

Lipopolisakkarit'in neden olduğu bağırsak toksisitesine karşı biyosentetik gümüş nanopartiküllerin etkisi

The effect of biosynthetic silver nanoparticles against intestinal toxicity caused by lipopolysaccharide

Fatma ÖZTÜRK-KÜP¹, Burçin KOÇAK², Ali Tuğrul AKIN¹, İsrail DOĞANYİĞİT², Aslı OKAN³, Emin KAYMAK³, Züleyha DOĞANYİĞİT³

ÖZET

Amaç: Nanopartiküller, sahip oldukları üstün fiziksel özellikleri nedeniyle biyoteknoloji, farmakoloji, tıp, sensörler, bilişim ve iletişim, elektronik, savunma, tekstil, makine ve inşaat sanayileri de dahil olmak üzere bir çok alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Biyolojik sentez yöntemleri toksik kimyasallar kullanılmadığından dolayı farmasötik ve diğer biyomedikal uygulamalar için çevre dostu özellikleri nedeniyle son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar ve bitki ekstraktları ile nanopartiküllerin biyolojik sentezi ile ilgili çalışmalar günümüzde hızla artmıştır. Bitki orijinli polifenolik bileşikler son zamanlarda çalışmalarda yoğun şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan bağırsak hasarı ve apoptozis üzerine üzüm çekirdeği ekstresi ile hazırlanan biyosentetik gümüş nanopartiküllerin etkisinin araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Çalışmada 80 adet Wistar albino türü yetişkin erkek sıçanlar; kontrol grubu, LPS uygulama grubu, üzüm çekirdeği ekstresi grubu, gümüş nanopartikül (AgNP) grubu, Ag iyonu grubu ve LPS+ Ag iyonu grubu, LPS+ AgNP grubu, LPS+ üzüm çekirdeği özütü grupları olmak üzere rastgele sekiz eşit gruba ayrıldı. Hayvanlardan alınan

ABSTRACT

Objective: Nanoparticles have been used in many fields including biotechnology, pharmacology, medicine, sensors, informatics and communications, electronics, defense, textile, machinery and construction industries due to their superior physical properties. Biological synthesis methods have been widely used in recent years due to their environmentally friendly properties for pharmaceutical and other biomedical applications since toxic chemicals are not used. Studies on the biological synthesis of microorganisms and plant extracts and nanoparticles have increased rapidly today. Plant origin polyphenolic compounds have been used extensively in recent studies. In this study, it was aimed to investigate the effect of biosynthetic silver nanoparticles prepared with grape seed extract on intestinal damage and apoptosis caused by lipopolysaccharide (LPS).

Methods: In the study, 80 rats of Wistar albino were male rats; control group, LPS group, grape seed extract group, silver nanoparticle (AgNP) group, Ag ion group and LPS + Ag ion group, LPS + AgNP group, LPS + grape seed extract groups were randomly divided into eight groups. Apoptotic cell counts were evaluated

¹Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kayseri

²Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri

³Yozgat Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yozgat



İletişim / Corresponding Author : Züleyha DOĞANYİĞİT

Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Erdoğan Akdağ Kampüsü 66100 Yozgat - Türkiye

E-posta / E-mail : zuleyha.doganyigit@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 11.02.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 26.03.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.52386

Öztürk-Küp F, Koçak B, Akın AT, Doğanyigit İ, Okan A, Kaymak E, Doğanyigit Z. Lipopolisakkarit'in neden olduğu bağırsak toksisitesine karşı biyosentetik gümüş nanopartiküllerin etkisi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 333-342

bağırsak dokularında histopatolojik değerlendirme ve TUNEL yöntemi ile apoptotik hücre sayıları değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmanın sonucunda LPS uygulamasının bağırsaklarda nekrotik villuslarda lümen dökülme, villuslarda dejeneratif değişiklikler ve kanamaya neden olduğu, Ag iyonu, üzüm çekirdeği özütü ve AgNP'lerin LPS ile birlikte uygulanması ile bu değişikliklerin hafiflediği görülmüştür. Ayrıca LPS apoptotik hücre sayısını da diğer gruplara göre anlamlı derecede artırmış ve Ag iyonu, üzüm çekirdeği ekstresi ve AgNP'lerin LPS ile birlikte uygulanması ise apoptotik hücre sayısı üzerine istatistiksel olarak olumlu etki göstermiştir.

Sonuç: Sonuç olarak biyosentetik AgNP'lerin LPS'nin neden olduğu toksisiteyi azaltacak potansiyele sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bu çalışma bundan sonraki çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: LPS, biyosentetik gümüş nanopartikül, üzüm çekirdeği ekstresi, bağırsak, TUNEL

by histopathological evaluation and TUNEL method in intestinal tissues from animals.

Results: As a result of the study, it has been observed that LPS application causes lumen pouring in necrotic villi in the intestines, degenerative changes and bleeding in villi, and these changes are alleviated with the application of Ag ion, grape seed extract and AgNPs together with LPS. In addition, LPS significantly increased the number of apoptotic cells compared to other groups, and the application of Ag ions, grape seed extract and AgNPs together with LPS showed a statistically positive effect.

Conclusion: As a result, It can be said that biosynthetic AgNPs have the potential to reduce the toxicity caused by LPS. This study will shed light on future studies.

