

Función antiinflamatoria y antioxidante del ácido ursólico en la pancreatitis aguda inducida por ceruleína en ratas

Ahmet Türkoğlu,^{1*} İbrahim İbiloğlu,² İbrahim Kaplan,³ Serkan Arslan,⁴ İbrahim Halil-Öcal⁵ y Metehan Gümüş⁶

¹Universidad Rumeli; ²Departamento de Patología, Universidad Dicle; ³Departamento de Bioquímica, Universidad Dicle; ⁴Departamento de Cirugía Pediátrica, Universidad Dicle; ⁵Hospital de Formación e Investigación de Adiyaman; ⁶Hospital Reyap de Estambul. Estambul, Turquía

Resumen

Antecedentes: El ácido ursólico se encuentra en numerosas plantas y se ha informado que tiene efectos antiproteasas, antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos, nefroprotectores, hepatoprotectores y cardioprotectores. **Objetivo:** Este estudio tuvo como objetivo investigar los efectos del ácido ursólico en la pancreatitis aguda inducida por ceruleína. **Material y métodos:** Treinta y dos ratas albinas Wistar fueron asignadas aleatoriamente a cuatro grupos iguales: grupo simulado, grupo de pancreatitis aguda, grupo de tratamiento y grupo de ácido ursólico. **Resultados:** Los niveles de amilasa sérica en los grupos de pancreatitis aguda y de tratamiento fueron significativamente más altos que en los otros grupos ($p < 0.05$). Además, los niveles séricos de IL-1 β , IL-6 y TNF- α fueron significativamente más altos en el grupo de pancreatitis aguda en comparación con el grupo de tratamiento. Aunque la actividad oxidante total del tejido pancreático en ambos grupos fue similar, la capacidad antioxidante total del tejido pancreático en el grupo de tratamiento fue significativamente mayor. **Conclusión:** Se observó que el ácido ursólico reduce el daño al páncreas y órganos remotos en la pancreatitis aguda, al igual que el estrés oxidativo.

PALABRAS CLAVE: Ácido ursólico. Actividad oxidante total. Capacidad antioxidante total. Ceruleína. Pancreatitis aguda.

Anti-inflammatory and anti-oxidant role of ursolic acid in cerulein-induced acute pancreatitis in rats

Abstract

Background: Ursolic acid (UA) is found in many plants, and has been reported to have anti-protease, antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, nephroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. **Objective:** The purpose of this study was to investigate the effects of ursolic acid in cerulein-induced acute pancreatitis (AP). **Materials and methods:** Thirty-two Wistar albino rats were randomly assigned to 4 equal groups: Sham, acute pancreatitis, treatment, and ursolic acid group. **Results:** Serum amylase levels in the AP and treatment groups were significantly higher than in the others ($p < 0.05$). In addition, serum IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels were significantly higher in the AP group in comparison with the treatment group. Although pancreatic tissue total oxidant activity in the AP and treatment groups was similar, pancreatic tissue total antioxidant capacity was significantly higher in the treatment group than in the AP group. **Conclusions:** Damage to the pancreas and remote organs in AP was observed to be reduced by UA. In addition, oxidative stress was observed to be decreased by the effect of UA.

KEYWORDS: Ursolic acid. Total oxidant activity. Total antioxidant capacity. Cerulein. Acute pancreatitis.

*Correspondencia:

Ahmet Türkoğlu

E-mail: ahmetturkoglu04@gmail.com

0016-3813/© 2023 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fecha de recepción: 16-05-2023

Fecha de aceptación: 17-07-2023

DOI: 10.24875/GMM.M23000782

Gac Med Mex. 2023;159:345-351

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

Antecedentes

La mortalidad en pacientes con pancreatitis aguda (PA) es elevada debido a falla multiorgánica y sepsis. Por lo tanto, en los últimos años se han publicado numerosos estudios experimentales centrados en el estrés oxidativo y las citoquinas que se piensa que desempeñan un papel en la fisiopatología de la enfermedad.^{1,2}

