

# GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİNİN ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ EKSTRAKTININ ENDOTOKSİK KALP DOKUSUNDAKİ HİSTOLOJİK DEĞİŞİKLERE VE TNF- $\alpha$ VE BNP EKSPRESYONUNA ETKİSİ

## Effect of Grape Seed Extract of Silver Nanoparticles on TNF- $\alpha$ and BNP Expression and Histologic Changes in Endotoxic Heart Tissue

Züleyha DOĞANYIĞİT<sup>1</sup>(0000-0002-6980-3384), Fatma ÖZTÜRK KÜP<sup>2</sup>(0000-0002-4785-4017), Emin KAYMAK<sup>3</sup>(0000-0002-3818-2693), Aslı OKAN<sup>1</sup>(0000-0001-8152-7338), Burçin OÇAK<sup>2</sup>(0000-0002-4459-7633), Ali Tuğrul AKİN<sup>2</sup>(0000-0002-1408-8571)

### ÖZET

Lipopolisakarit (LPS) tarafından oluşturulan endotokseminin patofizyolojik mekanizmalarının anlaşılmasında ve tedavisinde pek çok strateji geliştirilmesine rağmen, hala yoğun bakım ünitelerinin en önemli problemlerinden biridir. Bu çalışmada, endotoksik şok üzerine üzüm çekirdeği kullanılarak biyolojik olarak sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin (AgNP) koruyucu bir etkisi olup olmadığının kalp dokusundaki histolojik değişiklikler ve beyin natriüretik peptid (BNP) ekspresyonlarındaki değişimler ortaya konularak belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma için 80 adet Wistar albino cinsi yetişkin erkek sıçan 8 eşit gruba ayrılmıştır. Çalışma sonucunda Kontrol ve AgNP uygulanan gruplarda sağlıklı normal bir kalp görüntüsü izlenirken, LPS uygulanan grupta hücre çekirdeklerinde küçülme ve yapısal olarak düzensizlik görülmüştür. LPS ile birlikte AgNP uygulanan gruplarda normale yakın görüntü izlenmiştir. Tümör nekroze edici faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve BNP immünreaktivite sonuçlarının LPS grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı, LPS ile birlikte AgNP uygulanan gruplarda ise artmış olan TNF- $\alpha$  ve BNP immünreaktivitesinin kontrol grubuna benzer şekilde olduğu görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** LPS; Gümüş nanopartikül; Üzüm çekirdeği ekstresi; Protoantisiyanidin, BNP; TNF-  $\alpha$

### ABSTRACT

**Objectives:** Although many strategies have been developed to understand and treat the pathophysiological mechanisms of endotemia induced by lipopolysaccharide (LPS), it is still one of the most important problems of intensive care units. In this study, we aimed to determine whether there is a protective effect of biologically synthesized silver nanoparticles (AgNP) on endotoxic shock by using grape seed to reveal the changes in brain natriuretic peptide (BNP) expressions and histological changes in heart tissue. 80 Wistar albino adult male rats were divided into 8 equal groups. At the end of the study, while a healthy normal heart image was observed in control and AgNP treated groups, cell nuclei were reduced and structurally irregular in the LPS group. In the groups treated with LPS and AgNP, a close to normal image was observed. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-  $\alpha$ ) and BNP immunoreactivity results were significantly increased in the LPS group compared to the control group, whereas increased TNF-  $\alpha$  and BNP immunoreactivity were found to be similar to the control group in AgNP treated groups with LPS.

**Keywords:** LPS; Silver nanoparticle; Grape seed extract; Protoantisiyanidin; BNP; TNF-  $\alpha$

<sup>1</sup>Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, 66100 Erdoğın Akdağ Kampüsü/Yozgat

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 38100 Kayseri

<sup>3</sup>Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, 66100 Erdoğın Akdağ Kampüsü/Yozgat

<sup>4</sup>Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 38100 Kayseri

Züleyha DOĞANYIĞİT, Dr.Öğr.Üyesi  
Fatma ÖZTÜRK KÜP, Doç. Dr.  
Emin KAYMAK, Araş.Gör.  
Aslı OKAN, Dr.Öğr.Üyesi  
Burçin OÇAK, Doç. Dr.  
Ali Tuğrul AKIN, Doç. Dr.

### İletişim:

Dr.Öğr.Üyesi Züleyha DOĞANYIĞİT,  
Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, 66100 Erdoğın Akdağ Kampüsü/Yozgat  
Tel: 05053344603  
e-mail:  
zuleyha.doganvigit@gmail.com

Geliş tarihi/Received: :20.04.2019  
Kabul tarihi/Accepted: 16.05.2019  
DOI: 10.16919/bozoktip.556313

Bozok Tıp Derg 2019;9(3):87-96  
Bozok Med J 2019;9(3):87-96

## Giriş

Nanopartiküller, sahip oldukları üstün fiziksel özellikleri nedeniyle biyoteknoloji, farmakoloji, tıp, sensörler, bilişim ve iletişim, elektronik, savunma, tekstil, makine ve inşaat sanayileri vb. gibi çeşitli alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Au, Ag, Pt ve Pd gibi asil metal nanopartiküller biyolojik uygulamalarda özel fiziko-kimyasal özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle 2-200 nm büyüklüğündeki Altın nanopartiküller (AuNP) oldukça mükemmel bir biyouyumluluğa sahiptir ve tıpta ilaç çalışmalarında yoğun olarak test edilmektedir [1]. Canlı sistemlerde nanopartiküllerin hücre yüzeylerine tutunduğu, hücre zarı veya hücre örtülerine bağlandığı, bazı durumlarda değişik mekanizmalarla hücreye alındığı floresan, konfokal mikroskoplar ile taramalı ve geçirmeli elektron mikroskoplarla gösterilmektedir [2]. Nanopartiküller bazı memeli dokuları ile etkileşime girebilir ve işlevini değiştirebilir. Örneğin; metalik nanopartiküller, reaktif oksijen türevlerinin birikimine neden olarak antioksidant savunma mekanizmasını engelleyip hücre ölümlerine neden olabilirler [2]. Yapılan başka bir çalışmada 20 nm büyüklüğündeki AuNP'lerin embriyonik akciğer fibroblastlarında oksidatif hasar oluşturduğu, hücre siklusu ve DNA tamir genlerinin ekspresyonunu önleyerek hücre proliferasyonuna neden olduğu belirtilmiştir [3]. Nanopartiküllerin sıçanlar ve farelerde proenflamatuar yanıt sırasında sitokinlerin mRNA ifadesini ve enzimatik aktiviteyi engellediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [4].

