

Nikotinin Sıçan Pankreatit Modelindeki Hafifletici Etkisinde Vagusun Rolünün Araştırılması

Meltem Kolgazi¹ , Zozan Güleken^{2,3} , Bircan Kolbaşı^{4,5} 
Canberk Sami Başbüyük² , Feriha Ercan⁴ , Berrak Ç. Yeğen² 

¹Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³Üsküdar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁵İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Meltem KOLGAZİ, Dr. Öğr. Üyesi
Güleken ZOZAN, Dr. Öğr. Üyesi
Bircan KOLBAŞI, Arş. Gör. Dr.
Canberk Sami BAŞBÜYÜK, Dr.
Feriha ERCAN, Prof. Dr.
Berrak Ç. YEĞEN, Prof. Dr.

İletişim: Meltem Kolgazi

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul,
Türkiye

Tel: -

E-Posta: meltem.kolgazi@acibadem.edu.tr

Gönderilme Tarihi : 11 Şubat 2020

Revizyon Tarihi : 19 Mayıs 2020

Kabul Tarihi : 22 Mayıs 2020

ÖZET

Nikotinin birçok farklı dokuda anti-inflamatuvar etkilere sahip olduğu ve bu etkileri kolinerjik anti-inflamatuvar yoluyla aktive ederek gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Çalışmada akut pankreatit modelinde nikotin tedavisinin etkilerini ve bu etkilerin kolinerjik yolla ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır. Wistar albino sıçanların pankreas-safra ortak kanalı bağlanırken (PSKB), bir gruba da yalancı-cerrahi (YC) uygulandı. PSKB sıçanlara vagal aferent denervasyonu (perivagal kapsaisin; 10mg/ml) veya trunkal vagotomi uygulandı ya da vagusları sağlam bırakıldı. PSKB grupları cerrahi sonrası ikiye ayrılarak 4 gün boyunca intraperitoneal nikotin (1 mg/kg/gün) ya da serum fizyolojik verildi. Dördüncü günde dekapitasyonu takiben, serumda tümör nekroz faktör (TNF)- α ve interleükin (IL)-10 ölçümü, akciğer, karaciğer ve pankreas dokularında miyeloperoksidaz aktivitesi (MPO), malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) ölçümleri ve histolojik inceleme yapıldı. TNF- α düzeyi PSKB grubunda YC grubuna göre belirgin şekilde daha yüksekken, nikotin tedavisi alanlarda belirgin şekilde daha düşüktü. IL-10 düzeyi ise SF tedavisi almış PSKB grubunda YC grubuna göre daha düşüktü ve nikotin tedavisi ile arttığı gözlemlendi. YC grubuna göre PSKB grubunun pankreas, karaciğer ve akciğer dokularında mikroskopik hasar, MDA, MPO düzeyleri artarken GSH düzeyleri azaldı. Nikotin tedavisi ile karaciğer ve pankreas dokularındaki hasar, MDA, MPO düzeyleri azaldı ve GSH miktarları korundu. Vagal aferent denervasyonu ya da trunkal vagotomi yapılması nikotinin bu koruyucu etkilerini değiştirmede. Sonuçlar, nikotinin pankreatit hasarına karşı koruyucu etkilerini vagal yoldan bağımsız olarak, doğrudan immün hücreler üzerindeki $\alpha 7$ nAChR aktivasyonu ile nötrofil infiltrasyonunu ve pro-inflamatuvar sitokinleri inhibe ederek gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: pankreatit, nikotin, vagus, inflamasyon, pankreatik kanal bağlama

Investigation of the role of vagus nerve in the ameliorative effect of nicotine on rat pancreatitis model

ABSTRACT

The anti-inflammatory effects of nicotine on various organs and the involvement of the cholinergic anti-inflammatory pathway activation in these effects were previously shown. The purpose of the study is to evaluate the effects of nicotine treatment on the acute pancreatitis model and to investigate the association of the cholinergic pathway with these effects. In Wistar albino rats, the common pancreatic-biliary duct was ligated (PBDL) or sham-operation was performed. In PBDL rats, vagal afferent denervation (perivagal application of capsaicin; 10mg/ml) or trunkal vagotomy was applied or the vagi were left intact. Postoperatively, PBDL groups were treated intraperitoneally with either nicotine (1 mg/kg/day) or saline for 4 days. Following decapitation on the 4th day, serum tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-10 levels and myeloperoxidase activity (MPO), malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels in the pancreas, liver and lung tissues were measured, and histopathological analyses were made. While the TNF- α level was significantly higher in the PBDL group than in the sham-operated group, it was significantly lower in the subjects which have taken nicotine treatment. IL-10 level was lower in the PBDL group treated with saline than in the sham-operated group and an increase was observed with nicotine treatment. Compared to sham-operated group, microscopic damage scores, MDA, MPO levels in the pancreas, liver and lung tissues of the PBDL group were elevated, while GSH levels were reduced. Nicotine treatment depressed MDA and MPO levels, preserved GSH contents and reduced histological damage in the pancreas and liver. Vagal afferent denervation or trunkal vagotomy did not alter these protective effects of nicotine. The results suggest that the protective effects of nicotine on pancreatic inflammation could occur independently of the vagal pathways, but directly by the activation of $\alpha 7$ nAChR on the immune cells and by inhibiting neutrophil infiltration and pro-inflammatory cytokine release.

Keywords: pancreatitis, nicotine, vagus, inflammation, pancreatic duct ligation



Komplikasyonları nedeniyle hayati tehlike yaratabilen akut abdominal bir hastalık olan şiddetli akut pankreatit, görüntüleme ve girişimsel tekniklerdeki gelişmelere ve destekleyici tedavilere rağmen ciddi morbidite ve mortaliteyle ilişkili olmaya devam etmektedir (1). Akut pankreatitin patogeneğinde esas olarak pankreas kanalının tıkanmasının ve asiner aşırı uyarılmanın rol oynadığı (2), tripsinojen başta olmak üzere zimojenlerin asiner hücre içerisinde aktive olmasının akut pankreatite yol açtığı yaygın olarak kabul görmektedir (3). Mooren ve ark. (4) pankreas kanalının tıkanmasının hızlıca ekzokrin pankreas cevabında değişikliğe, Ca^{+2} sinyal değişikliklerine ve sindirim enzimlerinin hızla aktive olmasına neden olduklarını göstermiştir. Buna ek olarak, nötrofillerin tripsinojenin aktivasyonunda ve akut pankreatitte gelişen doku hasarında kritik bir rol oynadığı öne sürülmüş (5) ve bunu destekleyecek şekilde, sıçan pankreatit modelinde nötrofilin filtrasyonunun ve sitokin cevabının azaltılmasının hem pankreasta hem de uzak hedef dokulardaki inflamasyonu hafifletici ve iyileştirici etkileri olduğu gösterilmiştir (6,7).

