Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/221980

File ID	221980
Filename	Nederlandse samenvatting

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation
Author	E.P.M. van der Zanden
Faculty	Faculty of Medicine
Year	2011
Pages	165
ISBN	978-90-9026193-5

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/382099

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

Nederlandse samenvatting

In dit proefschrift werd onderzocht hoe de nervus vagus ontstekingen in de darm kan beïnvloeden. Het pionierswerk van Tracey en collega's heeft gedemonstreerd dat de nervus vagus, via zijn neurotransmitter acetylcholine, een belangrijke rol speelt bij het remmen van ontstekingsreacties[1]. Tevens hebben meerdere studies aangetoond dat cholinerge activatie ziekte vermindert in verschillende diermodellen zoals ischemie-reperfusie schade[2], hemorrhagische shock[3], peritonitis[4], DSS-colitis[5] en reumatoïde artritis[6].

Het doel van dit proefschrift was om het werkingsmechanisme van de zogenaamde 'cholinerge anti-inflammatoire pathway' in darmontstekingen verder te ontrafelen. Het maag-darmstelsel staat onder strikte controle van de nervus vagus[7,8], waardoor het gevoelig is voor immuun-modulatie door deze zenuw. Vooral in de darm, waar onze grootste verzameling microben huist en er goed gediscrimineerd moet worden tussen lichaamsvreemd en lichaamseigen, is strikte regulatie van de immuunreactie cruciaal. Wanneer dit proces uit balans is kunnen er ziekten optreden. Dit is bijvoorbeeld het geval in inflammatoire darmziekten (IBD), zoals de ziekte van Crohn en Colitis Ulcerosa, ziekten die veroorzaakt worden door een te sterke mucosale immuunreactie tegen onderdelen van de darmflora in genetisch vatbare personen. **Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de huidige kennis omtrent cholinerge modulatie van ontstekingen in de darm. Dit review beschrijft de mogelijke manieren waarop de nervus vagus de immuun respons kan reguleren. Tevens wordt de rol van activatie van de nicotinerge acetylcholine receptor (nAChR) en daaropvolgende signaleringsroutes in macrofagen en andere immuuncellen belicht. Tenslotte worden de mogelijke klinische implicaties van nervus vagus signalering besproken.

JAK2-STAT3 signalering in de 'cholinerge anti-inflammatoire pathway'

De 'cholinerge anti-inflammatoire pathway' wordt gekarakteriseerd door een verminderde productie van pro-inflammatoire cytokines via activatie van nAChRs op macrofagen[1]. Activatie van nAChRs kan *in vivo* tot stand komen door nervus vagus stimulatie, *in vitro* door het toedienen van cholinerge agonisten zoals acetycholine en nicotine. De nAChR bestaat uit verschillende onderdelen, subunits genoemd. De meeste studies wijzen de nAChR α7 subunit aan als essentiële schakel in het ontstekingsremmende effect van acetylcholine of nicotine[9, 10-12]. Wang et al hebben laten zien dat activatie van de nAChR α7 de transcriptiefactor NF-kBp65 remt, wat resulteert in een verminderde pro-inflammatoire cytokine productie[9,13]. In **hoofdstuk 3** hebben we geprobeerd uit te vinden via welke intra-cellulaire signaleringsroute acetycholine en nicotine hun effect bereiken. Wij hebben de betrokkenheid van de transcriptiefactor STAT3 in dit proces onderzocht, omdat STAT3 in potentie een negatieve regulator is van ontstekingsreacties[14, 15]. Wij toonden aan dat *in vitro*, nicotine en acetylcholine hun anti-inflammatoire effect op peritoneale macrofagen via nAChR α7-Jak2-STAT3 signalering bewerkstelligen. *In vivo*, hebben we de rol

