اثرات نانوذرات نقره بر فشار اکسیداتیو در موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار

ندا نوروزی[۱]، الهه سامانی جهرمی[۲]، سمانه ذوالقدری جهرمی[۲*]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.

۲- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.

*مسئول مکاتبات: z.jahromi@ibb.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۲

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی نانوذرات نقره بر فشار اکسیداتیو در موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار می‌باشد. در این مطالعه تجربی، ۵۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار، به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. گروه کنترل (بدون تیمار)، گروه شاهد (۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرم فیزیولوژی)، گروه تجربی۱ (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی ایزونیازید)، گروه تجربی۲ (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی ایزونیازید به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره) و گروه تجربی۳ (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی ایزونیازید به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره) دریافت کردند. همه تزریق‌ها برای مدت ۱۵ روز و داروی ایزونیازید بصورت گاواژ و نانوذره نقره بصورت تزریق درون صفاقی تجویز شد. سپس تمام حیوانات بیهوش شدند و خون‌گیری انجام شد. در پایان داده‌ها توسط آزمون ANOVA در سطح معناداری $p \leq ۰/۰۵$ توسط نرم افزار SPSS بررسی گردید. نتایج نشان داد داروی ایزونیازید سبب افزایش نیتریک اکساید، کاهش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل می‌گردد. در حالی‌که تیمار حیوانات با نانوذرات نقره منجر به کاهش اثرات سوءاکسیدانی ناشی از داروی ایزونیازید با کاهش نیتریک اکساید، افزایش گلوتاتیون پراکسیداز و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل گردید. نانوذرات نقره با کاهش تولید نیتریک اکساید و افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، از بروز آسیب‌های اکسیداتیو و در نتیجه تخریب غشاء و شکنندگی گلبول قرمز جلوگیری می‌کنند. به عبارت دیگر، آزمایش‌های انجام شده نقش آنتی‌اکسیدانی نانوذرات نقره را به خوبی نشان داد.

کلمات کلیدی: نانوذرات نقره، آنتی اکسیدان، موش صحرایی، گلوتاتیون پراکسیداز.

مقدمه

ذرات نانو به ذراتی اطلاق می‌شود که قطر آنها یا میانگین آنها در حدود $۱۰^{-۹}$ متر باشد. این ذرات به لحاظ ابعاد کوچک خود، خواص فیزیکی، شیمیایی، مکانیکی، الکتریکی و مغناطیسی منحصر به فردی دارند، آزادانه وارد سلول شده و می‌توانند در روند طبیعی آن تداخل کنند (۷). نقره به عنوان یکی از قوی‌ترین مواد ضدعفونی‌کننده در دسترس می‌باشد که دارای اثرات سمی کمی نسبت به بافت پستانداران است (۲٤). فلز نقره به آهستگی تحت شرایط فیزیولوژی بدن به یون نقره تغییر پیدا کرده و با سلول باکتریایی تعامل ایجاد می‌کند (۱۵). در سال‌های اخیر مکانیسم عمل نقره بررسی شده است و به نظر می‌رسد نقره با اثر ضدباکتریایی چند سطحی، منجر به انسداد آنزیم‌های تنفسی، تغییر DNA و دیواره سلولی

باکتری می‌شود (١٦). گزارش شده که غلظت کم یون‌های نقره آزاد شده از نانوذرات نقره در شرایط آزمایشگاهی، قادر به همولیز گلبول قرمز هستند (۵). البته نانوذرات نقره نیز می‌توانند سبب همولیز و تغییر شکل گلبول‌های قرمز انسان گردند (۱۱).

بر اساس مطالعات صورت گرفته، عوارض جانبی ایجاد شده در سلول‌های انسان، در معرض نانوذرات، ممکن است به علت تولید رادیکال‌های آزاد و گونه-های اکسیژن فعال (ROS) باشد که سبب آسیب درون سلولی می‌شوند (۲۰).

مشخص‌شده است یون‌های نقره با اتصال به‌گلوتاتیون احیاء شده سبب کاهش‌آن می‌شوند، در حالی‌که گلوتاتیون احیاشده نقش مهمی در حفظ ساختار و عملکرد مناسب سلول‌های خونی و نیز از بین‌بردن پراکسیدهای آلی دارند (۸).