Las especies de radicales libres producidas durante el metabolismo normal en el cuerpo o por varios factores externos pueden afectar los componentes intracelulares y extracelulares al dañar las funciones celulares. Las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno se producen en el cuerpo y causan daños significativos.³ En el estado fisiológico normal existe un equilibrio entre la producción de estas especies y las concentraciones tisulares de antioxidantes en el organismo.^{3,4} Los estados antioxidant y oxidante totales están relacionados con este equilibrio. Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno no solo tienen efectos tóxicos, sino también efectos beneficiosos sobre la función inmunitaria y las respuestas celulares. De igual forma tienen un papel importante en la patogénesis de la PA y están asociadas a su gravedad.^{5,6}

El ácido ursólico (AU) es un triterpenoide tipo ursano que se encuentra en numerosas plantas como *Sambucus chinensis*, *Glechoma hederacea*, *Eriobotrya japonica* y *Pyrola rotundifolia*; cada vez se está empleando más para el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos médicos debido a sus diferentes efectos farmacológicos.⁷ Se cree que muchos de los agentes propuestos en estudios experimentales acerca del tratamiento de la PA actúan por sus propiedades antioxidant y antiinflamatorias.^{1,2} El AU ha demostrado ser un potente agente antioxidant y antiinflamatorio en numerosas investigaciones.⁸⁻¹⁰ Sin embargo, también puede ser beneficioso para el tratamiento de diversas condiciones asociadas a la PA como hiperglucemia, hiperlipidemia, infecciones bacterianas y virales y dolor severo debido a sus efectos antiproteasa, antimicrobianos, hipolipidémicos, hipoglucemiantes, analgésicos y protectores en varios órganos.⁷⁻¹² Se ha informado que el AU ejerce sus efectos antiinflamatorios y analgésicos a través de la inhibición de la interleucina 1β (IL-1β), la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral α (TNF-α), NFκB, iNOS y COX-2.⁸⁻¹³ Estos efectos son muy importantes en la prevención del daño orgánico en la PA.^{1,2}

El presente estudio se realizó para investigar los efectos del ácido ursólico en la PA inducida por ceruleína.

Material y métodos

El estudio fue aprobado por el Comité Local de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad Dicle. En el estudio se utilizaron 32 ratas Wistar albinas, cada una con un peso de 200 a 250 g, las cuales se mantuvieron en ambientes alternados de 12 horas de luz y oscuridad en jaulas separadas y consumieron una dieta estándar para ratas. Las ratas permanecieron en ayuno 12 horas antes del estudio y solo se les permitió beber agua; se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos iguales:

- Grupo 1 (grupo simulado): ratas a las que se les administró solución salina mediante inyección intraperitoneal cada hora, seis veces en total.
- Grupo 2 (grupo de PA): a las ratas se les inyectó una dosis de 50 µg/kg de ceruleína cada hora por vía intraperitoneal, seis veces en total.¹⁴ Tres horas más tarde recibieron una inyección intraperitoneal de solución salina.
- Grupo 3 (grupo de tratamiento): tres horas después de la última inyección intraperitoneal de ceruleína igual que el grupo 2, a las ratas se les inyectó por vía intraperitoneal 10 mg/kg de ácido ursólico disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO).
- Grupo 4 (grupo de AU): a las ratas se les inyectó por vía intraperitoneal 10 mg/kg de ácido ursólico disuelto en DMSO.

Doce horas después de la última inyección de ceruleína, se aplicó anestesia y se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca. Posteriormente las ratas fueron sacrificadas y se tomaron muestras de tejido.

Todos los animales fueron anestesiados con 50 mg/kg de clorhidrato de ketamina intramuscular (Ketalar®, Pfizer, Estambul) y 5 mg/kg de clorhidrato de xilacina (Rompon®, Bayer, Şişli, Estambul) en condiciones asépticas. Una vez aplicada la anestesia y colocados los animales en decúbito supino, se procedió al rasurado de la pared anterior del abdomen y antisepsia con povidona iodada, luego se abrió el abdomen y se tomaron muestras de tejidos pancreático, hepático y pulmonar.

Análisis bioquímico

Las muestras de sangre obtenidas para el análisis bioquímico se almacenaron en hielo y se enviaron al

laboratorio correspondiente inmediatamente después de la punción cardíaca. Se centrifugaron a 3000 rpm durante tres minutos para separar las muestras de suero y se almacenaron congeladas a -80 °C para el análisis de amilasa sérica, IL-1 β , IL-6, capacidad antioxidante total (CAT), actividad oxidante total (AOT) y TNF- α .

