációs időt követően a felülúszó tápfolyadékot további vizsgálatokig Eppendorf csőbe gyűjtöttük, illetve a sejteket M-PER reagenssel (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) lizáltuk. Lyukanként 300 µl lizáló reagens hozzáadása után az edényeket 5 percig rázogattuk, majd a lyukak aljáról felkapart sejteket

szintén Eppendorf csövekbe gyűjtöttük. További felhasználásig ezeket a csöveket -80°C-on tároltuk.

A sejtkárosodás mértékének vizsgálata

Ahhoz, hogy a sejtmembrán károsodás mértékét meghatározzuk a laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim aktivitását mértük a kezelt tenyészetek tápfolyadékából. Az LDH kizárólagos citoplazmatikus jelenléte révén tudja igen érzékenyen tükrözni a különböző sejtkárosodások mértékét a vizsgált mintában. Ennek meghatározása egy speciális, enzim kinetikán alapuló fotometriás módszer segítségével történt (Diagnosticum Zrt., Budapest, Magyarország). A próbához felhasznált reagens (**1. táblázat**) 200 µl-ét 10 µl tápfolyadékkal kevertük össze, majd a keletkezett színes oldatok abszorbanciáját 340 nm-en hat alkalommal olvastuk le egy perces szüneteket tartva a mérések között. Az inkubációs szünetek során a mintákat 37°C-on tároltuk, az eredmények leolvasása pedig egy Multiskan GO 3.2. készülékkel történt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, 136 Massachusetts, USA). Az enzimaktivitás kiszámításához az egymást követően mért abszorbancia értékek különbségének átlagát használtuk.

A sejtek redox állapotának vizsgálata

A lipidperoxidáció mértékét jelző MDA koncentráció mérését sejt lizátumból végeztük MDA Colorimetric Assay Kit segítségével. A mérés lényege, hogy a lipidperoxidáció során keletkező MDA molekulák a hozzáadott reagens tiobarbitursav tartalmával piros színű vegyületet képeznek, amely így kolometriás méréssel mennyiségi meghatározásra alkalmazható. 300 µl friss tiobarbitursav oldatot mértünk 100 µl sejt-lizátumra, majd az elegyet 95°C-on inkubáltuk egy órán keresztül, ezt követte az oldat jégén történő hűtése 10 percig. Végül a minták abszorbanciáját 532 nm-en olvastuk le a korábban ismertetett készülékkel.

Az extracelluláris hidrogén-peroxid szint monitorozására Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay Kit-et alkalmaztunk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Az Amplex Red reagens 1:1 sztöchiometrikus arányban reagál a H₂O₂-al, mely során piros fluorescens termék keletkezik, ami fluorometriásan mérhető. Az Amplex Red munkaoldat (**1. táblázat**) 50 µl-hez ugyanennyi tápfolyadékot kevertünk, majd az elegyet 30 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az így keletkezett fluoreszcencia mérését Victor X2 2030 fluorométerrel végeztük (λ_{ex} = 560 nm; λ_{em} = 590 nm).

1. táblázat: A mérésekhez felhasznált munkaoldatok összetétele.

LDH munkaoldat:	Amplex Red munkaoldat:
56 mmol/l foszfátpuffer	100 µmol/l Amplex Red reagens
1,6 mmol/l piruvát	(10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin)
240 µmol/l NADH+H ⁺	0,2 U/ml tormaperoxidáz
pH= 7,5	(horseradish peroxidase, HRP)

IL-6 és SDF-1 gyulladásos mediátorok mennyiségi vizsgálata macskaspecifikus ELISA-tesztrel

A felhasznált tápfolyadékok és sejtlizátumok mintáinak IL-6 és SDF-1 koncentrációit macskaspecifikus ELISA tesztekkel (MyBioSource, San Diego, California, USA) határoztuk meg. A teszt szendvics ELISA módszerrel működve színreakcióval mutatta a vizsgálni kívánt mediátorok mennyiségét. A módszer lényege, hogy a gyártó által készített mikrotiter lemezen található lyukak alján IL-6 és SDF-1 specifikus ellenanyagok vannak kötve, melyekhez a tápfolyadék illetve sejtlizátum hozzáadását követően kötődnek a megfelelő gyulladásos mediátorok. A lemezek mosását követően már csak az ellenanyag – antigén komplexek vannak jelen a lyukakban. Ezen antigén (jelen esetben IL-6, SDF-1) kötésben nem lévő, másik epitópjához képes kapcsolódni az a mosás után hozzáadott ellenanyag, melyhez egy színreakciót katalizáló enzim is kötődik.

A kezelt tenyészetekről gyűjtött tápfolyadékok és sejt lizátumok mintáit óvatos felengedést, és 10 perc 14 000 g-n történő centrifugálást követően vizsgáltuk. Az IL-6 és az SDF-1 koncentrációk meghatározása az alábbi, megegyező módon történt: 50 µl standard oldatot és 50 µl mintát mértünk minden lyukba, és minden mintából két párhuzamost készítettünk. Vannak hígító oldatot (sample diluent) alkalmaztunk. Ezután minden lyukra 100 µl-t mértünk HRP-conjugate reagensből és lefedtük a lemezt. Ezt a lépést egy 1 órás inkubációs idő követte 37°C-on. A következő lépéshez mosófolyadékot készítettünk 19 ml desztillált vízből és 1 ml mosófolyadékból amivel a lemezt négyszer átmostuk. Az utolsó mosást követően 100 µl mosófolyadékot mérve a lemezre 1 percig hagytuk állni azt. Ezután a mosófolyadékot egy határozott mozdulattal leöntöttük a lyukakról és a lemezt óvatos mozdulatokkal papírvattán leütögettük. Ezt követően minden lyukba 50 µl Chromogen solution A-t, és 50 µl Chromogen solution B-t mértünk, és a lemezt 37°C-on inkubáltuk sötétben, 15 percen keresztül. Ahhoz, hogy a reakciót lezárjuk minden lyukra 50 µl kénsavat tartalmazó gátlófolyadékot (stop solution) mértünk. Az így kapott minták színe kékről

sárgára változott. A kapott színreakció abszorbanciáját 450 nm-en olvastuk le 5 perc elteltével Multiskan GO 3.2. készülék segítségével.

A húgyhólyag hámsejtek barrier funkciójának vizsgálata

A kezelt sejtek glükózaminoglikán réteg állapotának vizsgálata céljából a Blyscan reagenskészletét (Biocolor Ltd., Carrickfergus, Egyesült Királyság) alkalmaztuk. Ebben a reagensben egy olyan festékanyag (1,9-dimetil-metilénkék, DMMB) található, ami a vizsgálni kívánt mintában található glükózaminoglikán szulfátcsoportjaival komplex képzésre képes. Röviden, 50 µl tápfolyadékhoz 1 ml festék reagenst adtunk, majd 30 percen keresztül folyamatosan kevertük, hogy a komplexek kialakulhassanak. Ezt 10 perc centrifugálás követte 1300 g-n, majd a felülúszó óvatos eltávolítása után a kapott üledékkel folytattuk tovább munkánkat. Az üledékhez (festék-GAG komplex) disszociációs reagenst mértünk, melynek hatására a kötésben lévő festékanyag felszabadult, így fotometrállhatóvá téve a mostmár kék színű oldatokat. Az oldatok szabad festékanyag koncentrációja egyenesen arányos a benne található GAG mennyiségével. A kék mintákból 200 µl-t 96 lyukú mikrotiter lemezbe mértük és az oldatok abszorbanciáját 656 nm-en Multiskan GO 3.2. készülékkel leolvastuk.