مولکول نیتریک اکساید از اسیدآمینه ال-آرژنین و تحت اثر گروهی از آنزیم‌ها به نام نیتریک اکساید سنتتاز در بدن تولید می‌شود. از مهم‌ترین اعمال این ملکول نقش تنظیم‌کننده تون عروقی در نتیجه تنظیم جریان خون موضعی اندام‌ها می‌باشد (۲۱، ۱۱).

محققین بیان داشتند که رادیکال‌های آزاد از جمله نیتریک اکساید، ممکن است دارای نقش مهمی در زخم‌های ایجاد شده توسط انواع مختلف استرس داشته باشد (۱۹).

هدف از این تحقیق ارزیابی مارکرهای آنتی‌اکسیدانی شامل گلوتاتیون پراکسیداز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و مارکر نیتریک اکساید تحت تاثیر نانوذرات نقره بر فشار اکسیداتیو در رت بالغ می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی، ۵۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار با سن حدود ۱۳۰-۱۲۰ روزه و وزن تقریبی۲۰ ± ۱۹۰ گرم (تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی شیراز) استفاده شد و در شرایط دما و رطوبت مناسب و دوره ی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در قفس های مخصوص نگهداری شدند. تغذیه حیوانات از طریق غذاهای فشرده (پلت) مخصوص حیوانات آزمایشگاهی صورت می‌گرفت و در این مدت آب و غذای کافی در دسترس حیوانات قرار داشت. برای اطمینان از عدم وجود عفونت در بدن، حیوانات به دقت معاینه شدند. در این پژوهش تمام نکات اخلاقی در رابطه با نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی در تمام مدت پژوهش رعایت و موضوع در کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به شماره ۲۹۹۰/پ/د مورخه ۱۳۹٤/۸/۱۰ ثبت شده است. جمعیت حیوانات مورد به پنج گروه ده‌تایی شامل: گروه‌های کنترل، شاهد، تجربی۱، ۲ و ۳ تقسیم شدند.

گروه کنترل: آب و غذای کافی دریافت کردند و هیچ گونه تیمار دارویی نداشتند.

گروه شاهد: ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم حلال داروی ایزونیازید (سرم فیزیولوژی) به صورت گاواژ دریافت کردند.

گروه تجربی۱: داروی ایزونیازید با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت گاواژ دریافت کردند.

گروه تجربی ۲: ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی ایزونیازید به صورت گاواژ و نانوذره نقره با دوز ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند.

گروه تجربی ۳: ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی ایزونیازید به صورت گاواژ و نانو ذره نقره با دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند.

داروها روزی یک بار در نوبت صبح به استفاده از سرنگ انسولین به هر موش تزریق گردید. پس از

اتمام دوره تیمار (۱۵ روز) حیوانات بیهوش و خون-گیری از قلب حیوان انجام گرفت.

فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، نیتریک اکساید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی تهیه شده از شرکت استابیوفارم Stabiopharm و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده و با کمک دستگاه فتومتر (Stat fax 3300-USA) اندازه‌گیری شد.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم-افزار SPSS ویرایش ۱۶ با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و جهت مقایسه بین گروه‌ها از آزمون‌های آماری Duncan و Test-T استفاده شده است. اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ ≥p در نظرگرفته شد و نتایج به دست آمده به همراه محاسبات آماری مربوطه به صورت میانگین و خطای انحراف از معیار (Mean ± SEM)، به صورت نمودار بیان شده است. نتایج بررسی هر یک از پارامترها بر اساس برنامه Excel ترسیم گردید.