Medición de la capacidad antioxidante total

La CAT de las muestras de suero se determinó mediante un método de medición automatizado desarrollado por Erel.¹⁵ Se midió con un kit comercial de prueba del estado antioxidante total (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Turquía). El ensayo se calibró con una solución estándar antioxidante estable. Los resultados se expresaron en equivalente milimolar de Trolox/L.

Medición de la actividad oxidante total

Para medir la AOT se utilizó un kit comercial (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Turquía). El ensayo se calibró con peróxido de hidrógeno y los resultados se expresaron en equivalente micromolar de peróxido de hidrógeno/L.¹⁶

Medición de IL-6, IL1- β y TNF- α

IL-6 (kit IL-6-EASIA, DIAsource), IL-1 β (kit IL1- β , DIAsource) y TNF- α (kit TNF- α -EASIA, DIAsource) se estudiaron mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (método ELISA).¹⁷

Evaluación histopatológica

Las muestras de tejido de páncreas, hígado y pulmón obtenidas para el examen patológico se fijaron en recipientes que contenían formol tamponado a 10 %. Se siguieron los métodos clásicos de laboratorio y las muestras se incluyeron en bloques de parafina y se tomaron secciones con un espesor de 5 μ m en el portaobjetos. Se tiñeron con hematoxilina-eosina y fueron examinadas con microscopio óptico. Los hallazgos histopatológicos fueron evaluados por un patólogo que desconoció la distribución de los grupos.

Las secciones de páncreas fueron evaluadas por edema, hemorragia, grado de inflamación y necrosis

de células acinares. Los criterios definidos por Schmidt *et al.* se utilizaron para clasificar la lesión pancreática.¹⁸ En la evaluación de la lesión pulmonar se utilizó la siguiente puntuación: 0 a 7, fibrosis; 0 a 3, inflamación; 0 a 2, hemorragia. El daño hepático se evaluó por hipereosinofilia citoplasmática, picnosis nuclear, vacuolización citoplasmática, sangrado, infiltración de neutrófilos, necrosis con desintegración de los cordones hepáticos y pérdida de los bordes intercelulares, con una puntuación de 0 a 3.^{19,20}

Análisis estadístico

Los valores obtenidos durante el estudio se analizaron utilizando el programa informático SPSS (Statistical Program for Social Science, Chicago, Illinois, Estados Unidos). Las comparaciones entre todos los grupos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones binarias mediante la prueba U de Mann-Whitney. En todos los análisis se determinó $p < 0.05$ para indicar la significación estadística.

Resultados

Los niveles de amilasa sérica en los grupos de PA y tratamiento fueron significativamente más altos que en los demás ($p < 0.05$). Además, los niveles séricos de IL-1 β , IL-6 y TNF- α fueron significativamente más altos en el grupo de PA en comparación con el grupo de tratamiento (Figura 1). Los resultados de los análisis bioquímicos de los grupos se muestran en la Tabla 1.

Aunque los niveles de AOT en plasma fueron similares en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de PA, los niveles de la CAT en plasma fueron significativamente más bajos en el primero. Se detectaron valores más bajos de AOT y más altos de CAT en el tejido pulmonar del grupo de tratamiento. Aunque la AOT del tejido pancreático en los grupos de PA y tratamiento fueron similares, la CAT del tejido pancreático en el grupo de tratamiento fue significativamente mayor que en el grupo de PA (Tabla 2).

Evaluación histopatológica

En el grupo de PA se observó evidente necrosis de células acinares e infiltración de células inflamatorias en el tejido pancreático y en el grupo de tratamiento, menos necrosis e inflamación de células acinares