A tenyésztett sejtek claudin-4 tartalmát közvetlenül a sejtekből mértük macskaspecifikus ELISA teszttel (MyBioSource, San Diego, California, USA). A tápfolyadék leszívását követően a sejteket 2 alkalommal mostuk 200 µl, egyszeres töménységű Trissel pufferolt fiziologiás sóoldattal (Tris-buffered saline, TBS). Ezt a lépést követte a sejtek fixálása a 96 lyukú lemezen. Ehhez fixáló oldatot (fixing solution) használtunk, ami 8% - foszfáttal pufferolt sóoldatban (phosphate buffered saline, PBS) oldott - formaldehidet tartalmaz. A lyukakat ezután vékony parafilmrel fedtük és 20 percig szobahőmérsékleten pihentettük. A parafilm eltávolítása után a sejteket 3 alkalommal 200 µl mosófolyadékkal (washing buffer) mostuk, 5 percen keresztül, miközben óvatosan rázogattuk a lemezt. Minden mosást követően a mosófolyadékot leöntöttük, és az edényt óvatosan papírvattához ütögettük. Ezután 100 µl deaktiváló folyadékot (quenching buffer) mértünk a lyukakra, és 20 percen keresztül inkubáltuk a lemezt szobahőmérsékleten. A következő lépésben 200 µl mosófolyadékkal (washing buffer) mostuk a lemezt, 3 alkalommal, alkalomként 5 percen keresztül, óvatos rázogatás mellett. A mosást követően 200 µl gátlófolyadékot (blocking buffer) mértünk a lemezre, és egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követte egy utolsó, a korábbival megegyező mosás 200 µl mosófolyadékkal. Az utolsó mosás után 50 µl anti-claudin-4 ellenanyag tartalmú reagenst

(primary antibody) mértünk a sejtekre, parafilmmel lefedtük a lemezt és egy éjszakán keresztül (16 óra) inkubáltuk 4°C-on. Másnap, a parafilm eltávolítása után háromszor 5 percig, 200 µl mosófolyadékkal mostuk a lemezt, majd 50 µl-t mértünk a sejtekre másodlagos ellenanyagokból (secondary antibody) és 90 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, óvatos rázogatós mellett. Három újabb öt perces mosás után 50 µl szubsztrát oldatot (substrate solution) mértünk minden lyukba, majd 30 percen keresztül, sötétben és szobahőmérsékleten inkubáltuk a lemezt folyamatos rázogatós mellett. További 50 µl gátlóoldat (stop solution) hozzáadását követően az abszorbanciákat 450 nm-en olvastuk le Multiskan GO 3.2 segítségével.

Ahhoz, hogy kiderítsük az alkalmazott noradrenalin kezelés milyen hatással volt a sejtingegritás változására, a sejtek traszepiheliális elektromos rezisztenciáját mértük meg. A méréshez EVOM2 Volt/Ohm métert alkalmaztunk (World Precision Instruments, Florida, USA). A TER értékek leolvasása két időpontban, közvetlenül az utolsó noradrenalin kezelését követően és az egy napos regenerációs időt követően történt meg.

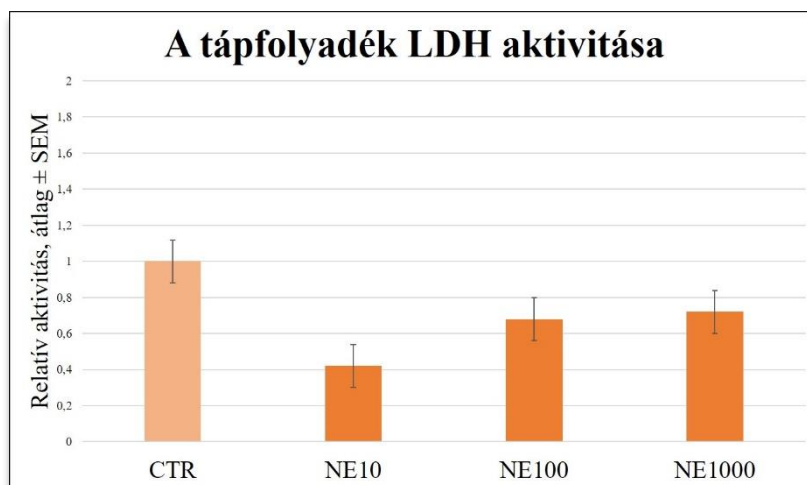
Statisztika

A kapott eredmények statisztikai elemzését R 4.2.2 (R Core Team, 2022) program segítségével végeztük. Az adatok normál eloszlásának ellenőrzése, a statisztikai analízist megelőzően, Shapiro-Wilk teszttel történt. Az átlagok közötti különbségek meghatározására „egyutas” ANOVA tesztet alkalmaztunk, Tukey post-hoc teszteket pedig a kezelt, illetve kontroll csoportok közötti páronkénti összehasonlítások elvégzésére vettünk igénybe. A különböző változók közötti összefüggések becslésére Pearson-féle korrelációs tesztet végeztünk. Szignifikáns különbséget abban az esetben állapítottunk meg, amennyiben $P < 0,05$. Minden közölt eredményt átlag $\pm$ standard hiba alakban adtuk meg.

Eredmények

A sejtkárosodás mértékének vizsgálata

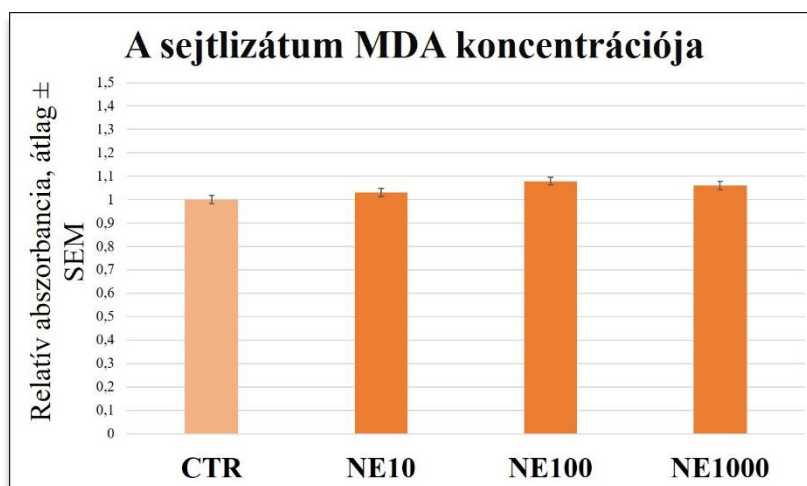
A vizsgálat során nem találtunk szignifikáns eltérést a noradrenalinval kezelt sejttényészetek tápfolyadékjának LDH aktivitásában a kontrollcsoportéhoz képest egyik alkalmazott dózis esetén sem (**3. ábra**).



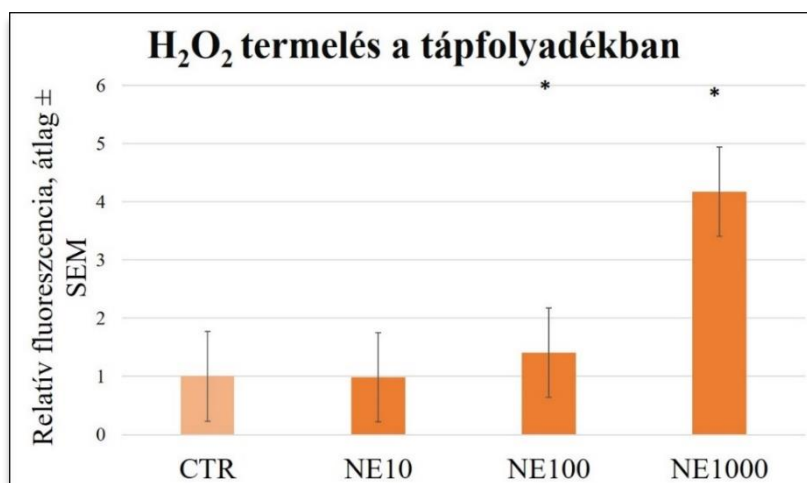
3. ábra: A tápfolyadék laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitása különböző koncentrációjú noradrenalinkezelést követően. CTR = kontroll, NE10 = 10 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE100 = 100 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE1000 = 1000 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin. (n=3/csoport, átlag $\pm$ SEM)

A sejtek redox állapotának vizsgálata

A különböző dózisú noradrenalinkezelések egyike sem eredményezett szignifikáns eltérést a vizsgált sejt lizátum MDA koncentrációjában (**4. ábra**), azonban a 100 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalinval és az 1000 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalinval kezelt sejtek esetén a tápfolyadék hidrogén-peroxid koncentrációja megnövekedett a kezeletlen sejtekéhez képest (NE100: $P=0,016$, NE1000: $P=0,018$; **5. ábra**).