Key Words: LPS, biosynthetic silver nanoparticle, grape seed extract, intestine, TUNEL

GİRİŞ

Nanoteknoloji, moleküler düzeydeki nanomateryallerin manipülasyonu ile ilgilenen ve fizik, kimya, biyoloji ve çeşitli mühendislik dallarıyla iç içe olan uygulamalı bir bilim dalıdır (1). Nanopartiküllerin kullanım alanları arasında ev aletleri ve ürün kaplamaları (2), biyomedikal uygulamalar (3, 4) mücevhencilik (5), elektrokimyasal sensörler ve biyosensör uygulamaları (6-9), tıp (10-12) gibi pek çok alan bulunmaktadır.

Son yıllarda gümüş nanopartiküller (AgNPs) üzerinde yeni optik, katalitik, antibakteriyel, antiviral ve antifungal özellikleri, geniş yüzey alanı ve yüksek reaktiviteleri nedeniyle çeşitli araştırmalar yapılmıştır (13). Gümüş ve diğer metal nanoparçacıkları hazırlamak için kullanılan kimyasal ve fiziksel teknolojiler oldukça pahalıdır ve yan ürünleri ve atıkları çevre için toksik ve zararlıdır

(14-16). Bu nedenle araştırmacılar nanopartiküllerin kimyasal ve fiziksel teknolojilere özgü bir alternatif olarak maya, mantarlar, bakteriler, meyve ve bitki özleri gibi çeşitli biyolojik sistemleri kullanarak sentezini önermektedir (17,18). Biyolojik sentez yöntemleri toksik kimyasallar kullanılmadığından farmasötik ve diğer biyomedikal uygulamalar için çevre dostudur.

Üzüm bitkisinin zengin bir proantosiyenin kaynağı olduğu bilinmektedir ve bu nedenle birçok araştırmacı üzüm ve yan ürünlerinin tanımlanması ve biyoaktivitelerinin değerlendirilmesi üzerine araştırmalar yapmaktadırlar. Üzüm çekirdeği özütü, esas olarak monomerik kateşin, epikateşin, gallik asidin yanında polimerik ve oligomerik proantosiyeninler açısından oldukça zengindir (19).

Lipopolisakkarit (LPS), Gram negatif bakterilerde

hücre duvarlarının toksik bir bileşenidir. Gram negatif bakteri hücre duvarı; içte peptidoglikan tabaka, dışta LPS, proteinler ve fosfolipitlerden oluşur. LPS tabakada bulunan endotoksin molekülü, hücre membranında kaldığı sürece inaktiftir. Hücrenin hızlı büyümesi veya hücre yıkımı sırasında açığa çıkan endotoksin sepsis/endotoksemide olaylar dizisini başlatan anahtar moleküldür. LPS iyi bilinen bir bakteriyel enfeksiyon modeli oluşturmak için yaygın olarak kullanılır (20).

Biz de bu çalışmada bağırsaklarda LPS ile oluşan histopatolojik hasara ve apoptoza karşı üzüm çekirdeği ekstresi ile biyolojik olarak sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin etkilerini araştırdık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Gümüş Nanopartiküllerinin Biosentezi ve Karakterizasyonu

Gümüş nanopartiküllerinin hazırlanmasında indirgeyici ajan olarak Üzüm (*Vitis vinifera*) bitkisinin çekirdek ekstresi kullanılmıştır. Kullanılan üzüm çekirdeği ekstresi Sepe Natural Organik Ürünler Sanayii ve Ticaret A.Ş tarafından kapsül şeklinde ticari olarak temin edilmiştir. İçeriğinde %95 oranında oligomerik proantosiyanın bulunmaktadır. Biosentetik gümüş nanopartiküllerin hazırlanması ve karakterizasyonu önceki çalışmamızda belirtildiği gibidir (21).

Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için kullanılacak olan deney prosedürü Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 16/058 nolu karar ile onaylanmıştır. Çalışmada kullanılan 8-12 haftalık *Wistar albino* türü yetişkin erkek sıçanlar Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilmiştir. Günün normal düzeninde 21 °C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamda su ve besin ihtiyacı karşılanan 80 adet sıçan aşağıda belirtilen şekilde 8 eşit gruba ayrılmıştır (n=10):

1. Grup 1 (Kontrol grubu): Bu gruptaki sıçanlara başlangıçta ve 30 dk. sonra olmak üzere deney süresi

boyunca ikişer kez serum fizyolojik (SF) (%0,9 NaCl sol.) 0,1 ml intraperitoneal (i.p.) yolla uygulanmıştır (SF+SF) (n=10).

2. Grup 2 (LPS grubu): Bu gruba i.p. yolla SF verildikten 30 dk. sonra yine i.p. yolla LPS (*Escherichia coli* LPS, serotip 0127: B8; Sigma Aldrich) (30 mg/kg) uygulanmıştır (SF+LPS) (n=10) (22).

3. Grup 3 (LPS + AgNP): Bu gruptaki sıçanlara LPS verildikten 60 dk. sonra AgNP oral yolla uygulanmıştır (200 mg/kg) (n=10) (23).

4. Grup 4 (LPS + Üzüm Çekirdeği Özütü): Bu grupta LPS (30 mg/ kg) verilen hayvanlara 60 dk. sonra üzüm çekirdeği ekstresi oral yolla verilmiştir (200mg/kg) (n=10).

5. Grup 5 (LPS+ Ag): Bu gruptaki LPS (30 mg/kg) verilen hayvanlara 60 dk. sonra AgNO₃ oral yolla verilmiştir (200mg/ kg) (n=10).