van STAT3 in de 'cholinerge anti-inflammatoire pathway' getest in een diermodel van post-operatieve ileus (POI). POI wordt gekarakteriseerd door een verminderde darmwerking en vertraagde maagontlediging en is een pathologische conditie die normaal gezien wordt na abdominale chirurgie[16]. Deze aandoening is het resultaat van ontsteking van het spierweefsel van de darm, ontstaan doordat residente macrofagen geactiveerd worden door manipulatie van de darm[17]. In een diermodel verbeterde POI aanzienlijk door stimulatie van de nervus vagus. Stimulatie van deze zenuw leidde tot STAT3 activatie in intestinale macrofagen, wat aangeeft dat acetylcholine, afkomstig van efferente zenuwvezels van de nervus vagus, STAT3 activeert. De bevinding dat macrofagen activiteit onder strikte neuronale controle staat wordt versterkt door de observatie dat cholinerge zenuwvezels en residente macrofagen zeer dichtbij elkaar liggen in de myenterische plexus. Concluderend hebben wij in hoofdstuk 3 laten zien dat remming van macrofagen activiteit via de 'cholinerge anti-inflammatoire pathway' wordt bewerkstelligd via JAK2-STAT3 signalering. Theoretisch zou het mogelijk zijn dat nicotine macrofagen activiteit remt via directe interactie van gedimeriseerd STAT3 met de NF-kB p65 subunit[18].

In **hoofdstuk 4,** werd de rol van de JAK2-STAT3 signaleringsroute in het anti-inflammatoire effect van nAChR activatie verder onderzocht. Dit hebben we gedaan door middel van STAT3 silencing, farmacologische antagonisten en dominant negatieve STAT3 constructen. Hierbij werden twee dominant negatieve constrcuten gebruikt: STAT3D, dat STAT3 binding aan het DNA tegengaat, en STAT3F, dat STAT3 fosforylatie en dimerisatie voorkomt[19]. Nicotine remde TNF productie in peritoneale macrofagen getransfecteerd met STAT3F, maar niet in cellen getransfecteerd met STAT3D. Dus, in tegenstelling tot onze bevindingen in hoofdstuk 3, zagen we dat het ontstekingsremmende effect van nicotine in macrofagen meer afhankelijk was van STAT3 DNA binding en de aanwezigheid van STAT3 eiwit, dan van STAT3 fosforylatie. Hypothetisch, kan ongefosforyleerd STAT3 (U-STAT3) belangrijk zijn in het ontstekingsremmende effect van nicotine, via binding aan NF-kB en remming van TNF transcriptie[20].

In conclusie, wordt er in hoofdstuk 3 en 4 een nieuwe moleculaire route geïdentificeerd die betrokken is bij het anti-inflammatoire effect van cholinerge activiteit in macrofagen. Dit geeft aan dat medicijnen die ingrijpen op de JAK2-STAT3 signaleringsroute in de toekomst mogelijk belangrijk kunnen zijn in de behandeling van ontstekingsziekten.

Cholinerge activiteit en fagocytose

Activatie van het cholinerge systeem kan de productie van pro-inflammatoire cytokines door macrofagen remmen. Echter, zeker in de darm, functioneren macrofagen meer als fagocyten die, samen met dendritische cellen, kritische bewakers zijn in het toelaten van luminale antigenen. Daarom is het de vraag of het ontstekingsremmende

