

PAPER DETAILS

TITLE: Siçanda endotoksemiye bagli çoklu organ hasarinda kolinerjik anti-inflamatuvar yolun rolü

AUTHORS: Meltem Kolgazi,Fatih Özgür,Ömer BEYAZOGLU,Ali Kocagöz,Mehmethan Çelik,Merve

AÇIKEL ELMAS,Meral Yüksel,Feriha Ercan,Inci Alican

PAGES: 21-30

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/165456>

Sıçanda Endotoksemiye Bağlı Çoklu Organ Hasarında Kolinergik Anti-İnflamatuvar Yolun Rolü

Meltem Kolgazi¹, Fatih Özgür², Ömer Beyazoglu², Ali Kocagöz², Mehmetan Çelik²,
Merve Açikel Elmas³, Meral Yüksel⁴, Feriha Ercan³, İnci Alican⁵

¹Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kayışdağı, İstanbul - Türkiye

²Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Haydarpaşa, İstanbul - Türkiye

³Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Maltepe, İstanbul - Türkiye

⁴Marmara Üniversitesi, Sağlık Meslek Yüksek Okulu, Laboratuvar Bölümü, Haydarpaşa, İstanbul - Türkiye

⁵Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Maltepe, İstanbul - Türkiye

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: İnci Alican

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Maltepe, İstanbul - Türkiye

Elektronik posta adresi / E-mail address: incialican@yahoo.com

Kabul tarihi / Date of acceptance: 6 Mart 2015 / March 6, 2015

ÖZET

Sıçanda endotoksemiye bağlı çoklu organ hasarında kolinergik anti-inflamatuvar yolun rolü

Amaç: Sıçanda sepsise bağlı çoklu organ hasarında kolinergik anti-inflamatuvar yolun rolünü araştırmak ve patojenezde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz (COX)-2 enzimlerinin etkileşimini incelemek.

Yöntemler: Sprague-Dawley sıçanlara lipopolisakkarid (LPS) (10 mg/kg; intraperitoneal) uygulanarak sepsis oluşturuldu. Tedavi gruplarına, LPS öncesi 3 gün süreyle nikotin (0.1 mg/kg; intraperitoneal) tek başına veya nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin (3 mg/kg; subkutan), selektif iNOS inhibitörü aminoguanidin (8 mg/kg; intraperitoneal) veya selektif COX-2 inhibitörü nimesulid (8 mg/kg; intraperitoneal) ile birlikte uygulandı. LPS'den 6 saat sonra dekapite edilen sıçanların karaciğer, böbrek ve akciğer örneklerinde malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH), myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, kemiluminisans ölçümleri ve hasar skorlaması yapıldı. Kanda alanin transaminaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve üre azotu (BUN) ölçüldü.

Bulgular: Sepsis kanda ALT ($p<0.05$), AST ($p<0.01$) ve BUN ($p<0.001$) düzeylerinde artışa, karaciğer, böbrek ve akciğerde MDA'da yükselmeye (sırası ile, $p<0.01$, $p<0.05$ ve $p<0.05$), MPO'da artışa (sırası ile, $p<0.01$, $p<0.05$ ve $p<0.001$), GSH'da azalmaya (karaciğer için $p<0.01$, böbrek için $p<0.01$) ve kemiluminisansa artışa (luminol her üç doku için $p<0.001$; lusigenin karaciğer için $p<0.001$, böbrek ve akciğer için $p<0.01$) neden oldu. Nikotin ALT, AST ve BUN düzeylerindeki yükselmeyi (her üç parametre için $p<0.05$), karaciğer ve böbrekte MDA artışını (sırası ile, $p<0.05$ ve $p<0.05$), GSH'daki azalmayı (sırası ile, $p<0.01$ ve $p<0.01$), doku hasarını (sırası ile, $p<0.05$ ve $p<0.05$) ve MPO artışını (karaciğer için $p<0.05$, böbrek için $p<0.01$ ve akciğer için $p<0.01$) engelledi. Nikotinin yararlı etkileri diğer tedaviler varlığında devam etme eğilimi gösterdi.

Sonuç: Nikotin tedavisi sepsise bağlı karaciğer, böbrek ve akciğer hasarını olasılıkla iNOS ve COX-2 enzim sistemlerinden bağımsız mekanizmalarla korumaktadır.

Anahtar sözcükler: Sepsis, sıçan, kolinergik anti-inflamatuvar yol, nikotin, inflamasyon

ABSTRACT

Role of the cholinergic anti-inflammatory pathway in endotoxemia-induced multi-organ damage in the rat

Objective: To investigate the role of the cholinergic anti-inflammatory pathway and interaction of inducible nitric oxide (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 in organ dysfunction in rat sepsis.

Methods: Lipopolysaccharide (LPS) (10 mg/kg; intraperitoneally) was given to Sprague-Dawley rats to induce sepsis. Groups were treated with nicotine alone or with nicotinic receptor antagonist mecamylamine (3 mg/kg; subcutaneously), selective iNOS inhibitor aminoguanidine (8 mg/kg; intraperitoneally) or selective COX-2 inhibitor nimesulide (8 mg/kg; intraperitoneally). Six hours after LPS, liver, kidney and lung samples were obtained for malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), myeloperoxidase (MPO), chemiluminescence assays and microscopic evaluation and blood was obtained for alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and blood urea nitrogen (BUN) assays.

Results: Sepsis increased ALT ($p<0.05$), AST ($p<0.01$) and BUN ($p<0.001$), tissue MDA ($p<0.01$ for liver and $p<0.05$, for kidney and lung), tissue MPO ($p<0.01$, for liver; $p<0.05$, for kidney; $p<0.001$, for lung) and chemiluminescence (luminol $p<0.001$, for all tissues; lucigenin $p<0.001$ for liver and $p<0.01$ for kidney and lung) while decreasing GSH ($p<0.01$, for liver and kidney) compared to control. Nicotine prevented the increase in ALT, AST and BUN ($p<0.05$, for each), increase in liver and renal MDA ($p<0.05$, for each), consumption of GSH ($p<0.01$, for liver and kidney), injury score ($p<0.05$, for liver and kidney) and increased MPO ($p<0.05$, for liver and $p<0.01$, for kidney and lung). Beneficial effects of nicotine seemed to persist in the presence of other therapies.