4. ábra: A sejtizátum malondialdehid (MDA) koncentrációja különböző koncentrációjú noradrenalin kezelést követően. CTR = kontroll, NE10 = 10 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE100 = 100 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE1000 = 1000 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin. (n=3/csoport, átlag $\pm$ SEM)

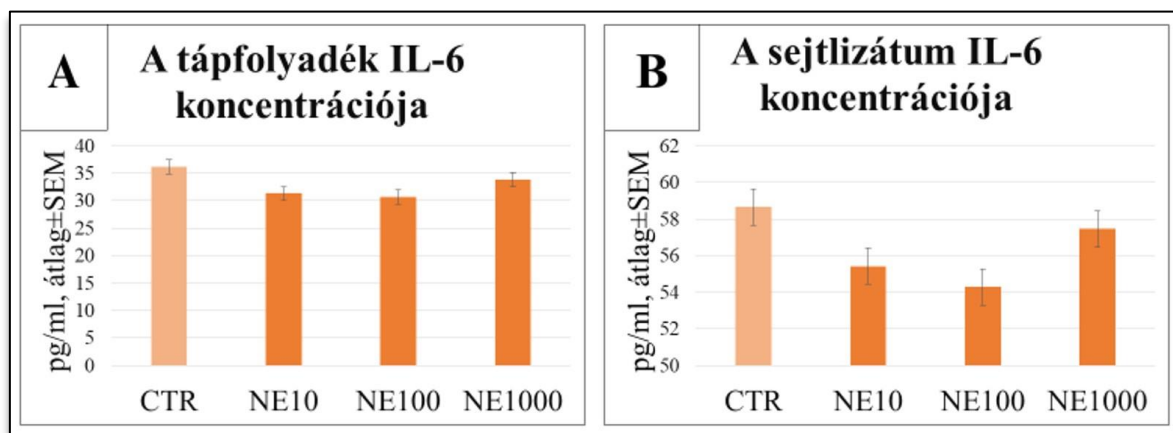


5. ábra: A különböző koncentrációjú noradrenalin oldattal kezelt sejtek hidrogén-peroxid termelésének mértéke. CTR = kontroll, NE10 = 10 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE100 = 100 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE1000 = 1000 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin. (n=3/csoport, átlag $\pm$ SEM, *P<0,05)

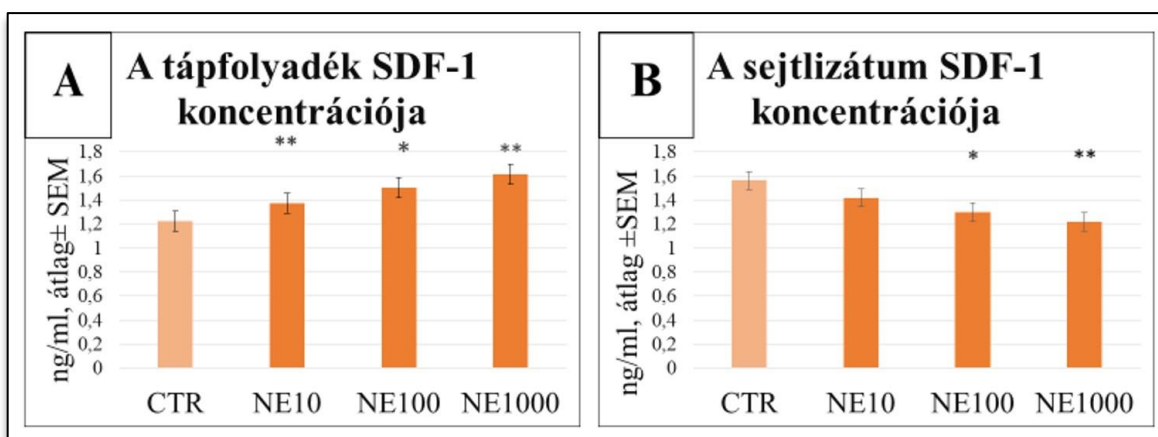
Az IL-6 és az SDF-1 gyulladásos mediátorok mennyiségi vizsgálata macskaspecifikus ELISA-teszttel

Az IL-6 koncentrációi sem a tápfolyadékban, sem a sejtizátumban nem mutattak szignifikáns változást egyik noradrenalin kezelést követően sem (**6A ábra, 6B ábra**). Ezzel szemben a tápfolyadékban mért SDF-1 koncentrációk növekedést mutattak a kontroll sejtekhez képest mindhárom alkalmazott noradrenalin dózis esetén (NE10: P=0,003, NE100: P=0,018, NE1000: P=0,002; **7A ábra**). Az SDF-1 koncentrációk sejtizátumból végzett vizsgálatain esetén a 10 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalinval végzett kezelés esetén nem figyelhető meg szignifikáns változás, azonban 100 $\mu\text{mol/l}$ és 1000 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin dózis alkalmazása

esetén csökkenést figyelhetünk meg az SDF-1 koncentrációjában a kezeltlen sejtekhez képest (NE100: $P=0,022$, NE1000: $P=0,005$; 7B ábra).



6.ábra: A tápfolyadék (A) és a sejtliázátum (B) interleukin-6 (IL-6) koncentrációjának változása különböző koncentrációjú noradrenalin kezelést követően. CTR = kontroll, NE10 = 10 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE100 = 100 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE1000 = 1000 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin. (n=3/csoport, átlag±SEM)



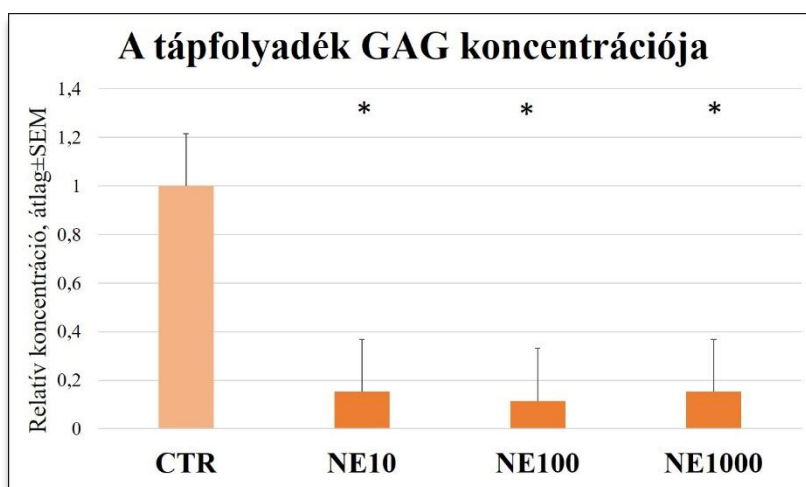
7.ábra: A tápfolyadék (A) és a sejtliázátum (B) stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) koncentrációjának változása különböző koncentrációjú noradrenalin kezelést követően. CTR = kontroll, NE10 = 10 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE100 = 100 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE1000 = 1000 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin. (n=3/csoport, átlag±SEM, * $P<0,05$, ** $P<0,01$)

A húgyhólyag hámsejtek barrier funkciójának vizsgálata

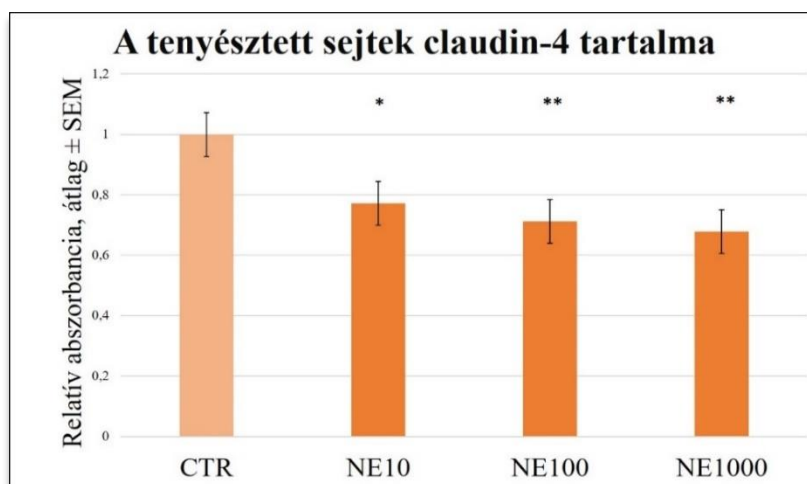
A vizsgált tápfolyadékok GAG tartalma mindhárom különböző noradrenalin koncentrációjú kezelést követően szignifikáns mértékben lecsökkent a kontroll sejttenyészetek tápfolyadékához képest (NE10: $P=0,024$, NE100: $P=0,021$, NE1000: $P=0,025$; **8. ábra**).