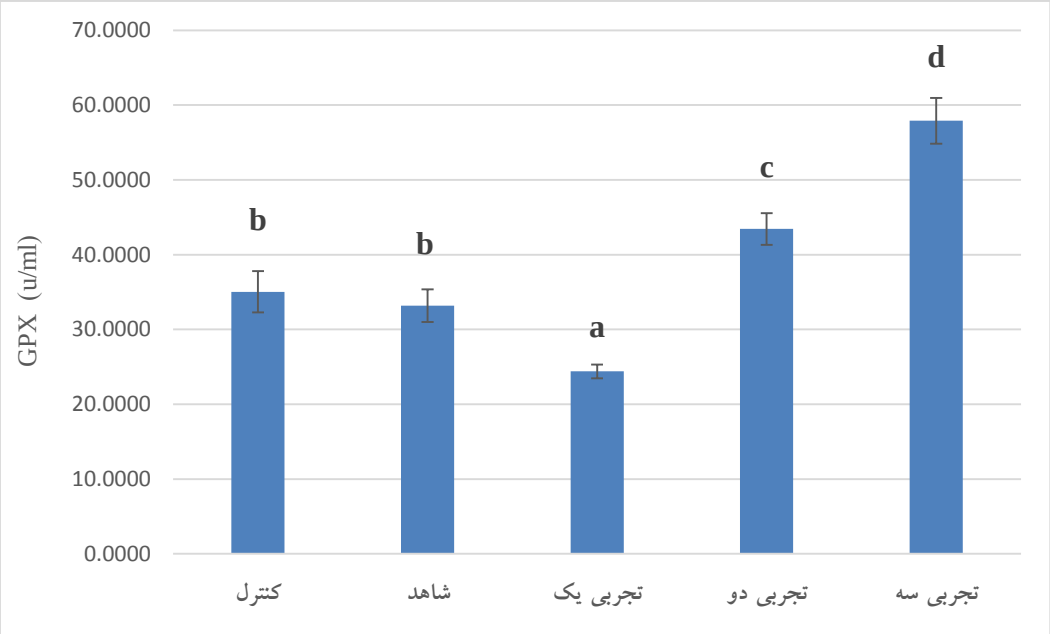
نتایج

مقایسه گروه‌های مورد بررسی از نظر نیتریک اکساید نشان داد که در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه‌های دیگر غلظت نیتریک اکساید افزایش معنی‌دار (در سطح ۰/۰۵ ≥p) داشته است. در حالی که گروه‌های تجربی ۲ و ۳ نسبت به گروه تجربی ۱ کاهش معنی-داری (در سطح ۰/۰۵ ≥p) داشته و گروه تجربی ۲ نسبت به گروه تجربی ۳ دارای کاهش معنی‌داری (در سطح ۰/۰۵ ≥p) می‌باشد. (نمودار۱).

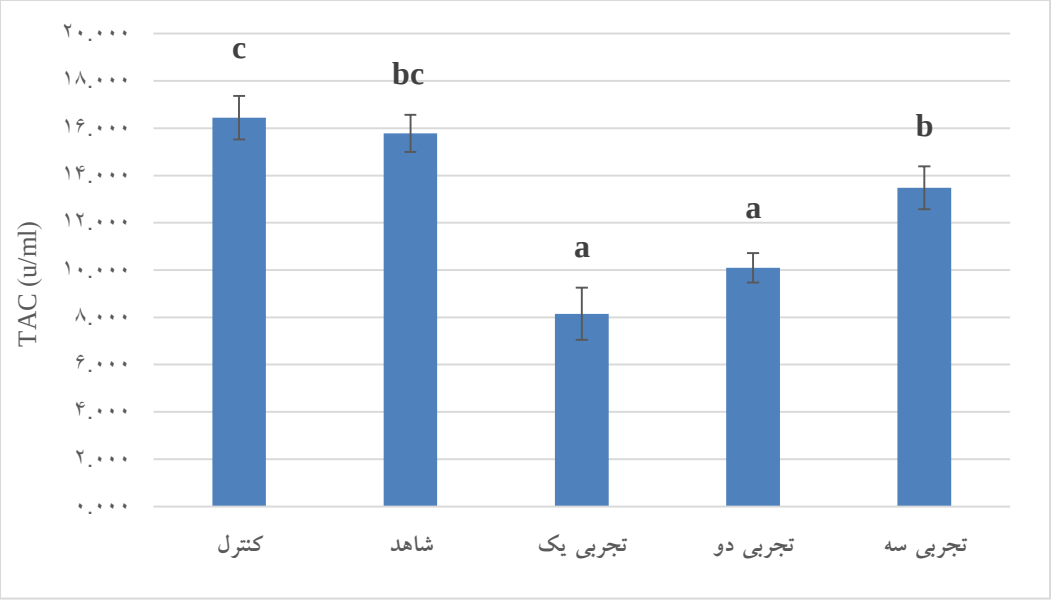
مقایسه گروه‌های مورد بررسی از نظر گلوتانیون پراکسیداز نشان داد که در گروه تجربی ۱ نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ ≥p بوده است. گروه‌های تجربی ۲ و ۳ افزایش نسبت به گروه-های دیگر (در سطح ۰/۰۵ ≥p) داشت و گروه تجربی ۳ نسبت به گروه تجربی ۲ افزایش معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ ≥p داشته است (نمودار ۲).