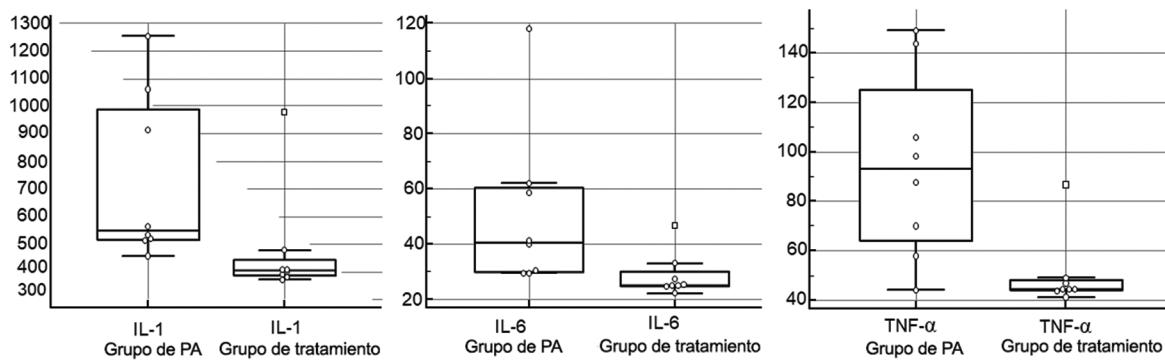


Figura 1. Comparación de los niveles de $IL-1\beta$, $IL-6$ y $TNF-\alpha$ entre los grupos de PA y de tratamiento. PA: pancreatitis aguda.

Tabla 1. Resultados bioquímicos de los grupos

Parámetro	Grupos				<i>p</i>
	Simulado	Pancreatitis aguda	Tratamiento	AU	
Niveles de amilasa sérica	719.00 (573.00-784.00)	1747.50 (1443.00-3010.00)	989.50 (615.00-1336.00)	645.50 (578.00-682.00)	0.000126
$TNF-\alpha$	46.97 (41.01-51.87)	92.89 (43.93-148.99)	44.23 (41.08-86.36)	45.28 (42.39-47.88)	0.006354
$IL-1\beta$	446.05 (369.09-493.88)	549.05 (456.56-1252.54)	404.36 (371.87-977.29)	417.98 (392.40-470.97)	0.002118
$IL-6$	24.92 (21.45-30.64)	40.554 (29.32-117.83)	25.169 (22.17-46.646)	26.623 (23.63-30.73)	0.005459
CAT	0.85 (0.76-0.90)	0.81 (0.67-1.46)	0.61 (0.39-1.25)	0.78 (0.69-0.88)	0.010493
AOT	553.64 (304.55-940.91)	1123.07 (547.05-3484.09)	837.72 (106.59-3447.95)	618.63 (421.36-1490.68)	0.190816

AOT: actividad oxidante total; AU: ácido ursólico; CAT: capacidad antioxidante total.

(Figuras 2A y 2B). En el tejido pulmonar se observó inflamación severa y fibrosis en el grupo de PA; la inflamación se redujo dependiendo del uso de AU en el grupo de tratamiento. Se observó daño hepático caracterizado por vacuolización citoplasmática significativa en el grupo de PA, si bien se observó curación del tejido hepático en el grupo de tratamiento (Figuras 2C y 2D). Las puntuaciones histopatológicas de los grupos se muestran en la Tabla 3.

Discusión

Los niveles de amilasa en suero y la evaluación histopatológica en nuestro modelo experimental, tanto en el grupo de PA como en el grupo de tratamiento, indicaron que la inducción de pancreatitis aguda se logró mediante la inyección de ceruleína.

El tratamiento actual de la PA implica atención de apoyo que incluye reposición de líquidos, control del dolor y prevención de infecciones. Por otro lado, actualmente no existe un tratamiento específico. En este contexto, se han utilizado experimentalmente algunos fármacos, entre ellos sustancias antiinflamatorias y antioxidantes para curar daños en el páncreas y órganos remotos. La gravedad de la PA está relacionada con el grado de respuesta inflamatoria sistémica, así como con las quimiocinas y las citocinas responsables de la progresión de la inflamación.²¹

La disfunción orgánica es una causa importante de morbilidad y mortalidad en los pacientes con PA. Se cree que la respuesta inflamatoria generalizada inapropiada y la tormenta de citocinas pueden provocar una disfunción multiorgánica. Inicialmente, los mediadores circulantes causan lesión del endotelio en los

