

A PACAP-38 citoprotektív és antiinflammatorikus hatásának vizsgálata vékonybél-autotranszplantációs modellben

Examination of cytoprotective and anti-inflammatory effect of PACAP-38 on small bowel autotransplantation

NEDVIG KLÁRA¹, SZABÓ GYÖRGYI², CSUKÁS DOMOKOS², SÁNDOR JÓZSEF², NÉMETH JÓZSEF³, KOVÁCS KRISZTINA⁴, REGLÓDI DÓRA⁵, KEMÉNY ÁGNES⁶, WÉBER GYÖRGY², FERENCZ ANDREA^{2,@}

¹Zala Megyei Kórház, Általános Sebészeti és Érsebészeti Osztály, Zalaegerszeg (igazgató: Prof. Dr. Vattay Péter)

²Semmelweis Egyetem, Kísérletes és Sebészeti Műtéttani Intézet, Budapest (igazgató: Prof. Dr. Weber György)

³Debreceni Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Debrecen (igazgató: Prof. Dr. Szilvassy Zoltán)

⁴Pécsi Tudományegyetem, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs (igazgató: Prof. Dr. Sümegei Balázs)

⁵Pécsi Tudományegyetem, Anatómiai Intézet, Pécs (igazgató: Prof. Dr. Reglődi Dóra); MTA „Lendület PACAP Kutatócsoport”

⁶Pécsi Tudományegyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Pécs (igazgató: Prof. Dr. Pintér Erika)

Bevezetés: A vékonybél ischaemia-reperfüsióval szembeni fokozott érzékenysége a szerv transzplantációjakor is jelen lévő probléma. Ismert a hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) sejtvédő hatása. Munkánkban azt vizsgáltuk, hogy PACAP-38-at tartalmazó University of Wisconsin (UW) oldatban történő konzerválás hogyan befolyásolja a szöveti PACAP- és citokinszinteket. **Anyag és módszer:** Wistar-patkányokon ($n = 56$) vékonybél-autotranszplantációt végeztünk. A graftokat 4 °C-os UW oldatban tároltuk 1 (I. csoport), 3 (II.) és 6 órán (III.), illetve 100 µg PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban 1 (IV.), 3 (V.) és 6 órán (VI.) át. A reperfüzio 3 óra volt. Bélmintákból a PACAP-38- és PACAP-27-szinteket radioimmunoassayjel határoztuk meg, míg a citokinexpressziót kemilumineszcens módszerrel és Luminex Multiplex Immunoassayjel mértük. **Eredmények:** A szöveti PACAP-38-szint a kontrollhoz ($57,32 \pm 3,5$ fmol/mg) képest a konzerválás idejével csökkent, és 6 óra után szignifikáns volt (III.: $32,6 \pm 3,9$ fmol/mg, $p < 0,05$), míg a IV–VI. csoportoknál szignifikánsan nőtt. A PACAP-27 szöveti értéke is hasonló tendenciával változott. Az sICAM-1, L-selectin és a metalloproteáz-1 szöveti inhibitorának emelkedett expresszióját mértük a III. csoportban, és jelentős csökkenés volt a VI. csoportban. **Következtetés:** UW oldathoz adott PACAP-38 növelte a szöveti PACAP-38- és PACAP-27-szinteket, és csökkentette a citokinexpressziót. Mindez a PACAP-38 citoprotektív és anti-inflammatorikus hatását jelzi bél-autotranszplantációs modellben.

Támogatta: OTKA (PD77474, 104984, CNK78480), MTA Bolyai-ösztöndíj és Lendület program.

Kulcsszavak: vékonybél, transzplantáció, PACAP-38, PACAP-27, citokinexpressio

Introduction: The small intestine is one of the most sensitive organs to ischemia-reperfusion injury during transplantation. Cytoprotective effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is well known. The aim of our study was to measure changes of PACAP-38-like immunoreactivities and cytokine levels in intestinal grafts stored PACAP-38 containing preservation solution. **Material and methods:** Small-bowel autotransplantation was performed on male Wistar rats ($n = 56$). Grafts were stored in University of Wisconsin (UW) solution at 4 °C for 1 (GI), 3 (GII), and 6 hours (GIII); and in PACAP-38 containing UW solution for 1 (GIV), 3 (GV), and 6 hours (GVI). Reperfusion lasted 3 hours in each group. Intestinal PACAP-38 immunoreactivities were measured by radioimmunoassay. To measure cytokine from tissue homogenates we used rat cytokine array and Luminex Multiplex Immunoassay. **Results:** Levels of PACAP-38-like and PACAP-27-like immunoreactivities decreased by preservation time compared to control. This decrease was significant following 6 hours cold storage ($p < 0.05$). Values remained significantly higher in grafts stored in PACAP-38 containing UW. Expressions of sICAM-1, L-selectin, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 were increased in GIII and were decreased in GVI. **Conclusion:** PACAP-38 increased tissue levels of PACAP-38 and PACAP-27, and decreased cytokine expression. This indicates that PACAP-38 has anti-inflammatory and cytoprotective effects in intestinal autotransplantation model.