Conclusions: Nicotine in sepsis protects the tissues partially via activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway independently of the iNOS and COX-2.

Key words: Sepsis, rat, cholinergic anti-inflammatory pathway, nicotine, inflammation

GİRİŞ

Sepsis, hemodinamik ve metabolik değişikliklerle karakterize çoklu organ hasarına ve ölüme yol açabilen klinik bir

tablodur (1). Şiddetli enfeksiyona karşı immün sistem ve nöroendokrin sistemlerin cevabı sepsisin patogeneğinde önemli rol oynar (2). Mikrovasküler disfonksiyon sepsisle ilişkili dolaşım yetmezliği ve organ disfonksiyonu için önem-

li bir faktör olarak kabul edilmektedir (3). Sepsise bağlı olarak gelişebilen şok tablosu; azalmış vasküler direnç ve miyokardiyal kontraktilete sonucunda oluşan hipotansiyon kaynaklı kan akımı ve oksijen dağıtımında yetersizlik, doku hipoksisi, organ hasarı ve yetmezliğiyle karakterizedir.

Kolinerjik anti-inflamatuvar yol, vagus siniri ve reseptörleri aracılığıyla pro-inflamatuvar sitokin salınımını inhibe eden nöral bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır. Kolinerjik anti-inflamatuvar yolun elektriksel olarak vagus sinirinin uyarılmasıyla aktivasyonunun, yanık hasarı oluşturmuş sıçanlarda karaciğer inflamasyonu (4), iskele/reperfüzyon hasarı (5), hemorajik şok (6), septik peritonit (7) modellerinde artmış serum tümör nekroz faktörü (TNF)- α seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Kolinerjik sinirler ile immün sistem arasındaki iletişim için α bungaratoksin-duyarlı kolinerjik nikotinik reseptör olan $\alpha 7$ nAChR'lerin gerekli olduğu ve bu reseptörün makrofajlarda ve diğer immün hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir (8). $\alpha 7$ nAChR agonistlerinin hem TNF- α hem de interlekin (IL)-1, IL-6 ve IL-8 serbestlenmesini inhibe ettiği farklı modellerde gösterilmiştir (9-11). Sinyal transdüksiyonu olasılıkla sitokin eksprese eden hücrelerdeki $\alpha 7$ nAChR reseptör aracılığıyla janus kinaz (JAK)2 fosforilasyonu ile sinyal transdüser ve transkripsiyon faktörü (STAT)-3'ün aktivasyonu sonucunda nükleer faktör (NF)- κ B translokasyonunda azalma ile gerçekleşmektedir (11).

Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi nitrik oksit (NO)'in ve siklooksijenaz (COX) enzimi de prostaglandinlerin sentezinde görev alan enzimlerdir. Her iki enzimin de yapısal ve indüklenebilir izoformları mevcuttur (12,13). NOS yapısal olarak endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) izoformlarına sahiptir (14). Nöronal NOS ve eNOS tarafından sentezlenen NO'nun genel olarak fizyolojik süreçlerde rol oynadığı, iNOS kaynaklı NO'nun ise peroksinitrit, nitrojen dioksit gibi türevleri yoluyla reaktif oksijen molekülleri gibi hasar verici olduğu kabul edilmektedir (15). COX enziminin de COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. COX-1 birçok dokuda yapısal olarak sentezlenirken COX-2 çeşitli pro-inflamatuvar mediyatör ve uyarı ile indüklenerek sentezlenen izoformdur (16). NO'nun sepsis ve septik şokla ilişkili vasküler değişikliklerde ve organ disfonksiyonunda önemli bir mediyatör olarak rol oynadığı bilinmektedir (17,18). NO kapiller perfüzyonda ve oksijen ulaşımında bozulmalar ve doku hipoksisi ile karakterize olan sepsisin erken döneminde kan akımının düzenlenmesinde

etkilidir ve aşırı NO üretimi sepsis sırasında mikrodolaşımsal bozukluklarda önemli rol oynamaktadır (19,20). Diğer taraftan, sepsiste COX-2 ekspresyonunun arttığı, COX-1 düzeylerinin ise değişmediği gösterilmiştir (21). Endotoksemi ile artan COX-2'nin reaktif oksijen türlerinin üretimini artırabileceği iddia edilmiş, COX-2 blokajı ile endotel kaynaklı gevşemenin tekrar sağlandığı gösterilmiştir (21).

Yukarıdaki bilgilerin ışığı altında bu çalışmada, deneysel sepsis modeli kullanılarak çoklu organ hasarında kolinerjik anti-inflamatuvar yolun rolünü araştırmak ve bu yolun patogeneğinde yer aldığı düşünülen iNOS ve COX-2 enzimleri ile etkileşimini incelemek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada her iki cinsiyetten eşit sayıda Sprague-Dawley sıçanlar (200-250 gr) kullanıldı. Sıçanlar ısı ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), nem (%65-70) ve ışık kontrolü sağlanmış ortamda standart sıçan yemi ile beslendiler. Deney süresince ışık döngüsü 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Çalışma protokolü için Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onay alındı.

Deneysel Sepsis Modeli

Sıçanlar sepsis oluşturmak üzere gece açlığını takiben her grupta 8 hayvan olacak şekilde kontrol grubu; sepsis grubu; sepsis + nikotin grubu; sepsis + mekamilamin + nikotin grubu; sepsis + aminoguanidin + nikotin grubu ve sepsis + nimesulid + nikotin gruplarına ayrıldı. Hayvanlara sepsis oluşturmak üzere lipopolisakkarid (LPS; *E. coli* endotoksin serotip 0111:B4) 10 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulandı. Kontrol grubuna, aynı yolla LPS'nin çözücüsü fizyolojik tuzlu su (1 ml/100 g) uygulandı. Tedavi gruplarına, LPS uygulanmasından önce 3 gün süreyle nikotin (0.1 mg/kg; intraperitoneal) tek başına veya nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin (3 mg/kg; subkutan), selektif iNOS inhibitörü aminoguanidin (8 mg/kg; intraperitoneal) veya selektif COX-2 inhibitörü nimesulid (8 mg/kg; intraperitoneal) ile birlikte uygulandı. Sıçanların tümü LPS veya çözücüsünün uygulamasından 6 saat sonra dekapite edildi. Gövde kanı toplandı, karaciğer, böbrek ve akciğer dokuları çıkarıldı. Serumda karaciğer fonksiyon testlerinden alanin transaminaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeyi ölçümü, böbrek fonksiyon testlerinden kan üre azot (BUN)

düzeyi ölçümü yapıldı. Dokularda ise, lipid peroksidasyonun göstergesi olan malondialdehid (MDA) ölçümü, endojen antioksidan glutatyon (GSH) düzeyi ölçümü, nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçümü, kemiluminisans yöntemiyle oksidan miktarı ölçümü ve histolojik skorlama yapıldı.