Tabla 2. Resultados bioquímicos tisulares

Parámetro	Grupos				p
	Simulado	Pancreatitis aguda	Tratamiento	Ácido ursólico	
CAT pulmonar	0.394 (0.18-0.63)	0.142 (0.053-0.263)	0.231 (-0.1400-0.737)	0.656 (0.2786-1.360)	< 0.005
CAT del páncreas	0.254 (0.124-0.345)	No disponible	0.163 (0.023-0.55)	0.418 (0.358-1.225)	> 0.005
AOT pulmonar	762.07 (319.31-1178.12)	769.03 (297.67-2199.59)	468.51 (254.27-1025.00)	1435.63 (42.35-3176.98)	> 0.005
AOT del páncreas	654.511 (132.41-2259.71)	1369.66 (182.24-2477.68)	1468.14 (671.25-2691.76)	1688.07 (294.60-22259.71)	> 0.005

AOT: actividad oxidante total; AU: ácido ursólico; CAT: capacidad antioxidante total.

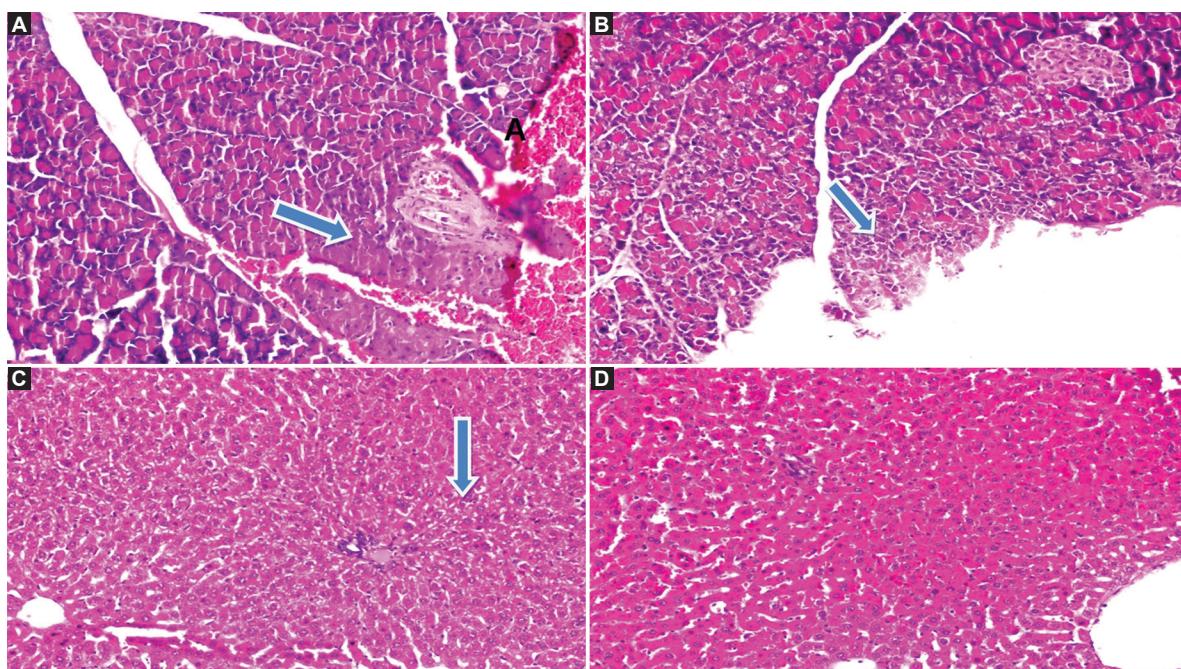


Figura 2. Exámenes histopatológicos de tejidos. A: necrosis de células acinares en tejido pancreático (pancreatitis). B: necrosis de células acinares en un pequeño número de células en tejido pancreático, grupo de tratamiento. C: en el grupo de pancreatitis se observa daño hepático caracterizado por vacuolización citoplasmática prominente en el tejido hepático. D: se observa cicatrización en tejido hepático (hematoxilina-eosina, 100×).

