فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۲۰، جلد ۶، شماره ۱، زمستان ۹۱، صفحه ۵۷ تا ۶۲

# بررسی تاثیر تزریق نانوذرات نقره بر وزن بدن، اندیکس کبدی و اندیکس طحالی در موش رت

حسین حمزه ای[۱]، **حامدعلیزاده[۲]**، نادرحاجی زاده[۳]، محمدتقی معاضد[۴]
۱-آزمایشگاه تحقیقات فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.
۲-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، زنجان، ایران. Hamedalizadeh1986@yahoo.com
۳-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ایلخچی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، ایلخچی، ایران.
٤-پژوهشگر نانوتکنولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

**تاریخ دریافت:۹۱/۹/۱٦ تاریخ پذیرش:۹۱/۱۲/۱۵**

## چکیده

**زمینه و هدف: نانو ذرات نقره ممکن است اثرات سمی داشته باشند که مکانیسم سمیت آنها روشن نیست و نگرانی های زیادی را در ارتباط با استفاده در طبیعت برای سلامتی انسان ها به وجود آورده است. میزان تغییرات در وزن بدن، اندیکس کبدی و اندیکس طحالی می تواند در شناسایی مخرب بودن یک فاکتور در بدن موثر باشد. این مطالعه به منظور بررسی اثر نانوذرات نقره بر وزن بدن و اندیکس کبدی و طحالی در موش رت انجام شد.**

**روش کار: ۲۱ سر موش صحرایی ماده نژاد اسپیرال به صورت تصادفی به ۷ گروه تقسیم شدند.موش ها وزن شدند.گروه اول به عنوان گروه شم،گروه دوم به عنوان گروه کنترل وگروه های سوم تا هفتم به عنوان گروه های آزمون به ترتیب با ۵، ۱۰، ۲۰، ٤۰ و ۸۰ ppm از نانوذرات نقره تیمار گردیدند. تیمار موش ها به مدت ۱۰ روز ادامه یافت سپس موش ها در روز یازدهم با بیهوشی در اتر کشته شدند. موش ها وزن شدند و پس از تشریح، کبد و طحال خارج شده و به منظور محاسبه اندیکس کبدی و طحالی وزن گردیدند.**

**یافته‌ها: نتایج این مطالعه تغییر معنی داری در وزن بدن موش، وزن طحال، وزن کبد و اندیکس های کبدی و طحالی نشان نداد.**

**نتیجه گیری: تزریق داخل صفاقی نانوذرات نقره تاثیری بر اندیکس کبدی و طحالی موش رت ندارد.**

**واژه‌های کلیدی:** نانوذرات نقره، اندیکس کبدی، اندیکس طحالی، وزن موش.

## مقدمه

فلز نقره به دلیل خاصیت ضد میکروبی در گذشته کاربردهای فراوانی داشته و بیشتر برای نگه داری از آب آشامیدنی، ترمیم زخم های سوختگی و جلوگیری از عفونت های گونوکوکی نوزادان مورد استفاده بوده است. همچنین نقره غیر سمی و non tolerant می باشد (۶، ۴). با ظهور آنتی بیوتیک ها، استفاده از این مواد کمرنگ شد اما امروزه به دلیل مقاومت های میکروبی و همچنین طیف وسیع اثر نقره، استفاده از این مواد رونق گرفته است. تفاوت در این است که امروزه استفاده از این مواد در فرمول های جدید مانند: مواد نانومقیاس به کار می رود. همچنین ویژگی های منحصربه فرد فیزیکوشیمیایی، می‌توانند مواد بسیار خوبی برای ضدعفونی باشند. به دلیل همین اثرات ضد میکروبی، این مواد در بسیاری از محصولات تجاری بهداشتی، پزشکی و دندانپزشکی مورد استفاده قرار می گیرند (۲). این محصولات سالیانه میلیاردها دلار سود عاید شرکت های سازنده خود می کنند. این شرکت ها با استفاده از نانوذرات نقره محصولاتی از قبیل پوشش های زخم، پوشاک، سرامیک و اسپری های ضد میکروبی ساخته اند و حتی ماشین لباسشویی و یخچال هایی با پوشش نانونقره تولید کرده اند (۳). نانو ذرات نقره، ذراتی با اندازه ۱۰۰-۱ نانومتر هستند که استفاده از آن ها در مقابله با عفونت‌ها روز به روز در حال افزایش است به طوری که نانو ذرات نقره امروزه به طور وسیعی در