Nanopartikül (NP) üretiminde maliyetin engelleyici bir unsur olması ve boyutları nedeniyle risklerinin engellenememesi, aynı zamanda bu risklerin tam olarak bilinmemesi nedeniyle yeni üretim metodları denenmeye başlanmıştır [5]. Mikroorganizmalar ve bitki ekstraktları ile NP'lerin biyolojik sentezi ile ilgili çalışmalar günümüzde hız kazanmıştır. NP'lerin yeşil sentezi (green synthesis); basit, toksik olmayan, güvenilir olarak doğal malzemelerin kullanılmasıdır. Temiz kimya enerji tasarrufu, atık azaltımı, kolay uygulanabilmesi ve kimyasalların zararlı etkilerinden kaçınılması gibi avantajları nedeniyle tercih edilen çevre dostu bir yöntemdir. Biyolojik sentez yöntemi ile elde edilen NP'ler biyomedikal uygulamaları için uygun olup toksik maddeler içermemektedir [6, 7].

Bitki orjinli polifenolik bileşikler son zamanlarda çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [8]. Üzüm ve üzüm çekirdeği özellikle zengin bir proantosiyanin kaynağıdır [9]. Proantosiyaninler askorbik asit ve vitamin E'den daha fazla antioksidant aktivite ve serbest radikal kovucu etki gösterirler. Üzüm çekirdeği ekstraktı hem hepatik fibrozise neden olan hücre dışı matriks elementlerinin üretimini hem de lipid peroksidasyonunu başlatan peroksi radikallerinin oluşumunu engelleyici bir etkiye sahiptir [10].

Yapılan çalışmalar, üzüm çekirdeği proantosiyaninin serbest radikalleri temizleyebildiğini, serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidatif hasarı ve miyokardiyal enfaktüs, ateroskleroz, ilaç ile oluşan karaciğer ve böbrek hasarını gibi hastalıkları önleyebildiğini göstermektedir [11].

Kalpte oluşan işlev bozukluğu sonucunda kalpten birçok natriüretik peptid salgınmasına rağmen bunlar arasında en hassas ve güncel olanı BNP'dir [12].

BNP'lerin bazı işlev bozukluklarında artması, bu patolojilerin tespitine yönelik çalışmalarda biyogösterge olarak kullanılmasına da neden olmuştur. Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda, atrial natriüretik peptid (ANP) ile birlikte BNP, kalp yetmezliği olan hastaların ayırıcı tanısında biyogösterge olarak kullanılmıştır [13]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise BNP, iskemik kalp hastalıklarında, akut miyokardit ve sepsis gibi enflamatuar hastalıklarda, akciğer hastalıklarının ayırıcı tanısında biyogösterge olarak kullanılmaktadır [14].

Bu çalışma da biyolojik yöntemlerle üzüm çekirdeği ekstraktı kullanılarak sentezlenen Gümüş (Ag) nanopartiküllerin sıçan kalp dokusunda LPS ile indüklenen hasara karşı oluşturacağı etkilerin histolojik ve immunohistokimyasal olarak TNF- $\alpha$  ve BNP ekspresyonlarını değerlendirmek suretiyle belirlenmesi amaçlanmaktadır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi ve Karakterizasyonu

Sentezde kullanılan üzüm çekirdeği ekstresi ticari olarak satın alınmıştır. 0,05 gr üzüm çekirdeği ekstresi 100 ml

distile su içerisinde karıştırılarak çözünmüştür. Elde edilen çözelti içerisine 1 mM gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 150 rpm'de çözeltinin renginde sarıdan kahverengine doğru değişim gözlenene kadar karıştırılmıştır. Renk değişiminden sonra karışım 10000 rpm'de 10 dk 4-6 kez santrifüj edilerek yıkanmıştır. Daha sonra AgNP'lerin UV-vis spektrofotometre, taramalı elektron mikroskobu ve ZETA potansiyeli analizleri ile fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir.

### Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmanın protokolü Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Protocol no:16/058). Çalışma da Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen Wistar albino türü yetişkin erkek sıçanlar kullanılmıştır. Kafesler içinde tutulan sıçanların günün normal düzeninde 21 OC ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlanmıştır. Çalışmada kullanılacak hayvan sayısı, cinsi ve uygulanacak dozlar mevcut literatür bilgilerine göre belirlenmiştir.

Çalışma için 80 adet Wistar albino cinsi yetişkin erkek sıçan aşağıdaki şekilde 8 eşit gruba ayrılmıştır (n=10):