Sigara tüketiminin çok sayıda dokunun işlevini bozarak birçok hastalığın gelişimini kolaylaştırdığı ve şiddetlendirdiği ispatlanmıştır (8,9). Tütün kullanımının sağlığa zarar verici sonuçlarının detaylı olarak çalışılmış olmasına rağmen, diğer taraftan epidemiyolojik çalışmalar ise sigara içen hastalarda birçok nörodejeneratif ve inflamatuvar hastalığın insidansının daha az olduğunu göstermektedir (10,11). Sigaranın hem yararlı hem de zarar verici etkilerinde *Nicotiana tabacum*'da bulunan doğal bir alkaloid olan ve immün sistemi baskıladığı gösterilmiş olan nikotin sorumlu tutulmaktadır (12-15). Bu hastalıklarda, örneğin osteoartrit (16) veya ülseratif kolitte (17,18), nikotin hastalığın gelişmesini geciktirmekte veya antioksidan etkisiyle inflamasyon şiddetini azaltmaktadır. Benzer şekilde, nikotin inflamasyon indüklenmiş çeşitli dokularda hastalık şiddetini azaltmakta ve iyileşme sürecini hızlandırabilmektedir (19-21).

Nikotin vücutta nikotinik reseptörler olarak adlandırılan reseptörleri uyararak etkilerini gösterir. Nikotinik reseptörler otonom gangliyonlarda hem sempatik hem de parasempatik sistemlerin pregangliyonik ve postgangliyonik nöronlar arası sinapslarında bulunur. Nikotinik etkileri de bu hücrelerin asetilkolinin bağlanması ile oluşan etkileri meydana getirir. Postgangliyonik nöronları uyararak otonom etkiler ortaya koyan ilaçlar nikotinik ilaçlar olarak adlandırılır. Nikotin hem sempatik hem de parasempatik postgangliyonik nöronların her ikisini aynı zamanda uyarır. Sonuçta, abdominal organlarda ve ekstremitelerde

şiddetli bir sempatik vazokonstriksiyona neden olurken aynı anda gastrointestinal aktivitenin artışı ve kalbin yavaşlaması gibi parasempatik etkilere neden olur (22).

Nikotin asiner hücre içinde kalsiyum düzeyini artırmak yoluyla salgıyı artırdığı (23) ve sigaraya uzun süreyle maruziyetin pankreas kanserine ve kronik pankreatite yol açtığı öne sürülmüşse de (24), akut pankreatitin şiddetini azaltıcı etkisinde nikotinik selektif kolinerjik bir agonist olarak "nikotinik anti-inflamatuvar yolak"ı aktive etmesinin rol oynadığı ortaya konmuştur (25). Nikotin bu anti-inflamatuvar etkisinin temel olarak nikotinik asetilkolin reseptörünün $\alpha 7$ altbirimine ($\alpha 7nAChR$) bağlı geliştiği ve $\alpha 7nAChR$ 'nin sessizleştirilmesinin ya da silinmesinin nikotinle oluşan anti-inflamatuvar-baskılayıcı etkileri ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (26). Deneysel pankreatit oluşturulmasından önce vagotomi uygulanmasının pankreatitin şiddetini artırdığı ortaya konmuştur (25). Her ne kadar akut pankreatite eşlik eden akciğer hasarının nikotin tedavisi ile hafiflediği gösterilmişse de (27), vagus sinirinin bütünlüğünün bozulmasının veya $\alpha 7nAChR$ agonisti verilerek nikotinik anti-inflamatuvar yolağın uyarılmasının pankreatite bağlı gelişmiş akciğer inflamasyonunun şiddetini değiştirmediği gösterilmiştir (25).

Mevcut çalışmalar ışığında, çalışmanın birinci amacı, pankreas-safra ortak kanalı bağlanarak eşzamanlı olarak akut pankreatit ve akut kolestatik hepatit oluşturulmuş sıçanlarda pankreas, karaciğer ve akciğerde gelişen doku hasarına nikotin tedavisinin etkisini ortaya koymaktır. İkinci olarak da, nikotin pankreas, karaciğer ve akciğerde gözlenen etkilerinde vagal sinir bütünlüğünün ve sadece vagal aferent sinir bütünlüğünün rolünü araştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada her iki cinsiyetten eşit sayıda Wistar albino sıçanlar (250-300 gr), sıcaklık ($22\pm 1^{\circ}C$) ve nem (%65-70) kontrolü sağlanmış bir ortamda 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık döngüsünde tutuldular. Standart sıçan yemi ile beslendiler ve suya serbestçe ulaştılar. Çalışmadaki tüm deneysel uygulamalar için Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı.

Deneyel ve cerrahi protokol

Akut pankreatit oluşturulacak sıçanlara (n=48) gece açlığı sonrasında intraperitoneal (ip) olarak verilen ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (0,75 mg/kg) anestezisi altında orta hat kesisi yapıldı ve pankreas-safra ortak kanalı ince bağırsağa yakın taraftan 4/0 iplikle üç kez düğümlemlenerek bağlandı

(PSKB). Anestezi altında iken, PSKB oluşturulan hayvanlar üçe ayrılarak, kapsaisine-duyarlı aferent liflerin denervasyonu için kapsaisin (10mg/ml, %10 Tween 80 içinde) veya taşıyıcısı (%10 Tween 80; Merck) perivagal olarak uygulandı veya trunkal vagotomi (TVg) yapıldı. Abdominal kesileri kapatılan sıçanlar kafeslerine alındılar. PSKB grupları cerrahi sonrası rastgele olarak ikiye ayrıldılar ve 4 gün boyunca nikotin (1 mg/kg/gün; Sigma-Aldrich) ya da taşıyıcı (serum fizyolojik, SF; 0,1ml/100gr/gün) ip olarak uygulandı.

Diğer bir grup sıçanda ise (yalancı-cerrahi grubu; n=8) anestezi altında sadece laparotomi yapıldı. Cerrahi sırasında perivagal olarak taşıyıcı (%10 Tween 80) uygulandı ve 4 gün boyunca taşıyıcı (SF) enjeksiyonu yapıldı. Tüm sıçanlara (yalancı-cerrahi ve PSKB) post-operatif 4 gün boyunca analjezik (0,1 mg/kg/gün, ip; Perfalgan, Bristol Myers Squibb) tedavisi verildi.

Dört günlük tedavi sonrasında tüm gruplar dekapite edilerek gövde kanı, akciğer, karaciğer ve pankreas örnekleri toplandı. Elde edilen serum örneklerinde pro-inflamatuvar bir sitokin olan tümör nekrozis (TNF)- α ve anti-inflamatuvar bir sitokin olan interlökin (IL)-10 düzeylerinin ölçümleri yapıldı. Akciğer, karaciğer ve pankreas örneklerinde oksidan hasarın göstergesi olan malondialdehid (MDA) düzeyi, antioksidan glutatyon (GSH) ve dokuya nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin düzeyi ölçüldü. Ayrıca dokular ışık mikroskopisi altında histolojik olarak incelenerek hasar açısından skorlandı.