Serum ALT, AST ve BUN Düzeyleri Ölçümleri

Serum AST, ALT ve BUN düzeyleri otomatize olarak çalışıldı (Cobas 8000 Modular Analytics, Roche Diagnostics, Almanya). AST ve ALT ölçümü için International Federation of Clinical Chemistry tarafından önerilen pridoksal fosfat aktivasyonlu yöntem kullanıldı. BUN testi ureaz ve glutamat dehidrogenaz kullanılarak üre ölçümü olarak gerçekleştirildi ve mg/dL olarak elde edilen sonuçlar 0.467 ile çarpılarak ifade edildi.

Dokuda MDA ve GSH Düzeyi Ölçümü

Doku örnekleri ağırlıklarının 10 katına denk gelen miktarda %10'luk triklorasetik asit (TCA) 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 ölçümle ifade edildi (22). GSH ölçümleri modifiye Ellman yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (23).

Dokuda MPO Aktivitesi 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 uzak-

laştırıldıktan 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 (24).

Dokuda Kemiluminisans Ölçümü

Dokuda kemiluminisans ölçümü 0.2 mM luminol veya lusigenin problemleri kullanılarak luminometre ile yapıldı. Tüm ölçümler 15 saniyelik intervaller şeklinde 5 dakika süreyle yapıldı ve sonuçlar mg doku başına eğri altındaki alan şeklinde ifade edildi (25).

Dokunun Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi

Akciğer, karaciğer ve böbrek dokuları %10'luk formalin ile fikse edildi. Rutin parafine gömme protokolü sonrası 5 µm kalınlığındaki kesitler hematoksin ve eosin (H&E) ile boyanarak fotomikroskopta (Olympus BX51, Japonya) değerlendirildi. Her deney grubunda 6-8 preparat ve her preparatta da rastgele seçilen 5 alan x20 büyütmede değerlendirildi ve Tablo 1'de gösterilen semikantitatif kriterlere göre skorlandı (26).

İstatistiksel Analiz

Mikroskopik skor verileri ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan (minimum-maksimum değerler), diğer veriler ise ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. Verilerin analizinde mikroskopik skor verileri için Mann-Whitney U non-parametrik test, diğer parametreler için Student's t testi kullanıldı. p<0.05 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edil-

Tablo 1: Doku hasarının mikroskopik skorlama kriterleri

Doku	Görünüş
Akciğer	- Vasküler konjesyon ve interstisyel ödem - İnflamatuvar hücre infiltrasyonu - Alveolar yapıda bozulma
Karaciğer	- Hepatositlerde vaküolizasyon ve piknotik hepatositler - Sinüzoidal genişleme ve konjesyon - Kupffer hücre aktivasyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu
Böbrek	- Glomerülde hasar ve Bowman boşluğunda genişleme - Proksimal ve distal tübüllerde hasar - İnterstisyel ödem ve vasküler konjesyon

Her kriter 0-3 arasında (0:yok; 1:hafif derecede; 2: orta derecede; 3: şiddetli) skorlandı. Maksimum skor=9

di. Analizler için Instat analiz programı (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) kullanıldı.

BULGULAR

Serum ALT, AST ve BUN Düzeyleri

Tedavisiz sepsis grubunda ALT, AST ve BUN düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olarak bulundu (sırası ile, $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$). Nikotin uygulaması tek başına ALT, AST ve BUN düzeylerindeki bu yükselmeyi önemli ölçüde engelledi (sırası ile, $p<0.05$, $p<0.05$ ve $p<0.05$). Nikotin ile birlikte mekamilamin, aminoguanidin veya nimesulid tedavilerinin de ALT, AST ve BUN'daki artışları benzer şekilde engelledikleri gözlemlendi (Tablo 2).

Doku MDA Düzeyleri

Karaciğer, böbrek ve akciğer örneklerinde LPS uygulaması dokuda lipid peroksidasyonun göstergesi olan MDA

düzeylerinde artışa yol açtı (sırası ile, $p<0.01$, $p<0.05$ ve $p<0.05$). Nikotin tedavisi karaciğer ve böbrekte sepsise bağılı MDA artışını engellerken (sırası ile $p<0.05$ ve $p<0.05$) akciğer dokusundaki etkisi istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı. Karaciğer ve böbrek dokularında nikotin bu yararlı etkisi nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin varlığında ortadan kalkarken, iNOS ve COX-2 inhibisyonu ile değişmedi (Şekil 1).

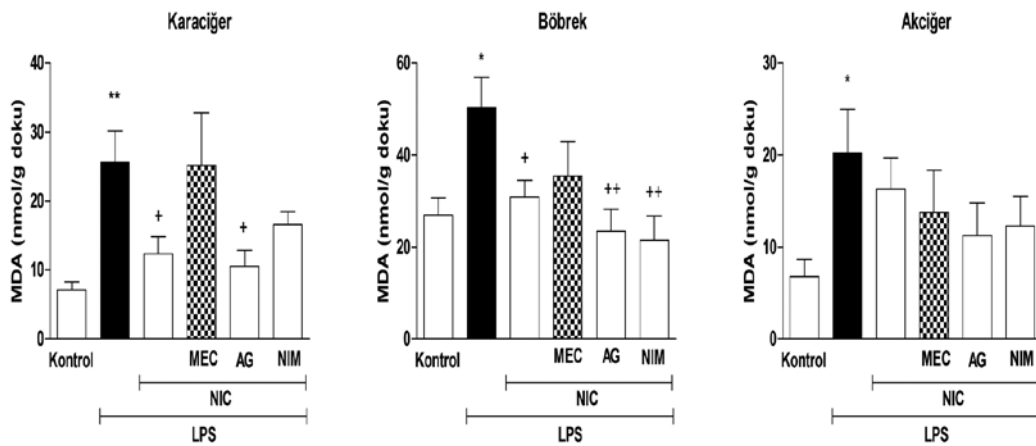
Doku GSH Düzeyleri

Karaciğer ve böbrek dokusunda LPS ile endojen antioksidan GSH düzeylerinde belirgin bir azalma gözlenirken (sırası ile, $p<0.01$ ve $p<0.01$) akciğerde bu etki görülmedi. Karaciğer ve böbrek örneklerinde sepsise bağılı azalan GSH nikotin tedavisi ile kontrol düzeylerine geri döndü (sırası ile, $p<0.01$ ve $p<0.01$). Karaciğer dokusunda mekamilamin ön tedavisi nikotin olumlu etkisini anlamlı düzeyde engellerken ($p<0.05$), aminoguanidin ve nimesulid ön tedavileri bu etkiyi değiştirmediler. Böbrek dokusunda