órganos y, posteriormente, la sobreexpresión de citoquinas en el espacio intersticial de varios órganos se considera el mecanismo principal de lesión del parénquima.²² Por lo anterior, se han estudiado diversas sustancias con el objetivo de mejorar la PA mediante la reducción de los mediadores inflamatorios. Se ha informado que la mayoría de estos fármacos actúa mediante la reducción de una o más citoquinas como IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Aunque se ha encontrado que algunos de estos medicamentos son efectivos, algunos no lo son.²³⁻²⁶

Por otro lado, se ha demostrado que el óxido nítrico y otros radicales libres participan en el agravamiento de la lesión oxidativa y pueden desempeñar un papel importante en la patogenia de la PA y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, el cual cuando es persistente se asocia a daño orgánico y muerte en pacientes con PA.²⁷

Se ha demostrado que el AU reduce los niveles de las citocinas, incluidas IL-1 β , IL-6 y TNF- α . El AU también reduce el estrés oxidativo al mejorar la actividad de la superóxido dismutasa y aumentar la eliminación

Tabla 3. Puntuaciones histológicas tisulares de los grupos

Tejidos	Grupos				p
	Simulado	PA	PA + AU	AU	
Páncreas	0 (0-0)	6 (2-9)	4 (2-5)	0 (0-1)	0.000006
Pulmón	0 (0-1)	5.5 (3-9)	1 (0-2)	0 (0-0)	0.000036
Hígado	0 (0-0)	1.5 (0-2)	0.5 (0-1)	0 (0-0)	0.000195

PA: pancreatitis aguda; AU: ácido ursólico.

de radicales libres oxidativos.^{28,29} En nuestro estudio, el AU mostró efectos antiinflamatorios al reducir los niveles de IL-1β, IL-6 y TNF-α; asimismo, mostró actividad antioxidante en sangre, páncreas y órganos remotos.

Los hallazgos histopatológicos mostraron acuñada necrosis de células acinares e infiltración de células inflamatorias en el tejido pancreático del grupo de PA. Por otro lado, encontramos que el tratamiento con AU redujo la necrosis de las células acinares y la inflamación en el tejido pancreático. De forma similar, se observaron diversos grados de curación en los tejidos del pulmón y el hígado según el uso de AU.

Durante mucho tiempo se ha discutido el papel de las antiproteasas en el tratamiento de la PA. En la patogenia de la PA se cree que el tripsinógeno se activa de manera inapropiada al convertirse en tripsina, la cual desempeña un papel importante en el inicio y progresión de la pancreatitis al activar los zimógenos pancreáticos debido a la falta de eliminación rápida de la tripsina activa en el páncreas.

La activación de las enzimas digestivas lleva a daño pancreático y da como resultado una respuesta inflamatoria. Por lo tanto, se ha planteado el uso de tratamiento antiproteasa, cuyo uso rutinario si bien no se recomienda en la PA, en algunos estudios se ha informado que previene la elevación de las enzimas pancreáticas, el dolor abdominal y el desarrollo de pancreatitis en pacientes sometidos a colangiopancreatografía retrógrada endoscópica.

Por otra parte, se ha propuesto la infusión arterial intravenosa o regional de antiproteasas en la PA grave para prevenir la progresión de la enfermedad.^{30,31} Creemos que, además de otros efectos, el potente efecto antiproteasas de la AU también debería evaluarse en el tratamiento de la PA.

Aún no se ha realizado ningún estudio sobre los efectos del AU en la PA, sin embargo, su efecto sobre la lipasa pancreática humana *in vivo* fue investigado

por Hyspler *et al.*,³² quienes identificaron efectos inhibidores del AU sobre la lipasa pancreática y sugirieron que la cáscara de manzana micronizada podría ser un suplemento adecuado para pacientes con obesidad o diabetes que requieren un inhibidor de la absorción de lípidos. En nuestro estudio analizamos los niveles de amilasa, no de la lipasa pancreática.

La principal limitación de nuestro análisis es que no se compararon diferentes dosis de AU; sería apropiado diseñar una investigación diferente al respecto. Además, pensamos que el efecto del AU sobre la pancreatitis necrosante o grave debería investigarse específicamente. Otra limitación se refiere a los efectos del DMSO sobre los niveles de amilasa, IL-1β, IL-6, CAT, AOT y TNF-α. El DMSO se ha utilizado como disolvente en numerosos estudios. Dado que sus efectos sobre los parámetros estudiados fueron mínimos, se ignoraron. En nuestro análisis no se midieron los efectos de DMSO en estos parámetros; sin embargo, se ha demostrado que el DMSO no altera los niveles de TNF, IL-6 CAT, AOT o amilasa, pero puede elevar los niveles de IL-1β.^{33,34}

Como resultado, en nuestro modelo de pancreatitis experimental observamos que el AU redujo el daño en el páncreas y órganos remotos en la pancreatitis aguda. Además, bioquímicamente observamos que el estrés oxidativo disminuyó por efecto del AU.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dirección de DUBAP (Proyectos de Investigación Científica de la Universidad de Dicle) por el apoyo financiero.