Kapsaisinin topikal uygulanması ile vagal aferent denervasyonu

Kapsaisinin solunum ve dolaşım sistemleri üzerindeki akut etkilerini ortadan kaldırmak için, kapsaisin uygulamasından hemen önce sıçanlara atropin sülfat (1 mg/kg, ip) enjekte edildi. Boyun bölgesine yapılan kesiden sonra servikal vaguslar bilateral olarak karotid arterlerden izole edildi (28). İzole edilmiş servikal vagusların altına parafilm yerleştirilerek, üzerine uygulanacak kapsaisinin altta bulunan dokulara sızması engellendi. Daha sonra, kapsaisin (10mg/ml) çözeltisine batırılan pamuk kulak-çöpleri ile vagusların üzeri 30 dakika boyunca ıslak tutuldu. Sonrasında SF ile yıkanarak kapsaisin ortamdan uzaklaştırıldı ve boyun bölgesi suture edildi (29).

Trunkal vagotominin uygulanması

Gece açlığı sonrasında diseksiyon mikroskobu altında mikrocerrahi seti yardımı ile subdiyafragmatik vagus özofagusun alt tarafından izole edildi. Özofagus takip edilerek

vagusun gastrik dalı izole edildi. İzolasyon sonrasında, gastrik dallar izlenerek tespit edilen hepatik ve çölyak dallar gastrik dallar ile birlikte ayırt edilmeksizin kesildi (30).

Serumda TNF- α ve IL-10 düzeylerinin ölçümü

Gövde kanı örneklerinin 3000 rpm ve 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmesi ile elde edilen serum örnekleri -80°C'de saklandı. Üreticinin rehberi ve talimatları uyarınca TNF- α ve IL-10 düzeyleri ticari enzim-bağlı immunosorbant assay (ELISA) kitleri kullanılarak ölçüldü (Biosource Europe S.A., Nivelles, Belgium). Sonuçlar mikrolitrede pikogram olarak ifade edildi.

Histolojik hazırlık ve analiz

Histolojik incelemeler için tüm gruplardan alınan pankreas, karaciğer ve akciğer örnekleri %10'luk formaldehit ile fikse edildiler, yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işleminden sonra toluen ile şeffaflandırıldılar ve parafine gömüldüler. Yaklaşık 5 μ m kalınlığındaki kesitler genel histolojik değerlendirmeler için hematoksiyen ve eozin (H&E) boyasıyla boyandılar ve fotomikroskop (Olympus BX51, Tokyo, Japan) ile incelendiler ve semikuantitatif olarak değerlendirildiler. Modifiye histopatolojik skorlama kriterleri ile değerlendirilen pankreas (*ödem, asiner nekroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu*), karaciğer (*hepatositlerde vaküolizasyon/piknotik hepatosit nükleusu, sinüzoidlerde genişleme/ konjesyon ve Kupffer hücre infiltrasyonu*) ve akciğer (*hemoraji ve vasküler konjesyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve alveol yapısında hasar*) dokuları her bir hasar parametresi için 0 ila 3 arasında değerlendirildi (0=yok, 1=hafif, 2=orta, 3=ciddi) (31,32). Tüm organlar için maksimum skor 9 idi.

MDA ve GSH düzeyi ölçümü

Pankreas, karaciğer ve akciğer örnekleri ağırlıklarının 10 katına denk gelen miktarda %10'luk triklorasetik asit ile homojenizasyonu takiben 3.000 devir ve 4°C'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant ayrılıp 15.000 devirde 8 dakika daha santrifüj edildi ve lipid peroksidasyonu düzeyi $1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak MDA cinsinden spektrofotometrik ölçümlerle ifade edildi (33). GSH ölçümleri modifiye Ellman yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. Kısaca 3.000 devirde 10 dk santrifüj edildikten sonra 0,5 mL süpernatant 0,3 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 2 ml ve 0,2 mL dithiobisnitrobenzoat (0,4 mg/mL 1% sodyum sitrat) çözeltisi bir tüpte karıştırıldı ve bu karışımdan alınan örneklerin absorbanansı 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. $1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak sonuçlar gram doku başına mikromol GSH olarak ifade edildi (34).

MPO aktivitesinin ölçümü

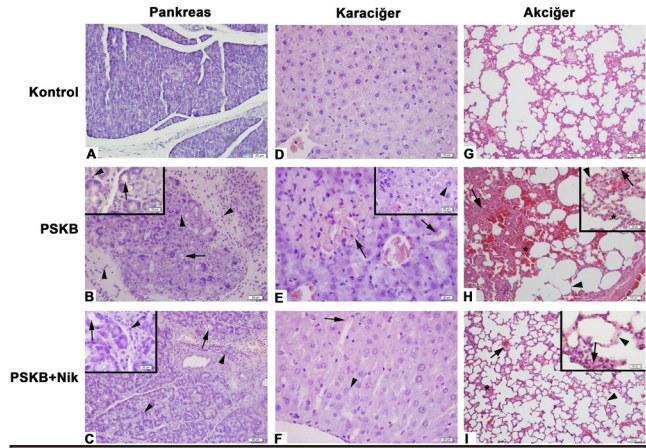
Doku örnekleri %0,5'lik HETAB (50 mM potasyum fosfat tamponu içinde; pH: 6) homojenize edildikten sonra, 12.000 rpm'de 10 dakika 4°C 'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 50 mM potasyum-fosfat tamponu içinde tekrar homojenize edildi. 50 mM potasyum-fosfat tamponu + o-dianisidin. 2HCl (20 mg/ml) + H₂O₂ (20 mM) + örnek içeren tüpler oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi ve reaksiyon %2'lik sodyum azid ile durduruldu. Absorbans değerleri 460 nm'de okundu (35).

İstatistiksel analiz

Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. Verilerin analizinde mikroskopik skor verileri için Mann-Whitney U nonparametrik test, diğer parametreler için tek yönlü ANOVA kullanıldı. $p < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizler için GraphPad analiz programı (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) kullanıldı.