Tablo 2: Kontrol, tedavisiz ve tedavili sepsis gruplarında serum ALT, AST ve BUN düzeyleri

	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dl)
Kontrol grubu	54.88±7.80	208.60±17.69	14.25±0.65
Sepsis grubu	1093.00±388.80*	1103.00±299.20**	46.88±2.53***
Ön-tedavili sepsis grupları			
Nikotin	138.80±60.83 ⁺	337.30±70.98 ⁺	35.75±3.25 ⁺
Nikotin + Mekamilamin	130.70±70.34 ⁺	389.30±153.90 ⁺	35.14±3.99 ⁺
Nikotin + Aminoguanidin	64.50±10.23 ⁺	345.40±42.59 ⁺	33.13±3.85 ⁺⁺
Nikotin + Nimesulid	54.13±6.61 ⁺	409.30±34.58 ⁺	16.38±3.55 ⁺⁺⁺

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$, kontrol grubuna kıyasla; ⁺ $p<0.05$, ⁺⁺ $p<0.01$ ve ⁺⁺⁺ $p<0.001$, tedavisiz sepsis grubuna kıyasla



Şekil 1: Kontrol, tedavisiz ve tedavili sepsis (LPS) gruplarına ait karaciğer, böbrek ve akciğer doku örneklerinde malondialdehid (MDA) düzeyleri. * $p<0.05$, ** $p<0.01$: kontrol grubuna kıyasla, ⁺ $p<0.05$, ⁺⁺ $p<0.01$: LPS grubuna kıyasla. LPS: lipopolisakkarid, NIC: nikotin, MEC: mekamilamin, AG: aminoguanidin, NIM: nimesulid.

nikotinin sepsise bağlı azalan GSH üzerine yararlı etkisi mekamilamin, aminoguanidin ve nimesulid varlığında devamlılık gösterdi (Şekil 2).

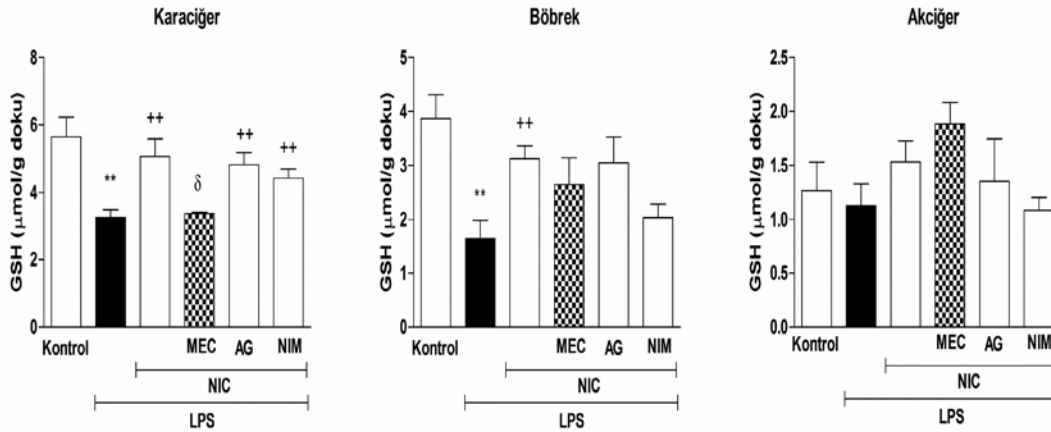
Doku MPO Aktivitesi

Dokuya nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilen MPO aktivitesi sepsisli gruba ait karaciğer, böbrek ve akciğer dokularında belirgin şekilde artış gösterirken (sırası ile, $p<0.01$, $p<0.05$ ve $p<0.001$), nikotin tedavisi bu artışları anlamlı şekilde azalttı (karaciğer için $p<0.05$, böbrek için $p<0.01$ ve akciğer için $p<0.01$). Karaciğer ve böbrek dokularında nikotinin etkisi mekamilamin varlığında

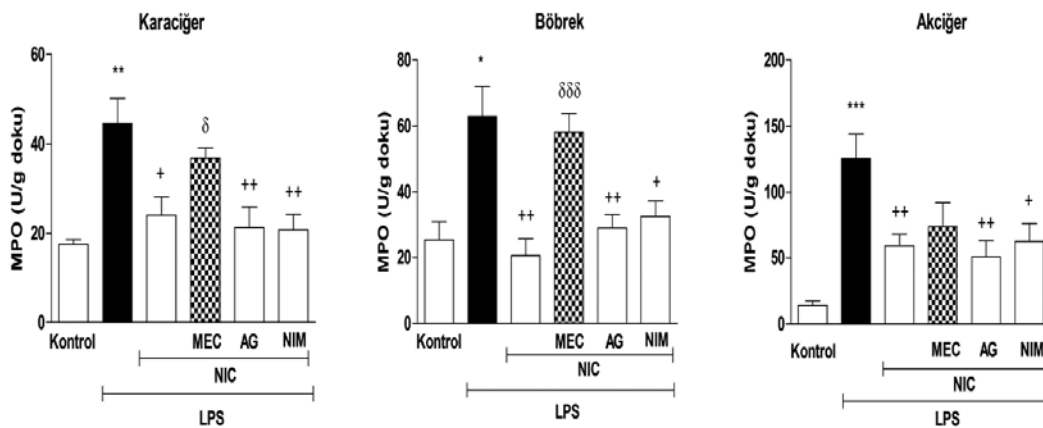
da anlamlı şekilde engellenirken (karaciğer için $p<0.05$; böbrek için $p<0.001$) iNOS ve COX-2 inhibisyonu ile devamlılık gösterdi. Akciğer örneklerinde ise, nikotinin etkisi diğer tedavilerin varlığında önemli ölçüde bir değişiklik göstermedi (Şekil 3).