پزشکی جهت مقابله با این که میکروب ها مورد استفاده قرار می گیرد (۵، ۱). نقره به طور طبیعی در اغلب بافت های بدن حضور دارد ولی نقش زیستی آن دقیقاً مشخص نیست. برخی معتقدند برای عملکرد مطلوب سیستم ایمنی، همه افراد نیازمند وجود ذرات نقره در بدن شان می باشند. از طرفی نقره در کبد متابولیزه نشده و از کلیه ها دفع نمی گردد لذا پیش بینی می شود در اثر مصرف زیاد در بدن تجمع یابد. نانوذرات نقره شامل سوسپانسیون آب خالص دیونیزه با نقره می باشد که در آن حدود ۸۰ درصد نقره به فرم نانوذرات نقره فلزی و بقیه به صورت نقره یونیزه (کلوئیدی) هستند (۱۶). علیرغم شباهت این محلول با کلوئید، تفاوت آن ها در ابعاد ذرات می باشد. نانوذرات نقره نه تنها به لحاظ ابعاد کوچک‌ترند بلکه به علت خنثی بودن، بر یون‌های کلوئیدی نقره برتری دارند. سطح تماس این ذرات با محیط به نسبت ذرات کلوئید افزایش چشم‌گیری دارد که به نوبه خود نه تنها اثرگذاری آن ها را افزایش می‌دهد، بلکه جذب و نفوذ این ذرات در سلول‌ها را بهبود می بخشد. هم‌چنین در محلول‌های نانونقره، شکل ذره ای یا فلزی نقره که فرم فعال آن است نسبت به شکل یونی بیشتر است. نقره یونی در معده و خون به شکل کلرید نقره کم محلول در می-آید که اثرگذاری بسیار کمی دارد، در حالی که نقره فلزی به اسید معده مقاومت کرده و درون بدن به شکل فعال باقی می ماند. در معده و خون تنها ۵ تا ۱۰ درصد یون های نقره فعالیت خود را حفظ می کنند. بهترین محلول کلوئیدی از نظر اندازه، حداقل ۵ برابر بزرگ‌تر و از نظر غلظت، شکل فلزی تا ۸ برابر ضعیف تر از محلول نانونقره است. بنابراین محلول نانونقره حداقل تا ۴۰ برابر تاثیرگذارتر از محلول‌های کلوئیدی است (۱۱، ۲). از آنجایی که تغییرات میزان اندیکس های کبدی و طحالی و تاثیر یک ماده به کاهش یا افزایش وزن بدن یکی از فاکتورهای مورد توجه در استفاده بیولوژیک از یک ماده محسوب می شود (۱۰)، لذا هدف از این مطالعه بررسی تاثیر تزریق نانوذرات نقره بر وزن بدن، اندیکس کبدی و اندیکس طحالی در موش رت می باشد تا بتوان یکی از فاکتورهای مورد توجه در استفاده از نانوذرات نقره را مورد بررسی قرار داد.

## مواد و روش ها

### مواد مورد استفاده

نانوذرات نقره با غلظت ppm ۴۰۰۰، دارای شکل کروی و به قطر ۱۸-۳ نانومتر با نام تجاری NANOCOLLOID از شرکت NANOCIDE تهیه شدند. آب مقطر دیونیزه از آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم پزشگی زنجان تهیه شد. ۲۱ سر موش صحرایی ماده نژاد اسپیرال بالغ ۸-۶ هفته ای از موسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی کرج تهیه گردید. به حیوانات پس از انتقال به محل انجام آزمایش یک هفته فرصت داده شد تا به محیط جدید سازگاری پیدا کنند. حیوانات در شرایط دمایی ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط نوری استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد و امکان دسترسی به آب و غذا به صورت یکسان نگه‌داری شدند. قفس‌های نگه-داری در هفته ۳ بار شسته و در کف آن تراشه های ظریف چوب ریخته می شد. شیشه های آب روزانه کنترل و تمیز می شد.