BULGULAR

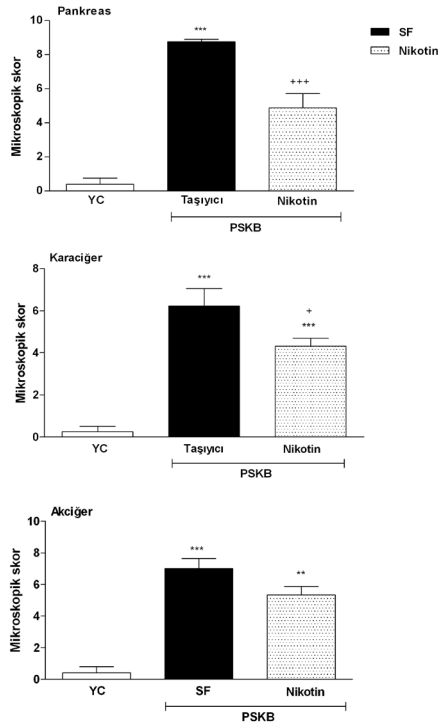
Deney gruplarının histolojik değerlendirmelerinde, yalancı-cerrahi grubunda düzenli pankreas morfolojisi, düzenli morfolojide karaciğer ve akciğer parankimleri izlendi (Şekil 1). Taşıyıcı tedavisi verilmiş PSKB grubunun pankreaslarında ciddi asiner nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, karaciğerlerinde ise sinüzoidal konjesyon ve hasarlı hepatositler gözlenirken, akciğerlerde yaygın alveolar kanama, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve alveol morfolojisinde dejenerasyon görüldü. Bu bulgulara paralel olarak, her üç dokuda hasara ilişkin mikroskopik hasar skorlarının da yalancı-cerrahi grubuna göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p < 0,001$; Şekil 2). Buna karşın, nikotin tedavisi verilmiş PSKB grubunun pankreas dokularında, bazı bölgelerde asiner hücre dejenerasyonunda gerileme ve orta düzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonu, karaciğerlerinde ise hafiflemiş sinüzoidal konjesyon ve hasarlı hepatosit sayısında azalma olduğu görüldü. Aynı şekilde, cerrahiye takiben nikotin tedavisi verilmiş PSKB grubunda alveolar kanamanın, inflamatuvar hücre infiltrasyonunun ve alveol morfolojisindeki dejenerasyonun azaldığı izlenmiştir. Mikroskopik hasar skorlarına bakıldığında da, nikotin tedavisinin karaciğer ($p < 0,05$) ve pankreas ($p < 0,001$) dokularında PSKB'ye bağlı hasarı azalttığı, ama akciğer dokularında gözlenen azalmış hasarın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.



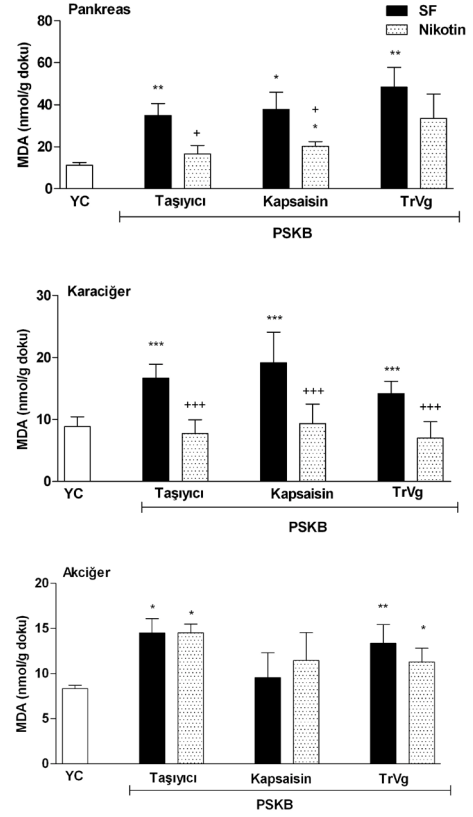
Şekil 1. Kontrol (yalancı cerrahi), PSKB ve PSKB+Nikotin gruplarına ait pankreas (A-C), karaciğer (D-F) ve akciğer (G-I) örneklerinin mikroskopik görüntüleri. Yalancı-cerrahi grubunda (A) düzenli pankreas dokusu; PSKB grubunda (B) asiner nekroz (ok), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (okbaşı); PSKB+Nikotin (C) grubunda bazı bölgelerde asiner hücre dejenerasyonu (ok) ve orta düzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonu (okbaşı) görülmektedir. Yalancı-cerrahi grubunda (D) düzenli karaciğer parankimi; PSKB grubunda (E) sinüzoidal konjesyon (ok) ve hasarlı hepatositler (okbaşı); PSKB+Nikotin (F) grubunda hafiflemiş sinüzoidal konjesyon (ok) ve az sayıda hasarlı hepatosit (okbaşı) görülmektedir. Yalancı-cerrahi grubunda (G) düzenli morfolojide akciğer parankimi; PSKB grubunda (H) yaygın alveolar kanama (*), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok) ve alveol morfolojisinde dejenerasyon (okbaşı); PSKB+Nikotin (I), grubunda alveolar kanamanın (*) inflamatuvar hücre infiltrasyonunun (ok) ve alveol morfolojisindeki dejenerasyonun (okbaşı) azaldığı görülmektedir. H&E boyası. PSKB: Pankreas Safra Kanalı Bağlanması.

Pro-inflamatuvar bir sitokin olan TNF- α 'nın düzeyi SF tedavisi almış PSKB grubunda yalancı-cerrahi grubuna göre belirgin şekilde daha yüksek bulunurken ($p < 0,01$; Şekil 3), nikotin tedavisi alanlarda TNF- α düzeyi anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,05$; Şekil 3). Buna paralel olarak, anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-10 düzeyi SF tedavisi almış PSKB grubunda yalancı-cerrahi grubuna göre daha düşüktü ($p < 0,05$). Vagal denervasyon yapılmadan nikotin tedavisi uygulanmış pankreatit gruplarında ise IL-10 düzeylerinin arttığı gözlemlendi ($p < 0,05-0,001$). Buna karşın, ne kapsaisin ile aferent sinir denervasyonunun, ne de trunkal vagotomi yapılmasının nikotin ile baskılanan TNF- α ve artan IL-10 düzeylerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı bulundu.

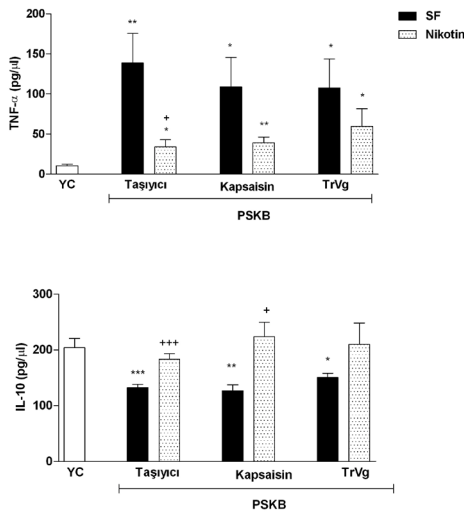
MDA düzeyleri SF-tedavili PSKB grubunun pankreas, karaciğer ve akciğer dokularında yalancı-cerrahi grubuna göre belirgin bir şekilde artarken ($p < 0,05-0,001$), nikotin tedavisi alan grupta karaciğer ($p < 0,001$) ve pankreas ($p < 0,05$) dokularında MDA düzeyleri belirgin bir şekilde azalmış bulundu (Şekil 4). Ancak, nikotin tedavisi öncesinde kapsaisin ile ya da trunkal vagotomi ile denervasyon yapılmış PSKB gruplarının doku MDA düzeylerinde, denervasyon yapılmamış nikotin tedavili gruplara göre, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.