Supported by Grant OTKA (PD77474, 104984, CNK78480), Bolyai Scholarship and “Lendület” program of the Hungarian Academy of Sciences.

Keywords: small bowel, transplantation, PACAP-38, cytokine expression

Beérkezett: 2013. szeptember 2.; *elfogadva:* 2013. szeptember 5.

@ *Levelezési cím/Corr. address:* Dr. Ferencz Andrea, Semmelweis Egyetem, Kísérletes és Sebészeti Műtéttani Intézet, 1089 Budapest, Nagyvárud tér 4., Tel.: +36 1 459 1500/56575, Fax: +36 1 459 1500/56574, E-mail: andrea.ferencz@gmail.com

Bevezetés

A vékonybél fokozottan érzékeny a szöveti ischaemiás/reperfüziós (I/R) károsodásokra, amivel transzplantációja során is számolnunk kell. Kísérletes és klinikai eredmények igazolták, hogy transzplantációkor a konzerválás (hideg ischaemia) és a reperfüzio mind rövid, mind hosszú távon káros hatású, növeli az acut kilökődések számát, vagy krónikus allograft-funkciózavart okoz.¹⁻² A jelenleg „standardként” használt University of Wisconsin (UW) konzerváló oldatot főként vese és máj tárolására fejlesztették ki. A többi szervvel kapott jó eredmények ellenére a bélgraftok tárolására ez az oldat nem „optimális”.³⁻⁴ Folyamatos kutatások folynak a forgalomban lévő oldatok módosítása (új összetevők, magasabb energia- és tápanyagtartalom), illetve új oldatok kifejlesztése terén.⁵⁻⁷

A hypophysis adenilat-cikláz aktiváló polipeptid (Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide, PACAP) az evolúció során jól konzervált, széles hatásspektrumú neuropeptid, amely hat az endokrin mirigyekre, a cardiovascularis és légzőrendszerre, valamint az emésztőtraktusra is. A polipeptidnek két formája van, a 38 aminosavat tartalmazó PACAP-38 és a 27 aminosavból álló PACAP-27.⁸ Mint „brain-gut” peptidek az emésztőrendszer teljes hosszában megtalálhatóak, immunreaktivitásuk a sejtestekben és az idegvégződéseken mutatható ki, főként a jejunum és az ileum területén.⁹ Fokozott affinitással kötődnek a PAC1 és a VIP-del (vasoactiv intestinal peptid) közös VPAC1 és VPAC2 receptorokhoz.⁸⁻⁹ Mindhárom receptoruk megtalálható a mucosában, a myentericus neuronokban, neuroendokrin és érendothelsejteken, valamint a simaizomsejteken.¹⁰⁻¹¹

A PACAP-38 antiapoptotikus, antiinflammatorikus és antioxidáns protektív hatása számos *in vitro* és *in vivo* kísérletben igazolódott.¹²⁻¹⁵ Pontosán még nincs tisztázva, hogy milyen mechanizmusokon keresztül hat, de az igen, hogy a bélszöveti I/R-s károsodás a béltraktusban citokinfelzabadulást eredményez.¹⁶ Számos gyulladási modellben leírták, hogy a PACAP antiinflammatorikus hatása részben a citokinek és kemokinek termelésének gátlása révén érvényesül.^{15,17-19} Célunk vékonybél-autotranszplantáció során PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő konzerválást követően a szöveti PACAP-38 és PACAP-27 immunreaktivitásának, valamint a citokinszinteknek a kimutatása volt.

Anyag és módszer

Kísérleteinkhez felnőtt hím Wistar-patkányokat ($n = 56$, $n = 8$ /csoport) használtunk. Az altatáshoz intramuscularisan ketamin-hidrokloridot (75 mg/testsúly-kg) és diazepamot (75 mg/testsúly-kg) adtunk. A vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága engedélyében (BA02/2000-9/2008) megadott módon végeztük el.