6. Grup 6 (Üzüm çekirdeği özütü): Bu gruptaki sıçanlara SF verildikten 30 dk. sonra üzüm çekirdeği ekstresi oral yolla verilmiştir (200 mg/kg) (n=10) (24).

7. Grup 7 (AgNP): Bu gruba SF verildikten 30 dk. Sonra AgNP oral yolla verilmiştir (200 mg/kg) (n=10).

8. Grup 8 (Ag iyonu): Bu grupta SF (30 mg/kg) verilen sıçanlara 30 dk. sonra AgNO₃ oral yolla verilmiştir (200 mg/ kg n=10).

Tüm i.p. enjeksiyonlar günün aynı saatinde yapılmış ve deney sonunda ketaminehydrochloride (50 mg/kg i.m/i. p) ve %2 xylazinehydrochloride (10 mg/kg i.m/i.p) ile anestezi altına alınarak bağırsak dokuları çıkarılan ratların yaşamlarına son verilmiştir. Elde edilen bağırsak dokuları %4'lük formaldehit içerisinde fikse edilerek rutin doku takibinden sonra, histopatolojik değerlendirme ve TUNEL analizi için parafin bloklar içerisine gömülmüştür.

Histolojik Analiz

%4'lük formaldehit solüsyonu ile fikse edilen ve rutin histolojik doku takibinden geçirildikten sonra parafine gömülen dokulardan alınan 5µm

kalınlığındaki kesitler Harris Hematoksilen ve Eozin ile boyanarak ışık mikroskobu altında incelendi (Olympus BX53). Bağırsak kesitlerinde histopatolojik değerlendirme amacıyla nekrotik villusun bağırsak lümenine dökülmesi, kanama ve villustaki dejeneratif değişiklikler gibi kriterler kullanıldı. Her kategorideki histopatolojik sonuçlar 0 = yok, 1= hafif, 2 = orta ve 3 = şiddetli şeklinde skorlanmıştır. Sonuçlar Image J yazılım programı ile değerlendirilmiştir.

TUNEL Yöntemi

Bağırsak doku kesitlerine apoptoz tespiti amacıyla TUNEL metodu (In-situ Cell Death Detection Kit, Florescein Kit -Roche-, kit içerisinde önerilen işlem sırasına göre uygulandı. Öncelikle 5-6 µm kalınlığındaki barsak kesitleri deparaffinize edildi, daha sonra rehidre edilen kesitler PBS ile yıkandı. Yıkamadan sonra, antijen geri kazanımı için dokular 0.01 M Sodyum Sitrat tampon içerisine koyuldu ve mikrodalga fırında 5 dk. boyunca 300-350 °C'ye maruz bırakıldı. Oda sıcaklığında soğumaya bırakılan dokular daha sonra kit içerisinde bulunan TUNEL reaksiyonu enzim karışımı ile karanlık ortamda 37 °C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra PBS ile yıkanan dokuların üzerine 4,6-diamidinde-2'-phenylindol (DAPI) damlatıldı ve üzeri kapatılan dokular üzerinde floresan mikroskop (Olympus BX51) altında 450-500 dalga boyunda apoptotic hücre tayini gerçekleştirildi.

Apoptotik indeks için toplamda 20X objektifte 50 farklı alandaki apoptotik hücreler sayıldı ve sonuçlar Image J yazılım programı ile değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada kullanılan istatistiksel veriler, SPSS 22.0 (SPSS Inc, USA) paket programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hocTukey testi ile değerlendirildi. Ayrıca yapılan istatistiksel analizlerin doğrulanması ve grafiklerin elde edilmesi amacıyla GraphpadPrism7.0 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). P<0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Biyosentetik Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

UV-VIS spektrofotometre kullanımı metalde var olan lokalize yüzey plazmon rezonansını uyararak, bir elektrik alan oluşturup belirli bir dalga boyunda rezonans meydana getirir ki o dalga boyunda güçlü ışın saçılmasına neden olmaktadır. Bu sayede spektrofotometrik ölçümlerin değerlendirilmesi farklı dalga boylarında renksel ya da kolorimetrik olarak kullanılan skala değerlendirmesi yapılır. Üzüm çekirdeği ekstresi AgNP kompleksindeki Ag⁺ iyonunun Ag⁰ iyonuna indirgenmesi, yüzey plazmon rezonansının uyarılmasını sağlamıştır ve sonuç olarak UV-Vis spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. UV-Vis ölçümlerine göre 420-470 nm dalga boyunda AgNP oluşması beklenir. Yapılan ölçüm sonucunda üzüm çekirdeği ekstraktının ~278 nm'de, biyosentetik AgNP'nin ise ~446 nm de absorbans piki verdiği belirlenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu analizi ile AgNP'lerin küresel şekilli ve ortalama olarak büyüklüklerinin de 67.20 ± 5 nm olduğu belirlenmiştir (21). AgNP'lerin elektriksel yükü zeta analizi ile belirlenmiştir. Yapılan ölçüm sonuçlarına göre AgNP elektriksel yükü -30,4 olarak tespit edilmiştir. Yüzey yükünün negatif olması negatif-negatif itme kuvvetinden dolayı AgNP'lerde yüksek dağılım, uzun süreli kararlılık ve iyi kolloidal yapının oluştuğunu göstermektedir (21).