1. Grup 1 (Kontrol grubu): Sadece serum fizyolojik (SF) (%0,9 NaCl sol.) 0,1 ml i.p. yolla başlangıçta ve 30 dak. sonra olmak üzere 2'şer kez (SF+SF) (n=10).
2. Grup 2 (LPS grubu): SF verildikten 30 dak. sonra LPS (30 mg/kg) (SF+LPS) (n=10). İntraperitoneal olarak uygulanmıştır [15].
3. Grup 3 (LPS + Gümüş Nanopartikül): LPS verildikten 60 dak. sonra AgNP-Üzüm çekirdeği ağız yolu ile verilmiştir (200mg/kg) (n=10) [16].
4. Grup 4 (LPS + Üzüm Çekirdeği Ekstraktı): LPS (30 mg/kg) verilen hayvanlara 60 dak. sonra Üzüm çekirdeği ekstraktı ağız yolu ile verilmiştir (200mg/kg) (n=10).
5. Grup 5 (LPS+ Ag): LPS (30 mg/kg) verilen hayvanlara 60 dak. sonra AgNO<sub>3</sub> ağız yolu ile verilmiştir (200mg/kg) (n=10).
6. Grup 6 (Üzüm çekirdeği ekstraktı): SF verildikten 30 dak. sonra üzüm çekirdeği ekstraktı ağız yolu ile verilmiştir (200 mg/kg) (n=10) [10].
7. Grup 7 (Gümüş Nanopartikül): SF verildikten 30 dak. sonra AgNP ağız yolu ile verilmiştir (200 mg/kg) (n=10).
8. Grup 8 (Ag iyonu): SF (30 mg/kg) verilen hayvanlara

30 dak. sonra AgNO<sub>3</sub> ağız yolu ile verilecektir (200 mg/kg n=10).

Tüm intraperitoneal enjeksiyonlar günün aynı saatinde yapılmış ve deney protokolü tamamlandıktan 24 saat sonra sıçanlara anestezi uygulamak amacıyla ketamine hydrochloride (50 mg/kg i.m/i. p) ve %2 xylazine hydrochloride (10 mg/kg i.m/i.p) verilerek kalp dokuları alınmıştır. Dokular formaldehit içinde fikse edilerek rutin histolojik doku takibi metodu uygulanarak parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklardan alınan 5 $\mu$ m kalınlığındaki kesitlere histolojik değerlendirme için Hematoksilin&Eozin boyama prosedürü, BNP ekspresyonunun belirlemek için de immünohistokimyasal boyama prosedürü uygulanmıştır.

### Histolojik Analiz

Doku örnekleri histolojik incelemelerde kullanılmak üzere %10'luk formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, tespit işleminden sonra dokulara rutin doku takip aşamaları uygulanarak parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan 5-6  $\mu$ m'lik kesitler, genel histolojik yapıyı görmek amacıyla hematoksilin-eozin (H&E) ile boyanarak olympus BX51 mikroskobu altında incelenmiştir.

### Immunohistokimyasal Analiz

Kalp dokusunda oluşan TNF- $\alpha$  ve BNP ekspresyonundaki farklılıkları belirlemek için avidin-biotin-peroksidaz yöntemiyle işaretleme yapılmıştır. Bunun için alınan 5-6  $\mu$ m lik kesitler bir gece 60°C'de tutulacak, önce ksilen sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmiş, daha sonra fosfat tampon (PBS) ile 3 defa 5'er dakika yıkanan kesitler, antijen geri kazanımı için %5'lik sitrat tamponu ile mikrodalga fırında 600W'de 3X5 defa kaynatılmıştır. 20 dakika oda ısısında aynı tampon solüsyon içinde bekletildikten sonra PBS ile tekrar yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 5 dakika %3 hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile muamele edilmiş ve sonraki aşamalar için ABC staining system boyama kiti kullanılmıştır. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 20 dakika blok serum uygulanmıştır. Hemen ardından kesitler primer antikor (TNF- $\alpha$  ve BNP için ayrı ayrı) damlatılarak 1 gece +4°C'de bekletilmiş ve ertesi gün 20 dakika

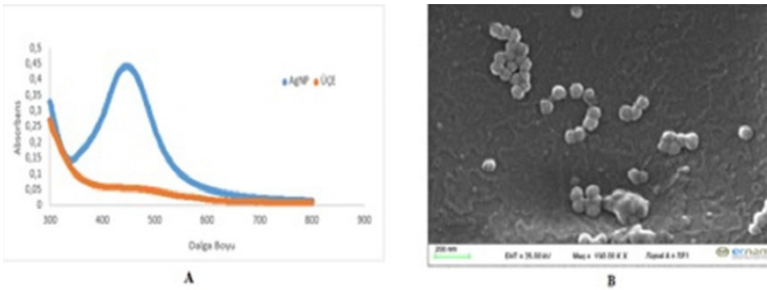
inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak, primer antikor yerine PBS kullanılmıştır. Yıkama işleminden sonra kesitler biotinli sekonder antikor ile 30 dakika inkübe edilmiş ve ardından yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Daha sonra Avidin-Biotin (AB) enzim ayracı ile 30 dakika muamele edilen kesitler yıkanarak immunreaktiviteyi görünür hale getirmek için diaminobenzidin (DAB) özelliği gösteren kitteki peroksidaz substrat ile 5 dakika muamele edildikten sonra 5 dakika deiyonize H<sub>2</sub>O ile yıkanmış, Gill hematoksilen ile karşıt boyanan kesitler birkaç kez deiyonize H<sub>2</sub>O ile yıkanmıştır. Son aşama olarak artan alkol serileri ile su uzaklaştırılarak ksilden geçirilen kesitler entellan ile kapatılmıştır. Olympus BX51 model ışık mikroskobu altında DP71 model dijital fotoğraf makinesi ile elde edilen görüntüler ekspresyon farklılığı açısından image j yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.

### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS22 programı kullanıldı. Elde edilen ekspresyon değerleri, TUNEL pozitif hücre sayısı sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılması için parametrik testlerden One – way Anova testi uygulandı. Çoklu karşılaştırma post-Hoc Tukey testi ile yapıldı.