### روش کار

موش‌ها به صورت تصادفی به ۷ گروه ۳ تایی تقسیم شدند و هر گروه در قفس جداگانه و در یک شرایط نگه‌داری شدند. گروه اول به عنوان گروه شم هیچ‌گونه تیماری را دریافت نکردند، گروه دوم به عنوان گروه کنترل با نرمال سالین تیمار شدند، گروه‌های سوم تا هفتم به عنوان گروه‌های آزمون به ترتیب با ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ ppm از نانوذرات نقره تیمار گردیدند. تیمار

موش‌ها به مدت ۱۰ روز و هر روز یک‌بار در میان سیکل روشنایی (ساعت ۱۲ ظهر) موش ها انجام گردید. تیمار بدین ترتیب بود که پس از گرفتن و مهار موش‌ها ۱ میلی لیتر از تیمار مورد نظر به صورت داخل صفاقی به آن ها تزریق می‌شد. پس از ۲۴ ساعت از آخرین تزریق، موش‌ها به وسیله دی اتیل اتر، ابتدا بیهوش و سپس کشته شدند. موش‌ها دوباره وزن شدند. برای محاسبه ی میزان اندیکس طحالی، وزن طحال بر حسب میلی‌گرم بر وزن موش بر حسب گرم تقسیم شد. برای محاسبه‌ی میزان اندیکس کبدی، وزن کبد بر حسب میلی‌گرم بر وزن موش بر حسب گرم تقسیم شد (۱۷، ۹، ۷).

**تجزیه و تحلیل آماری**

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون ANOVA One-Way (تحلیل واریانس یک طرفه) و انجام تست LSD در محیط SPSS و محاسبات و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel صورت گرفت (۱۴).

## نتایج

نتایج مربوط به میانگین وزن موش ها در گروه های مختلف که در جدول ۱ آمده است نشان داد که نانوذرات نقره باعث تغییر معنی دار بین گروه‌های مختلف نشده است. تحلیل آماری نتایج وزن موش ها اختلاف معنی‌داری در گروه های دریافت کننده نانوذرات نقره و گروه کنترل و گروه شم نشان نداد (جدول ۱).

**جدول ۱- مقادیر مختلف بر وزن بدن موش صحرایی بر حسب گرم**

| گروه ها | میانگین ± انحراف معیار |
|---|---|
| گروه ۱ شم | ۱۷۱±۱ |
| گروه ۲ کنترل | ۱۶۲/۳±۲/۵ |
| گروه ۳ نانوذرات نقره ۵ ppm | ۱۸۳/۳±۱۵ |
| گروه ٤ نانوذرات نقره ۱۰ ppm | ۱۸۲/۳±۱۷ |
| گروه ۵ نانوذرات نقره ۲۰ ppm | ۱۷۷/٦±٤/۱ |
| گروه ٦ نانوذرات نقره ٤۰ ppm | ۱۷۱/۱±۵ |
| گروه ۷ نانوذرات نقره ۸۰ppm | ۱۷۳/۳±۰/۵۷ |

نتایج مربوط به میانگین وزن طحال در گروه های مختلف این مطالعه در جدول ۲ آورده شده است. تحلیل آماری نشان داد که گروه ۳ که با غلظت۵ ppm نانوذرات نقره تیمار شده بود اختلاف معنی داری با سایر گروه‌ها دارد اما دیگر گروه‌ها با هم‌دیگر اختلاف معنی داری در وزن طحال نشان ندادند (جدول ۲).