مقایسه گروه‌های مورد بررسی از نظر ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل نشان داد که میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه‌های دیگر کاهش معنی دار (در سطح ۰/۰۵ ≥p) بوده است. در حالی که گروه تجربی ۳ نسبت به گروه‌های تجربی ۱ و ۲ افزایش معنی‌دار (در سطح ۰/۰۵ ≥p)، اما در مقایسه با گروه کنترل و شاهد کاهش نشان داد (نمودار۳).

نمودار ۱- مقایسه گروه‌های مورد بررسی از نظر نیتریک اکساید. بر اساس آزمون دانکن اگر ستون‌ها دارای حداقل یک حرف مشترک باشند آن ستون‌ها با همدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.



نمودار ۲- مقایسه گروه‌های مورد بررسی از نظر گلوتاتیون پراکسیداز



نمودار ۳- مقایسه گروه های مورد بررسی از نظر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

بحث

در پژوهش حاضر، در گروه دریافت‌کننده ایزونیازید افزایش معنی‌دار نیتریک اکساید مشاهده شد. تحقیقات تیمینیس و همکارانش نشان می‌دهد که ایزونیازید توسط یک آنزیم پراکسیداز-کاتالاز باکتریایی به نام Kat G فعال می‌گردد. از فعال‌سازی ایزونیازید به واسطه Kat G گروهی از رادیکال‌های آزاد مانند نیتریک اکساید تولید می‌شود. تولید این رادیکال‌های آزاد اساس عمل آنتی‌باکتریال داروی ایزونیازید به حساب می‌آید. اما از سوی دیگر افزایش غلظت نیتریک اکساید منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت موجود زنده خواهد شد (۲۵).

همچنین مشاهده گردید نانوذرات نقره قادر هستند با کاهش معنی‌دار غلظت نیتریک اکساید اثرات ناشی از افزایش آن را بکاهند. به این ترتیب استرس اکسیداتیو ایجاد شده ناشی از داروی ایزونیازید با استفاده از نانوذرات از بین می‌رود. البته کاهش نیتریک اکساید در دوز کمتر نقره، بیشتر از دوز بالاست، که با توجه به خواص سمی نقره در دوزهای بالاتر قابل توجیه است.

محققین در مطالعه‌ای، ارزیابی نانوذرات نقره بر زیست‌پذیری سلولی، نشت لاکتات دهیدروژناز، استرس اکسیداتیو و چرخه سلولی را نشان دادند که نتایج، نشان دهنده کاهش زیست‌پذیری سلولی بود. یعنی نانوذرات نقره منجر به آسیب غشایی، کاهش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز شدند (۱۲).

علی‌رغم آنچه در مطالعات محققین مبنی بر کاهش فعالیت آنزیم گلوتانیون پراکسیداز در اثر نانوذرات نقره مطرح بود، اما در پژوهش حاضر، شاهد افزایش فعالیت این آنزیم در اثر نانوذرات نقره بودیم. به عبارت دیگر نانوذرات نقره توانستند اثر اکسیدانی داروی ایزونیازید را که موجب کاهش فعالیت آنزیم گلوتانیون پراکسیداز گشته را خنثی کنند. بنابراین محتمل است که نانوذرات نقره دارای رفتاری دو گانه

و وابسته به غلظت می‌باشد که در غلظت‌های خاصی اثر سمی و در غلظت‌های دیگری اثر آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کند. سطح سرمی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل یکی از شاخص‌هایی است که نشان‌دهنده مقاومت پلاسما در مقابل عوامل اکسیدان می‌باشد (۱۸).