Şekil 2. Yalancı Cerrahi, PSKB ve PSKB+Nikotin gruplarına ait pankreas, karaciğer ve akciğer örneklerinde mikroskopik hasar skoru değerleri. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edilmiştir. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ YC grubuna göre; + $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$ PSKB grubuna göre. PSKB: Pankreas Safra Kanalı Bağlanmış; SF: Serum Fizyolojik, YC: Yalancı Cerrahi.



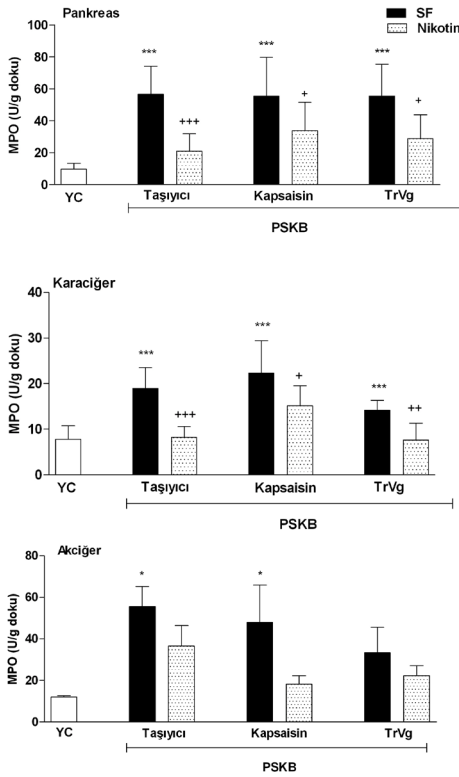
Şekil 4. Yalancı Cerrahi, PSKB ve PSKB+Nikotin gruplarına ait pankreas, karaciğer ve akciğer örneklerinde malondialdehid (MDA) düzeyleri. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edilmiştir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ YC grubuna göre; + $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$ PSKB grubuna göre. PSKB: Pankreas Safra Kanalı Bağlanmış; SF: Serum Fizyolojik, YC: Yalancı Cerrahi.



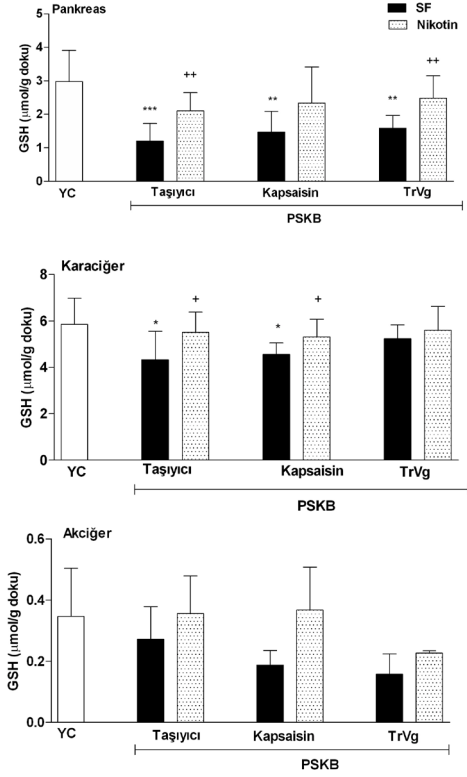
Şekil 3. Yalancı Cerrahi, PSKB ve PSKB+Nikotin gruplarına ait serum TNF- α ve IL-10 ölçüm değerleri. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edilmiştir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ YC grubuna göre; + $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$ PSKB grubuna göre. TNF- α : Tümör Nekroz Faktör-alfa; IL: İnterlökin; PSKB: Pankreas Safra Kanalı Bağlanmış; SF: Serum Fizyolojik, YC: Yalancı Cerrahi.

SF verilmiş PSKB grubunun pankreas, akciğer ve karaciğer dokularında MPO aktivite düzeylerinin yalancı-cerrahi grubunun dokularında ölçülen MPO aktivite düzeylerine göre arttığı gözlemlendi ($p < 0,05-0,001$; Şekil 5). PSKB cerrahisi sonrasında nikotin tedavisi alanlarda pankreas ve karaciğer dokularında MPO aktivitesi anlamlı şekilde azalırken ($p < 0,001$), nikotin tedavisi öncesinde kapsaisin ile vagal aferentdenervasyon veya trunkal vagotomi yapıldığında tek başına nikotin tedavisi almış PSKB grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmedi.

GSH düzeylerine bakıldığında ise, SF tedavisi alan pankreatit grubunun pankreas ($p<0,001$) ve karaciğer ($p<0,05$) dokularında ölçülen GSH düzeyi yalancı-cerrahi grubuna göre anlamlı şekilde düşük iken, nikotin tedavisi almış PSKB grubunda doku GSH miktarlarındaki tükenmenin engellendiği görüldü ($p<0,05-0,01$; Şekil 6). Vagusun intakt olmasının ya da vagal aferent denervasyon veya trunkal vagotomi yapılmasının nikotin pankreas ve karaciğerde GSH'u artırıcı etkisini değiştirmediğ gözlemlendi. Akciğer dokusunda ise pankreatit grupları ile yalancı-cerrahi grubu arasında GSH düzeyleri farklı bulunmadı.



Şekil 5. Yalancı Cerrahi, PSKB ve PSKB+Nikotin gruplarına ait pankreas, karaciğer ve akciğer örneklerinde myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi düzeyleri. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$, *** $p<0,001$ YC grubuna göre; + $p<0,05$, ++ $p<0,01$, +++ $p<0,001$ PSKB grubuna göre. PSKB: Pankreas Safra Kanalı Bağlanmış; SF: Serum Fizyolojik, YC: Yalancı Cerrahi.



Şekil 6. Yalancı Cerrahi, PSKB ve PSKB+Nikotin gruplarına ait pankreas, karaciğer ve akciğer örneklerinde glutatyon (GSH) düzeyleri. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ YC grubuna göre; + $p<0,05$, ++ $p<0,01$ PSKB grubuna göre. PSKB: Pankreas Safra Kanalı Bağlanmış; SF: Serum Fizyolojik, YC: Yalancı Cerrahi.

TARTIşMA

Ciddi morbidite ve mortaliteyle ilişkili olan akut pankreatitte yeni tedavi seğeneklerine ihtiyağ vardır. Çalışmanın sonuğları, pankreas-safra kanalının bağlanmasıyla oluşturulan akut pankreatit ve kolestatik hepatit modelinde nikotin tedavisinin pankreas ve karaciğer dokularında inflamatuvar parametreleri belirgin bir şekilde azalttığını, bilateral servikal ve trunkal vagotominin ise nikotin bu olumlu etkilerini ortadan kaldırmadığını göstermiştir.