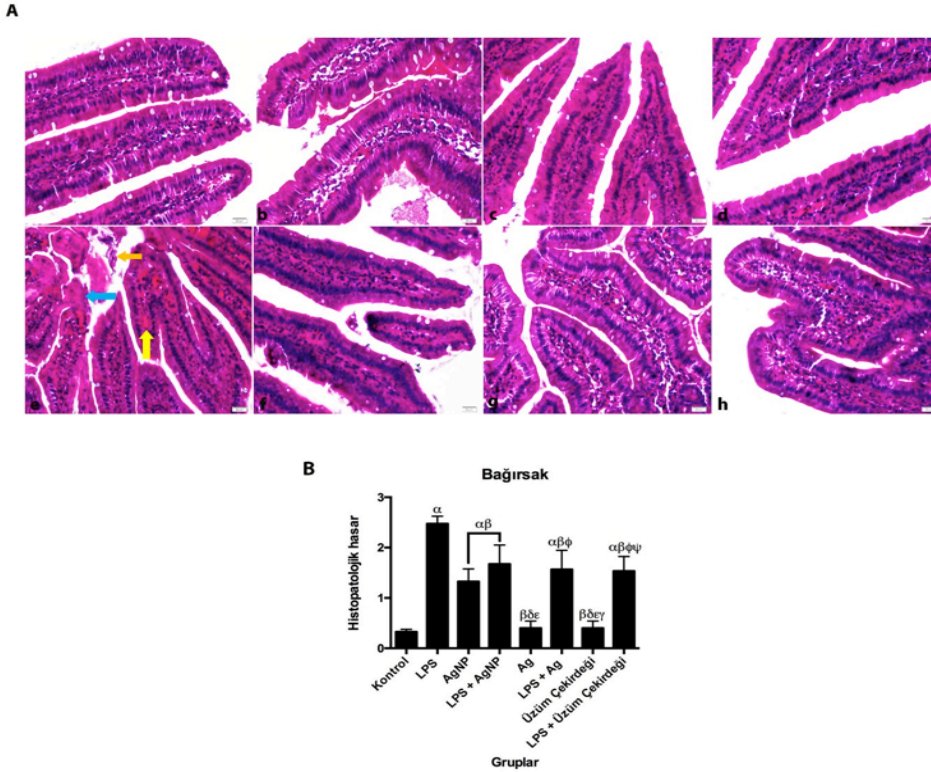
Histopatolojik Analizler

Biyosentetik AgNP'lerin LPS ile oluşturulan bağırsak toksisitesine karşı herhangi bir etkisinin olup olmadığı, fareler üzerinde yapılan in vivo çalışmalar sonucunda histolojik ve immunohistokimyasal analizler ile belirlenmeye çalışılmıştır.

Yapılan histolojik incelemeler sonucunda Ag ve üzüm çekirdeği uygulanan gruplara ait bağırsak dokularının, histolojik olarak kontrol grubuna benzer bir yapı gösterdiği belirlendi (Şekil 1A). LPS uygulanan

bağırsak dokusunda kanama (sarı ok), nekrotik villusun bağırsak lümenine dökülmesi (turuncu ok), ve villustaki dejeneratif değişiklikler (mavi ok) gözlenmektedir. Şekil 1B' de gösterilen histopatolojik skorlamaya göre; istatistiksel olarak LPS, AgNP, LPS + AgNP, LPS + Ag ve LPS + Üzüm çekirdeği gruplarının kontrol grubundan farklı olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS' de gözlenen histopatolojik hasarın diğer tüm gruplardan yüksek olduğu görülmüştür ($P < 0.05$). AgNP ve LPS + AgNP grupları LPS grubuna göre hasar oranı

azalmıştır ($P < 0.05$). Ag ve üzüm çekirdeği uygulanan gruplardaki hasarın LPS + AgNP ve LPS + Ag gruplarına göre daha az olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$). Sadece Ag uygulanan grupta gözlenen hasarın LPS + Ag grubuna göre daha az olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Son olarak, LPS + Ag grubu ile LPS + Üzüm çekirdeği grubu arasında değerlendirilen hasar miktarının birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Kontrol, Ag ve Üzüm çekirdeği uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık olmadığı gösterilmiştir.



Şekil 1A. Kontrol grubu (a), AgNP grubu (b), Ag grubu (c), Üzüm çekirdeği grubu (d), LPS grubu (e), LPS + AgNP grubu (f), LPS + Ag grubu (g) ve LPS + Üzüm çekirdeği (h) grubu bağırsak dokularının H&E boyama yöntemi ile histopatolojik olarak değerlendirilmesi. Büyütme 20X, bar = 50 μ m.

Şekil 1B. Histogram grafiğinde gösterilen histopatolojik skor verileri ort. \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü ANOVA varyans analizi ve TUKEY post hoc çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır ($\alpha P < 0.05$ kontrol grubundan farklı; $\beta P < 0.05$ LPS grubundan farklı; $\delta P < 0.05$ AgNP grubundan farklı; $\epsilon P < 0.05$ LPS + AgNP grubundan farklı; $\phi P < 0.05$ Ag grubundan farklı; $\gamma P < 0.05$ LPS + Ag grubundan farklı; $\psi P < 0.05$ Üzüm çekirdeği grubundan farklı)