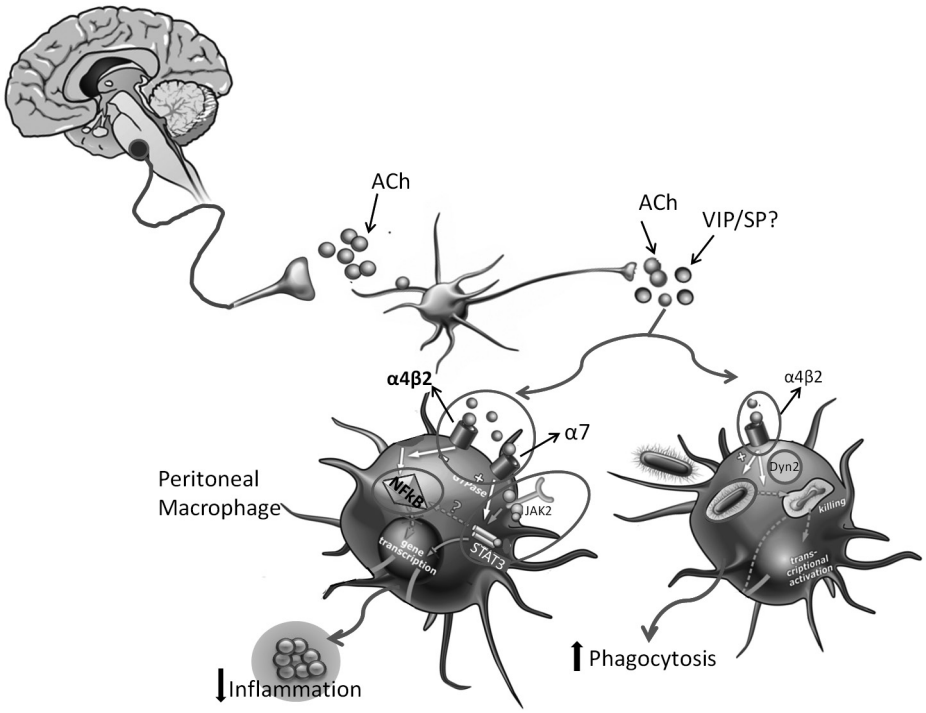
effect van nervus vagus stimulatie in de darm exclusief rust op verminderde cytokine productie door macrofagen. Mogelijk beïnvloedt de nervus vagus ook andere belangrijke macrofaag functies. In **hoofdstuk 5**, hebben we het effect van nAChR activatie op endo- en fagocytose van peritoneale en mucosale macrofagen bestudeerd. Het bleek dat nAChR activatie endocytose en fagocytose in intestinale en peritoneale macrofagen stimuleert. Dit effect werd teweeggebracht door rekrutering van dynamin-2[21] naar de 'fagocyterende cup'. De anti-inflammatoire effecten van nAChR activatie werden eerder toegeschreven aan nAChR α7 activatie[9]. Wij hebben duidelijk laten zien dat de toegenomen fagocytose door cholinerge agonisten via de nAChR α4β2 verliep, en niet via α7. Ondanks deze toename in fagocytose, reduceerde acetylcholine NF-kB activatie en pro-inflammatoire cytokine productie, terwijl de productie van het anti-inflammatoire IL-10 toenam. *In vivo*, leidde nervus vagus stimulatie tot verhoogde opname van luminale antigenen door intestinale fagocyten. Hierbij leidde nAChR activatie in darm weefsel tot een verhoogde passage van luminale bacteriën over de mucosa en een verhoogde drainage van luminale bacteriën. Concluderend wordt in hoofdstuk 5 aangetoond dat acetylcholine een tweeledig effect heeft in macrofagen, het stimuleert fagocytose via nAChR α4β2 activatie, terwijl het NF-kB activatie en productie van ontstekingsmediatoren remt. Op die manier draagt nervus vagus stimulatie bij aan de surveillance in het intestinale en peritoneale compartiment.

Modulatie van immuun cellen door de nervus vagus *in vivo*

In **hoofdstuk 6**, hebben we geprobeerd te analyseren hoe nervus vagus activiteit immuun cellen *in vivo* kan beïnvloeden. Wij onderzochten of nervus vagus activiteit de immuunreactie mogelijk niet alleen via de uitscheiding van acetylcholine remt, maar misschien ook via alternatieve neurotransmitters zoals neuropeptides. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) en substance P (SP) zijn neuropeptides die uitgebreid tot expressie komen in de darm en zij hebben belangijke immuunmodulerende functies. Stimulatie van de nervus vagus veranderde de expressie van VIP en SP in darm weefsel van muizen . *In vitro*, leidde het tegelijkertijd toedienen van Ach en VIP tot een verlaagde LPS-geinduceerde TNF productie, bijna tot aan ongestimuleerde waarden. SP verhoogde NF-kB transcriptionele activiteit en TNF productie in macrofagen, maar wanneer SP en Ach tegelijk werden toegediend, neutraliseerde nicotine de pro-inflammatoire effecten van SP. Deze immunomodulerende effecten van acetylcholine, nicotine, VIP en SP waren onafhankelijk van calcium signalering. Samenvattend hebben we in hoofdstuk 6 aangetoond dat nervus vagus stimulatie VIP en SP expressie in de darm verandert, terwijl cholinerge agonisten *in vitro* de immunomodulerende acties van VIP en SP beïnvloeden. Deze data wekken de suggestie dat het anti-inflammatoire effect van de nervus vagus in de darm versterkt zou kunnen worden door gelijktijdig vrijkomende neuropeptiden.