Financiamiento

Se recibió el financiamiento para el proyecto DUBAP 2013/07.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Responsabilidades éticas

Protección de sujetos humanos y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos estuvieron de acuerdo con las normas del comité de ética de investigación clínica correspondiente y con

las del Código de Ética de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki).

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores obtuvieron la aprobación del comité de ética para el análisis y la publicación de los datos clínicos adquiridos de forma rutinaria y no se requirió el consentimiento informado para este estudio observacional retrospectivo.

Uso de inteligencia artificial para la generación de texto. Los autores declaran que no utilizaron ningún tipo de inteligencia artificial generativa para la redacción de este manuscrito, ni para la creación de imágenes, gráficos, tablas o sus correspondientes leyendas.

Bibliografía

1. Büyükerber M, Savaş MC, Bağcı C, Koruk M, Gülsen MT, Tutar E, et al. The beneficial effect of propolis on cerulein-induced experimental acute pancreatitis in rats. *Turk J Gastroenterol.* 2009;20(2):122-8.
2. Wang L, Li Y, Ma Q, Liu Y, Rui YY, Xue P, et al. Chaiqin Chengqi Decoction decreases IL-6 levels in patients with acute pancreatitis. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2011;12(12):1034-40.
3. Cikman O, Soylemez O, Ozkan OF, Kiraz HA, Sayar I, Ademoglu S, et al. Antioxidant activity of syringic acid prevents oxidative stress in l-arginine-induced acute pancreatitis: an experimental study on rats. *Int Surg.* 2015;100(5):891-6.
4. Taysi S, Alguri FS, Mohammed ZR, Ali OA, Taysi ME. Thymoquinone: a review on its pharmacological importance, and its association with oxidative stress, COVID-19, and radiotherapy. *Mini Rev Med Chem.* 2022;22(14):1847-75.
5. Taysi S, Tascan AS, Ugur MG, Demir M. Radicals, oxidative/nitrosative stress and preeclampsia. *Mini Rev Med Chem.* 2019;19(3):178-93.
6. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89-96.
7. Ren D, Zuo R, González-Barrios AF, Bedzyk LA, Eldridge GR, Pasmore ME, et al. Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(7):4022-34.
8. Checker R, Sandur SK, Sharma D, Patwardhan RS, Jayakumar S, Kohli V, et al. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF-κB, AP-1 and NF-AT. *PLoS One.* 2012;7(2):e31318.
9. Liobikas J, Majiene D, Trumbeckaitė S, Kursvietiene L, Masteikova R, Kopustinskiene DM, et al. Uncoupling and antioxidant effects of ursolic acid in isolated rat heart mitochondria. *J Nat Prod.* 2011;74(7):1640-4.
10. Martin-Aragón S, de lasHeras B, Sanchez-Reus MI, Benedi J. Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolicacid on tetrachloride-induced liver damage in rat sand primary cultures of rat hepatocytes. *Exp Toxicol Pathol.* 2001;53(2-3):199-206.
11. Jedinák A, Mucková M, Kostálková D, Malíř T, Masterová I. Antiprotease and antimetastatic activity of ursolic acid isolated from *Salvia officinalis*. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2006;61(11-12):777-82.
12. Jung SH, Ha YJ, Shim EK, Choi SY, Jin JL, Yun-Choi HS, et al. Insulin-mimetic and insulin-sensitizing activities of a pentacyclic triterpenoid insulin receptor activator. *Biochem J.* 2007;403(2):243-50.
13. Chang CW, Chang WT, Liao JC, Chiu YJ, Hsieh MT, Peng WH, et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of methanol extract of *Cissus repens* in mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:135379.
14. Ulmasov B, Oshima K, Rodriguez MG, Cox RD, Neuschwander-Tetri BA. Differences in the degree of cerulein-induced chronic pancreatitis in C57BL/6 mouse substrains lead to new insights in identification of potential risk factors in the development of chronic pancreatitis. *Am J Pathol.* 2013;183(3):692-708.
15. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37(4):277-85.
16. Esen C, Alkan BA, Kirnap M, Akgul O, Isikoglu S, Erel O. The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index. *J Periodontol.* 2012;83(6):773-9.
17. Aydin Y, Kaplan İ, Bilen Y, Bulut Ç, Genç F, Türkyılmaz A, Eroğlu A. Plasma levels of IL-6 and TNF-α in patients with esophageal cancer. *Turk J Med Sci.* 2012;42(5):762-67.
18. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg.* 1992;215(1):44-56.
19. Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe H, et al. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int.* 2000;58(2):658-73.
20. Camargo CA Jr, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology.* 1997;26(6):1513-20.
21. Mofidi R, Duff MD, Wigmore SJ, Madhavan KK, Garden OJ, et al. Association between early systemic inflammatory response, severity of multiorgan dysfunction and death in acute pancreatitis. *Br J Surg.* 2006;93(6):738-44.
22. Wang H, Ma S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Emerg Med.* 2008;26(6):711-5.
23. Zhang DQ, Feng H, Chen WC. Effects of hydrogen-rich saline on taurocholate-induced acute pancreatitis in rat. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:731932.
24. Dur A, Kose H, Kocayigit A, Kocaman O, Ismayilova M, Sonmez FC. The anti-inflammatory and antioxidant effects of thymoquinone on ceruleine induced acute pancreatitis in rats. *Bratisl Lek Listy.* 2016;117(10):614-8.
25. Wang LZ, Luo MY, Zhang JS, Ge FG, Chen JL, Zheng CQ. Effect of ulinastatin on serum inflammatory factors in Asian patients with acute pancreatitis before and after treatment: a meta-analysis. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2016;54(11):8908.
26. Gulcubuk A, Haktanır D, Cakiris A, Ustek D, Guzel O, Erturk M, et al. The effects of resveratrol on tissue injury, oxidative damage, and pro-inflammatory cytokines in an experimental model of acute pancreatitis. *J Physiol Biochem.* 2014;70(2):397-406.
27. Que RS, Cao LP, Ding GP, Hu JA, Mao KJ, Wang GF. Correlation of nitric oxide and other free radicals with the severity of acute pancreatitis and complicated systemic inflammatory response syndrome. *Pancreas.* 2010;39(4):536-40.
28. Liu B, Piao X, Guo L, Liu S, Chai F, Gao L. Ursolic acid protects against ulcerative colitis via anti-inflammatory and antioxidant effects in mice. *Mol Med Rep.* 2016;13(6):4779-85.
29. Huang HC, Huang CY, Lin-Shiau SY, Lin JK. Ursolic acid inhibits IL-1beta or TNF-alpha-induced C6 glioma invasion through suppressing the association ZIP/p62 with PKC-zeta and downregulating the MMP-9 expression. *Mol Carcinog.* 2009;48(6):517-31.
30. Kitagawa M, Hayakawa T. Antiproteases in the treatment of acute pancreatitis. *JOP.* 2007;9(4):518-25.
31. Piaścik M, Rydzewska G, Milewski J, Olszewski S, Furmanek M, Walecki J, et al. The results of severe acute pancreatitis treatment with continuous regional arterial infusion of protease inhibitor and antibiotic: a randomized controlled study. *Pancreas.* 2010;39(6):863-7.
32. Hyspler R, Ticha A, Tomasova A, Zadak Z. The inhibition of pancreatic lipase by ursolic acid from natural source. *Clinical Nutrition.* 2018;9:37.
33. Xing L, Remick DG. Mechanisms of dimethyl sulfoxide augmentation of IL-1 beta production. *J Immunol.* 2005;174(10):6195-202.
34. Kurtoglu T, Durmaz S, Rahman ÖF, Kahraman Çetin N, Yilmaz M, Barbarus E, et al. Borate reduces experimental supra-ceeliac aortic clamping-induced oxidative stress in lung and kidney, but fails to prevent organ damage. *Turk Gogus Kalp Damar Cerrahisi Derg.* 2021;29(3):320-9.