Vékonybél-autotranszplantációs modell

Az „S” (Sham) csoportba a csak median laparotomián átesett, áloperált állatok kerültek. Az I–VI. csoportokban Na-heparin (0,2 U/g) adása mellett minden esetben a colon descendensig történő vékonybél-resectio történt, majd a bél lumenét fiziológiás sóoldattal mostuk át. A graftok perfúziója az arteria mesenterica superioron keresztül valósult meg. Majd 100 ml 4 °C-os UW oldatban tároltuk (ViaSpan, Dupont Pharma, Bad Hamburg, Németország) 1 órán (I. csoport), 3 órán (II. csoport) és 6 órán keresztül (III. csoport). A további graftokat 100 µg PACAP-38-at tartalmazó 100 ml UW oldatban 1 órán (IV. csoport), 3 órán (V. csoport) és 6 órán keresztül (VI. csoport) konzerváltuk. Ezt követően end-to-end érvarrattal állítottuk helyre a mesenterialis erek folytonosságát. A reperfüzio minden esetben 3 órán át tartott. A laparotomia után (kontroll, K) és a reperfüzio végén szövetmintákat vettünk.

Radioimmunoassay

A bélszövetből származó mintákat (600 mg) jéghideg vízben homogenizáltuk, majd 12 000-es fordulatszámon 30 percig 4 °C-os hőmérsékleten centrifugáltuk. Ezután a felülúszót a PACAP-38-szerű és PACAP-27-szerű immunreakciók vizsgálata céljából RIA analízisnek vetettük alá, ahogy azt korábban leírtuk.²⁰ A PACAP-38 antiszérumát 88111-3-mal, a PACAP-27 antiszérumát 88123-mal rövidítettük. Jelölt anyagként 125-ös jódizotóppal jelölt juhból származó PACAP24-38-at és PACAP-27-et használtunk (csövenként 5000 cpm-et). A standardjaink juhból származó PACAP-38 és PACAP-27 voltak (0–1000 fmol/ml). A vizsgálatot 0,1 M NaCl-ot, 0,05% nátrium-azidot és 0,25% marha-szérumalbumint tartalmazó 7,4-es pH-jú 0,05 M-os 1 ml térfogatú foszfátpufferben végeztük. A vizsgálati elegy 100 µl antiszérumot (a 88111-3 jelűből 1:10 000 hígítást, a 88123 jelűből 1:45 000 hígítást), 100 µl jelölt anyagot és 100 µl standardot vagy ismeretlen mintát tartalmazó polipropilén csövekbe került. 48–72 órát követő 4 °C-on történő inkubáció után az (antiszérumból származó) antitesteket megkötő peptideket 100 µl szeparáló oldat segítségével elkülönítettük azoktól a peptidektől, amelyek nem kötöttek antitestet. A szeparáló oldat összetétele: 10 g aktív szén, 1 g dextrán és 0,2 g közönséges zsírintes tejpor 100 ml desztillált vízben oldva. 4 °C-on 20 percig 3000-es fordulaton való centrifugálást követően a cső tartalmának felülúszóját óvatosan elöntöttük (= dekantáltuk), és a csőben maradó csapadék radioaktivitását gamma-számlálóval mértük. Az ismeretlen minta PACAP-38-, illetve PACAP-27-tartalmát kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg. A PACAP-38-szerű és PACAP-27-szerű kötődés arányát femtomol/mg szövetértékben adtuk meg.

A citokinaktivitás mérése

Citokin Array

A bélszövet citokintartalmának kemilumineszcens vizsgálatát a korábban leírtak szerint végeztük.¹³ Röviden, a szöveti homogenizátum méréséhez patkánycitokinkitet használtunk (Panel A Array kit, R&D Systems). A bélszövetet proteáz inhibitor tartalmú PBS pufferben homogenizáltuk, Triton X-100-at adtunk hozzá, majd $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a felhasználásig. A mintákhoz antitestegyedert adtunk, majd 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk őket. Háromszori pufferes mosás után tormaperoxidáz-konjugált Streptavidint adtunk a mintákhoz, és kemilumineszcens mérés (Amersham Biosciences, Hungary) után rtg-filmre rögzítettük az eredményeket.

Luminex Multiplex Immunassay

A korábban leírtak alapján a bélszövetben három „host” marker (szolúbilis intercellularis adhaesiós molekula-1: sICAM-1; L-szelektin; tissue inhibitor of metalloproteináz-1: TIMP-1) szintjét határoztuk meg Flurokine MAP Rat Base kit (R&D Systems) segítségével, a gyártó instrukciói alapján.²¹ Az eredményeket pg/g nedvesszövet-értékben adtuk meg.

Statisztika

Az eredmények értékelésekor átlagot és standard errort számoltunk. Az adatokat ANOVA varianciaanalízissel dolgoztuk fel. A szignifikancia szintje $p < 0,05$ volt. Az adatok kiértékeléshez a MicroCal Origin (6.0) programot (Microcal Software, USA) alkalmaztuk.