De bevinding dat nicotine activatie van immuun cellen remt, samen met de observatie dat nervus vagus activiteit ziekte tegengaat in verschillende diermodellen, impliceert dat therapeutische middelen die de op de 'cholinergic anti-inflammatoire pathway' aangrijpen, bruikbaar zouden kunnen zijn in mensen. Desalniettemin hebben klinische trials waarin nicotine als behandeling getest werd, verschillende uitkomsten laten zien[22]. Dit zou deels verklaard kunnen worden door de bevinding dat humane immuun cellen een gevarieerde nAChR expressie hebben, veroorzaakt door genetische of omgevingsfactoren[23, 24]. In **hoofdstuk 7**, hebben we onderzocht of roken of herhaaldelijk blootstelling aan nicotine de expressie van nAChR α7, dupα7 of β2 op humane monocyten kan veranderen. Wij demonstreerden dat herhaaldelijke nicotine blootstelling nAChR α7 expressie verhoogt in een humane monocyten cellijn. Tevens was nAChR α7 in een pilot studie alleen aantoonbaar op monocyten van rokers. Aan de andere kant werden cellen niet gevoeliger voor cholinerge immuunmodulatie door deze toegenomen nAChR α7 expressie.

Dit **samenvattend figuur** is een model van het mechanisme waarmee nervus vagus activiteit de functie van darm macrofagen beïnvloedt, zoals is gebleken uit de resultaten in dit proefschrift.



Efferente vezels van de nervus vagus, die ontspringen uit de hersenstam, scheiden acetylcholine uit als gevolg van fysiologische of electrische stimulatie. Stimulatie van de nervus vagus kan immuun cellen beïnvloeden via directe vrijstelling van acetylcholine of via post-ganglionaire mechanismen waarbij alternatieve

neurotransmitters betrokken zijn zoals VIP en SP. Acetylcholine bindt op nAChRs die tot expressie komen op immuun cellen zoals intestinale macrofagen. Acetylcholine heeft een tweeledig effect op macrofagen: aan de ene kant reduceert het de productie van pro-inflammatoire cytokines meest waarschijnlijk deels via nAChR α7 activatie, aan de andere kant stimuleert het fagocytose via activatie van de nAChR α4β2. Acetylcholine remt TNF prodcutie uiteindelijk via JAK2-STAT3 signalering. Uit onze studies blijkt dat het anti-inflammatoire effect van nAChR activatie meer afhankelijk is van STAT3 DNA binding en STAT3 eiwit, dan van STAT3 fosforylatie. De nAChR α4β2 afhankelijke toename in fagocytose wordt bewerkstelligd door recrutering van Dynamin-2 naar de 'fagocyterende cup'. Samenvattend laat dit figuur zien hoe nervus vagus stimulatie macrofagen naar een meer 'inactief' fenotype duwt, wat van nut kan zijn in ziektes die gekarakteriseerd worden door een ontregelde immuunreactie.

Therapeutische opties en toekomstperspectieven.

Resultaten uit veel *in vitro* en *in vivo* onstekingsmodellen impliceren dat therapeutische middelen die op de 'cholinerge anti-inflammatoire pathway' aangrijpen in de toekomst belangrijk zouden kunnen zijn bij de behandeling van immuunziekten. *In vivo* kan cholinerge activiteit op meerdere manieren worden verkregen. De meest bekende, maar niet de meest selectieve manier, is door het roken van sigaretten. In inflammatoire darmziekten is roken een belangrijke omgevingsfactor, het heeft echter verschillende effecten in colitis ulcerosa en in de ziekte van Crohn. Terwijl roken het risico op het ontwikkelen van de ziekte van Crohn verhoogt, lijkt het een beschermend effect te hebben in de ontwikkeling van colitis ulcerosa en het vermindert de ernst van de ziekte[25]. Desalniettemin hebben klinische trials naar nicotine als behandeling van colitis ulcerosa geen significant voordeel aangetoond vergeleken met standaard therapie, terwijl nicotine wel meer bijwerkingen gaf[22]. Juist om deze reden is het een uitdaging om een specifieke nAChR agonist te ontwikkelen met de sterkste anti-inflammatoire effecten en de minste bijwerkingen. Gedeeltelijk selectieve nAChR α7 en α4β2 agonisten zijn al getest in patiënten met neuronale aandoeningen[26]. De best gekarakteriseerde nAChR agonist GTS-21, een partiële α7 agonist die ook werkt op de α4β2 nAChR[27], wordt goed getolereerd in mensen. *In vitro*, bleek deze agonist de productie van pro-inflammatoire cytokines door immuun cellen van muizen en mensen te verminderen[28, 29]. In een recente studie naar de effecten van GTS-21 op de afweerreactie tijdens endotoxemie in 14 niet-rokende vrijwilligers, werden geen verschillen gevonden in de cytokine respons tussen de GTS-21 en placebo groep[30].