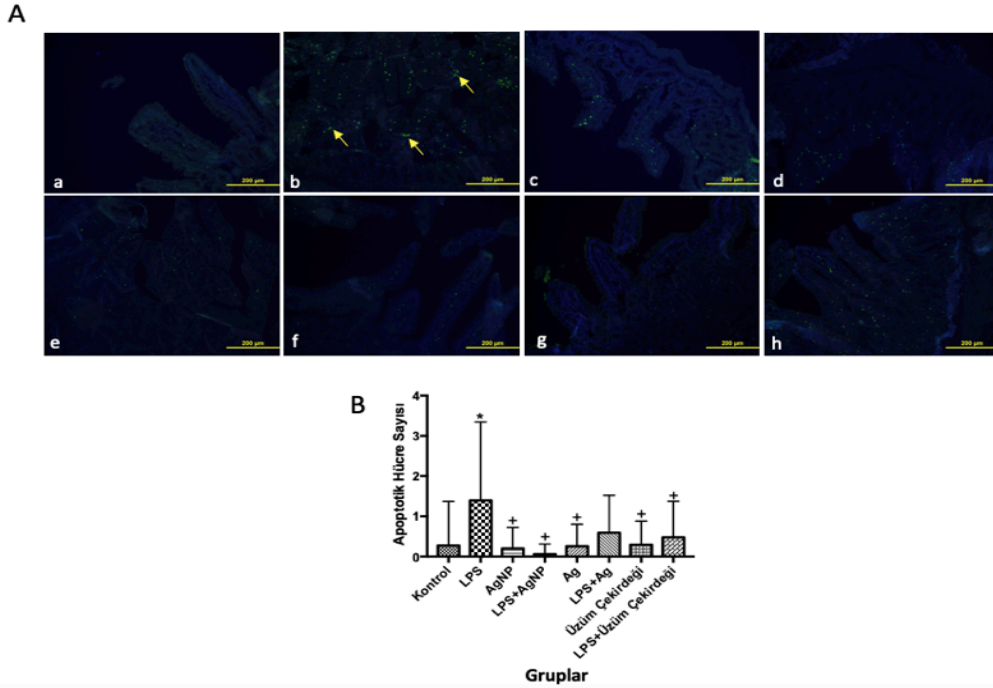
Apoptotik Analizler

TUNEL metodu uygulanan kesitlerde yeşil renkli ışığa sergileyen hücreler sarı ok ile gösterilmiştir (Şekil 2A). Şekil 2B’de gerçekleştirilen apoptotik hücre sayısı tayini sonucunda LPS grubunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bu anlamlılık ‘**’ ile gösterilmiştir. Ayrıca LPS grubu ile kıyaslandığında AgNP, Ag, Üzüm çekirdeği, LPS+AgNP, LPS+Üzüm çekirdeği gruplarındaki apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde az olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$). LPS grubu ile bu gruplar arasındaki anlamlı farklılık ise ‘+’ işareti ile gösterilmiştir. Kontrol grubu ile LPS+Ag grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir

farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Buna rağmen LPS grubu ile LPS+Ag grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

Nanoteknoloji, nanomateryal uygulamalarının yanı sıra bu materyallerin sentezi ve karakterizasyonu ile de ilgilenmektedir. Nanopartiküller eşsiz özellikleri sayesinde son yıllarda birçok bilim insanının dikkatini çekmiş ve çok çeşitli alanlarda uygulanma imkânı bulmuşlardır. Farmakolojinin nanoteknoloji ile birleştirilmesi gittikçe artan ilaca dirençli mikroorganizmaları kontrol etmek için yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesine yardımcı olmuştur. Gümüş, altın, titanyum dioksit



Şekil 2A. Kontrol grubu (a), AgNP grubu (b), Ag grubu (c), Üzüm çekirdeği grubu (d), LPS grubu (e), LPS + AgNP grubu (f), LPS + Ag grubu (g) ve LPS + Üzüm çekirdeği (h) grubu bağırsak dokularının TUNEL yöntemi ile değerlendirilmesi. Sarı oklar apoptotik hücreleri göstermektedir.

Şekil 2B. Apoptotik indeks histogram grafiğinde gösterilmektedir.

vb. antimikrobiyal metaller ve magnezyum oksit gibi metal oksit nanopartikülleri en iyi bilinenler arasındadır. Bunun yanı sıra, son yıllarda bitkisel kaynaklı polifenolik bileşiklerin nanopartiküller ile birleştirilerek yeni stratejiler geliştirilmesi yaygın hale gelmiştir (25).

Üzüm çekirdeği ile yapılan çalışmalar zengin proantosiyanin içeriğinin serbest radikalleri temizleyebildiği ve oksidatif stres ile ilişkili miyokardial infarktüs, ateroskleroz, ilaç ile indüklenmiş akciğer, karaciğer ve böbrek hasarı (26-28) ve prenatal dönemde valproik asit maruziyetine bağlı olarak geliştirilen serebral korteks defektine karşı etkili olduğunu göstermektedir (29).

Üzüm çekirdeğinin dokularda inflamasyona bağlı meydana gelen oksidatif hasara karşı olumlu etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir. Wang ve ark. (30) farelerde yaptıkları çalışmada arsenik trioksit (As₂O₃) ile indüklenen renal inflamasyonda, üzüm çekirdeğinin NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonunu inhibe ederek inflamatuvar sitokinlerin salınımını baskıladığını bildirmiştir.

Bakteriyel LPS sepsisi ve septik şoku tetikleyen bir endotoksindir ve immün hücreleri tarafından Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α) ve IL-1 β , IL-6 ve IL-10 gibi pro- ve anti-inflamatuvar sitokinlerin salınımı ile sonuçlanan inflamatuvar cevabın oluşturulmasına neden olmaktadır (22).