این یافته‌ها حاکی از آن است که نانوذرات نقره در دوز بالاتر اثر آنتی‌اکسیدانی بهتری از خود نشان می‌دهد. البته ذکر این نکته ضروری است که با توجه به اثرات سمی که برای این نانوذرات ذکر شده است، بالاتر از یک حد مشخص احتمال مشاهده اثر عکس وجود دارد.

نانوذرات در چرخه حیات و اکوسیستم، پایین‌ترین سطح سمیت را از خود نشان داده‌اند لذا استفاده از این مواد به عنوان کاهنده اثر تخریبی داروها می‌تواند انتخاب مناسبی باشد (٦). از جمله این مواد نانوذرات نقره می‌باشند که کاربردهای فراوان پزشکی دارند (۲۲).

در بررسی رنجبر و همکاران مشخص شد که دوزهای ۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و حفاظت کبدی و دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثرات اکسیدانی و سمیت کبدی می‌باشد. با توجه به اینکه منبع اصلی تولید گونه‌های فعال اکسیژن میتوکندری می‌باشد شاید یکی از مکانیسم‌های اثرات این نانوذرات تداخل در عملکرد میتوکندری باشد (۲). البته در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۱ با بررسی خواص نانوذرات نقره (رفتار و اثرات آن)، به این نتیجه رسیدند که ساز و کار اثر سمی این نانوذرات هنوز شناخته نشده است و به نظر می‌رسد باعث سمیت با یون‌های غیرمحلول نقره شوند (۲۲) که با توجه به نتایج بررسی رنجبر و همکاران یکی از واکنش‌های سمیت این مواد در دوزهای بالا، تضعیف دستگاه آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۲).

مکانیسم‌های شیمیایی، تولید ROS، رهاسازی یون‌های سمی، آسیب اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی مهم‌ترین فرآیند در سم‌شناسی نانو می‌باشند، چرا که ROS منجر به آسیب و مرگ سلولی می‌گردد.

همچنین این عوامل در التهاب نیز نقش داشته و از طریق تنظیم ژنی و پاسخ پیش التهابی NF kB و AP1 می‌باشد (۹، ۲۳). نانوذرات از طریق برهمکنش الکتروشیمیایی یا فیزیکی با ایجاد ROS سبب آسیب DNA نیز می‌گردند. همچنین این مواد به پروتئین‌ها، آنزیم‌ها مانند گاسترین، ملکول سیگنالینگ همانند هورمون‌ها و پروتئین‌های ساختاری همانند توبولین آسیب وارد نموده و باعث بیماری‌های نورودژنراتیو می‌گردند (١٤، ۱۳). همچنین در مطالعات قبلی با ارزیابی اثر نانوذره نقره بر میتوکندری، به این نتیجه رسیدند که نانوذرات نقره باعث تخریب عملکرد میتوکندری و نفوذپذیری غشاء می‌گردند. این مواد در فسفریلاسیون میتوکندری تداخل نموده و سمیت میتوکندریایی ایجاد می‌شود (۱۰).

در پژوهشی که توسط میرنژاد و همکاران انجام شد مشخص شد که نانوذره نقره در کنار آنتی بیوتیک‌ها، مقاومت داوریی باکتری را کمتر کرده و باکتری‌ها را از بین می‌برند و در نهایت استفاده از نانوذره نقره در کنار آنتی‌بیوتیک‌های رایج، ما را قادر خواهد کرد تا از غلظت‌های بسیار کمتر آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کنیم و اثرات سوء آنها را کاهش دهیم (٤).

نانوذره نقره دارای اثر مهاری بر سلول‌های سرطانی می‌باشد (۱).

این نانوذره علاوه بر خواص ضدباکتریایی و عدم ایجاد مقاومت در میکروارگانیسم‌ها، باعث شده که این مواد، جایگزین خوبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها به شمار روند. بارزترین ویژگی این ذرات سمیت دوگانه است. بنابراین در مقابل باکتری‌ها اثرات سمی از خود بروز می‌دهند و در نقطه مقابل برای بدن زیست‌سازگارند.