A húgyhólyag hámsejtek claudin-4 tartalmának vizsgálata során kapott eredményeik azt mutatták, hogy hasonlóan a GAG koncentrációkhoz, mindhárom noradrenalin dózis alkalmazása szignifikáns csökkenést eredményezett a sejtek claudin-4 tartalmában (NE10: $P=0,018$, NE100: $P=0,003$, NE1000: $P=0,001$; **9. ábra**).

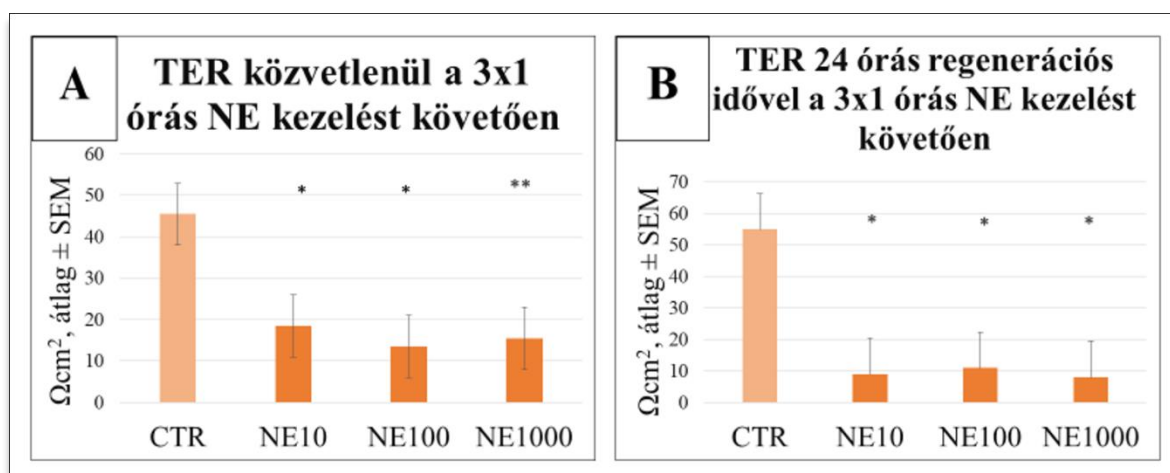
A TER értékek szintén szignifikáns csökkenést mutattak mindhárom alkalmazott noradrenalin kezelés után. Ez a szignifikáns csökkenés megfigyelhető volt akkor, amikor a TER értékek meghatározását közvetlenül a noradrenalin kezelés után végeztük (NE10: $P=0,009$, NE100: $P=0,009$, NE1000: $P=0,007$; **10A ábra**) illetve abban az esetben is, amikor az alkalmazott kezeléseket 24 órás regenerációs idő követte (NE10: $P=0,012$, NE100: $P=0,016$, NE1000: $P=0,014$; **10B ábra**).



8.ábra: Különböző noradrenalin koncentrációjú oldatokkal kezelt sejttenyészetek tápfolyadékjának glükózaminoglikán (GAG) koncentrációja. CTR = kontroll, NE10 = 10 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE100 = 100 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE1000 = 1000 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin. ($n=3/\text{csoport}$, átlag $\pm$ SEM, * $P<0,05$)



9. ábra: A tenyésztett sejtek claudin-4 tartalmának vizsgálata különböző koncentrációjú noradrenalinos kezelést követően. CTR = kontroll, NE10 = 10 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE100 = 100 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE1000 = 1000 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin. (n=3/csoport, átlag $\pm$ SEM, *P<0,05, **P<0,01)



10. ábra: Transzepitheliális elektromos rezisztencia (TER) értékek közvetlenül az alkalmazott noradrenalinos kezeléseket követő méréssel meghatározva (A) és 24 órával a noradrenalinos kezelést követően mérve (B). CTR = kontroll, NE10 = 10 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE100 = 100 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin, NE1000 = 1000 $\mu\text{mol/l}$ noradrenalin. (n=3/csoport, átlag $\pm$ SEM, **P<0,01)

Pearson's féle korrelációs teszt

A Pearson's féle korrelációs teszt használatával pozitív szignifikáns korrelációt találtunk a vizsgált tápfolyadékok SDF-1 és H_2O_2 tartalma között ($P=0,009$, $R^2=0,51$), illetve negatív szignifikáns korrelációt a tápfolyadékok SDF-1 koncentrációja és a vizsgált sejtek claudin-4 tartalma között ($P<0,001$, $R^2=-0,63$). További szignifikáns negatív korrelációt figyeltünk meg a kapott H_2O_2 értékek és a sejtek claudin-4 koncentrációja között ($P=0,017$, $R^2=-0,48$).

Megbeszélés és következtetések

Korábbi tanulmányok igazolták, hogy a noradrenalin kiemelkedő szereppel bíró stresszhormon a kórkép kialakulásában [78]. Környezeti stresszorok hatására aktiválódik a szimpatikus idegrendszer, illetve fokozódik a katekolaminok (így a noradrenalin) szintézise is, ami megemelkedett hormonkoncentráció formájában jelentkezik az érintett állat szervezetében. Buffington és munkatársai több kutatás során igazolták a noradrenalin kiemelkedő fontosságát és a szimpatikus idegrendszer aktivációjának bekövetkezését a kórkép kialakulása során. Kutatásaik során emelkedett plazma noradrenalin koncentrációról, és szintén emelkedett hormonszintről publikáltak az érintett egyedek húgyhólyagjának szövetében FIC-ben szenvedő macskák esetén [91, 92]. Birder és munkatársai igazolták, hogy a noradrenalin jelátviteli folyamataiban szerepet játszó alfa- és béta-adrenerg receptorok a húgyhólyagban található neuronok mellett az uroepithelium sejteiben is megtalálhatóak, és stimulálásukon keresztül a noradrenalin direkt hatást képes kiváltani a szerv stresszre adott válaszára [93, 94].

FIC-ben szenvedő macskák esetében megfigyelhető, hogy a betegségben érintett egyedek stresszre adott válaszkészsége eltér a fiziológiástól. Ez az eltérés állhat annak a jelenségnek a hátterében is, hogy a FIC akut formája során produkált tünetek általában kezelés nélkül, önkorlátozó módon csillapodnak, ám ezek gyakran visszatérnek ismételt stressz hatására [92]. Munkánk során az alkalmazott noradrenalin koncentrációkat úgy állítottuk be, hogy azok széleskörben lefedjék a hormon szervezetbeli koncentrációinak változását, illetve a kezelés módját (3x1 órás NE kezelés és azt követő egy órás regenerációs idő) is úgy választottuk meg, hogy az a krónikus intermittáló stresszre leginkább hasonlítson. A sejtkárosodás mértékének vizsgálata céljából mértük az extracelluláris LDH aktivitást, és egyik alkalmazott noradrenalin dózis esetén sem kaptunk szignifikáns változást. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a felhasznált noradrenalin koncentrációk nem bizonyultak citotoxikusnak az általunk tenyésztett macska uroepithelsejtek számára.

A reaktív oxigén származékok fontos elemei a gyulladás kialakulásának, hiszen oxidatív stresszt indukálnak és emelik a különböző gyulladásos mediátorok mennyiségét a hatásuk helyén. Közvetlenül az érintett sejtekre gyakorolt sejtmembrán-károsító hatásuk által megváltoztatják azok permeabilitási tulajdonságait [95, 96]. A vizsgálatunk során mért egyik lipidperoxidációs marker, az MDA koncentrációi nem változtak szignifikáns mértékben az alkalmazott noradrenalin kezeléseket követően. A sejtek redox állapotának meghatározására

alkalmazott másik faktor, a H_2O_2 koncentrációját tápfolyadékból határoztuk meg, és az a háromszor egy órás, 100 és 1000 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú noradrenalin kezelést követően szignifikáns növekedést mutatott a kezeletlen sejtekhez képest. A H_2O_2 koncentrációja emellett pozitív korrelációt mutatott az extracelluláris SDF-1 koncentrációval is. Ez az eredményünk egybevág más kutatócsoportok eredményeivel is: patkányokon végzett kísérletek során a kísérleti állatok húgyhólyagjába injektált H_2O_2 képes volt gyulladást provokálni a szervben az IL-6, IL-1 és TNF-alfa molekulák szintjének emelésével [95].