**جدول ۲- میانگین وزن طحال موش ها بر حسب میلی گرم**

| گروه ها | میانگین ± انحراف معیار |
|---|---|
| گروه ۱ شم | ۸۰٦/٦±۵/۷ |
| گروه ۲کنترل | ۷۰۳/۳±۱۵/۲ |
| گروه ۳ نانوذرات نقره ۵ ppm | ۸۸٦/٦±٦۰/۲ |
| گروه ٤ نانوذرات نقره ۱۰ ppm | ۷۵۰±۷٦/۳ |
| گروه ۵ نانوذرات نقره ۲۰ ppm | ۷۰٦/٦±۷۳/۷ |
| گروه ٦ نانوذرات نقره ٤۰ ppm | ۷۰۳/۳±۵/۷ |
| گروه ۷ نانوذرات نقره ۸۰ppm | ۷۵٦/٦±۱۸۳/۳ |

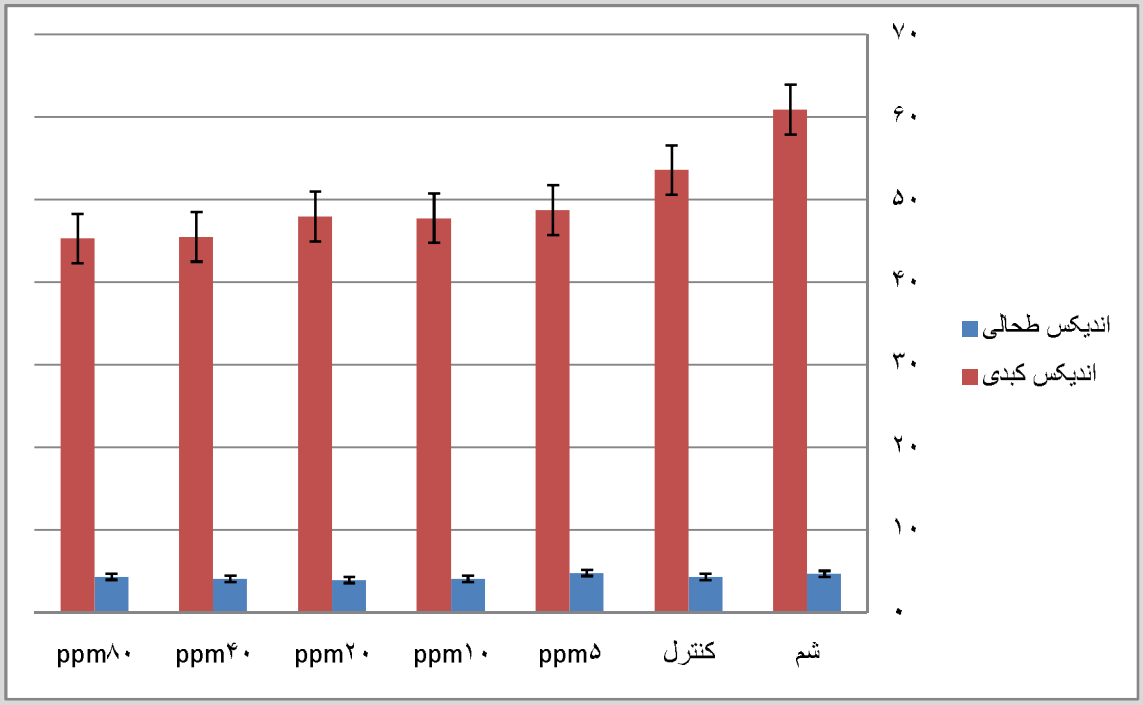
نتایج مربوط به میانگین وزن کبد در موش ها در جدول ۳ نشان داده شده است. آنالیز آماری نشان داد که گروه شم و گروه کنترل اختلاف معنی داری با تمام گروه‌ها دارد.هم‌چنین گروه های ۲ و ۳ اختلاف معنی-داری با گروه‌های ۶ و ۷ دارند (جدول ۳).