### SONUÇLAR

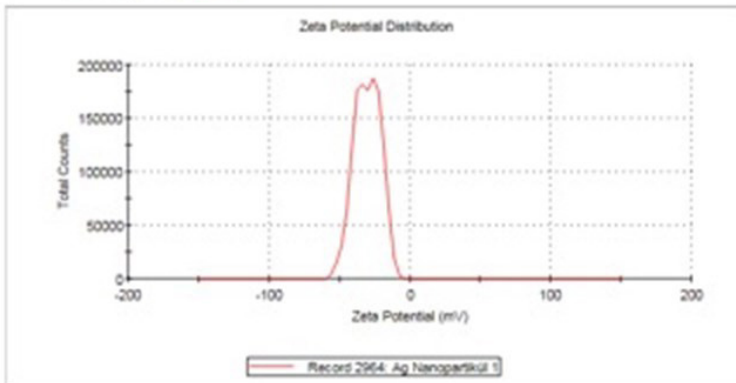
Üzüm Çekirdeği Ekstresi (ÜÇE) AgNP kompleksindeki Ag<sup>+</sup> iyonunun Ag<sup>0</sup> iyonuna indirgenmesi, yüzey plazmon rezonansının uyarılmasını sağlamıştır ve sonuç olarak UV-Vis spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. UV-Vis ölçümlerine göre 420-470 nm dalga boyunda AgNP oluşması beklenir. Yapılan ölçüm sonucunda ~ 453 nm dalga boyunda spektrum elde edilmiştir (Şekil 1.A). Taramalı elektron mikroskobu analizi ile AgNP'lerin küresel şekilli ve ortalama olarak büyüklüklerinin de 67.20  $\pm$  5 nm olduğu belirlenmiştir (Şekil 1. B).



Şekil 1. A. Yapılan ölçüm sonucunda ~ 453 nm dalga boyunda spektrum B. Taramalı elektron mikroskobu analizi ile AgNP'lerin küresel şekilli ve ortalama olarak büyüklüklerinin de 67.20  $\pm$  5 nm

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -30,4	Peak 1: -37,0	66,2	5,84
Zeta Deviation (mV): 8,74	Peak 2: -19,3	33,8	3,58
Conductivity (mS/cm): 0,0206	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality Good



Şekil 2. AgNP'lerin elektriksel yükü zeta analizi ile belirlenmiştir. Yapılan ölçüm sonuçlarına göre AgNP elektriksel yükü -30,4 olarak tespit edilmiştir.



AgNP'lerin elektriksel yükü zeta analizi ile belirlenmiştir. Yapılan ölçüm sonuçlarına göre AgNP elektriksel yükü -30,4 olarak tespit edilmiştir (Şekil 2).

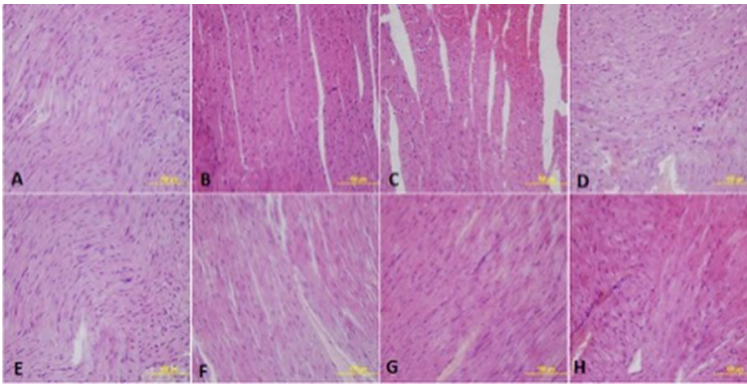
### Histolojik Bulgular

Hemotoksilen eozin boyama ile kalp dokusunda genel yapı gözlemlendi. Kontrol ve ilaç uygulanan gruplarda sağlıklı normal bir görüntü görüldü. LPS uygulanan grupta hücre çekirdeklerinde küçülme ve yapısal olarak

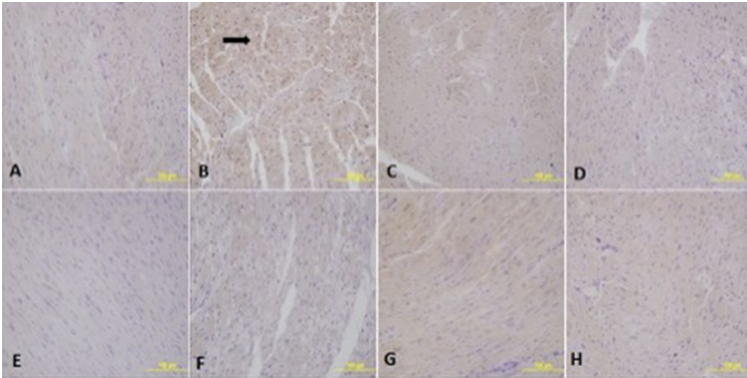
düzensizlik görüldü. LPS ile birlikte ilaç uygulanan gruplarda normale yakın görüntü gözlemlendi (Şekil 3).

### Immunohistokimyasal bulgular

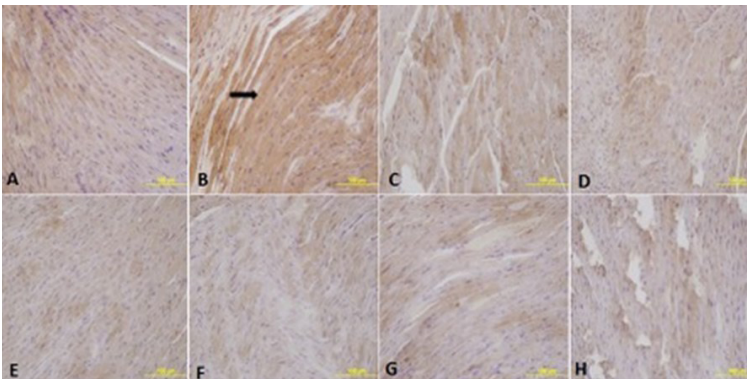
TNF- $\alpha$  ve BNP immünreaktivite sonuçlarının LPS grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı Tablo 1' de gösterilmiştir. LPS ile birlikte ilaç uygulanan gruplarda kontrol grubuna yakın bir sonuç görülmüştür (Şekil 4-5-6).