A krónikus stressz gyulladásban betöltött szerepének vizsgálatához két gyulladási mediátor koncentrációit vizsgáltunk tápfolyadékból és sejtlikátumból: a pro-inflammatorikus hatású IL-6 citokint, és az SDF-1 kemokint. Vizsgálatunk során az IL-6 tápfolyadékban, illetve sejtlikátumban mért koncentrációjára nem volt szignifikáns hatása egyik alkalmazott noradrenalin kezelésnek sem, ellentétben egy korábbi kutatás eredményével, melyben az alkalmazott egy órás noradrenalin kezelés szignifikáns hatást fejtett ki az IL-6 koncentrációjára [89]. Az IL-6 termelésre gyakorolt stimulációs hatást állapították meg patkányok szív eredetű fibroblast sejtjeinek noradrenalinval történő kezelését követően, illetve humán mikrovaskuláris endothel sejt vonal (HMEC-1) kezelése esetén, ezzel igazolva a noradrenalin gyulladásban betöltött szerepét [97, 98]. További kutatások fokozott IL-6 expresszióról publikáltak különböző dózisú és idejű noradrenalinkezeléseket követően emberi gyomor epithelsejteken végzett kezeléseket követően [99]. Vizeletben mért IL-6 koncentrációk vizsgálata során szintén szignifikáns emelkedésről számoltak be noradrenalin kezelés hatására patkányoknál mesterségesen kiváltott cisztitisz, illetve FIC-ben szenvedő macskák esetén is [99, 100].

Az SDF-1 tápfolyadékban mért koncentrációja minden alkalmazott noradrenalin dózis esetén emelkedést mutatott, ezzel szemben pedig csökkenést a sejtlikátumok vizsgálata során. Ezen eredmények alapján arra lehet következtetni, hogy a noradrenalinval kezelt sejtek intenzíven termelték és adták le saját környezetükbe az SDF-1 kemokint, ami hozzájárulhat a FIC-ben szenvedő macskák gyulladással járó tüneteinek kialakulásához. Az SDF-1 betegség kórfejlődésében betöltött szerepével foglalkozó kutatások szintén emelkedett SDF-1 koncentrációról számoltak be FIC-es macskák vérében, de humán esetekben is hasonló eredmények születtek intersticiális cisztitisz-ben szenvedő betegek vizeletmintáinak vizsgálatát követően [82, 101].

Eredményeink alapján elmondható, hogy az SDF-1 érzékenyebb a noradrenalin jelenlétére, mint az IL-6, ami párhuzamban áll egy korábbi kutatás eredményével, ahol FIC-es macskák vérében emelkedett SDF-1 koncentrációt mértek változatlan IL-6 koncentráció

mellett [82]. Ezt igazolja kutatócsoportunk korábbi kísérlete is, melyben különböző dózisú noradrenalin kezelések alkalmazásakor az SDF-1 koncentráció emelkedéséhez alacsonyabb noradrenalin dózisok is elegendőek voltak az IL-6-nál alkalmazottakhoz képest [89]. Továbbá a tény, hogy mind az egyszeri akut [89], mind a krónikus intermittáló noradrenalin kezelés emelkedést váltott ki a tápfolyadék SDF-1 koncentrációjában – igazolva ezzel, hogy a húgyhólyaghámsejtek képtelenek adaptálódni a noradrenalin tartós jelenlétéhez – tovább erősíti a hormon betegség kórfejlődésében betöltött fontos szerepét.

Dolgozatom részeként vizsgáltuk a noradrenalin intermittáló jelenlétének húgyhólyaghámsejtek barrier funkciójára kifejtett hatását. Ennek érdekében a tápfolyadék GAG koncentrációját, az uroepithelsejtek claudin-4 tartalmát és a TER értékeket határoztuk meg a noradrenalin kezelés követően. Számos korábbi kutatás alátámasztja, hogy a húgyhólyag lumen felületét borító GAG réteg károsodása megjelenik FIC-ben szenvedő macskák esetén, habár az mostanáig nem került tisztázásra, hogy ez az oka, vagy a következménye a betegség kialakulásának [17, 70, 71, 102, 103]. Kísérleteink során azt az eredményt kaptuk, hogy az alkalmazott noradrenalinkezelés szignifikánsan csökkentette a tápfolyadékok GAG tartalmát, ezáltal igazolva a noradrenalin kulcsfontosságú szerepét a húgyhólyaghám permeabilitásának megváltozásában FIC-es macskák esetén.

A húgyhólyag barrier funkciójának fontos elemei a *tight junction* sejtkapcsolatok, melyek számos fehérjéből épülnek fel. Az egyik legfontosabb ilyen fehérje a claudin-4, ami a *tight junction* sejtkapcsolatok részeként az esernyő sejtekben ioncsatornaként működve befolyásolni képes a sejtmembrán permeabilitást [9]. A claudin-4-hez hasonló *tight junction* fehérjék mennyiségi vizsgálata hasznos eszköze az uroepithelium átteresztőképesség vizsgálatának, hiszen a hólyaghám barrier funkciója legfőképpen a *tight junction* sejtkapcsolatok strukturális integritásának függvénye. Eredményeink szerint a GAG koncentráció csökkenése mellett az uroepithel sejtek claudin-4 tartalma is szignifikáns csökkenést mutatott mindhárom alkalmazott noradrenalin dózis esetén. Eredményeink egybevágnak olyan korábbi kutatások eredményeivel, amik számos egyéb *tight junction* fehérje, mint az occludin, E-cadherin, uroplakin, és zona-occludens 1 fehérjék csökkent mennyiségéről számoltak be FIC-ben szenvedő macskák esetén [104, 105].

Mindezek mellett a kísérleteink során megállapított transzepitheliális elektromos rezisztencia (TER) értékek is szignifikáns csökkenést mutattak 10, 100 és 1000 $\mu\text{mol/l}$ dózisú noradrenalinkezelést követően akkor is, ha a mérést közvetlenül a kezelés után, és akkor is, ha a mérést egy 24 órás regenerációs időt követően végeztük. Ezzel megegyező,

csökkent TER értékekről számolt be egy kutatócsoport, akik vizsgálataikat FIC-es macskákon végezték [106].

Kutatásunk során negatív korrelációt találtunk a claudin-4 és a H_2O_2 koncentrációja, illetve a claudin-4 és az SDF-1 koncentrációja között, melyek a gyulladásos válasz és az oxidatív stressz, illetve a húgyhólyaghám barrier funkciója közötti komplex kölcsönhatás jelenlétére utalhatnak. Ezt az összefüggést igazolják korábbi kutatások eredményei is, melyekben a H_2O_2 képes volt a paracelluláris permeabilitást fokozni azáltal, hogy a *tight junction* fehérjét károsította, vagy a sejtkapcsolaton belüli eloszlásukat módosította [107, 108, 109].

Kutatócsoportunk korábbi tanulmánya alapján elmondható, hogy az egyszeri noradrenalin kezelés által kiváltott akut stressz képes pro-inflammatorikus választ, oxidatív stresszt és barrier funkció romlást kiváltani macska eredetű húgyhólyaghámsejt-tenyészetben, igazolva ezzel a noradrenalin betegségben betöltött fontos szerepét [89]. Mivel azonban a FIC során jelentkező tünetek önkorlátozó jelleggel törénő megszűnése után azok ismételt stresszhatásra gyakran visszatérnek, érdemes volt vizsgálni, hogy a tünetek újbóli megjelenésének hátterében az ismételten megemelkedett noradrenalin koncentráció állhat-e az érintett állatokban, vagy esetleg az uroepithelsejtek képesek alkalmazkodni az őket ért stresszhatásokhoz. Korábbi kutatások során igazolták, hogy bizonyos sejttypusok, például a májsejtek képesek sikeresen alkalmazkodni az őket érő hőstresszhez, illetve az endothel sejtek a mechanikai stresszhez tudnak adaptálódni, azonban tudomásunk szerint jelen dolgozat létrejöttéig nem volt található irodalmi adat a noradrenalin krónikus jelenlétének az uroepithel sejtek adaptációjára gyakorolt hatásáról [110, 111].