Doku Kemiluminisans Değerleri

Dokuda hidroksil radikali, hidrojen peroksit, hipoklorit ve peroksinitrit varlığını gösteren luminol kemiluminisans ve süperoksit radikali varlığının göstergesi olan lusigenin kemiluminisans değerleri, her üç dokuda da sepsis grubunda kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek bulun-



Şekil 2: Kontrol, tedavisiz ve tedavili sepsis (LPS) gruplarına ait karaciğer, böbrek ve akciğer örneklerinde glutatyon (GSH) düzeyleri. ** $p<0.01$: kontrol grubuna kıyasla, ++ $p<0.01$: LPS grubuna kıyasla, δ $p<0.05$: nikotin tedavili LPS grubuna kıyasla. LPS: lipopolisakkarid, NIC: nikotin, MEC: mekamilamin, AG: aminoguanidin, NIM: nimesulid.



Şekil 3: Kontrol, tedavisiz ve tedavili sepsis (LPS) gruplarına ait karaciğer, böbrek ve akciğer örneklerinde myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi düzeyleri. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$: kontrol grubuna kıyasla, + $p<0.05$, ++ $p<0.01$: LPS grubuna kıyasla, δ $p<0.05$, $\delta\delta$ $p<0.001$: nikotin tedavili LPS grubuna kıyasla. LPS: lipopolisakkarid, NIC: nikotin, MEC: mekamilamin, AG: aminoguanidin, NIM: nimesulid.

Tablo 3: Kontrol, tedavisiz ve tedavi sepsis gruplarına ait karaciğer, böbrek ve akciğer kemiluminisans değerleri

	Karaciğer		Böbrek		Akciğer	
	Luminol	Lusigenin	Luminol	Lusigenin	Luminol	Lusigenin
Kontrol grubu	8.58±0.79	8.94±1.09	9.48±1.69	8.02±1.02	9.64±1.05	11.26±0.59
Sepsis grubu	21.84±1.65***	16.23±0.66***	16.78±0.61***	14.39±1.01**	20.60±1.64***	20.53±1.77**
Ön-tedavili sepsis grupları						
Nikotin	11.66±1.46+++	10.21±0.89+++	7.93±0.63+++	10.41±1.03+	10.26±1.33+++	10.49±1.21+++
Nikotin + Mekamilamin	9.37±1.54+++	10.19±1.19+++	11.33±1.29	11.33±1.06++	11.40±1.16+++	11.51±0.73+++
Nikotin + Aminoguanidin	8.03±0.96+++	10.90±1.12++	9.94±0.52+++	8.91±0.62+++	9.85±1.54+++	7.94±0.62+++
Nikotin + Nimesulid	9.61±0.87+++	7.36±0.44+++	8.35±0.98+++	10.34±0.76++	8.88±1.19+++	9.95±1.60+++

p<0.01,p<0.001, kontrol grubuna kıyasla; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, tedavisiz sepsis grubuna kıyasla

Tablo 4: Kontrol, tedavisiz ve tedavi sepsis (LPS) gruplarına ait karaciğer, böbrek ve akciğer örneklerinde mikroskopik lezyon skoru değerleri. Veriler ortalama±standart sapma ve medyan (minimum-maksimum) olarak ifade edilmiştir.

	Karaciğer	Böbrek	Akciğer
Kontrol grubu	0.01±0.04 0.00 (0.00-0.10)	0.02±0.04 0.00 (0.00-0.10)	0.02±0.06 0.00 (0.00-0.15)
Sepsis grubu	8.25±1.25*** 9.00 (6.00-9.00)	7.00±1.82*** 6.75 (4.50-9.00)	8.50±1.22*** 9.00 (6.00-9.00)
Ön-tedavili sepsis grupları			
Nikotin	6.42±0.66+ 6.00 (6.00-7.50)	4.50±0.95+ 4.50 (3.00-6.00)	7.75±1.47 8.25 (6.00-9.00)
Nikotin + Mekamilamin	6.92±1.88 6.75 (4.50-9.00)	5.25±1.26 4.50 (4.50-7.50)	6.50±1.55 6.00 (4.50-9.00)
Nikotin + Aminoguanidin	4.31±1.25+++ 4.50 (3.00-6.00)	5.00±1.22+ 5.25 (3.00-6.00)	6.94±2.11 6.75 (3.00-9.00)
Nikotin + Nimesulid	6.86±0.80+ 7.50 (6.00-7.50)	4.71±1.04+ 4.50 (3.00-6.00)	6.21±1.82 6.00 (4.50-9.00)

***p<0.001, kontrol grubuna kıyasla; +p<0.05, +++p<0.001, LPS grubuna kıyasla.
LPS: lipopolisakkarid

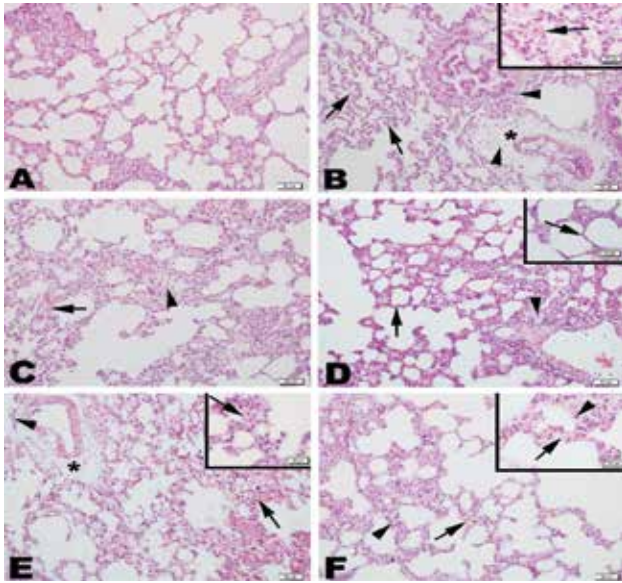
du (luminol her üç doku için p<0.001; lusigenin karaciğer için p<0.001, böbrek ve akciğer için p<0.01). Her üç doku da sepsise bağlı artan luminol ve lusigenin kemiluminisans değerleri tek başına veya diğer tedavilerle birlikte nikotin uygulanması ile anlamlı şekilde azalma gösterdi (Tablo 3).