Pallares ve ark. (31) ratlarda LPS ile endotoksitemi modeli oluşturmuş ve bu endotoksiteminin belirli doku ve organlardaki etkilerini gözlemek amacıyla kan plazması, eritrositler, dalak ve karaciğerde üzüm çekirdeği ekstresinin etkilerini incelemiştir. Çalışmanın sonucunda LPS ile indüklenen endotoksitemi modelinde üzüm çekirdeği ekstresinin kan plazmasında, eritrositlerde, dalakta ve karaciğerde artan NO_x proinflatuvar markırı ekspresyonunu azalttığını bulmuşlardır. Ayrıca üzüm çekirdeği ekstresinin IL-6 ve iNOS ekspresyonlarını da ciddi şekilde azalttığını belirlemiştir.

Nanopartiküller içerisinde en yaygın kullanıma

sahip olanlardan biri olan AgNPs çok güçlü antimikrobiyal özelliklere sahiptir ve gıda, tıbbi ürünler ve endüstriyel kaplama gibi birçok alanda yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Fakat tüm yararlı özelliklerine rağmen, nihayetinde metal olan bu parçacıkların beslenme, hava veya su yoluyla vücuda alınması ile karaciğer, böbrek, akciğer ve beyin gibi çeşitli organlarda fazla miktarda birikmesi ciddi sonuçlara yol açabileceğinden dikkatli olunmalıdır. Nitekim AgNP ile yapılan çalışmalar, bu nanopartiküllerin balıklarda, farelerde ve insanlarda hücre içerisinde biriktiği ve tüm vücuda dağılabildiği belirlenmiştir (32-34).

Elle ve ark. (35) yapmış oldukları çalışmada, oral yolla verilen AgNPs'nin kalp ve karaciğer dokusunda oksidatif stresi arttırdığını ve kan plazmasında proinflatuvar sitokinlerin artışına sebep olduğunu bulmuşlardır.

AgNPs birçok hayati doku ve organda (karaciğer, dalak, beyin, böbrek, kalp, akciğer) birikme özelliğine sahiptirler (36-38). Adeyemi ve Faniyan, AgNP'nin çeşitli dokularda lipid peroksidasyonuna neden olabileceğini ve eser miktardaki uygulamalarının antioksidan özelliğe sahip olmasına rağmen bu özelliğini oksidatif stres indükleyicisi olarak değiştirebildiğini bildirmişlerdir (39). AgNP'nin biyolojik etkileri üzerine yapılan birçok çalışma, bu nanopartiküllerin doku ve organlardaki toksik etkilerinin oksidatif strese dayandığını bildirmişlerdir (36, 40).

Bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) birçok doku ve organda inflamasyona sebep olmakta ve sistemik inflamasyonu tetikleyerek sepsise neden olabilmektedir. Zong ve ark. (41) yaptıkları çalışmada LPS ile indüklenmiş ince bağırsak hasarı üzerine domuz lactoferrin-türevli peptid LFP-20'nin etkisini incelemiştir. Çalışmada LPS'nin ince bağırsakta mukozal lezyonların oluşumuna ve apoptozise sebep olduğunu ve özellikle ileumda makrofajların çoğaldığını ve bölgede nötrofil infiltrasyonunun ciddi şekilde arttığını gözlemlemiştir. Yaptığımız

çalışmada, LPS uygulanan bağırsak dokusunda hemoraji, bağırsak lümeninde gözlenen nekrotik villuslar ve genel villus yapısındaki dejeneratif değişiklikler gözlenmiştir. Bu değişikliklere bağlı olarak gerçekleştirilen doku hasarı skorlamasına göre LPS grubunda kontrol grubuna oranla ciddi bir histopatolojik hasar belirlenmiştir. Ag ve Üzüm çekirdeği ekstresi uygulanan gruplarda bağırsak histolojisinin kontrole yakın bir doku morfolojisi sergilediği, AgNP uygulanan grupta ise histopatolojik hasarın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde artmış olduğu fakat LPS grubundaki histopatolojik hasardan da istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde az olduğu belirlenmiştir. Ayrıca LPS+AgNP, LPS+Üzüm çekirdeği ekstresi ve LPS+Ag gruplarındaki histopatolojik hasarın LPS grubundan anlamlı bir şekilde az olduğu gözlenmiştir.

İntestinal mukoza vücudun ilk savunma hattı olarak görev yapmaktadır ve antijenlere karşı dirençli bir bariyer sağlamaktadır. Enfeksiyon sırasında, intestinal mukozanın bütünlüğü apoptoz ve nekrozdan önemli ölçüde etkilenir ve intestinal mukozal bariyerin bozulmasına neden olur (42).

Zhou ve ark. yaptıkları çalışmada, ratlarda LPS ile indüklenmiş immün stresin intestinal mukoza hücrelerindeki apoptozis üzerine visfatinin etkisini

incelemişlerdir. Apoptozisi belirlemek amacıyla ELISA ve Western Blot yöntemleri ile pro-caspase-3 ve caspase-3 ifadelerindeki değişiklikleri incelemiş ve TUNEL yöntemi aracılığıyla da apoptotik hücre tayini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda, visfatinin LPS ile indüklenmiş intestinal mukoza hücrelerindeki artan apoptozisi azalttığı ve olumlu bir etki gösterdiği belirtilmiştir (42). Yaptığımız çalışmada, TUNEL yöntemi uygulanan kesitlerde belirlenen apoptotik indeks ışığında LPS'nin sıçanlarda ciddi bir inflamasyona neden olduğunu ve apoptotik hücre sayısı kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını belirledik. Ayrıca apoptotik hücre sayısının LPS grubunda, Ag, AgNP, LPS+AgNP, Üzüm çekirdeği ve LPS+Üzüm çekirdeği gruplarına göre de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fazla olduğunu gözledik.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada LPS'nin sıçanların bağırsak mukozasında meydana getirdiği histopatolojik hasara karşı uygulanan biyosentetik AgNP ve üzüm çekirdeği ekstresinin tedavi edici etkilere sahip olduğunu belirledik. Ayrıca biyosentetik AgNP ve üzüm çekirdeği ekstresinin bağırsak mukozasında artan apoptozisi azalttığı ve mukozayı inflamasyona bağlı apoptozisin zararlı etkilerinden koruduğunu söyleyebiliriz.