Dolgozatom eredményeit összefoglalva elmondható, hogy a krónikus rekurrens stressz hatását imitáló intermittáló noradrenalin kezelés direkt molekuláris hatással volt a tenyésztett primer macska uroepithelsejtekre. A kezelés hatására fokozódott a gyulladáskeltő citokinek termelődése, nőtt az oxidatív stressz foka és a megváltozott paracelluláris permeabilitás hatására romlott a húgyhólyaghám barrier funkciója. Ezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a noradrenalin periodikus felszabadulásának fontos szerepe lehet a FIC kórfejlődésében, illetve az emelkedett noradrenalin jelenlét az érintett macskáknál közvetlen hatással lehet a betegség tüneteinek kialakulásában szerepet játszó hólyagban bekövetkező változásokra.

Összefoglaló

Az alsó húgyúti megbetegedések gyakran fordulnak elő házimacskákban, ezért pontos diagnosztikájuk kiemelt jelentőséggel bír a klinikai gyakorlatban. A betegség során produkált tünetek hátterében állhat többek közt húgykövesség, daganatos elváltozás, bakteriális húgyúti fertőzések vagy anatómiai rendellenesség. Amennyiben az előbb említett kórokok egyike sem igazolódik be, ismeretlen oktanú, tehát idiopatikus húgyhólyaggyulladásról beszélhetünk (angolul feline idiopathic cystitis, FIC), mely betegség pontos kórfejlődése mai napig ismeretlen. Mivel az említett alsó húgyúti megbetegedések hátterében az esetek több, mint 50%-ban FIC áll, ezért a patogenezis vizsgálata kiemelt jelentőséggel bír.

Annak érdekében, hogy más, potenciálisan befolyásoló tényezők hatását kiküszöböljük, *in vitro* körülmények között vizsgáltuk a hormon közvetlen molekuláris hatását macska eredetű primer húgyhólyaghámsejt-tenyészetben. A sejttenyészet létrehozásához húgyhólyaghámsejteket izoláltunk egy végleges elaltatásra került macska húgyhólyagjából, majd a kinyert sejteket 6 napig tenyésztettük. A tenyésztést követően 10, 100 és 1000 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú noradrenalin-oldattal kezeltük a sejteket krónikus, intermittáló stresszhatást imitálva, 3x1 órán keresztül, a kezelések között egy óras regenerációs időt tartva, majd vizsgáltuk a kezelés gyulladásra, a sejtek redox állapotára és barrier funkciójára kifejtett hatását.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az alkalmazott noradrenalinkezelés képes volt a húgyhólyaghámsejteken pro-inflammatorikus válasz létrehozására és oxidatív stressz kiváltására azáltal, hogy növelte a tápfolyadék SDF-1- (stromal cell-derived factor 1) és H_2O_2 -koncentrációját. Továbbá, az alkalmazott kezelés képes volt csökkenteni a tenyészetek glükózaminoglikán (GAG) koncentrációját, a *tight junction* sejtkapcsolatok claudin-4 fehérje tartalmát, illetve a TER értékeket, ezáltal bizonyítva a stresszhormon permeabilitást fokozó hatását. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a 3x1 órás intermittáló noradrenalinkezelésnek – mint a rekurrens stressz modelljének – direkt molekuláris hatása volt a húgyhólyaghámsejtek gyulladásos válaszára, oxidatív állapotára és a húgyhólyaghámsejtek integritására, igazolva ezzel, hogy a hormon kulcsszerepet játszhat a FIC kórfejlődésében a krónikus esetekben, és hogy az emelkedett noradrenalin-koncentráció hatással lehet a betegség tüneteinek kialakulásában szerepet játszó húgyhólyagban bekövetkező változásokra.

Irodalomjegyzék

1. Guzsal E (1981) Házállatok szövettana. pp 182–184
2. Birder L, Andersson K-E (2013) Urothelial Signaling. *Physiol Rev* 93:653–680. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2012>
3. Khandelwal P, Abraham SN, Apodaca G (2009) Cell biology and physiology of the uroepithelium. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 297:F1477–F1501. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00327.2009>
4. Apodaca G (2004) The Uroepithelium: Not Just a Passive Barrier. *Traffic* 5:117–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1600-0854.2003.00156.x>
5. Petry G, Amon H (1966) Licht und elektronenmikroskopische Studien über Struktur und Dynamik des Übergangsepithels. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 69:587–612. <https://doi.org/10.1007/BF00406304>
6. Olsburgh J, Harnden P, Weeks R, Smith B, Joyce A, Hall G, Poulsom R, Selby P, Southgate J (2003) Uroplakin gene expression in normal human tissues and locally advanced bladder cancer. *J Pathol* 199:41–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/path.1252>
7. Riedel I, Liang F-X, Deng F-M, Tu L, Kreibich G, Wu X-R, Sun T-T, Hergt M, Moll R (2005) Urothelial umbrella cells of human ureter are heterogeneous with respect to their uroplakin composition: different degrees of urothelial maturity in ureter and bladder? *Eur J Cell Biol* 84:393–405. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2004.12.011>
8. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE (2003) Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81:1–44. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(02\)00037-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6107(02)00037-8)
9. Acharya P, Beckel J, Ruiz WG, Wang E, Rojas R, Birder L, Apodaca G (2004) Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 287:F305–F318. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00341.2003>
10. Findley MK, Koval M (2009) Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life* 61:431–437. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/iub.175>
11. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:511–516. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.511>
12. Tsukita S, Tanaka H, Tamura A (2019) The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. *Trends Biochem Sci* 44:141–152. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.09.008>
13. Flores-Benítez D, Ruiz-Cabrera A, Flores-Maldonado C, Shoshani L, Cereijido M, Contreras RG (2007) Control of tight junctional sealing: role of epidermal growth factor. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 292:F828–F836. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00369.2006>
14. Wegener J, Abrams D, Willenbrink W, Galla H-J, Janshoff A (2004) Automated multi-well device to measure transepithelial electrical resistances under physiological conditions. *Biotechniques* 37:590–597. <https://doi.org/10.2144/04374ST03>
15. Lewis SA (2000) Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 278:F867–F874. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.278.6.F867>
16. Hurst RE, Van Gordon S, Tyler K, Kropp B, Towner R, Lin H, Marentette JO, McHowat J, Mohammadi E, Greenwood-Van Meerveld B (2016) In the absence of overt urothelial damage, chondroitinase ABC digestion of the GAG layer increases bladder permeability in ovariectomized female rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 310:F1074–F1080. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00566.2015>
17. Buffington CAT, Blaisdell JL, Binns SP, Woodworth BE (1996) Decreased Urine Glycosaminoglycan Excretion in Cats with Interstitial Cystitis. *J Urol* 155:1801–1804. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)66201-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)66201-3)
18. Buffington CAT (2011) Idiopathic Cystitis in Domestic Cats—Beyond the Lower Urinary Tract. *J Vet Intern Med* 25:784–796. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0732.x>
19. Parsons L, Boychuk D, Jones S, Hurst R, Callahan H (1990) Bladder Surface Glycosaminoglycans: An Epithelial Permeability Barrier. *J Urol* 143:139–142. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)39897-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)39897-X)
20. Porter S (2013) Tidy's Physiotherapy E-Book. Elsevier Health Sciences
21. Abdulkhaleq LA, AMA, AR, Z-SM, T-YYH, & HMNM (2018) The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet World* 627–635

22. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C (2015) Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J Autoimmun* 60:1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.04.006>
23. Zhang J-M, An J (2007) Cytokines, Inflammation, and Pain. *Int Anesthesiol Clin* 45:
24. Laing KJ, Secombes CJ (2004) Chemokines. *Dev Comp Immunol* 28:443–460. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.09.006>
25. Erdei Anna SGPJ (2012) *Immunológia*. pp 221–232
26. Gabay C (2006) Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 8:S3. <https://doi.org/10.1186/ar1917>
27. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T (2004) IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113:1271–1276. <https://doi.org/10.1172/JCI20945>
28. Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, Uchida T, Kariyone S, Hirano T, Kishimoto T, Takatsuki F, Akiyama Y (1989) Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* 74:1241–1244. <https://doi.org/10.1182/blood.V74.4.1241.1241>
29. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014) IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
30. Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Egawa T, Kawabata K, Nagasawa T (2003) Long-Term Hematopoietic Stem Cells Require Stromal Cell-Derived Factor-1 for Colonizing Bone Marrow during Ontogeny. *Immunity* 19:257–267. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00201-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00201-2)
31. Okabe S, Fukuda S, Kim Y-J, Niki M, Pelus LM, Ohyashiki K, Pandolfi PP, Broxmeyer HE (2005) Stromal cell-derived factor-1 α /CXCL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1. *Blood* 105:474–480. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0843>
32. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA (1998) Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:9448–9453. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9448>
33. Mirshahi F, Pourtau J, Li H, Muraine M, Trochon V, Legrand E, Vannier J-P, Soria J, Vasse M, Soria C (2000) SDF-1 Activity on Microvascular Endothelial Cells: Consequences on Angiogenesis in in Vitro and in Vivo Models. *Thromb Res* 99:587–594. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(00\)00292-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0049-3848(00)00292-9)
34. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OMZ, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ (1999) Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Induce Expression of CXCR4 on Human Endothelial Cells: In Vivo Neovascularization Induced by Stromal-Derived Factor-1 α . *Am J Pathol* 154:1125–1135. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65365-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65365-5)
35. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* 49:1603–1616. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
36. Fang J, Seki T, Maeda H (2009) Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev* 61:290–302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.02.005>
37. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
38. Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH, Cochrane CG (1988) Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest* 82:1040–1050. <https://doi.org/10.1172/JCI113660>
39. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N (2016) Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev* 2016:7432797. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
40. Zuo J, Zhang Z, Luo M, Zhou L, Nice EC, Zhang W, Wang C, Huang C (2022) Redox signaling at the crossroads of human health and disease. *MedComm (Beijing)* 3:e127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mco2.127>
41. Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4:181–189. <https://doi.org/10.1038/nri1312>
42. Schieber M, Chandel NS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology* 24:R453–R462

43. Gutteridge JMC (1984) Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 172:245–249. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)81134-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)81134-5)
44. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P (2004) [Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker]. *Wiad Lek* 57:453–455
45. McCabe GP, Ecker C (1996) Risk factors for relinquishment of cats. *J Am Vet Med Assoc* 209:582–588
46. Willeberg P (1976) Interaction effects of epidemiologic factors in the feline urological syndrome. *Nord Vet Med* 28:193–200
47. Gonçalves BA, Vianna LR, Andrade CC, Oliveira JSG (2020) Treatment of Feline Idiopathic Cystitis (Pandora's Syndrome) with Neural Therapy—Case Report. *Ecricon EC Veterinary Science* 15:1–5
48. Westropp JL, Kass PH, Buffington CAT (2006) Evaluation of the effects of stress in cats with idiopathic cystitis. *Am J Vet Res* 67:731–736. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.4.731>
49. Forrester S (2023) FLUTD: How Important is It?
50. Jones E, Palmieri C, Thompson M, Jackson K, Allavena R (2021) Feline idiopathic cystitis: pathogenesis, histopathology and comparative potential. *J Comp Pathol* 185:18–29
51. Westropp JL, Buffington CAT (2004) Feline idiopathic cystitis: current understanding of pathophysiology and management. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 34:1043–1055
52. Gunn-Moore DA (2003) Feline lower urinary tract disease. *J Feline Med Surg* 5:133–138. [https://doi.org/10.1016/S1098-612X\(02\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1098-612X(02)00129-8)
53. Defauw PAM, Van de Maele I, Duchateau L, Polis IE, Saunders JH, Daminet S (2011) Risk factors and clinical presentation of cats with feline idiopathic cystitis. *J Feline Med Surg* 13:967–975
54. Seth JH, Sahai A, Khan MS, Van der Aa F, De Ridder D, Panicker JN, Dasgupta P, Fowler CJ (2013) Nerve growth factor (NGF): a potential urinary biomarker for overactive bladder syndrome (OAB)? *BJU Int* 111:372–380
55. Tony Buffington CA, Westropp JL, Chew DJ (2014) From FUS to Pandora syndrome: where are we, how did we get here, and where to now? *J Feline Med Surg* 16:385–394
56. Sparkes A (2018) Understanding feline idiopathic cystitis. *In Pract* 40:95–101
57. Kruger JM, Osborne CA, Goyal SM, Wickstrom SL, Johnston GR, Fletcher TF, Brown PA (1991) Clinical evaluation of cats with lower urinary tract disease. *J Am Vet Med Assoc* 199:211–216
58. Buffington CAT, Westropp JL, Chew DJ, Bolus RR (2006) Risk factors associated with clinical signs of lower urinary tract disease in indoor-housed cats. *J Am Vet Med Assoc* 228:722–725
59. Cameron ME, Casey RA, Bradshaw JWS, Waran NK, Gunn-Moore DA (2004) A study of environmental and behavioural factors that may be associated with feline idiopathic cystitis. *Journal of Small Animal Practice* 45:144–147
60. Stella JL, Lord LK, Buffington CAT (2011) Sickness behaviors in response to unusual external events in healthy cats and cats with feline interstitial cystitis. *J Am Vet Med Assoc* 238:67–73
61. Lekcharoensuk C, Osborne CA, Lulich JP (2001) Epidemiologic study of risk factors for lower urinary tract diseases in cats. *J Am Vet Med Assoc* 218:1429–1435
62. Kim Y, Kim H, Pfeiffer D, Brodbelt D (2018) Epidemiological study of feline idiopathic cystitis in Seoul, South Korea. *J Feline Med Surg* 20:913–921
63. Piyaungsri K, Tangtrongsup S, Thitaram N, Lekklar P, Kittinuntasilp A (2020) Prevalence and risk factors of feline lower urinary tract disease in Chiang Mai, Thailand. *Sci Rep* 10:196
64. Willeberg P (1984) Epidemiology of naturally occurring feline urologic syndrome. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 14:455–469
65. Jones BR, Sanson RL, Morris RS (1997) Elucidating the risk factors of feline lower urinary tract disease. *N Z Vet J* 45:100–108
66. Westropp JL, Delgado M, Buffington CAT (2019) Chronic lower urinary tract signs in cats: current understanding of pathophysiology and management. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 49:187–209
67. Forrester SD, Towell TL (2015) Feline idiopathic cystitis. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 45:783–806
68. Parsons CL (2007) The Role of the Urinary Epithelium in the Pathogenesis of Interstitial Cystitis/Prostatitis/Urethritis. *Urology* 69:S9–S16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.urology.2006.03.084>
69. Hostutler RA, Chew DJ, DiBartola SP (2005) Recent concepts in feline lower urinary tract disease. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 35:147–170
70. Panchaphanpong J, Asawakarn T, Pusoonthornthum R (2011) Effects of oral administration of N-acetyl-d-glucosamine on plasma and urine concentrations of glycosaminoglycans in cats with idiopathic cystitis. *Am J Vet Res* 72:843–850. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.6.843>