**جدول ۳- میانگین وزن کبد موش ها بر حسب میلی گرم**

| گروه ها | میانگین ± انحراف معیار |
|---|---|
| گروه ۱ شم* | ۱۰٤۲۳/۳±٥۳۲ |
| گروه ۲ کنترل | ۸۷۰٦/٦±٤۳٥ |
| گروه ۳ نانوذرات نقره ٥ ppm | ۸۹٤۰±٥۲۳ |
| گروه ٤ نانوذرات نقره ۱۰ ppm | ۸۷۱۳/۳±۷۷٥ |
| گروه ٥ نانوذرات نقره ۲۰ ppm | ۸٥۲٦/٦±۳/٦ |
| گروه ٦ نانوذرات نقره ٤۰ ppm | ۷۷۸٦/٦±۱٤۰ |
| گروه ۷ نانوذرات نقره ۸۰ ppm | ۷۸٥٦/٦±۲۳٥ |

* نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل

مقایسه اندیکس کبدی و طحالی گروه‌های مختلف که در نمودار ۱ نشان داده شده است. تحلیل آماری اندیکس طحالی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایش با گروه‌های شم و کنترل وجود ندارد. اما تحلیل آماری اندیکس کبدی تفاوت معنی داری بین گروه شم با گروه‌های آزمایش وجود دارد




**نمودار ۱- مقایسه اندیکس طحالی و کبدی در گروه‌های مختلف بر حسب میلی‌گرم بر وزن موش‌ها**

## بحث و نتیجه گیری

نانو تکنولوژی در حال توسعه یافتن است و در حوزه های متنوعی از قبیل سلامت، بهداشت (نظیر محصولات پر فروش آرایشی بهداشتی)، غذا و تغذیه، سلامت محیطی و کشاورزی استفاده می شود؛ لذا جای تعجب نیست که بسیاری از محصولات مهندسی شده نانو ذرات در حال حاضر در دسترس مصرف کنندگان قرار دارند (۱۸). اگرچه نانوذرات نقره به صورت گسترده در محصولات مصرفی بکار می رود، اطلاعات سم شناسی کافی در مورد آن‌ها در دسترس نمی باشد. مسیرهای ورود نانو ذرات به بدن (تنفسی، دهانی و پوستی) و انتقال آن ها به دلیل اندازه کوچک نانوذرات در مقاله های فراوان مورد بحث قرار گرفته است (۱۶). Hyun و همکاران در سال ۲۰۰۸ پس از کالبدشکافی و بررسی بافت های گروه کنترل با گروه دریافت کننده نقره نشان دادند که نانو ذره نقره با سایز ۳۲۳ نانومتر در هیچ یک از بافت ها مشاهده نگردید اما دو سایز ۲۲ و ۷۱ نانومتر در بافت ها دیده شد که سایز کوچک تر نانو نقره بیشترین جذب را در سطح سلول‌های معدی – روده‌ای داشته است. در مطالعه حاضر از نانوذرات با اندازه کوچک استفاده شده است اما تغییر معنی داری در اندیکس کبدی و طحالی و هم‌چنین وزن موش ها مشاهده نشد. بر اساس مطالعات گزارش شده آزمایشگاهی، هیچگونه تغییر قابل توجه توکسیکولوژیکی در موش هایی که ۲۸ روز در معرض نانوذرات به صورت استنشاقی بودند دیده نشد که با یافته های این مطالعه هم‌خوانی دارد (۱۱). تحلیل نتایج مربوط به تغییر میزان وزن بدن موش‌ها که در جدول ۱ ذکر شده است، نشان داد که وزن بدن موش‌ها تغییر معنی داری نداشتند و این بدین معنی است که تزریق صفاقی نانوذرات نقره تاثیری بر تغییر وزن موش‌ها در طول این مطالعه نداشته است. هم‌چنین آنالیز آماری وزن طحال موش‌ها (جدول ۲) در مجموع اختلاف معنی داری بین گروه های مختلف نشان نداد و این به معنی عدم تغییر وزن طحال موش های تیمار شده با نانوذرات نقره است. اما در تجزیه و تحلیل با روش آماری گروه ۳ که با غلظت 5ppm نانوذرات نقره تیمار شده بودند، اختلاف معنی داری نسبت به سایر گروه ها نشان داد که به لحاظ مطالعات انجام شده قابل توجیه نیست و نیازمند مطالعات بیشتری می باشد. تحلیل آماری وزن کبد موش ها اختلاف معنی داری بین گروه های آزمایش و کنترل نشان نداد اما گروه شم (گروه ۱) اختلاف معنی داری با سایر گروه ها نشان داد که حدس زده می شود به علت عدم استرس ناشی از تزریق باشد.اندیکس کبدی و طحالی نیز اختلاف معنی داری بین گروه های مختلف آزمایش نشان نداد و فقط اندیکس کبدی گروه شم با گروه های دیگر اختلاف قابل توجهی داشت که می توان با اختلاف موجود در وزن کبدی این گروه (جدول ۳) آن را توجیه نمود. در سال ۲۰۰۵ سمیت نانوذرات مختلف از جمله نانوذرات نقره را بر کبد موش صحرا یی مورد ارزیابی قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض میتوکندری نشت قابل ملاحظه و وابسته به دوز لاکتات دهیدروژناز را مشاهده کردند (۱۵). از طرفی Moudgi و همکاران در سال ۲۰۰۶ ، نشان دادند که تاثیر نانوذرات بر روی سلول های موجودات زنده به قطر، شکل و اندازه نانوذرات بستگی دارد (۱۳). اخیرا گزارش شده است که ذرات نانو، رادیکال آزاد و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کنند و با مکانیسم استرس اکسایشی یعنی حمله رادیکال‌های آزاد به بافت‌ها، می‌توانند به اندام‌ها و بافت‌های مختلف آسیب برسانند (۸). هر کدام از این روش‌های ورود ممکن است تاثیرات قابل توجهی به قسمت های مختلف بدن وارد نماید از جمله تاثیرات عمده‌ای که می‌تواند داشته باشد و کمتر توسط محققین مورد توجه قرار گرفته است تاثیر نانوذرات نقره بر کبد و