Eredmények

Radioimmunassay

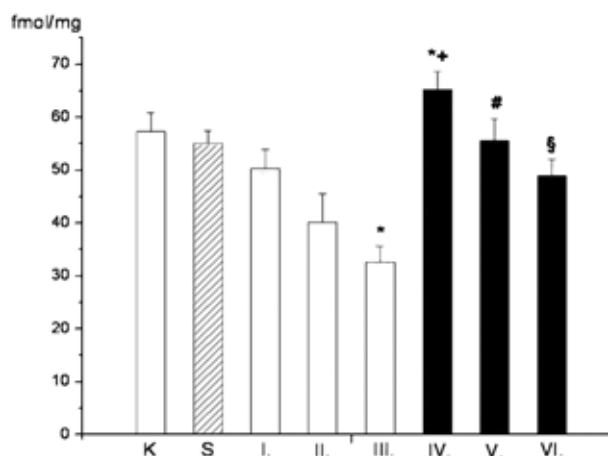
A szöveti PACAP-38-szerű immunreaktivitás $57,32 \pm 3,5$ fmol/mg volt a kontrollmintákban, és $55,1 \pm 2,5$ fmol/mg az áloperált csoportban. Értéke 1 óras hideg konzerválást követően $50,4 \pm 3,5$ fmol/mg-ra (I. csoport), 3 óra után $40,1 \pm 5,5$ fmol/mg-ra csökkent (II. csoport). Ez a változás a 6 órás konzerválás végére (III. csoport: $32,6 \pm 3,0$ fmol/mg; $p < 0,05$) szignifikáns volt. PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő tárolást követően szignifikánsan magasabb szinteket mértünk (IV–VI. csoport). Értéke a IV. csoportban $65,2 \pm 3,4$ fmol/mg, az V. csoportban $55,2 \pm 4,2$ fmol/mg, míg a 6 órás csoportban $48,9 \pm 3,2$ fmol/mg volt (1. ábra).

A szöveti PACAP-27-szerű immunreaktivitás a hideg konzerválás és az autotranszplantáció során csökken a kontroll- ($4,2 \pm 0,2$ fmol/mg) mintákhoz képest. Ez a csökkenés szignifikáns volt mind az 1 óras (I. csoport: $2 \pm 0,2$ fmol/mg; $p < 0,05$), mind a 3 óras (II. csoport: $1,6 \pm$

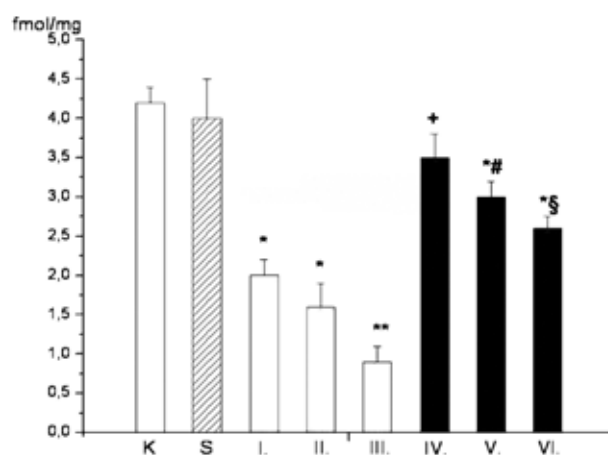
$0,3$ fmol/mg; $p < 0,05$), mind a 6 órás (III. csoport: $0,9 \pm 0,2$ fmol/mg; $p < 0,01$) mintáknál is. PACAP-38-at is tartalmazó UW oldatban történő tárolást követően értéke szignifikánsan magasabb volt a csak UW-ban tárolt mintákhoz képest (IV. csoport: $3,5 \pm 0,3$ fmol/mg; V. csoport: $3,0 \pm 0,2$ fmol/mg; VI. csoport: $2,6 \pm 0,15$ fmol/mg; $p < 0,05$) (2. ábra).

Citokinnmérési eredmények

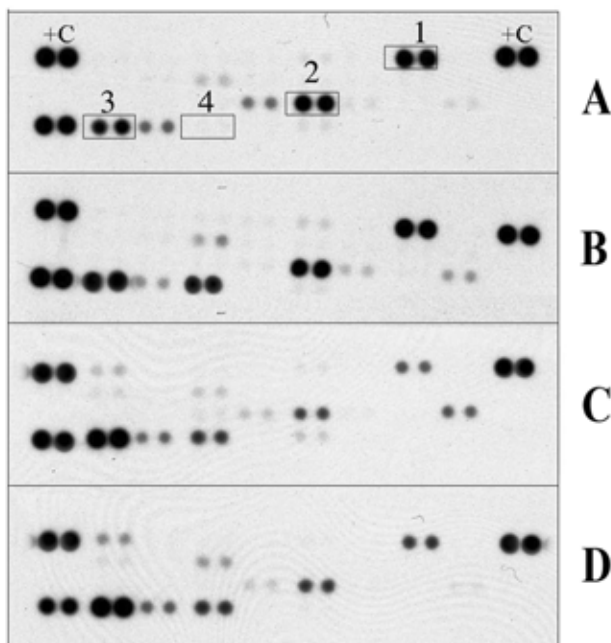
A kemilumineszcens vizsgálatok igazolták, hogy a citokinnek közül a szolúbilis intercellularis adhaesiós molekula (sICAM-1, CD54) (3. ábra, 1) és az L-szelektin (CD62L/LECAM-1) (3. ábra, 2) normál aktivitása volt detektálható a kontrollbélszövetben. A III. csoportban expressziójuk nem változott 6 órás UW oldatban történő konzerválás és az azt