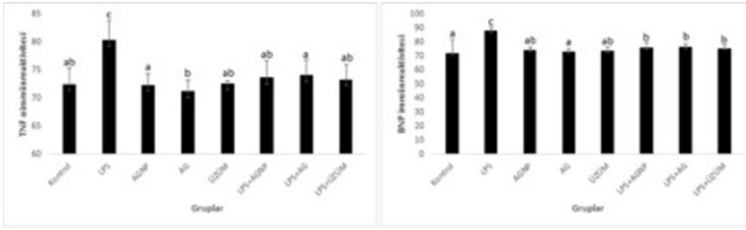
**Şekil 3.** Kontrol grubu (A), LPS grubu (B), AgNP grubu (C), Ag grubu (D), Üzüm Çekirdeği ekstresi grubu (E), LPS+AgNP grubu (F), LPS+Ag grubu (G) ve LPS+Üzüm Çekirdeği ekstresi grubu (H) gösterilmiştir. Görüntü büyütmesi X400.



**Şekil 4.** Kontrol grubu (A), LPS grubu (B), AgNP grubu (C), Ag grubu (D), Üzüm Çekirdeği Ekstresi grubu (E), LPS+AgNP grubu (F), LPS+Ag grubu (G) ve LPS+Üzüm Çekirdeği Ekstresi grubu (H) TNF- $\alpha$  görüntüleri gösterilmiştir. Ok ile boyanmış alanlar gösterilmektedir. Görüntü büyütmesi X400.



**Şekil 5.** Kontrol grubu (A), LPS grubu (B), AgNP grubu (C), Ag grubu (D), Üzüm Çekirdeği Ekstresi grubu (E), LPS+AgNP grubu (F), LPS+Ag grubu (G) ve LPS+Üzüm Çekirdeği Ekstresi grubu (H) BNP görüntüleri gösterilmiştir. Ok ile boyanmış alanlar gösterilmektedir. Görüntü büyütmesi X400.



Şekil 6. TNF- $\alpha$  ve BNP immünreaktivite sonuçları gösterilmektedir.

## TARTIŞMA

Mikroorganizmalar ve bitki ekstraktları ile NP'lerin biyolojik sentezi ile ilgili çalışmalar günümüzde hızla artmıştır. Bitki orjinli polifenolik bileşikler son zamanlarda çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [8]. Üzüm ve üzüm çekirdeği özellikle zengin bir proantosiyenin kaynağıdır [9]. Proantosiyenler askorbik asit ve vitamin E'den daha fazla antioksidant aktivite ve serbest radikal kovucu etki gösterirler. Kimyasal yol ile sentez edilen NP'lerin biyolojik aktiviteleri ve in vivo çalışmalar olmasına rağmen biyolojik olarak sentezlenen NP'lerin biyolojik aktivitelerinin ve in vivo ortamda etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar oldukça azdır. Bu nedenle bizde bu çalışmada üzüm çekirdeği ekstresinin endotoksik kalp dokusu üzerine koruyucu etkisi olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki üzüm çekirdeği proantosiyenin (GSP) serbest radikalleri temizleyebildiğini, serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidatif hasarı ve miyokardiyal enfaktüs, ateroskleroz, ilaç ile oluşan karaciğer ve böbrek hasarını gibi hastalıkları önleyebildiğini göstermektedir [11].

Üzüm çekirdeğinin antioksidan etkileri ve karaciğer hepatik steatoz üzerine etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bouhamidi ve ark. [17] yapmış oldukları çalışmada üzüm çekirdeğinin ratlarda karaciğer mikrokromozomlarında çoklu doymamış yağ asitlerini azalttığını belirlemişlerdir [17].

En yaygın kullanılan nanoparçacıklardan biri olan AgNP'ler mükemmel antimikrobiyal özelliklere sahiptir ve gıdalarda, tıbbi ürünlerde ve endüstriyel kaplamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Toplum sağladıkları potansiyel yararlarına rağmen,

AgNP'lerin biyolojik yan etkileri, AgNP'ler insan gastrointestinal sistemine birkaç yoldan (hava, su, yiyecek) girip karaciğer, böbrek, akciğer ve beyin gibi organlarda birikebileceğinden dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir [18-20]. Bu nedenle, NP'ler ve canlı hücreler arasındaki etkileşimi anlamamıza katkıda bulunan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bazı çalışmalar, AgNP'lerin balıklara, farelerde ve insanlarda hücrelere girebildiklerini ve vücutta dağılabildiklerini [21-23], vücut ağırlığında azalmaya ve kan biyokimyasal parametrelerinde ve iltihabında değişikliklere yol açtıklarını [19] göstermektedir.

Elle ve arkadaşları [24] yaptıkları çalışma da in vivo olarak, ağız yoluyla verilen AgNP'lerin karaciğer ve kalbi hedef alan, oksidatif stres ve iltihaplanmaya neden olan zararlı etkilere neden olduğunu göstermişlerdir.

AgNP'ler, geniş antimikrobiyal potansiyelleri nedeniyle biyomedikal amaçlar için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Ancak hücresel sistemler üzerindeki etkileri sadece birkaç çalışmada ele alınmıştır. Adeyemi ve Faniyan [25] de yaptıkları çalışmayla AgNP'lerin lipid peroksidasyonuna neden olabileceğini ve antioksidan durumunu oksidatif strese neden olacak şekilde değiştirdiğini göstermektedir [25].

Daha önce yapılan in vitro çalışmalar, AgNP'lerin çeşitli dokulardan türetilen hücrelerde toksik olduğunu göstermiştir [26, 27]. Ayrıca, çok sayıda çalışma, inhalasyon, yutma veya intra-peritoneal enjeksiyonla uygulanan AgNP'lerin, kan dolaşımına geçme ve birkaç organda birikme yeteneğine sahip olduğunu, dolayısıyla kısmen oksidatif stres yoluyla toksisiteye neden olduğunu göstermiştir [28, 29]. NP kaynaklı oksidatif stresin, AgNP'lerin biyolojik etkilerini düzenleyen ana mekanizma olduğu varsayılmaktadır [30, 31].