71. Pereira DA, Aguiar JAK, Hagiwara MK, Michelacci YM (2004) Changes in cat urinary glycosaminoglycans with age and in feline urologic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1672:1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.02.002>
72. Lutgendorf Sk, Kreder Kj, Rothrock Nane, Ratliff Tl, Zimmerman B (2000) Stress And Symptomatology In Patients With Interstitial Cystitis: A Laboratory Stress Model. *J Urol* 164:1265–1269. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)67152-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)67152-2)
73. Stella JL, Lord LK, Buffington CAT (2011) Sickness behaviors in response to unusual external events in healthy cats and cats with feline interstitial cystitis. *J Am Vet Med Assoc* 238:67–73. <https://doi.org/10.2460/javma.238.1.67>
74. Larauche M, Kiank C, Tache Y (2009) Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60:33
75. Reche A, Buffington Cat (1998) Increased tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the locus coeruleus of cats with interstitial cystitis. *J Urol* 159:1045–1048
76. Welk KA, Buffington CAT (2003) Effect of interstitial cystitis on central neuropeptide and receptor immunoreactivity in cats. *Research Insights into Interstitial Cystitis* 30:74
77. Westropp JL, Buffington CAT (2003) Effect of a corticotropin releasing factor (crf) antagonist on hypothalamic-pituitary-adrenal activation in response to crf in cats with interstitial cystitis. *Research Insights into Interstitial Cystitis* 30:74
78. Westropp JL, Welk KA, Buffington CAT (2003) Small adrenal glands in cats with feline interstitial cystitis. *J Urol* 170:2494–2497
79. McEwen BS (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886:172–189
80. Stella J, Croney C, Buffington T (2013) Effects of stressors on the behavior and physiology of domestic cats. *Appl Anim Behav Sci* 143:157–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.10.014>
81. Seawright A, Casey R, Kiddie J, Murray J, Gruffydd-Jones T, Harvey A, Hibbert A, Owen L (2008) A case of recurrent feline idiopathic cystitis: the control of clinical signs with behavior therapy. *Journal of Veterinary Behavior* 3:32–38
82. Parys M, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kruger JM (2018) Serum Cytokine Profiling in Cats with Acute Idiopathic Cystitis. *J Vet Intern Med* 32:274–279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jvim.15032>
83. Carney HC, Sadek TP, Curtis TM, Halls V, Heath S, Hutchison P, Mundschenk K, Westropp JL (2014) AAEP and ISFM Guidelines for Diagnosing and Solving House-Soiling Behavior in Cats. *J Feline Med Surg* 16:579–598. <https://doi.org/10.1177/1098612X14539092>
84. Sævik BK, Trangerud C, Ottesen N, Sørum H, Eggertsdóttir A V (2011) Causes of lower urinary tract disease in Norwegian cats. *J Feline Med Surg* 13:410–417. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.12.012>
85. Buffington CAT, Westropp JL, Chew DJ, Bolus RR (2006) Clinical evaluation of multimodal environmental modification (MEMO) in the management of cats with idiopathic cystitis. *J Feline Med Surg* 8:261–268. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2006.02.002>
86. Gunn-Moore DA (2008) FIC (feline idiopathic cystitis). *Hill's Pet Nutrition*, Ed 1–8
87. Neilson J (2004) Thinking outside the box: Feline elimination. *J Feline Med Surg* 6:5–11. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2003.09.008>
88. Cooper ES, Owens TJ, Chew DJ, Buffington CAT (2010) A protocol for managing urethral obstruction in male cats without urethral catheterization. *J Am Vet Med Assoc* 237:1261–1266. <https://doi.org/10.2460/javma.237.11.1261>
89. Hatala P, Lajos A, Mackei M, Sebők C, Tráj P, Vörösházi J, Neogrady Z, Mátiš G (2023) 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. *Vet Sci* 10:. <https://doi.org/10.3390/vetsci10020132>
90. Chew D, Buffington CAT (2013) Pandora syndrome: it's more than just the bladder. In: *Conf. Am. Assoc. Feline. Pract.* pp 75–83
91. Tony Bca, Karel P (2001) Increased Plasma Norepinephrine Concentration In Cats With Interstitial Cystitis. *Journal of Urology* 165:2051–2054. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)66292-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)66292-1)
92. Buffington CAT, Teng B, Somogyi GT (2002) Norepinephrine Content And Adrenoceptor Function In The Bladder Of Cats With Feline Interstitial Cystitis. *J Urol* 167:1876–1880. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)65253-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)65253-6)
93. Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ (2001) Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:13396–13401. <https://doi.org/10.1073/pnas.231243698>

94. Birder L (2004) Role of the urothelium in bladder function. *Scand J Urol Nephrol* 38:48–53. <https://doi.org/10.1080/03008880410015165>
95. Homan T, Tsuzuki T, Dogishi K, Shirakawa H, Oyama T, Nakagawa T, Kaneko S (2013) A Novel Mouse Model of Chronic Inflammatory and Overactive Bladder by a Single Intravesical Injection of Hydrogen Peroxide. *J Pharmacol Sci* 121:327–337. <https://doi.org/https://doi.org/10.1254/jphs.12265FP>
96. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK (2018) Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res* 122:877–902. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>
97. Bürger A, Benicke M, Deten A, Zimmer H-G (2001) Catecholamines stimulate interleukin-6 synthesis in rat cardiac fibroblasts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 281:H14–H21. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.1.H14>
98. Stohl LL, Zang JB, Ding W, Manni M, Zhou XK, Granstein RD (2013) Norepinephrine and adenosine-5'-triphosphate synergize in inducing IL-6 production by human dermal microvascular endothelial cells. *Cytokine* 64:605–612. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.08.005>
99. Yang R, Lin Q, Gao HB, Zhang P (2014) Stress-related hormone norepinephrine induces interleukin-6 expression in GES-1 cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 47:101–109. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20133346>
100. Mohamaden WI HR and BH (2019) Alterations of Pro-Inflammatory Cytokines and Tissue Protein Expressions in Cats with Interstitial Cystitis. *Pak Vet J* 151–156
101. Corcoran A, Yoshimura N, Tyagi V, Jacobs B, Leng W, Tyagi P (2012) Mapping the cytokine profile of painful bladder syndrome/interstitial cystitis in human bladder and urine specimens. *World J Urol* 31:1. <https://doi.org/10.1007/s00345-012-0852-y>
102. Tony Buffington CA, Dennis JC, DiBartola SP (1996) Interstitial Cystitis in Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 26:317–326. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(96\)50212-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0195-5616(96)50212-3)
103. Kruger JM, Osborne CA, Lulich JP (2009) Changing Paradigms of Feline Idiopathic Cystitis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 39:15–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.09.008>
104. Kullmann FA, McDonnell BM, Wolf-Johnston AS, Lynn AM, Giglio D, Getchell SE, Ruiz WG, Zabbarova I V, Ikeda Y, Kanai AJ, Roppolo JR, Bastacky SI, Apodaca G, Buffington CAT, Birder LA (2018) Inflammation and Tissue Remodeling in the Bladder and Urethra in Feline Interstitial Cystitis. *Front Syst Neurosci* 12:
105. Lee J-D, Lee M-H (2014) Decreased expression of zonula occludens-1 and occludin in the bladder urothelium of patients with interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Journal of the Formosan Medical Association* 113:17–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfma.2012.03.010>
106. Lavelle JP, Meyers SA, Ruiz WG, Buffington CAT, Zeidel ML, Apodaca G (2000) Urothelial pathophysiological changes in feline interstitial cystitis: a human model. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 278:F540–F553. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.278.4.F540>
107. Rao RK, Li L, Baker RD, Baker SS, Gupta A (2000) Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 279:G332–G340. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.2.G332>
108. Collares-Buzato CB, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH (1998) Increased tyrosine phosphorylation causes redistribution of adherens junction and tight junction proteins and perturbs paracellular barrier function in MDCK epithelia. *Eur J Cell Biol* 76:85–92. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0171-9335\(98\)80020-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0171-9335(98)80020-4)
109. Lee H-S, Namkoong K, Kim D-H, Kim K-J, Cheong Y-H, Kim S-S, Lee W-B, Kim K-Y (2004) Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 68:231–238. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mvr.2004.07.005>
110. Mackei M, Molnár A, Nagy S, Pál L, Kővágó C, Gálfi P, Dublec K, Husvéth F, Neogrády Z, Mátis G (2020) Effects of Acute Heat Stress on a Newly Established Chicken Hepatocyte—Nonparenchymal Cell Co-Culture Model. *Animals* 10:1. <https://doi.org/10.3390/ani10030409>
111. Matthews BD, Overby DR, Mannix R, Ingber DE (2006) Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *J Cell Sci* 119:508–518. <https://doi.org/10.1242/jcs.02760>

Köszönetnyilvánítás

Dolgozatom befejezéseként hálámat szeretném kifejezni mindazok felé, akik ezen munkának létrejöttéhez valamilyen módon hozzájárultak. Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Hatala Patrícának tartozom hálával, hiszen számos egyéb teendője mellett fáradhatatlanul segített a dolgozatom megírásában és a kísérletek végrehajtásában. Támogatása és odafigyelése nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Mátis Gábornak, aki nemcsak a TDK munkám lehetőségét teremtette meg a tanszéken, hanem a biokémia szeretetét is átadta számomra. Biztatása a dolgozat ötletének felmerülésétől annak elkészültéig végig kísért. Külön köszönet illeti Dr. Bartha Tibor tanszékvezető Urat, hogy lehetőséget adott arra, hogy bekapcsolódhassak a tanszék tudományos munkájába. Hálával tartozom szobatársaimnak, és barátaimnak, akik mindig segítségemre voltak, amikor arra volt szükség. Végül, de nem utolsó sorban családom kitartó támogatását szeretném megköszönni, hogy végig mellettem álltak, hittek bennem és támogattak a dolgozat elkészülése során.