Son alışmalar, vagus sinirinden salgılanan asetilkolinin-öliyak mezenterik gangliyonlardan kaynaklanan splenik sinirin noradrenerjik nöronlarını aktive ettiğini ve dalakta norepinefrin salgılanmasına neden olduğunu iddia etmektedir. Bu adrenerjik sinir liflerinden salgılanan norepinefrinin ise splenik T hücrelerinden asetilkolin sentezini uyardığı gösterilmiştir (36). Asetilkolinin, sitokin sentezinin inhibisyonunda ve anti-inflamatuvar etkilerde önemli rol oynadığı ve asetilkolinin sitokin eksprese eden hücrelerdeki $\alpha 7nAChR$ ve ligand etkileşimi sonucunda nükleer faktör (NF)- κB translokasyonunu azalttığı ve inflamasyon

bölgesinde de immün hücreler üzerinden anti-inflamatuvar etkileri olduğu düşünülmektedir (37,38). Vagusun stimülasyonunun yüksek dozda endotoksin almış hayvanlarda TNF- α salınımını belirgin şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (39). Sonraki çalışmalar vagus sinirinin uyarılmasının pro-inflamatuvar sitokinlerin inhibisyonuna yol açarak (40), miyokard iskemisi (41), iskemi/reperfüzyon hasarı (42), hemorajik şok (43), ileus (44), deneysel artrit (45) ve kolit (46) gibi deneysel inflamasyon modellerinde iyileştirici etkileri olduğunu göstermiştir. Akut pankreatitte, pankreas içinde hiperaktive olan sindirim enzimlerinin otosindirime ve doku nekrozuna neden olduğu ve böylece pro-inflamatuvar medyatörlerin salgılanmasına yol açtığı düşünülmektedir (47). Pankreatit TNF- α , IL-1 β ve trombosit aktive edici faktör (PAF) gibi inflamatuvar medyatörlerin devreye girmesiyle ilerlemekte ve pankreas hasarına neden olmaktadır. İnflamasyon sırasında inhibitörk-B'nin (IkB) bozunması, NF- κ B'nin nükleer translokasyon sinyallerini serbest bırakarak NF- κ B dimer p50/p65'in DNA düzenleyici bağlanma alanına bağlandığı ve pro-inflamatuvar sitokin genlerini regüle ettiği ifade edilmektedir. NF- κ B aktivasyonu ile IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin ifadesinde artış olmakta ve bunlar da inflamatuvar yanıtta rol oynamaktadırlar (48). Sonuçta, pankreasın asiner hücrelerinden salgılanan sitokinler nötrofiller ve makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerin bölgeye toplanmasına yol açar. Bununla beraber asiner hücre kaynaklı proteazların aktivasyonu ve otosindirimi de lokal inflamatuvar yanıtın sistemik yanıtı dönüşmesine neden olmaktadır (49).

Tütünün birincil aktif maddesi olan nikotin etkili bir selektif kolinerjik agonisttir. Nikotin vücutta nikotinik reseptörler olarak adlandırılan reseptörleri uyararak etkilerini gösterir. Nikotinik reseptörler otonom gangliyonlarda hem sempatik hem de parasempatik sistemlerin pregangliyonik ve postgangliyonik nöronlar arası sinapslarında bulunur. Nikotinik reseptörleri iki alfa, birer beta, gama ve delta alt üniteleri olmak 5 alt ünitelerden meydana gelir. Bu alt ünitelerin farklı kombinasyonları ile bir araya gelmesi geniş bir nikotinik reseptör ailesini oluşturur. Nikotinik reseptörlerin iki alfa ünitesi asetil kolinin bağlanma bölgesidir. Asetil kolinin buraya bağlanması nikotinik reseptörlerde konformasyonel bir değişikliğe yol açar ve Na⁺ iletkenliği değişerek içeri doğru Na⁺ iyonunun akışı gerçekleşir ve hücrede bir depolarizasyon meydana gelir. Nikotinin etkileri de bu hücreler asetilkolinin bağlanması ile oluşan etkileri meydana getirir (50).

Farelerde dekstran sodyum sülfatla indüklenen akut kolit modelinde, nikotin tedavisinin CD4 T hücrelerde IL-6 üretimini azalttığı ve kolon hasarının şiddetini azalttığı (49), endotoksin ile immünize edilmiş makrofajlarda nikotin uygulanmasının ise NF κ B translokasyonunu inhibe ettiği (51) gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da pankreas-safra kanalı bağlanmış sıçanlarda 72 saatin sonunda serum TNF- α düzeylerinde artışın nikotin tedavisi ile anlamlı şekilde azaldığı, IL-10 düzeylerindeki azalmanın ise nikotin tedavisi ile engellendiği görüldü. Buna karşın, aferent denervasyonun ya da trunkal vagotominin nikotin ile baskılanan TNF- α ve artan IL-10 düzeylerine anlamlı bir etkisi olmamıştır. Benzer şekilde, vagal denervasyonun veya spesifik α 7nAChR agonisti verilmesinin pankreatite sekonder gelişen akciğer inflamasyonunun şiddetini etkilemediği gösterilmiştir (25). Nikotinin vagustan bağımsız anti-inflamatuvar etkisinin, birçok inflamatuvar hücre yüzeyinde eksprese edilen α 7nAChR aracılığıyla sitokinlerin salınımını inhibe etmesiyle gerçekleşebildiği düşünülmektedir (52). Pankreasın asiner hücrelerinden salgılanan sitokinlerin nötrofil ve makrofaj gibi inflamatuvar hücrelerin de bölgeye toplanmasına yol açtığı bildirilmiştir (53). Bu nedenle nötrofillerin granüllerinde bulunan, dokuda nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olarak kabul edilen miyeloperoksidaz enzim aktivitesine bakılmış ve pankreatite bağlı olarak pankreas ve karaciğerde artmış bulunan MPO aktivitesini nikotin tedavisinin azalttığı bulunmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda profilaktik olarak ya da akut pankreatit oluşturulmasından sonra uygulanan nikotin, fizostigmin veya neostigmin tedavisinin histolojik skorları ve miyeloperoksidaz aktivitesini belirgin bir şekilde düşürdüğü gösterilmiştir (54).

Deneysel akut pankreatitte, pankreas dokusunda ve plazmada lipit peroksidasyon ürünlerinin arttığı ve MDA düzeylerinin hastalığın şiddeti ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (55). Çalışmamızda da pankreatit oluşturulmuş sıçanlarda artan MDA düzeyinin nikotin tedavisi ile azaldığı gözlemlendi. Akut pankreatitte pankreas dokusunda GSH'nin tükendiği ve bunun proenzim aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleştiği öne sürülmektedir (56). Çalışmada pankreatite bağlı görülen GSH'daki tükenmenin nikotin tedavisi ile pankreas ve karaciğer dokusunda engellendiği görüldü. Buna karşın, MDA, MPO ve GSH düzeylerindeki nikotin tedavisiyle ilişkili iyileşmelerin vagal denervasyondan etkilenmemesi nikotinin direkt antioksidan etkisini düşündürmektedir. Benzer şekilde, sepsise bağlı gelişen çoklu organ hasarında da nikotinin akciğer dokusu haricinde lipit peroksidasyonunu sınırlayarak, GSH tüketimini engelleyerek ve MPO aktivitesini baskılayarak anti-inflamatuvar etkili olduğu gösterilmiştir (21).