TEŞEKKÜR

Biyosentetik nanopartiküllerin karakterize edilmesinde SEM, Zeta potansiyel ölçümleri ve UV analizlerinin yapılmasında yardım ve destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (ERNAM)'ne ve çalışmayı FYL-2016-6769 numaralı proje ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Sahoo D, Dill DL, Tibshirani R, Plevritis SK. Extracting binary signals from microarray time-course data. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(11):3705-12. DOI: 10.1093/nar/gkm284.
2. Hanks NA, Caruso JA, Zhang P. Assessing *Pistia stratiotes* for phytoremediation of silver nanoparticles and Ag(I) contaminated waters. *J Environ Manage.* 2015;164:41-5. DOI: 10.1016/j.jenvman.2015.08.026.
3. Stone RC, Fellows BD, Qi B, Trebatoski D, Jenkins B, Raval Y, et al. Highly stable multi-anchored magnetic nanoparticles for optical imaging within biofilms. *J Colloid Interface Sci.* 2015;459:175-82. DOI: 10.1016/j.jcis.2015.08.012.
4. Uskoković V. When 1+1>2: Nanostructured composites for hard tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;57:434-51. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.050.
5. Asztemborska M, Steborowski R, Kowalska J, Bystrzejewska-Piotrowska G. Accumulation of Platinum Nanoparticles by *Sinapis alba* and *Lepidium sativum* Plants. *Water Air Soil Pollut.* 2015;226(4):126-. DOI: 10.1007/s11270-015-2381-y.
6. Haverkamp RG, Marshall AT, van Agterveld D. Pick your carats: nanoparticles of gold-silver-copper alloy produced in vivo. *Journal of Nanoparticle Research.* 2007;9(4):697-700.
7. Li H, Qiao Y, Li J, Fang H, Fan D, Wang W. A sensitive and label-free photo electrochemical aptasensor using Co-doped ZnO diluted magnetic semiconductor nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics.* 2016; (77): 378-84. DOI: 10.1016/j.bios.2015.09.066.
8. Yamada K, Choi W, Lee I, Cho B-K, Jun S. Rapid detection of multiple foodborne pathogens using a nanoparticle-functionalized multi-junction biosensor. *Biosensors and Bioelectronics.* 2016;77:137-43.
9. Yu Y, Guo M, Yuan M, Liu W, Hu J. Nickel nanoparticle-modified electrode for ultra-sensitive electrochemical detection of insulin. *Biosensors and Bioelectronics.* 2016;77:215-9. DOI: 10.1016/j.bios.2015.09.036.
10. Göbel G, Lange R, Hollidt J-M, Lisdat F. Development of a fast and simple test system for the semiquantitative protein detection in cerebrospinal liquids based on gold nanoparticles. *Talanta.* 2016;146:49-54.
11. Schwaminger SP, Garcia PF, Merck GK, Bodensteiner FA, Heissler S, Günther S, et al. Nature of Interactions of Amino Acids with Bare Magnetite Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C.* 2015;119(40):23032-41.
12. Zhu K, Wu M, Lai H, Guo C, Li J, Wang Y, et al. Nanoparticle-enhanced generation of gene-transfected mesenchymal stem cells for in vivo cardiac repair. *Biomaterials.* 2016;74:188-99. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.010.
13. Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S, Are view on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *J. Adv. Res.* 2016(7) 17-28.
14. Yu DG, Formation of colloidal silver nanoparticles stabilized by Na⁺-poly(-glutamic acid)-silver nitrate complex via chemical reduction process, *J. Colloids Surf. B* 2007;(59): 171-8.
15. Mallick K, Witcomb MJ, Scurrella MS, Self-assembly of silver nanoparticles in a polymer solvent: formation of a nanochain through nanoscale soldering. *Mater. Chem. Phys.* 2005;(90):221-4.
16. Smetana AB, Klabunde KJ, Sorensen CM, Synthesis of spherical silver nanoparticles by digestive ripening, stabilization with various agents, and their 3-D and 2-D superlattice formation, *J. Colloid Interface Sci.* 2005;(284):521-6.
17. Senapati S, Ahmad A, Khan MI, Sastry M, Kumar R, Extracellular biosynthesis of bimetallic Au-Ag alloy nanoparticles, *Small* 2005;(1):517-520.
18. Shahverdi AR, Minaeian S, Shahverdi HR, Jamalifar H, Nohi AA, Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: anovel biological approach, *Process Biochem.* 2007;(42):919-23.
19. Rodriguez-Perez C, Garcia-Villanova B, Guerra-Hernandez E, Verardo V. Grape Seeds Proanthocyanidins: An Overview of In Vivo Bioactivity in Animal Models. *Nutrients.* 2019;11(10).doi: 10.3390/nu11102435.
20. Fısgın NT. Sepsis. *OMÜ Tıp Dergisi.* 2004;21(2):100-9.
21. Doğanıyğıt, Z., Öztürk Küp, F., Kaymak, E., Okan, A., Koçak, B., Akin, AT., Gümüş Nanopartiküllerinin ve Üzüm Çekirdeği Ekstraktının Endotoksik Kalp Dokusundaki Histolojik Değişikliklere ve TNF- α ve BNP Ekspresyonuna Etkisi. *Bozok Tıp Dergisi* , 2019; (9):87-96.