Mikroskopik Değerlendirme

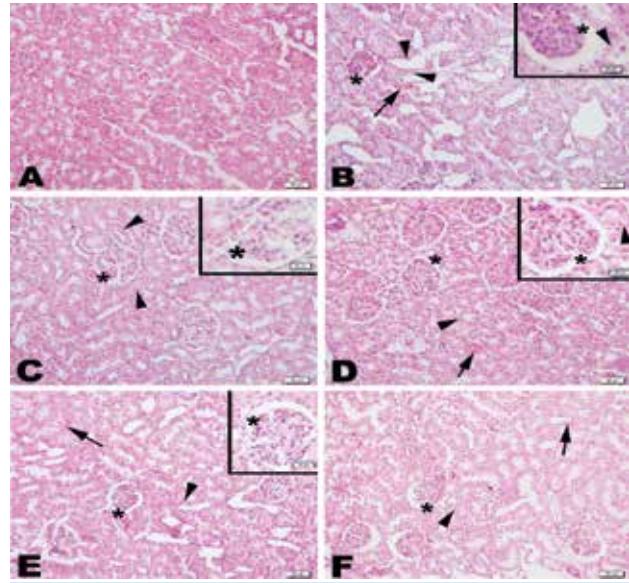
Sepsis grubunda karaciğer, böbrek ve akciğer dokularında mikroskopik hasar skoru kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde yüksekti (sırası ile, p<0.001, p<0.001 ve p<0.001). Tek başına nikotin tedavisi karaciğer ve böbrekteki hasarda anlamlı azalmaya yol açtı (sırası ile, p<0.05 ve p<0.05). Karaciğer ve böbrekte nikotinin bu etkisi aminoguanidin varlığında devam etti (sırası ile, p<0.001 ve p<0.05). Benzer şekilde, nimesulid varlığında nikotinin karaciğer ve böbrekteki hasar üzerine yararlı etkisi devam

etti (sırası ile, p<0.05 ve p<0.05). Ancak akciğerde sepsise bağlı hasarın tek başına veya diğer tedavilerle birlikte nikotin varlığında anlamlı bir değişiklik göstermediği gözlemlendi (Tablo 4).

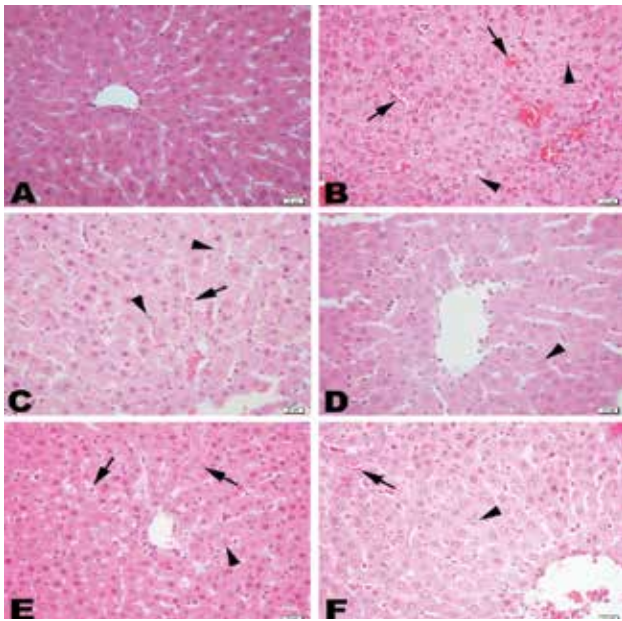
Karaciğer, böbrek ve akciğer örneklerinin morfolojik incelemesinde, sepsise bağlı olarak karaciğerde ciddi hepatosit hasarı, sinuzoidlerde genişleme, konjesyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu; böbrekte ciddi glomerül hasarı, Bowman boşluğında genişleme, proksimal ve distal tübüllerde hasar, orta düzeyde vasküler konjesyon ve interstisyel ödem ve akciğerde alveol yapısında bozulma, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon ve interstisyel ödem gözlemlendi. Tek başına nikotin uygulanan ve nikotin ile birlikte mekamilamin, aminoguanidin veya nimesulid tedavisi uygulanan sepsis gruplarına ait her üç dokuda da morfolojik hasarın önemli ölçüde gerilemekle birlikte devam ettiği izlendi (Şekil 4, 5 ve 6).



Şekil 4: Kontrol, tedavisiz ve tedavi sepsis gruplarına ait akciğer örneklerinin H&E boyama sonrası mikroskopik görüntüleri. Kontrol grubunda (A) normal akciğer parenkim morfolojisi; sepsis grubunda (B) alveol yapısında bozulma, inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başı), vasküler konjesyon (ok) ve interstisyel ödem (*) görülmektedir. Tek başına nikotin (C), nikotin + mekamilamin (D), nikotin + aminoguanidin (E) ve nikotin + nimesulid (F) tedavisi alan sepsisli gruplarda alveol yapısında bozulma, vasküler konjesyon (ok) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun (ok başı) ve interstisyel ödemin (*) azalmakla birlikte devam ettiği görülmektedir.



Şekil 6: Kontrol, tedavisiz ve tedavi sepsis gruplarına ait böbrek örneklerinin H&E boyama sonrası mikroskopik görüntüleri. Kontrol grubunda (A) normal böbrek korteks morfolojisi; sepsis grubunda (B) Bowman boşluğunda genişleme ve glomerüler konjesyon (*), vasküler konjesyon ve kanama (ok) ve tübül epitelinde hasar (ok başı) görülmektedir. Tek başına nikotin (C), nikotin + mekamilamin (D), nikotin + aminoguanidin (E) ve nikotin + nimesulid (F) tedavisi alan sepsisli gruplarda Bowman boşluğunda genişleme ve glomerüler konjesyon (*), vasküler konjesyon ve kanama (ok) ve tübül epiteli hasarında (ok başı) önemli ölçüde azalma izlenmektedir.