Nikotin güçlü anti-inflamatuvar etkileri olasılıkla sitokin eksprese eden hücrelerdeki $\alpha 7nAChR$ aracılığıyla janus kinaz (JAK)-2 fosforilasyonu ve sinyal transdüser ve transkripsiyon faktörü (STAT)-3'ün aktivasyonu sonucunda NF- κB translokasyonunda azalma ile gerçekleşmektedir (51). Nikotin I- κB 'nin fosforilasyonunu baskılar ve NF- κB 'nin transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder (52). Zheng ve arkadaşlarının (58) yaptıkları çalışmada, şiddetli akut pankreatitte nikotin doza bağlı bir şekilde doku hasarını azalttığı, sindirim enzim ve pro-inflamatuvar sitokin üretimini baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca $CD4^+CD25^+$ Treg sayısını ve immünregülatör moleküllerin ve transforme edici büyüme faktörü $\beta 1$ 'in ekspresyonunu artırmak suretiyle baskılayıcı kapasitesini güçlendirmiştir (59). PengMa ve arkadaşları (27) taurokolat ile indüklenen akut pankreatit modelinde nikotin tedavisinin serum amilaz, lipaz ve IL-6 seviyelerini düşürdüğünü, pankreasta ve akciğerde hasarı iyileştirdiğini, akciğer MPO aktivitesini ve akciğer TNF- α seviyesini düşürdüğünü göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise, pankreas ve karaciğer dokularında nikotin tedavisi ile belirgin bir iyileşme gözlemlendi, ancak pankreatitte gelişen oksidan akciğer hasarı etkilenmedi. Pankreas ve karaciğer dokularında nikotin tedavisi ile gözlenen anti-inflamatuvar yanıt vagal denervasyon ile değişmedi. Bu sonuçlara zıt olarak, serulein ile indüklenen akut pankreatit modelinde bilateral servikal vagotominin pankreas ve akciğer dokusundaki iyileşmeyi ortadan kaldırdığı ve nikotin ile deprese olan MPO aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (25). Pankreas enzimlerinin sekresyonunu artıran bir kolesistokinin analogu olan seruleine bağlı gelişen ve çalışmamızda kullandığımız kanal obstrüksiyonuna bağlı gelişen pankreatit modellerinde, enzim aktivasyon basamaklarının değişik yollardan gerçekleşmesinin patofizyolojideki farklılıktan sorumlu olacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, sıçanlarda pankreas-safra ortak kanalı bağlanarak 72 saatin sonunda gerçekleşen akut pankreatite bağlı olarak pankreasta ve karaciğerde gözlenen oksidan doku hasarı intraperitoneal nikotin tedavisi ile hafiflemiş ve bu iyileşme doku düzeyinde mikroskopik olarak da ortaya konmuştur. Diğer taraftan, kapsaisin ve trunkal vagotomi ile yapılan vagal denervasyon nikotin hasarı hafifletici etkilerini değiştirmemiştir. Dolayısıyla, nikotin-pankreatit hasarındaki koruyucu etkilerini vagal yoldan bağımsız olarak, doğrudan immün sistem hücreleri üzerindeki $\alpha 7nAChR$ aktivasyonu ile nötrofil infiltrasyonunu ve pro-inflamatuvar sitokinleri inhibe ederek gerçekleştirildiği savunulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Ahmet Atsız, İbrahim Bekir Boz ve Batuhan Küçükali'ye deneyler sırasında yardımları dolayısıyla teşekkür ederiz. Çalışmanın verileri 7-12 Eylül 2014'te 18. International Microscopy Congress'te poster olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Greenberg JA, Hsu J, Bawazeer M, Marshall J, Friedrich JO, Nathens A, et al. Clinical practice guideline: management of acute pancreatitis. *Can J Surg.* 2016; 59(2):128-40.
- Wang GJ, Li Y, Zhou ZG, Wang C, Meng WJ. Integrity of the pancreatic duct-acinar system in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2010; 9(3):242-7.
- Hegyi P, Pandol S, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr. The acinar-ductal tango in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut.* 2011; 60(4):544-52.
- Mooren FCh, Hlouschek V, Finkes T, Turi S, Weber IA, Singh J, et al. Early changes in pancreatic acinar cell calcium signaling after pancreatic duct obstruction. *J Biol Chem.* 2003; 278(11):9361-9.
- Abdulla A, Awla D, Thorlacius H, Regnér S. Role of neutrophils in the activation of trypsinogen in severe acute pancreatitis. *J Leukoc Biol.* 2011; 90(5):975-82.
- Kasımay O, İşeri SO, Barlas A, Bangir D, Yeğen C, Arbak S, Yeğen BC. Ghrelin ameliorates pancreaticobiliary inflammation and associated remote organ injury in rats. *Hepatol Res.* 2006; 36(1):11-9.
- Barlas A, Cevik H, Arbak S, Bangir D, Sener G, Yeğen C, Yeğen BC. Melatonin protects against pancreaticobiliary inflammation and associated remote organ injury in rats: role of neutrophils. *J Pineal Res.* 2004; 37(4):267-75.
- Danson SJ, Rowland C, Rowe R, Ellis S, Crabtree C, Horsman JM, et al. The relationship between smoking and quality of life in advanced lung cancer patients: a prospective longitudinal study. *Support Care Cancer.* 2016; 24(4):1507-16.
- Doll R, Peto R. Mortality in relation to smoking: 20 years' observations on male British doctors. *Br Med J* 1976; 2:1525-1536.
- Fratiglioni L, Wang HX. Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease: review of the epidemiological studies. *Behav Brain Res* 2000; 113:117-120.
- Manthorpe R, Benoni C, Jacobsson L, Kirtava Z, Larsson A, Liedholm R, et al. Lower frequency of focal lip sialadenitis (focus score) in smoking patients. Can tobacco diminish the salivary gland involvement as judged by histological examination and anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies in Sjogren's syndrome? *Ann Rheum Dis* 2000; 59:54-6
- Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:372-377.
- Rezonzew G, Chumley P, Feng W, Hua P, Siegal GP, Jaimes EA. Nicotine exposure and the progression of chronic kidney disease: role of the $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303:F304-F312
- Bruin JE, Petre MA, Lehman MA et al. Maternal nicotine exposure increases oxidative stress in the offspring. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:1919-1925
- Bryden DW, Burton AC, Barnett BR, Cohen VJ, Hearn TN, Jones EA, et al. Prenatal nicotine exposure impairs executive control signals in medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology.* 2016; 41(3):716-25.
- Felson DT, Zhang Y. Smoking and osteoarthritis: a review of the evidence and its implications. *Osteoarthritis Cartilage* 2015; 23:331-333.
- Ozdemir ZN, Tazegul G, Kuru P, Bilgin S, Mentese ST, Erzik C, et al. Nicotine alleviates colitis-induced damage in rats via its anti-oxidative activity. *Marmara Medical Journal* 2014; 27: 13-20