AgNP'ler, karaciğer, dalak, beyin, böbrekler [32], kalp [31], akciğerler [32, 33], gibi insan vücudunun farklı organlarında birikebilir ve çökebilir. Moradi-Sardareh ve arkadaşları [34] tarafından yapılan çalışmanın sonuçları, AgNP'lerin çok düşük konsantrasyonda toksik etkilerini açıkça desteklemekte ve yaşamda kullanılacak nanoparçacık türevli uygulamaların güvenliğini doğrulayabilmek için in vivo incelemelerin gerekli olduğunu göstermektedir. Moradi-Sardareh ve arkadaşları [34] kalp patolojisini de değerlendirdikleri çalışmada endotel hücre hasarı ve kalp kası liflerinin nükleer değişiklikleri, yüksek dozlarda AgNP'lerle tedavi edilen farelerde belirgin olarak gözlemlenmiştir. Kalp dokusuyla ilgili en alakalı bulgu kas liflerinin dağılmış nükleer genişlemesi ve kas içi damarların dolgun endotelial hücreleri olarak gösterilmektedir.

Günümüzde, NP'ler doğal mevcudiyetleri, hızlı oluşumları ve çevre dostu doğaları nedeniyle farklı bitki kaynakları kullanılarak sentezlenmektedir [35]. Bizde çalışmamızda AgNP'lerle üzüm çekirdeği ekstresini birleştirdik.

Nakkala ve arkadaşları [36]'nın yaptığı çalışmada Acorus calamus'un (ACRE) sulu rizom özütü kullanılarak sentezlenmiş AgNP'ler Wistar sıçan modelinde in vitro antikanser aktivitesi ve in vivo toksisite bakımından değerlendirilmiştir. İn vivo toksisite çalışması, 29. günde AST, ALT, LDH ve TNF-a ve IL-6 gibi enflamatuvar belirteçler ve kontrol grubuna kıyasla AgNP'lerle tedavi edilen sıçanlar olduğunda önemli değişiklikler olduğunu ortaya çıkardı. Histopatolojik inceleme sonucunda 5 ve 10 mg / kg ağırlığında AgNP ile böbrek, dalak, akciğer, kalp, testis ve beyinde önemli bir değişiklik olmadığı görüldü. Ancak, AgNP'lerin 10 mg / kg ağırlığında, karaciğerde orta derecede hücre şişmesi ve vakuolar dejenerasyonu gösterdi ve bu değişiklikler, yıkama süresi sonunda tekrar normale döndü. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, düşük konsantrasyonlardaki yeşil sentezlenen AgNP'lerin çevre dostu doğaya sahip birçok yönden yararlı olabileceğini göstermektedir. Bu konuda yapılan daha önceki Önceki çalışmalarda da NP'lerle tedavi edildiğinde enflamatuvar belirteçlerin seviyelerinde değişiklikler olduğu da belirtildi [37, 38].

Sulaiman ve arkadaşları [39] yaptıkları çalışmayla

AgNP'lerin oral uygulamasının bazı biyokimyasal parametreler ve doku morfolojisi üzerindeki biyokimyasal etkisi değerlendirilmiştir. Histolojik incelemelerde sıçan kardiyak, renal ve hepatik dokularda NP uygulamasının neden olduğu, inflamasyon, hiperkromik anemi, glomerüllerin polimorf infiltrasyonu ve hücresel dejenerasyonu içeren hücresel morfolojik lezyonlar saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da kontrol grubunda normal kalp dokusu gözlenirken, LPS uygulanan gruplarda hücre çekirdeklerinde küçülme ve yapısal olarak düzensizlik görüldü. Ag, Üzüm çekirdeği ekstresi ve AgNP uygulanan gruplarda kontrole yakın histolojik yapı gözlenirken LPS ile birlikte Ag, Üzüm çekirdeği ekstresi ve AgNP uygulanan gruplarda ise yine kontrol grubuna yakın kalp histolojisi gözlemlendi.

Literatürde, birçok hastalığa bağlı olarak ortaya çıkan kardiyak etkilerin belirlenmesinde plazma BNP düzeylerinin kullanılması ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır [40]. Yapılan son çalışmalarda da kalbin işlev bozukluklarının yanı sıra iskemik kalp hastalıklarında da BNP düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir [41, 42].

BNP, ventriküler hipertrofi gibi ventriküler duvar stresindeki artışa cevap olarak salgılanır ve kalp iskemisinde ve ciddi kalp yetmezliğinde görülen bir dizi durumda yüksek konsantrasyonlarda saptanabilir [43].

Gao ve arkadaşları [44] tarafından yapılan akut kardiyak disfonksiyon sonrası sıçan miyokard dokusunda BNP ekspresyonunu ve adli tıp uygulamasında kardiyak disfonksiyon tanısında BNP'nin rolünü araştırdıkları çalışmada BNP'nin pozitif boyanma derecesi, kardiyak disfonksiyon süresince geçen süre boyunca artmıştır. BNP ekspresyonu, kardiyomiyositlerde 1 saat ile 2 saat arasında hafif pozitif, 4 saat ile 6 saat arasında, ifade orta düzeyde pozitifken, 10 saat ile 12 saat arasında, BNP en güçlü pozitif ifadeyi göstermiştir. BNP'nin ekspresyonu, Western blotlama ve gerçek zamanlı RT-PCR ile kardiyak disfonksiyonun artan zamanı ile anlamlı bir artış sağlamıştır. Dong ve arkadaşları [45] tarafından yapılan çalışmada BNP düzeyleri serumda ELISA metodu ile ölçülmüştür. Kontrol grubuna kıyasla MI gruplarında BNP düzeyleri önemli derecede yüksek

bulunmuştur. MI gruplarının kendi aralarındaki farkın ise anlamlı olmadığı görülmüştür.