Şekil 5: Kontrol, tedavisiz ve tedavi sepsis gruplarına ait karaciğer örneklerinin H&E boyama sonrası mikroskopik görüntüleri. Kontrol grubunda (A) normal karaciğer parenkim morfolojisi; sepsis grubunda (B) sinüzoidal konjesyon ve kanama (ok) ve hasarlı hepatositler (ok başı) görülmektedir. Tek başına nikotin (C), nikotin + mekamilamin (D), nikotin + aminoguanidin (E) ve nikotin + nimesulid (F) tedavisi alan sepsisli gruplarda sinüzoidal konjesyon ve kanama (ok) ve hasarlı hepatositlerde (ok başı) azalma izlenmektedir.

TARTIŞMA

Bu çalışmanın verileri, sıçanda endotoksin uygulanmasına bağlı olarak gelişen sepsisin karaciğer, böbrek ve akciğerde önemli ölçüde hasara yol açtığını ve bu hasarın nikotin tedavisi ile belirgin derecede azaldığını göstermektedir. Nikotin'in yararlı etkisi nikotinik reseptör antagonisti ön tedavisi ile kısmen engellenirken iNOS ve COX-2 inhibisyonu ile değişme göstermemiştir.

Sepsisin enfeksiyon odağının uzağındaki organlarda ilerleyici hasar gelişimine yol açtığı bilinmektedir (27). Sepsis ile indüklenen bu çoklu organ hasarının gelişiminde oksidatif stresin önemli rolü olduğu gösterilmiştir (28). Bakterilerden endotoksin serbestlenmesi sepsis gelişimindeki ilk basamaktır. Endotoksin inflamatuvar hücreleri aktive ederek inflamatuvar yanıtın daha da şiddetlenmesine yol açan pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β gibi) serbestlenmesine neden olmaktadır. Bu inflamatuvar kaskad lökositlerin çeşitli organlara infiltrasyonuna ve buna bağlı olarak vasküler ve parenkimal hücre disfonksiyonuna yol açmaktadır (27). Çalışmamızda, tedavisiz sepsisli grupta karaciğer, böbrek ve akciğer örneklerinde mikroskopik

düzeydeki hasarın lipid peroksidasyonda artış ve endojen antioksidan glutatyonda azalma ile birlikte olduğu görülmektedir. Bu bulguların yanı sıra dokuda oksidan varlığının doğrudan gösterilmesini sağlayan kemiluminisans yöntemiyle elde edilen veriler, sepsise bağlı olarak her üç dokuda oksidan hasarın varlığına işaret etmektedir. Ek olarak, incelenen dokulardaki oksidan hasar MPO aktivitesi artışı ile paralellik göstermiştir ve bu bulgu da dokularda hasara neden olan oksidan kaynakları arasında nötrofillerin bulunduğu düşündürmektedir.

Vagus siniri kaynaklı sinyallerin uyarılmasının, yüksek dozda endotoksin uygulanan sıçanlarda TNF- α serbestlenmesini anlamlı şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (29). Daha sonra yapılan çalışmalar, vagus siniri sinyallerinin deneysel sepsis, iske mi/reperfüzyon, hemorajik şok, ileus, deneysel artirit ve pankreatitte sitokin aktivitesini inhibe ettiğini ve hastalık sonlanımlarını düzelttiğini ortaya koymuştur (29-37). Vagus sinirinin uyarılmasına bağlı sitokin sentezindeki inhibisyonun mekanizması, vagus sinirinin ana nörotransmitteri olan asetilkoline atfedilmiştir (28,38,39). Sitokin serbestleyen makrofajlar ve diğer inflamatuvar hücreler asetilkolin reseptörü eksprese ederler ve bu da sitokin sentezini ve serbestlenmesini baskılayan intraselüler sinyali tetikler (38,39). Sitokinleri inhibe ettiği en iyi şekilde karakterize edilmiş olan kolinerjik reseptör, nikotinik asetilkolin reseptörün $\alpha 7$ alt birimi ($\alpha 7$ nAChR)'dir. Çalışmamızda, bu reseptörün uyarıcısı olarak verilen nikotin olasılıkla bu mekanizmayı hareket geçirerek sepsise bağlı özellikle karaciğer ve böbrekte ve daha az oranda akciğerde oksidan strese bağlı gelişen hasarda yararlı etki göstermiştir. Nikotin bu dokular-

daki hasarda mikroskobik düzeyde gerileme sağlarken dokulardaki nötrofil infiltrasyonunu ve oksidan metabolitlerdeki artışı da engellemiştir. Bu etkilerine paralel olarak sepsise bağlı dokulardaki GSH içeriğinde tükenme de nikotin tedavisi ile önemli ölçüde engellenmiştir. Bu bulgular deneysel sepsis modelinde, nikotin uygulamasının olasılıkla dokuya nötrofil göçünü azaltarak oksidatif stresi azalttığını düşündürmektedir. Nikotinin etkilerinin nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin ile kısmen geri dönmesi nikotinin $\alpha 7$ nAChR'den bağımsız mekanizmalar aracılığı ile etkisini gösterebildiği şeklinde açıklanabilmektedir. Diğer taraftan, nikotin ile birlikte selektif iNOS veya COX-2 inhibitörlerinin uygulandığı sepsisli gruplarda ortaya çıkan yararlı etkilerin (tüm parametreler için) nikotinin tek başına uygulandığı gruptaki etkilere benzer düzeyde olduğu da dikkat çekmektedir. Nikotinin sepsise bağlı gelişen hasar üzerine koruyucu etkilerinin selektif iNOS veya COX-2 inhibisyonu varlığında değişiklik göstermemesi nikotinin bu etkilerinin bu enzim sistemleriyle etkileşimden bağımsız olduğunu düşündürmektedir. Dokuların morfolojik olarak değerlendirilmesi, nikotin tedavisi alan sepsisli grupta hasarın kısmen önlenemediğini ortaya koymuştur; bu da sepsisten önce 3 günlük nikotin tedavisinin koruyuculuk açısından yeterli olmadığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak, çalışmanın bulguları sepsis öncesi yapılan nikotin ön tedavisinin kolinerjik anti-inflamatuvar yolu aktive ederek karaciğer, böbrek ve akciğer dokularındaki sepsise bağlı hasarı kısmen koruduğunu ve bu etkinin olasılıkla iNOS ve COX-2 enzim sistemlerinden bağımsız olarak gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003; 348: 138-150.
- Klijn E, Den Uil CA, Bakker J, Ince C. The heterogeneity of the microcirculation in critical illness. *Clin Chest Med*. 2008; 29: 643-654.
- Cauwels A. Nitric oxide in shock. *Kidney Int*. 2007; 72: 557-565.
- Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Susarla S, Czura CJ, Tracey KJ. Cholinergic anti-inflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J Vasc Surg*. 2002; 36(6): 1231-1236.
- Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM, Giuliani D, Bigiani A, Marini H, Squadrito G, Minutoli L, Bertolini A, Marini R, Adamo EB, Venuti FS, Squadrito F. Efferent vagal fiber stimulation blunts nuclear factor-kappa B activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation*. 2003; 107: 1189-1194.
- van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno MJ, de Vos AF, Tracey KJ, van der Poll T. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J Infect Dis*. 2005; 191(12): 2138-2148.
- Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 2003; 421: 384-388.
- Su X, Lee JW, Matthay ZA, Mednick G, Uchida T, Fang X, Gupta N, Matthay MA. Activation of the alpha7nAChR reduces acid-induced acute lung injury in mice and rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007; 37(2): 186-192.
- Bencherif M, Lippello PM, Lucas R, Marrero MB. Alpha7 nicotinic receptors as novel therapeutic targets for inflammation-based diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68(6): 931-949.