18. Deniz M, Sahin HH, Tekin S, Yeşiller M, Ağaoğlu B, Cetinel S, Yeğen BÇ. Nicotine withdrawal alleviates acetic acid-induced gastric injury in rats. *Nicotine withdrawal alleviates acetic acid-induced gastric injury in rats. Environ Toxicol Pharmacol.* 2009; 27(2):200-5.
19. Hastrup SG, Chen X, Bechtold JE, Kyle RF, Rahbek O, Keyler DE, et al. Effect of nicotine and tobacco administration method on the mechanical properties of healing bone following closed fracture. *J Orthop Res.* 2010; 28(9):1235-9.
20. Lee MY, Chen L, Toborek M. Nicotine attenuates iNOS expression and contributes to neuroprotection in a compressive model of spinal cord injury. *J Neurosci Res* 2009; 87:937-947
21. Özdemir-Kumral ZN, Özbeyli D, Özdemir AF, Karaaslan BM, Kaytaz K, Kara MF, et al. Protective effect of nicotine on sepsis-induced oxidative multiorgan damage: role of neutrophils. *Nicotine Tob Res.* 2017; 19(7):859-864.
22. Hall JE. Guyton & Hall. *Textbook of Medical Physiology*, 12 th ed., 2011; 60. Bölüm, Çev: Abdullah Arslan, Nobel Tıp Kitabevleri. s. 740.
23. Chowdhury P, Udupa KB. Effect of nicotine on exocytotic pancreatic secretory response: role of calcium signaling. *Tob Induc Dis.* 2013;11(1):1.
24. Edderkaoui, Mouad. Thrower, Edwin. (2015). Smoking induced pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2015.25
25. van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Bruno MJ, Larosa GJ, Ulloa L, Tracey KJ, et al. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology.* 2006; 130(6):1822-30.
26. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* 2003; 421(6921):384-8.
27. Ma P, Yu K, Yu J, Wang W, Ding Y, Chen C, et al. Effects of nicotine and vagus nerve in severe acute pancreatitis-associated lung injury in rats. *Pancreas.* 2016; 45(4):552-60.
28. Holzer HH, Raybould HE. Vagal and splanchnic sensory pathways mediate inhibition of gastric motility induced by duodenal distention. *Am J Physiol* 1992; 262:G603-G608.
29. Mazelin L, Theodorou V, More J, Fioramonti J, Bueno L. Protective role of vagal afferents in experimentally-induced colitis in rats. *J Auton Nerv Syst* 1998;73:38-45.
30. Tatewaki M, Harris M, Uemura K, Ueno T, Hoshino E, Shiotani A, et al. Dual effects of acupuncture on gastric motility in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 285(4):R862-72.
31. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL: A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215:44-56
32. Sener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanli G, Kaçmaz A, Tilki M, Yeğen BC. Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today.* 2005; 35(1):52-9.
33. Casini A, Ferrali M, Pompella AS, Maellaro E, Comperti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *Am J Pathol.* 1986; 123: 520-531
34. Aykac G, Uysal M, Yalcin AS, Kocak-Toker N, Sivas A, Oz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipidperoxide, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rat. *Toxicology.* 1985; 46: 71-76.
35. Bradley PP, Preibat D, Christerser RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982; 78: 206-209.
36. Di Giovangiulio M, Verheijden S, Bosmans G, Stakenborg N, Boeckxstaens GE, Matteoli G. The neuromodulation of the intestinal immune system and its relevance in inflammatory bowel disease. *Front Immunol* 2015; 6:59.
37. Van Der Zanden EP, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ. The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil.* 2009;21(1):6-17.
38. Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med.* 2004; 10(11):1216-21.
39. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405(6785):458-62.
40. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Ulloa L, Yang H, et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med* 2002; 195(6):781-8.
41. Mioni C, Bazzani C, Giuliani D, Altavilla D, Leone S, Ferrari A, et al. Activation of an efferent cholinergic pathway produces strong protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Crit Care Med.* 2005; 33(11):2621-8.
42. Altavilla D, Guarini S, Bitto A, Mioni C, Giuliani D, Bigiani A, et al. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway reduces NF-kappaB activation, blunts TNF-alpha production, and protects against splanchnic artery occlusion shock. *Shock.* 2006; 25(5):500-6.
43. Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM, Giuliani D, Bigiani A, Marini H, et al. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation.* 2003; 107(8):1189-94.
44. de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 2005; 6(8):844-51.
45. L.V. Borovikova, S. Ivanova, D. Nardi, M. Zhang, H. Yang, M. Ombrellino, K.J. Tracey, Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation, *Auton. Neurosci.* 85 (2000) 141-147].
46. Kolgazi M, Uslu U, Yuksel M, Velioglu-Ogunc A, Ercan F, Alican I. The role of cholinergic anti-inflammatory pathway in acetic acid-induced colonic inflammation in the rat. *Chem Biol Interact.* 2013; 205 (1): 72-80.
47. Singh P, Garg PK. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding. *Indian J Gastroenterol.* 2016 May;35(3):153-66.
48. Yu JH, Kim H. Oxidative stress and inflammatory signaling in cerulein pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(46):17324-9.
49. Sakai Y, Masamune A, Satoh A, Nishihira J, Yamagiwa T, Shimosegawa T. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 2003; 124(3):725-36.
50. John C. Kincaid. Action Potential, Synaptic Transmission, and Maintenance of Nerve Function in Medical physiology: principles for clinical medicine/edited by Rodney A. Rhoades, David R. Bell. 4th ed, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2013, pp. 55
51. Hayashi S, Hamada T, Zaidi SF, Oshiro M, Lee J, Yamamoto T, et al. Nicotine suppresses acute colitis and colonic tumorigenesis associated with chronic colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014;307(10):G968-78.
52. Yoshikawa H, Kurokawa M, Ozaki N, et al. Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetyl choline receptor alpha7. *Clin Expl Immunol.* 2006;146(1):116-23.
53. Gallowitsch-Puerta M, Pavlov VA. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Life Sci.* 2007 May 30;80(24-25):2325-9.

54. Yang ZW, Meng XX, Xu P. Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis. *J Cell Mol Med.* 2015; 19(11):2513-20.
55. Schneider et al. Pharmacological cholinergic stimulation as a therapeutic tool in experimental necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 2014;43: 41-46.
56. Shi C, Andersson R, Zhao X, Wang X. Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatology.* 2005;5(4-5):492-500.
57. Pérez S, Pereda J, Sabater L, Sastre J. Redox signaling in acute pancreatitis. *Redox Biol.* 2015; 5:1-14.
58. Zheng et al. Nicotine Ameliorates Experimental Severe Acute Pancreatitis via Enhancing Immunoregulation of CD4⁺ Regulatory T Cells. *Pancreas* 2015;44: 500-506.
59. Zheng YS, Wu ZS, Zhang LY, Ke L, Li WQ, Li N, Li JS. Nicotine ameliorates experimental severe acute pancreatitis via enhancing immunoregulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Pancreas.* 2015 Apr;44(3):500-6.