1. ábra. A PACAP-38 immunreaktivitásának szintje autotranszplantált vékonybéliszövetben (K: kontroll, S: áloperált; Mean ± SE; * $p < 0,05$ vs. kontroll; + $p < 0,05$ vs. I. csoport; # $p < 0,05$ vs. II. csoport; § $p < 0,05$ vs. III. csoport)



2. ábra. A PACAP-27 immunreaktivitásának szintje autotranszplantált vékonybéliszövetben (K: kontroll, S: áloperált; Mean ± SE; * $p < 0,05$ vs. kontroll; ** $p < 0,01$ vs. kontroll; + $p < 0,05$ vs. I. csoport; # $p < 0,05$ vs. II. csoport; § $p < 0,05$ vs. III. csoport)



3. ábra. A bélszövet citokinexpressiójának vizsgálata kemilumineszcens módszerrel. Különböző citokinek jelenléte látható a kontroll (a), 6 órás hideg UW oldatban történő konzerválás (b), 6 órás hideg konzerválás PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban (c) és az azt követő reperfusio (d) során. Jelentős változás figyelhető meg az sICAM-1 (1), az L-szelektin (2) és a TIMP-1 (4) expressiójában. A RANTES- (CCL5) szintek (3) minden csoportban emelkedettek voltak (+K: pozitív kontroll). A többi citokinnél (bal felső saroktól indulva: CINC-1, CINC-2alpha/beta, CINC-3, GM-CSF, IFN-gamma, IL-1alpha, IL-1beta, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IP-10, LIX, MIG, MIP-1alpha, TNF-alpha és VEGF) nem volt változás

követő reperfusiók periódus végére. A VI. csoportban mind a 6 órás PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő konzerválás, mind az azt követő 3 órás reperfusio jelentős citokinaktivitás-csökkenést okozott. A RANTES (CCL5) (3. ábra, 3) szintek minden csoportban megemelkedtek. A kontrollmintákban a mátrix-metalloproteináz szöveti inhibitorának (TIMP-1) aktivitása (3. ábra, 4) nem volt mérhető. Jelentős aktivitást mértünk a III. csoportban a 6 órás PACAP-38 nélküli UW oldatban való konzerválást követően. A VI. csoportban a PACAP-38-at tartalmazó hideg konzerválás csökkentette ezen aktivitások szintjét.

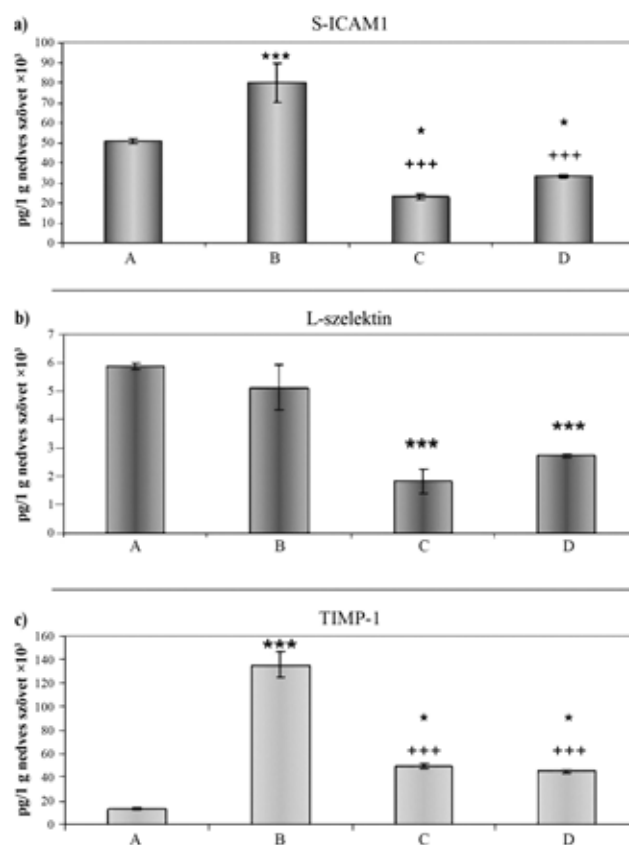
Az előbbi méréseket a Luminex Immunoassayjel kapott eredmények is megerősítették (4.a-c ábra). Az sICAM és az L-szelektin expressiója hasonló a kontroll- (4.a-b ábra, A oszlop) és az ischaemiás csoportokban (4.a-b ábra, B oszlop), míg mindkét esetben szignifikáns csökkenés figyelhető meg a PACAP-38-cal tárolt graftoknál (4.a-b ábra, C és D oszlop). A TIMP expressiója a kimutatási határon volt a kontrollmintákban (4.c ábra, A oszlop), és jelentős emelkedés volt hideg ischaemia után (4.c ábra, B oszlop). Az emelkedett TIMP-szinteket mérsékelte a PACAP-38-at tartalmazó konzerválás (4.c ábra, C és D oszlop).