10. Li J, Mathieu SL, Harris R, Ji J, Anderson DJ, Malysz J, Bunnelle WH, Waring JF, Marsh KC, Murtaza A, Olson LM, Gopalakrishnan M. Role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in regulating tumor necrosis factor- α (TNF- α) as revealed by subtype selective agonists. *J Neuroimmunol.* 2011; 239(1-2): 37-43.
11. de Jonge WJ1, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 2005; 6: 844-851.
12. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 109-142.
13. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB J.* 1998; 12: 1063-1073.
14. Napoli C, Crimi E, Williams-Ignarro S, Nigris F, Ignarro LJ. Chapter 23. Nitric Oxide, Oxidative Stress, Immune Response and Critical Care. In: Ignarro LJ, eds. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology.* Academic Press; 2009. p. 755-772.
15. Awad SS. State-of-the-art therapy for severe sepsis and multisystem organ dysfunction. *Am J Surg.* 2003; 186: 23-30.
16. Viridis A, Colucci R, Fornai M, Blandizzi C, Duranti E, Pinto S, Bernardini N, Segnani C, Antoniolli L, Taddei S, Salvetti A, Del Tacca M. Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 312(3): 945-953.
17. Levy RM, Prince JM, Billiar TR. Nitric oxide: a clinical primer. *Crit Care Med.* 2005; 33: 492-495.
18. Ellis CG, Jagger J, Sharpe M. The microcirculation as a functional system. *Crit Care.* 2005; 9: 3-8.
19. Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis –hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care.* 2003; 7: 359-373.
20. Trzeciak S, Cinel I, Philip Dellinger R, Shapiro NI, Arnold R, Parrillo JE, Hollenberg SM, Microcirculatory Alterations in Resuscitation and Shock (MARS) Investigators. Resuscitating the microcirculation in sepsis: the central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. *Acad Emerg Med.* 2008; 15: 399-413.
21. Wu KK. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol.* 1995; 33: 179-207.
22. Casini A, Ferrali M, Pompella AS, Maellaro E, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extra hepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *Am J Pathol.* 1986; 123: 520-531.
23. Aykac G, Uysal M, Yalcin AS, Kocak-Toker N, Sivas A, Oz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rat. *Toxicology.* 1985; 46: 71-76.
24. 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.
25. Haklar G, Ulukaya-Durakbasa C, Yuksel M, Dagli T, Yalcin AS. Oxygen radicals and nitric oxide in rat mesenteric ischemia-reperfusion: modulation by L-arginine and N-nitro-L-arginine methyl ester. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998; 25: 908-912.
26. 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): 52-59.
27. Neviere RR, Cepinskas G, Madorin WS, Hoque N, Karmazyn M, Sibbald WJ, Kvietys PR. LPS pretreatment ameliorates peritonitis-induced myocardial inflammation and dysfunction: role of myocytes. *Am J Physiol.* 1999; 277: H885-892.
28. Sato M, Maulik N, Das DK. Cardioprotection with alcohol: role of both alcohol and polyphenolic antioxidants. *Ann NY Acad Sci.* 2002; 957:122-135.
29. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405: 458-462.
30. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Ulloa L, Yang H, Sudan S, Czura CJ, Ivanova SM, Tracey KJ. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med.* 2002; 195: 781-788.
31. Mioni C, Bazzani C, Giuliani D, Altavilla D, Leone S, Ferrari A, Minutoli L, Bitto A, Marini H, Zaffe D, Botticelli AR, Iannone A, Tomasi A, Bigiani A, Bertolini A, Squadrito F, Guarini S. Activation of an efferent cholinergic pathway produces strong protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Crit Care Med.* 2005; 33: 2621-2628.
32. Altavilla D, Guarini S, Bitto A, Mioni C, Giuliani D, Bigiani A, Squadrito G, Minutoli L, Venuti FS, Messineo F, De Meo V, Bazzani C, Squadrito F. Activation of the cholinergic antiinflammatory pathway reduces NF-kappa b activation, blunts TNF-alpha production, and protects against splanchnic artery occlusion shock. *Shock.* 2006; 25: 500-506.
33. Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM, Giuliani D, Bigiani A, Marini H, Squadrito G, Minutoli L, Bertolini A, Marini R, Adamo EB, Venuti FS, Squadrito F. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation.* 2003; 107: 1189-1194.
34. De Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DUJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 2005; 6: 844-851.
35. Borovikova LV, Ivanova S, Nardi D, Zhang M, Yang H, Ombrellino M, Tracey KJ. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Auton Neurosci.* 2000; 85: 141-147.
36. van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Bruno MJ, Larosa GJ, Ulloa L, Tracey KJ, van der Poll T. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology.* 2006; 130: 1822-1830.
37. Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry B, Balakhaneh D, Huston J, Tracey KJ, Al-Abed Y, Metz CN. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med.* 2005; 201: 1113-1123.

38. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 2003;421: 384-388.
39. Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, Tracey KJ, Ulloa L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med*. 2004; 10: 1216-1221.