Om werkzame nAChR agonisten te ontwikkelen, is exacte kennis nodig over welke nAChRs betrokken zijn bij het cholinerge anti-inflammatoire effect. Deze effecten zijn eerder alleen toegeschreven aan activatie van de nAChR α7[9]. Desondanks was de nAChR α7 niet aanwezig op monocyten van niet rokende vrijwilligers (hoofdstuk 7) en tevens slaagden wij er niet in om α7 nAChR transcript in bepaalde muis

macrofagen aan te tonen (hoofdstuk 5). Verdere analyse van nAChR α7 eiwit in deze macrofagen wordt belemmerd door het feit dat commercieel verkrijgbare α7 antibodies niet specifiek blijken te zijn, omdat deze niet alleen een band aankleuren in brein homogenaten van wildtypes maar ook in brein van α7 nAChR Knock-out (KO) muizen[31]. Hierbij komt dat nicotine zowel in wildtype, als in α7 KO muizen TNF productie reduceerde (hoofdstuk 5). Deze observaties impliceren dat de effecten van acetylcholine en nicotine op peritoneale macrofagen niet exclusief moeten worden toegeschreven aan nAChR α7 activatie, maar mogelijk ook aan andere nAChR subtypes. Daarom kan het gebruik van selectieve agonisten voor andere nAChR subunits dan de α7 subunit succesvol zijn, met name agonisten voor de nAChR α4β2, het receptor subtype dat essentieel blijkt te zijn voor activatie van fagocytose. Naast het gebruik van specifieke cholinerge agonisten zou nervus vagus stimulatie zelf een potentiële therapeutische behandeling kunnen zijn bij ontstekingsziekten. In patiënten met therapieresistente epilepsie en depressie, wordt nervus nagus stimulatie al gebruikt als nieuwe adjuvante therapie. Daarnaast is gebleken dat vette voeding het parasympathische zenuwstelsel kan activeren.

De bevinding dat nicotine activiteit van immuun cellen remt, samen met de observatie dat nervus vagus stimulatie of specifieke nAChR agonisten ziekte in meerdere inflammatoire diermodellen tegengaan, impliceert dat therapeutische behandelingen die zich richten op cholinerge signalering, voordelig kunnen zijn in mensen. Toch moet men in gedachten houden dat het ontwikkelen van medicijnen die aangrijpen op de 'cholinerge anti-inflammatoire pathway' gecompliceerd kan zijn, omdat er in mensen individuele verschillen kunnen zijn in de reactie op deze middelen.

Samenvattend, hebben we in dit proefschrift het werkingsmechansime van de 'cholinerge anti-inflammatoire pathway' verder geïdentificeerd. Onze data kunnen nieuwe aangrijpingspunten bieden voor de ontwikkeling van toekomstige medicijnen tegen de behandeling van darmontstekingen, zoals colitis ulcerosa.