Megbeszélés

Jelen kutatásunkban kísérletes vékonybél-autotranszplantáció során vizsgáltuk a bélszövet PACAP-38- és PACAP-27-szintjét, valamint a szöveti citokinexpressiót, a szervkonzerváláshoz PACAP-38-at tartalmazó UW oldatot használva.

Az intenzív kutatásoknak köszönhetően az utóbbi években egyre több vékonybél-transzplantáció történik a világon, azonban a graftok és a betegek túlélését a klinikai gyakorlatban ma is számos probléma befolyásolja. A konzerváló oldat alapvető szerepet játszik a hideg ischaemia és az azt követő reperfusio során fellépő szövetkárosodás csökkentésében. A klinikai rutin szerint jelenleg UW oldatot használnak a bélgraftok tárolására. Ez az oldat máj és vese konzerválása esetén számos előnnyel bír, ugyanakkor a vékonybél tárolásához nem optimális.^{4,22} Számos kutatás folyik a kereskedelemben kapható oldatok összetételének módosítása, illetve új oldatok kifejlesztése terén.

Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a bélszövet PACAP-38-szerű és PACAP-27-szerű immunreaktivitása a konzerválási idő előrehaladtával 1 és 3 órás hideg tárolást követő-



4. ábra. A bélszövet citokinexpressiójának vizsgálata immunassay módszerrel. Az sICAM-1, az L-szelektin és a TIMP-1 expressiójában bekövetkező változások láthatóak a kontroll (A), 6 órás hideg UW oldatban történő konzerválás (B), 6 órás hideg konzerválás PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban (C) és az azt követő reperfusio (D) alatt (Mean ± SE; * $p < 0,05$ vs. A; *** $p < 0,01$ vs. A; +++ $p < 0,001$ vs. B)

en csökkent. Ez a csökkenés 6 órás hideg ischaemia után szignifikáns volt. Korábbi meleg I/R-s vékonybélmodellben végzett kutatásaink hasonló eredményeket mutattak az endogén PACAP-38 szintjének változása tekintetében.¹² A hideg ischaemiát követő PACAP-38-szint csökkenését okozhatja mind az ischaemiás sejtek fokozott PACAP-38-felvétele, mind a PACAP-38 szintézisének csökkenése, mind pedig a sejtkárosodás miatti fokozott PACAP-lebomlás. Hasonló megfigyelést tettek kísérletes fekélymodellben is, ahol a PACAP immunreaktivitásának acut csökkenését figyelték meg.²³ A PACAP-38- és PACAP-27-szintek szignifikánsan magasabbak voltak azokban a graftokban, amelyeket PACAP-38-tartalmú UW oldatban tároltunk. Érdekes módon 1 órás konzerválást követően a PACAP-38 szintje a kontrollértékek fölé emelkedett. 3 és 6 órás, PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő konzerválás hatására a bélsejt-homogenizátumban szignifikánsan megnőtt a PACAP-38- és PACAP-27-szint. A reperfüziós időszak végén észlelt emelkedett értékek kialakulásáért felelős mechanizmust pontosan nem ismerjük. Ezt okozhatja az endothelsejtekben a hypoxia következtében csökkent adenilát-cikláz-aktivitás miatt kialakult alacsonyabb intracelluláris cAMP-szint.²⁴ Ez a feltételezés in vivo vékonybél-prezervációs vizsgálatok során is megerősítést nyert. Az említett mechanizmusok közül a celluláris cAMP-jelátvitel játszhatja a fő szerepet az ischaemiás bél integritásának megőrzésében.²⁵ A legújabb tanulmányok megerősítették, hogy a PACAP-38 hatására a cAMP-szint megemelkedik, ami megóvjaa a bélszövetet az I/R okozta károsodástól.²⁶ Továbbá kimutatták, hogy az alapvetően extrinsic denervációval járó vékonybél-transzplantáció során a PACAP-38-szint a gyomorban csökken, de a bélben nem. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a bél PACAP-38-tartalmú idegrostjainak kettős – intrinsic és extrinsic – eredete van.⁹ A másik lehetséges magyarázat, hogy a konzerváló oldathoz adott, külsőleg bevitt PACAP specifikus receptoraihoz hozzákötődve fejti ki antioxidáns és protektív hatását a bélben.^{7,12}