22. Doganyigit Z, Kup FO, Silici S, Deniz K, Yakan B, Atayoglu T. Protective effects of propolis on female rats' histopathological, biochemical and genotoxic changes during LPS induced endotoxemia. *Phytomedicine*. 2013;20(7):632-9. doi: 10.1016/j.phymed.2013.01.010.
23. Ragab GMA, El-Denshary ES, Hassan AM, Abdel-Azeim SH, Hassan NS, Mannaa FA, et al. Grape (*Vitis vinifera*) seed extract inhibits the cytotoxicity and oxidative stress in liver of rats treated with carbon tetrachloride. *Global J Pharmacol*. 2013;7(3):258-69.
24. Atasever A, Yaman D. The effects of grape seed and colchicine on carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2014;66(8):361-5. doi: 10.1016/j.etp.2014.04.008.
25. Gharpure S, Akash A, Ankamwar B. A Review on Antimicrobial Properties of Metal Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2020;20(6):3303-39.
26. Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res*. 2010;302(2):71-83. doi: 10.1007/s00403-009-1001-3.
27. Yadav M, Jain S, Bhardwaj A, Nagpal R, Puniya M, Tomar R, et al. Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update. *J Med Food*. 2009;12(3):473-84. doi: 10.1089/jmf.2008.0096.
28. Hu Y, Wei M, Niu Q, Ma R, Li Y, Wang X, et al. Grape seed proanthocyanidin extract alleviates arsenic-induced lung damage through NF- κ B signaling. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019;244(3):213-26. <https://doi.org/10.1177/1535370219829881>.
29. Arafat EA, Shabaan DA. The possible neuroprotective role of grape seed extract on the histopathological changes of the cerebellar cortex of rats prenatally exposed to Valproic Acid: animal model of autism. *Acta Histochem*. 2019;121(7):841-51. doi: 10.1016/j.acthis.2019.08.002.
30. Wang C, Li J, Song GL, Niu Q, Xu SZ, Feng GL, et al. Grape Seed Procyanidin Extract Reduces Arsenic-Induced Renal Inflammatory Injury in Male Mice. *Biomed Environ Sci*. 2017;30(7):535-9. doi: 10.3967/bes2017.071.
31. Pallares V, Fernandez-Iglesias A, Cedo L, Castell-Auvi A, Pinent M, Ardevol A, et al. Grape seed procyanidin extract reduces the endotoxic effects induced by lipopolysaccharide in rats. *Free Radic Biol Med*. 2013;60:107-14. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.007.
32. Li Y, Bhalli JA, Ding W, Yan J, Pearce MG, Sadiq R, et al. Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology*. 2014;8 Suppl 1:36-45. doi: 10.3109/17435390.2013.855827.
33. Sarhan OM, Hussein RM. Effects of intraperitoneally injected silver nanoparticles on histological structures and blood parameters in the albino rat. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:1505-17. doi: 10.2147/IJN.S56729. eCollection 2014.
34. Vrcek IV, Zuntar I, Petlevski R, Pavicic I, Dutour Sikiric M, Curlin M, et al. Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. *Environ Toxicol*. 2016;31(6):679-92. doi: 10.1002/tox.22081.
35. Elle Ebabe R, Gaillet S, Vide J, Romain C, Laurent C, Rugani N, et al. Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats: effects on oxidative stress and inflammation. *Food Chem Toxicol*. 2013;60:297-301. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.071.
36. Ahamed M, Alsalhi MS, Siddiqui MK. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23-24):1841-8. doi: 10.1016/j.cca.2010.08.016.
37. Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, et al. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect*. 2001;109 Suppl 4(Suppl 4):547-51. DOI: 10.1289/ehp.01109s4547.
38. Tang J, Xiong L, Wang S, Wang J, Liu L, Li J, et al. Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *J Nanosci Nanotechnol*. 2009;9(8):4924-32. DOI: 10.1166/jnn.2009.1269.
39. Adeyemi OS, Faniyan TO. Antioxidant status of rats administered silver nanoparticles orally. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 2014;9(3):182-6. doi: 10.3892/etm.2019.8108.
40. Klein S, Dell'Arciprete ML, Wegmann M, Distel LY, Neuhuber W, Gonzalez MC, et al. Oxidized silicon nanoparticles for radiosensitization of cancer and tissue cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;434(2):217-22. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.042.
41. Zong X, Cao X, Wang H, Zhao J, Lu Z, Wang F, et al. Porcine lactoferrin-derived peptide LFP-20 modulates immune homeostasis to defend lipopolysaccharide-triggered intestinal inflammation in mice. *Br J Nutr*. 2019;121(11):1255-63. doi: 10.1017/S0007114519000485.
42. Zhou Y, Yuan HR, Cui L, Ansari AR, Xiao K, Luo Y, et al. Effects of visfatin on the apoptosis of intestinal mucosal cells in immunological stressed rats. *Acta Histochem*. 2017;119(1):26-31. doi: 10.1016/j.acthis.2016.11.002.