Ogawa ve Bolt [14], natriüretik peptidlerin ANF ve BNP'nin LPS kaynaklı sepsiste ekspresyonunu ve salgılanmasını ve sitokinler ve diğer biyolojik olarak aktif maddelerle ilişkisini araştırdıkları çalışma da LPS uygulamasının plazma ANF ve BNP seviyelerini, kardiyak içeriği ve BNP'nin gen ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Akut koroner sendrom, konjestif kalp yetmezliği veya hipertansif kalp hastalığı gibi kardiyak patolojilere, natriüretik peptidlerin ANF ve BNP'nin plazma konsantrasyonunda bir artış eşlik eder [46]. Gerçekten de, sol ventrikül sistolik disfonksiyonunun herhangi bir klinik veya ekokardiyografik kanıtı olmadan septik hastalarda plazma BNP yükselmesi oluşabildiği gösterilmiştir [47].

Yukarıdaki gözlemler ve kardiyak hastalığın biyobelirteçleri olarak plazma natriüretik peptidlerinin özgülüğü üzerindeki olası etkileri ile ilgili olarak, ağır sepsis veya septik şok hastalarında hem atriyal natriüretik faktör (ANF) hem de BNP kan düzeylerinde artış olduğunu bildirmiş ve sepsis veya septik şokun teşhisi ve prognozu için kanda natriüretik peptid düzeylerinin ölçülmesinin yararlı olacağı önerilmiştir [48-50].

Bizde yaptığımız çalışmada kalp dokusunda BNP ve TNF- $\alpha$  ekspresyonunu belirledik. Buna göre LPS uygulanan gruplarda diğer gruplara kıyasla anlamlı bir artış olurken Ag, Üzüm çekirdeği ekstresi ve AgNP uygulanan gruplarda ekspresyon oranları kontrol grubuna oldukça yakın, LPS ile birlikte Ag, Üzüm çekirdeği ekstresi ve AgNP uygulanan gruplarda LPS ile artan ekspresyon düzeylerinin düşürüldüğü gözlenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Kasthuri J, Veerapandian S, Rajendiran N. Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agent. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009;68(1):55-60. doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.09.021. PubMed PMID: 18977643.
2. Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Au nanoparticles target cancer. *Nanotoday*. 2007;2(1):18-29.
3. Hartung GA, Mansoori GA. In vivo General Trends, Filtration and Toxicity of Nanoparticles *J Nanomater Mol Nanotechnol* 2013;2(3).
4. Li JJ, Zou L, Hartono D, Ong C-N, Bay B-H, Lanry Yung L-Y. Gold nanoparticles induce oxidative damage in lung fibroblasts in vitro. *Advanced Materials* 2007;20(1):138-42.
5. Bihari P, Vippola M, Schultes S, Praetner M, Khandoga AG, Reichel CA, et al. Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Part Fibre Toxicol*. 2008;5:14. doi: 10.1186/1743-8977-5-14. PubMed PMID: 18990217; PubMed Central PMCID: PMCPMC2584664.
6. Flippo E, Serra A, Buccolieri A, Manno D. Green synthesis of silver nanoparticles with surose and maltose: Morphological and structural characterization. *J Non-Crystalline Solids*. 2010;356(6-8):344-50.
7. Salam HA, Rajiv P, Kamaraj M, Jagadeeswaran P, Gunalan S, Siv-araj R. Plants: green route for nanoparticle synthesis. *Int Res J Biol Sci*. 2012;1(5):85-90.
8. 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. PubMed PMID: 19898857; PubMed Central PMCID: PMCPMC2813915.
9. Silva RC, Rigaud J, Cheynier V, Chemina A. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*. 1991;30(4):1259-64.
10. 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. PubMed PMID: 24925249.
11. 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. PubMed PMID: 19627194.
12. Karakılıç E, Karaca MA, Bozkurt Ş, Coşkun F, Sivri B. BNP Nedir? Acil Serviste Beyin Natriüretik Faktör (BNP) Kullanımı. *Akademik Acil Tıp dergisi*. 2005;3(5):7-10.
13. Ruskoaho H. Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. *Endocr Rev*. 2003;24(3):341-56. doi: 10.1210/er.2003-0006. PubMed PMID: 12788803.
14. Ogawa T, de Bold AJ. Brain natriuretic Peptide production and secretion in inflammation. *J Transplant*. 2012;2012:962347. doi: 10.1155/2012/962347. PubMed PMID: 23251786; PubMed Central PMCID: PMCPMC3515950.
15. 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. PubMed PMID: 23453303.
16. 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 oxidativestress in liver of rats treated with carbon tetrachloride. *Global J Pharmacol*. 2013;7(3):258-69.
17. Bouhamidi V, Prevost V, Nouvelot A. High protection by grape seed proanthocyanidins (GSPC) of polyunsaturated fatty acids against UV-C induced peroxidation. *Life Sci* 1998;321(1):31-8.
18. Cha K, Hong HW, Choi YG, Lee MJ, Park JH, Chae HK, et al. Comparison of acute responses of mice livers to short-term expo-