متابولیسم آن می باشد (۱۲). مقایسه اثرات توکسیکی ذرات کوچک با ذرات بزرگ و تجمع و انتشار ذره در بافت های مغز، ریه، کبد، کلیه و بیضه به نحوه مصرف از راه دهانی یا تزریق بستگی دارد. موش هایی که نانو ذرات نقره با سایزهای متفاوت از طریق تزریق در خون را دریافت کرده بودند، نانو ذرات وارد جریان خون شده و در بافت ها مخصوصاً کلیه، کبد، طحال، مغز و ریه انباشته شده بودند در مطالعه حاضر نانوذرات نقره به صورت صفاقی تجویز می شدند اما اثری بر روی اندیکس های بافت طحال و کبد نشان ندادند که این موضوع خود می تواند به هنگام مصرف نانو مواد مورد توجه قرار گیرد. با توجه به این مشاهدات توصیه می شود یک مطالعه جداگانه اثر تزریق در خون و صفاق نانوذرات نقره را بر روی بافت های حساس بدن مورد بررسی قرار دهد تا بتوان راهکارهای جدیدی برای نوع مصرف نانوذرات نقره پیشنهاد کرد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از کارکنان مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی زنجان به خصوص آقایان محمد کاظمی و مجید احمدی کمال تشکر و قدردانی را به عمل می آورند.

## منابع

**۱**-اجلی، محسن.، صلوتی، مجتبی.، علیزاده، حامد.، حیدری، زهرا.، حمزه ای، حسین.، علیزاده، آرام.، ۱۳۸۹. اثرمهاری کانجوگه داکسی سیکلین و ناوذرات نقره بر باکتری بروسلا ملی تنسیس. مجله دنیای میکروب ها. سال سوم، شماره دوم (پیاپی۷)، ۱۰۰-۸۴.

**۲**-رضویان، سیدمحمدحسین.، صفرپور، الهام.، روشنایی، کامبیز.، یزدیان، محمدرضا.، حیدریه، نسرین.، ۱۳۸۹. بررسی تغییرات برخی پارامترهای بیوشیمیائی وهماتولوژیک درخون موش های صحرائی نژاد ویستار به موازات مصرف خوراکی نانوذرات نقره. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل. دوره ۱۳، شماره ۱. ۲۷-۲۲.