A bélszövet károsodásáért elsősorban az I/R során keletkező gyulladáskeltő mediátorok, közöttük a citokinek is felelősek. Az indukált gyulladással kaszkád aktiválhatja a leukocytákat és az endothelsejteket, ami végül szöveti gyulladáshoz, többszervi elégtelenséghez és halálhoz vezethet. I/R-t követően vékonybél-transzplantáció során a bél citokintermelő szervvé válik, fenyegetve ezáltal a graft és a beteg túlélését.²⁷

Jelen vizsgálatunkban azt találtuk, hogy az sICAM-1 és az L-szelektin expressiója jelen volt a kontrollbélszövetben is, és szabályos aktiválódást mutatott 6 órás, hideg UW oldatban való konzerválás és azt követő reperfüzió során. Ezzel szemben a 6 órás, PACAP-38-tartalmú UW oldatban való tárolás jelentősen csökkentette a citokinek aktivációját. A sICAM-1 és az L-szelektin fokozott expressiója vese I/R-t követően is megfigyelhető volt, ugyanakkor ott a PACAP-kezelt csoportokban csökkenés volt kimutatható.^{13,15} A citokinek közé tartozó adhaesiós molekulák részt vesznek a leukocyták, a vérlemezkék, a T-sejtek és az endothelsejtek

közötti intercelluláris kommunikációban, beindítva ezzel a microvascularis sérülést és a reperfüziós károsodást.²⁸ A RANTES (CCL5) nem konstitutívan termelődő kemokin, csupán gyulladás során expressálódik. Modellünkben a CCL5-szint minden csoportban emelkedett volt, ugyanakkor a PACAP-kezelt csoportokban enyhe csökkenés volt megfigyelhető. Gyulladásos folyamatokban a mátrix-metalloproteináz-9 (MMP-9) és endogén inhibitorának (TIMP-1) transzkripciója a proinflammatorikus mediátorok hatására indukálódik. Kísérletünkben a TIMP-1 erőteljes aktivációja volt kimutatható PACAP-38 nélküli UW oldatban való 6 órás tárolást követően. PACAP-38 tartalmú oldatban történő konzerválás csökkentette az aktivációt. A PACAP gyulladásgátló hatása részben a citokin- és kemokintermelésre történő gátló hatása révén érvényesül.^{13,15,17}

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy eredményeink igazolták a PACAP-38 citoprotektív és antiinflammatorikus hatását PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő vékonybél-konzerválás és -autotranszplantáció során, aminek a jövőben klinikai jelentősége lehet.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönettel tartoznak a Pécsi Tudományegyetem Sebészeti Oktató és Kutató Intézet munkatársainak a kísérletek elvégzéséhez nyújtott segítségért. A kutatást támogatta az OTKA PD77474, 104984, CNK78480, az MTA Bolyai-ösztöndíj és Lendület program.

Irodalomjegyzék

- ¹ Ferencz A, Nedvig K, Fekecs T, Rác B, Weber Gy, Hashimoto H, Baba A, Helyes Z, Reglödi D: Comparison of intestinal cold preservation injury on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in knockout and wild-type mice. *Transplant Proc* 2010; 42: 2290–2
- ² Linfert D, Chowdhry T, Rabb H: Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev* 2009; 23: 1–10
- ³ Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ: Perspectives in organ preservation. *Transplantation* 2007; 83: 1289–98
- ⁴ Roskott AM, Nieuwenhuijs VB, Dijkstra G, Koudstaal LG, Leuvenink HG, Ploeg RJ: Small bowel preservation for intestinal transplantation: a review. *Transpl Int* 2011; 24: 107–31
- ⁵ Inuzuka K, Unno N, Yamamoto N, Sagara D, Suzuki M, Nishiyama M, Konno H: Effect of hyperbarically oxygenated-perfluorochemical with University of Wisconsin solution on preservation of rat small intestine using an original pressure-resistant portable apparatus. *Surgery* 2007; 142: 57–66
- ⁶ Wei L, Hata K, Doorschodt BM, Büttner R, Minor T, Tolba RH: Experimental small bowel preservation using Polysol: A new alternative to University of Wisconsin solution, Celsior and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution? *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3684–91