REFERENCE LIST

1. 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.
2. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Susarla S, Czura CJ, Tracey KJ. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. J Vasc Surg 2002;36:1231-1236.
3. 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.
4. van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno MJ, de Vos AF, Tracey KJ, van der PT. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. J Infect Dis 2005;191:2138-2148.
5. Ghia JE, Blennerhassett P, Kumar-Ondiveeran H, Verdu EF, Collins SM. The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. Gastroenterology 2006;131:1122-1130.
6. van Maanen MA, Lebre MC, van der Poll T, Larosa GJ, Elbaum D, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice. Arthritis Rheum 2009;60:114-122.
7. Altschuler SM, Ferenci DA, Lynn RB, Miselis RR. Representation of the cecum in the lateral dorsal motor nucleus of the vagus nerve and commissural subnucleus of the nucleus tractus solitarii in rat. J Comp Neurol 1991;304:261-274.
8. Altschuler SM, Escardo J, Lynn RB, Miselis RR. The central organization of the vagus nerve innervating the colon of the rat. Gastroenterology 1993;104:502-509.
9. 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.
10. Pavlov VA, Ochani M, Yang LH, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Lin X, Levi J, Parrish WR, Rosas-Ballina M, Czura CJ, Larosa GJ, Miller EJ, Tracey KJ, Al Abed Y. Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. Crit Care Med 2007;35:1139-1144.
11. Parrish WR, Rosas-Ballina M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani M, Ochani K, Yang LH, Hudson L, Lin X, Patel N, Johnson SM, Chavan S, Goldstein RS, Czura CJ, Miller EJ, Al Abed Y, Tracey KJ, Pavlov VA. Modulation of TNF release by choline requires alpha7 subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. Mol Med 2008;14:567-574.
12. De Jonge WJ, Ulloa L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. Br J Pharmacol 2007;151:915-929.
13. 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.
14. Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. Immunity 1999;10:39-49.
15. Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? J Clin Invest 2002;109:1143-1148.
16. Prasad M, Matthews JB. Deflating postoperative ileus. Gastroenterology 1999;117:489-492.
17. De Jonge WJ, van den Wijngaard RM, The FO, ter Beek ML, Bennink RJ, Tytgat GN, Buijs RM, Reitsma PH, van Deventer SJ, Boeckxstaens GE. Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. Gastroenterology 2003;125:1137-1147.

18. Yu Z, Zhang W, Kone BC. Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappaB. Biochem J 2002;367:97-105.

19. de Koning JP, Soede-Bobok AA, Ward AC, Schelen AM, Antonissen C, van Leeuwen D, Lowenberg B, Touw IP. STAT3-mediated differentiation and survival and of myeloid cells in response to granulocyte colony-stimulating factor: role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). Oncogene 2000;19:3290-3298.

20. Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. Genes Dev 2007;21:1396-1408.

21. Gold ES, Underhill DM, Morrissette NS, Guo J, McNiven MA, Aderem A. Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. J Exp Med 1999;190:1849-1856.

22. McGrath J, McDonald JW, Macdonald JK. Transdermal nicotine for induction of remission in ulcerative colitis. Cochrane Database Syst Rev 2004;CD004722.

23. Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, Moriwaki Y, Misawa H. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. Life Sci 2007.

24. Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, Yamada S, Ando T, Kazuko F, Kawashima K. Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. Neurosci Lett 1999;266:17-20.

25. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? World J Gastroenterol 2007;13:6134-6139.

26. Cincotta SL, Yorek MS, Moschak TM, Lewis SR, Rodefer JS. Selective nicotinic acetylcholine receptor agonists: potential therapies for neuropsychiatric disorders with cognitive dysfunction. Curr Opin Investig Drugs 2008;9:47-56.

27. Kitagawa H, Takenouchi T, Azuma R, Wesnes KA, Kramer WG, Clody DE, Burnett AL. Safety, pharmacokinetics, and effects on cognitive function of multiple doses of GTS-21 in healthy, male volunteers. Neuropsychopharmacology 2003;28:542-551.

28. Giebelen IA, van Westerloo DJ, Larosa GJ, de Vos AF, van der PT. Local stimulation of alpha7 cholinergic receptors inhibits LPS-induced TNF-alpha release in the mouse lung. Shock 2007;28:700-703.

29. Kox M, van Velzen JF, Pompe JC, Hoedemaekers CW, van der Hoeven JG, Pickkers P. GTS-21 inhibits pro-inflammatory cytokine release independent of the Toll-like receptor stimulated via a transcriptional mechanism involving JAK2 activation. Biochem Pharmacol 2009.

30. Kox M, Pompe JC, Gordinou de Gouberville MC, van der Hoeven JG, Hoedemaekers CW, Pickkers P. Effects of the alphaalpha7nAChR Agonist GTS-21 on the Innate Immune Response in Humans. Shock 2011.

31. Moser N, Mechawar N, Jones I, Gochberg-Sarver A, Orr-Urtreger A, Plomann M, Salas R, Molles B, Marubio L, Roth U, Maskos U, Winzer-Serhan U, Bourgeois JP, Le Sourd AM, De BM, Schroder H, Lindstrom J, Maelicke A, Changeux JP, Wevers A. Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures. J Neurochem 2007;102:479-492.