**۳**-شوندی، زینب.، غضنفری، طوبی.، نظری مقدم، کیومرث.، عبدی عالی، احیا.، ۱۳۸۹. بررسی اثر بازدارندگی نانوذرات نقره کلوییدی بر سه سویه باکتریایی و سلول های ماکروفاژ در کشت ۲۴ ساعته. مجله دانشور. سال ۱۷، شماره ۸۸. ۱۶-۹.

**۴**-علیزاده، حامد.، اجلی، محسن.، حمزه ای، حسین.، ۱۳۹۰. بررسی اثر بازدارندگی نانوذرات کلوئیدی نقره علیه سالمونلا تیفی. فصلنامه علوم زیستی. شماره پیاپی ۱۴، جلد۴، شماره۳، ۱۳۵-۱۴۰.

**۵**-علیزاده، حامد.، صلوتی، مجتبی.، شاپوری، رضا.، عبداله زاده، پیمان.، ناصریان، جواد.، ۱۳۹۰. اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره علیه بروسلا ملی تنسیس M ۱۶در شرایط آزمایشگاهی مدل حیوانی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک. سال ۱۴، شماره ۶ ویژه نامه ۳، ۶۴-۷۰.

**۶**-علیشاهی، مجتبی.، مصباح، مهرزاد.، ۱۳۸۹. مقایسه ی سمیت نانوذرات نقره (Silver Nanoparticles) در چهار گونه ی ماهی: آمور، شیربت، اسکار و سوروم. مجله علمی-پژوهشی بیولوژی دریا. سال ۲، شماره ۷. ۵۱-۴۵.

**7.**Adawi, D., Ahrne, S., Molin, G., Effects of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on bacterial translocation and liver injury in an acute liver injury model, International Journal of Food Microbiology, 2001, 70(3):213-220.

**8.**Akradi L،SohrabiHaghdoost I، Djeddi AN. Histopathologic and apoptotic effect of nanosilver in liver of broiler chickens. African Journal of Biotechnology. 2012;11(22):6207-6211.

**9.**Badawy, O. F. H., Shafii, S. S. A., Tharwat, E. E., Kamal, A. M., Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* infection, Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz, 2004, 23(3): 1011-1022.

**10.**Donato, de C., Filipe, D.T., Gioia, C., Norbert, M., Dorothee, S., Edward, B. B and Domenico O., Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-

borne pathogens, Veterinary Microbiology. 2010.

**11.**Hyun JS, Lee BS, Ryu HY, Sung JH, Chung KH, Yu IJ. Effects of repeated silver nanoparticles exposure on the histological structure and mucins of nasal respiratory mucosa in rats. Toxicol Lett 2008; 182 (1-3): 24-8.

**12.**Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. Crit Rev Toxicol 2010; 40(4): 328-46.

**13.**Moudgi¬ BM, Robert SM. Designing a sterategies for safety evaluation of nanomaterials. Partnano-interface in a microfluidic chip to probe living VI. Characterization of nanoscale particles for cells: challenges and perspectives. Toxicological Science USA.2006;103:6419-6424.

**14.**Pompei, A., Cordisco, L., Raimondi, S., Amaretti, A., Pagnoni, U. M., Matteuzzi, D., Rossi, M., In vitro comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans, Physiology and microbial chemistry, 2008, 14:280-286.

**15.**SaberMH, John JS.Toxicological highlight safety evaluation of silver nanoparticles: inhalation model for chronic exposure. Toxicological Sciences. 2009;108(2):223-224 .

**16.**Shu, Q., Gill, H. S., A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice, Medical Microbiology and Immunology, 2001, 189:147-152.

**17.**Tang J, Xi T. Status of biological evaluation on silver nanoparticles. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi 2008; 25(4): 958-61.

**18.**Wang, Y., Han, F., Hu, B., Li, J., Yu, W., In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate, Nutrition Research, 2006, 26:597-603.

**19.**Wijnhoven S, Peijneburg W, Herberts C. Nano-silver-a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. 2009;3(2):109-138.