- sure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol Lett.* 2008;30(11):1893-9. doi: 10.1007/s10529-008-9786-2. PubMed PMID: 18604478.
19. Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol.* 2008;20(6):575-83. doi: 10.1080/08958370701874663. PubMed PMID: 18444010.
20. Sung JH, Ji JH, Yoon JU, Kim DS, Song MY, Jeong J, et al. Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhal Toxicol.* 2008;20(6):567-74. doi: 10.1080/08958370701874671. PubMed PMID: 18444009.
21. 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. PubMed PMID: 24266757.
22. 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. PubMed PMID: 24711700; PubMed Central PMCID: PMC3969345.
23. 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. PubMed PMID: 25448069.
24. Ebabe Elle R, Gaillet S, Vide J, Romain C, Lauret 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. PubMed PMID: 23933361.
25. Adeyemi OS, Faniyan TO. Antioxidant status of rats administered silver nanoparticles orally. *Journal of Taibah University Medical Sciences* 2014;9(3):182-6.
26. Miura N, Shinohara Y. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(3):733-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.039. PubMed PMID: 19836347.
27. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol Lett.* 2008;179(2):93-100. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.04.009. PubMed PMID: 18508209.
28. Comfort KK, Maurer EI, Braydich-Stolle LK, Hussain SM. Interference of silver, gold, and iron oxide nanoparticles on epidermal growth factor signal transduction in epithelial cells. *ACS Nano.* 2011;5(12):10000-8. doi: 10.1021/nn203785a. PubMed PMID: 22070748.
29. Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett.* 2008;179(3):130-9. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.04.015. PubMed PMID: 18547751.
30. Klein S, Dell'Arciprete ML, Wegmann M, Distel LV, 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. PubMed PMID: 23535374.
31. 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. PubMed PMID: 20719239.
32. 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. PubMed PMID: 19928170.
33. 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 4:547-51. doi: 10.1289/ehp.01109s4547. PubMed PMID: 11544161; PubMed Central PMCID: PMC3969345.
34. Moradi-Sardareh H, Basir HRG, Hassan ZM, Davoudi M, Amidi F, Paknejad M. Toxicity of silver nanoparticles on different tissues of Balb/C mice. *Life Sci.* 2018;211:81-90. doi: 10.1016/j.lfs.2018.09.001. PubMed PMID: 30189219.
35. Konwarh R, Gogoi B, Philip R, Laskar MA, Karak N. Biomimetic preparation of polymer-supported free radical scavenging, cytocompatible and antimicrobial "green" silver nanoparticles using aqueous extract of Citrus sinensis peel. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011;84(2):338-45. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.01.024. PubMed PMID: 21316933.
36. Nakkala JR, Mata R, Raja K, Khub Chandra V, Sadras SR. Green synthesized silver nanoparticles: Catalytic dye degradation, in vitro anticancer activity and in vivo toxicity in rats. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018;91:372-81. doi: 10.1016/j.msec.2018.05.048. PubMed PMID: 30033267.
37. Byrne JD, Baugh JA. The significance of nanoparticles in particle-induced pulmonary fibrosis. *McGill J Med.* 2008;11(1):43-50. PubMed PMID: 18523535; PubMed Central PMCID: PMC32322933.
38. Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, et al. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med.* 2007;64(9):609-15. doi: 10.1136/oem.2005.024802. PubMed PMID: 17409182; PubMed Central PMCID: PMC3969345.
39. Sulaiman FA, Adeyemi OS, Akanji MA, Oloyede HOB, Sulaiman AA, Olatunde A, et al. Biochemical and morphological alterations caused by silver nanoparticles in Wistar rats. *Journal of Acute Medicine* 2015;5(4):96-102.
40. Tsai SH, Lin YY, Chu SJ, Hsu CW, Cheng SM. Interpretation and use of natriuretic peptides in non-congestive heart failure settings. *Yonsei Med J.* 2010;51(2):151-63. doi: 10.3349/ymj.2010.51.2.151. PubMed PMID: 20191004; PubMed Central PMCID: PMC3969345.
41. Goetze JP, Christoffersen C, Perko M, Arendrup H, Rehfeld JF, Kastrup J, et al. Increased cardiac BNP expression associated with myocardial ischemia. *FASEB J.* 2003;17(9):1105-7. doi: 10.1096/fj.02-0796fje. PubMed PMID: 12709407.
42. Mollmann H, Nef HM, Kostin S, Dragu A, Maack C, Weber M, et al. Ischemia triggers BNP expression in the human myocardium

independent from mechanical stress. *Int J Cardiol.* 2010;143(3):289-97. doi: 10.1016/j.ijcard.2009.03.012. PubMed PMID: 19329198.

**43.** Kailash NP. Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides.* 2004;26(6):901-32.

**44.** Gao WM, Cao ZP, Mi L, Du ZB, Maeda H, Zhu BL. [Expression of BNP in rat myocardial tissue after acute cardiac dysfunction]. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 2013;29(2):86-90. PubMed PMID: 23930498.

**45.** Dong X, Wang C, Zhang J, Wang S, Li H, Kang Y, et al. Cholecystokinin Expression in the Development of Postinfarction Heart Failure. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43(6):2479-88. doi: 10.1159/000484454. PubMed PMID: 29130944.

**46.** Ramos H, de Bold AJ. Gene expression, processing, and secretion of natriuretic peptides: physiologic and diagnostic implications. *Heart Fail Clin.* 2006;2(3):255-68. doi: 10.1016/j.hfc.2006.08.005. PubMed PMID: 17386895.

**47.** Shor R, Rozenman Y, Bolshinsky A, Harpaz D, Tilis Y, Matas Z, et al. BNP in septic patients without systolic myocardial dysfunction. *Eur J Intern Med.* 2006;17(8):536-40. doi: 10.1016/j.ejim.2006.07.013. PubMed PMID: 17142170.

**48.** Yuçel T, Memis D, Karamanlioglu B, Sut N, Yuksel M. The prognostic value of atrial and brain natriuretic peptides, troponin I and C-reactive protein in patients with sepsis. *Exp Clin Cardiol.* 2008;13(4):183-8. PubMed PMID: 19343164; PubMed Central PMCID: PMC2663482.

**49.** Roch A. What does high NT-proBNP mean in septic shock patients? A part of the puzzle. *Crit Care.* 2007;11(2):122. doi: 10.1186/cc5728. PubMed PMID: 17442126; PubMed Central PMCID: PMC2206461.

**50.** Nikolaou NI, Goritsas C, Dede M, Paissios NP, Papavasileiou M, Rombola AT, et al. Brain natriuretic peptide increases in septic patients without severe sepsis or shock. *Eur J Intern Med.* 2007;18(7):535-41. doi: 10.1016/j.ejim.2007.01.006. PubMed PMID: 17967335.