- 7 Ferencz A, Rác B, Tamás A, Reglődi D, Lubics A, Németh J, Nedvig K, Kalmár-Nagy K, Horváth OP, Wéber Gy, Róth E: Influence of PACAP on oxidative stress and tissue injury following small bowel autotransplantation. *J Mol Neurosci* 2009; 37: 168–76
- 8 Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Basille D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 2009; 61: 283–357
- 9 Hannibal J, Ekblad E, Mulder H, Sundler F, Fahrenkrug J: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the gastrointestinal tract of the rat: Distribution and effects of capsaicin or denervation. *Cell Tissue Res* 1998; 291: 65–79
- 10 Schulz S, Rocken C, Mawrin C, Weise W, Holtt V, Schulz S: Immunocytochemical identification of VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptors in normal and neoplastic human tissues with subtype-specific antibodies. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8235–42
- 11 Pirone A, Baoan D, Piano I, Santina LD, Baglini A, Lenzi C: Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) immunoreactivity distribution in the small intestine of the adult New Hampshire chicken. *Acta Histochem* 2011; 113: 477–83
- 12 Ferencz A, Kiss P, Wéber Gy, Helyes Zs, Shintani N, Baba A, Reglődi D: Comparison of intestinal warm ischemic injury in PACAP knockout and wild-type mice. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 435–42
- 13 Horváth G, Márk L, Brubel R, Szakály P, Rác B, Kiss P, Tamás A, Helyes Zs, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Furjes G, Németh J, Reglődi D: Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide display increased sensitivity to renal oxidative stress in vitro. *Neurosci Lett* 2010; 469: 70–4
- 14 Rác B, Gallyas F, Kiss P, Tóth G, Hegyi O, Gasz B, Bor-siczky B, Ferencz A, Róth E, Tamás A, Lengvári I, Lubics A, Reglődi D: The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involves inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regul Pept* 2006; 137: 20–6
- 15 Reglődi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gábríel R, Horváth G, Szakály P, Sándor B, Lubics A, László E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Zs, Welke L, Lakatos A, Tamás A: PACAP is an endogenous protective factor – insights from PACAP deficient mice. *J Mol Neurosci* 2012; 48: 482–92
- 16 Grotz M, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G: Intestinal cytokine response after gut ischemia. Role of gut barrier failure. *Ann Surg* 1999; 229: 478–86
- 17 Delgado M, Genea D: Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in vitro and in vivo. *J Immunol* 2001; 167: 966–75
- 18 Horváth G, Rác B, Reglődi D, Kovács K, Kiss P, Gallyas F, Bognár Z, Szabó A, Magyarlaki T, László E, Lubics A, Tamás A, Tóth G, Szakály P: Effects of PACAP on mitochondrial apoptotic pathways and cytokine expression in rats subjected to renal ischemia/reperfusion. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 411–8
- 19 Ohtaki H, Satoh A, Nakamachi T, Yofu S, Dohi K, Mori H, Ohara K, Miyamoto K, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Matsunaga M, Shioda S: Regulation of oxidative stress by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mediated by PACAP receptor. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 397–403
- 20 Brubel R, Horváth G, Reglődi D, Lubics A, Tamás A, Kiss P, László E, Németh J, Márk L, Szakály P: Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor in the rat kidney. *Transplant Proc* 2011; 43: 1297–9
- 21 Nedvig K, Wéber Gy, Németh J, Kovács K, Reglődi D, Kemény A, Ferencz A: Changes of PACAP immunoreactivities and cytokine levels after PACAP-38 containing intestinal preservation and autotransplantation. *J Mol Neurosci* 2012; 48: 788–94
- 22 Salehi P, Spratlin J, Chong F, Churchill A: Beneficial effects of supplemental buffer and substrate on energy metabolism during small bowel storage. *Cryobiology* 2004; 48: 245–53
- 23 Mei Q, Sundler F: Changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide innervation of rat oxyntic mucosa during ulcer healing. *Neuropeptides* 1998; 32: 527–35
- 24 Yan SF, Ogawa S, Stern DM, Pinsky DJ: Hypoxia-induced modulation of endothelial cell properties: Regulation of barrier function and expression on interleukin-6. *Kidney Int* 1997; 51: 419–25
- 25 Minor T, Isselhard W: Cellular signal level of cyclic AMP and functional integrity of the small bowel after ischemic preservation: An experimental pilot study in the rat. *Eur Surg Res* 1998; 30: 144–8
- 26 Riera M, Torras J, Cruzado JM, Lloberas N, Liron J, Herrero I, Navarro MA, Grinyo JM: The enhancement of endogenous cAMP with pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects rat kidney against ischemia through the modulation of inflammatory response. *Transplantation* 2001; 72: 1217–23
- 27 Kostopanagiotou G, Avgerinos ED, Markidou E, Voiniadis P, Chondros C, Theodoraki K, Smyrniotis V, Arkadopoulos N: Protective effect of NAC preconditioning against ischemia-reperfusion injury in piglet small bowel transplantation: effects on plasma TNF, IL-8, hyaluronic acid, and NO. *J Surg Res* 2011; 168: 301–5
- 28 Vollmar B, Menger MD: Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculation pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 396: 13–29