این ذرات انتخاب مناسب برای تشخیص و درمان بیماری سرطان هستند (۳) که پژوهش ذکر شده بیانگر تاثیر مثبت نانوذره نقره بر بدن می‌باشد که از این نظر هم راستا با مطالعه حاضر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نانوذرات نقره با کاهش تولید نیتریک اکساید و افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، از بروز آسیب‌های اکسیداتیو و در نتیجه تخریب غشا و شکنندگی گلبول قرمز جلوگیری می‌کنند. به عبارت دیگر، آزمایش‌های انجام شده نقش آنتی‌اکسیدانی نانوذرات نقره را به خوبی نشان می‌دهد. البته ذکر این نکته ضروری است که با توجه به اثرات سمی که برای نانوذرات نقره مطرح شده است، استفاده از غلظت کم نانوذرات، دارای نقش آنتی‌اکسیدانی است که منجر به افزایش پایداری سلول در برابر اکسیدان‌ها می‌گردد و اثرات سمی ایجاد نمی‌کند.

تشکر و قدردانی

نتایج این تحقیق بر مبنای پایان‌نامه کارشناسی ارشد سرکار خانم ندا نوروزی دانش‌آموخته رشته زیست-شناسی گرایش تکوینی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و با هزینه‌ی شخصی نویسندگان انجام شده است. بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه مسئولین محترم آزمایشگاه در اجرای این طرح قدردانی می-شود.

منابع

۱. راشمزاد، م آ.، علی‌عسگری، ا. تفویضی، ف. ۱۳۹٤. بررسی مقایسه‌ای اثر سمیت سلولی نانوذرات نقره بیولوژیکی و تجاری سنتز در سرطان معده در انسان و خطوط سلول‌های فیبروبلاست ریه طبیعی. مجله دانشگاه علوم پزشکی تهران، سال ۷۲، شماره ۱۲، صفحات ۸۰۷–۷۹۹.

۲. رنجبر، آ. عطایی، ز. قاسمی، ح. حیدری، شایسته،ت. ۱۳۹۱. بررسی اثر نانوذرات نقره بر بیومارکرهای استرس اکسیداتیو کبد در موش صحرائی نر: اثر حفاظتی یا سمی؟ دومین کنفرانس ملی فناوری نانو از تئوری تا کاربرد.

۳. قربانی، ف. ۱۳۹۳. استفاده از نانوذرات نقره در پزشکی. توسعه فناوری نانو وب سایت ستاد.

٤. میرنجاد، ر. عرفانی، م. صادقی و پیران فر. ۱۳۹۱. اثر هم‌افزایی نانوذرات نقره با استرپتومایسین بر بروسلا آبورتوس مقاوم به استرپتومایسین. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، سال ۱۵، شماره ۵، صفحات ۷۹–۷۲.

5. Ballinger P., Brown B., Griffin M., Steven F., 1982. Evidence for carriage of silver by sulphadimidine: haemolysis of human erythrocytes. *British Journal of Pharmacology*, 77(1): 141-145.

6. Binyu Y., 2011. Synthesis of Ag–TiO2 composite nano thin film for antimicrobial application. *Nanotechnology*, 22: 115-603.

7. Chen D., Bai J., 2007. Biological effect induced by nanosilverparticles: in vivo study. *Biomedical Materials*, 2(3): S126-S128.

8. Drake P.L., Hazelwood K.J., 2005. Exposure related health effects of silver and silver compound, a review. The Annals of *Occupational Hygiene*, 49: 575-585.

9. Eom H.J., Choi J., 2010. P38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environmental science and Technology*. 44(21):8337 -8342.

10. Gopinath P., Gogoi S.K., Sanpui P., Paul A., Chattopadhyay A., Ghosh S.S., 2010. Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(2): 240-245.

11. Kwon T., Woo H.J., Kim Y.H., Lee H.J., Park K.H., Park S., 2012. Optimizing Hemocompatibility of Surfactant-Coated

Silver Nanoparticles in Human Erythrocytes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(8): 6168-6175.

12. Ling song X., Li B., Xu K., 2012. Citotoxicity of water-soluble Mpeg-SH-coated silver nanoparticles in HL-7702 cells. *Cell Biology Toxicology*, 28: 225-237.

13. Liu G., Men P., Harris P.L., Rolston R.K., Perry G., Smith M.A., 2006. Nanoparticle iron chelators: a new therapeutic approach in Alzheimer disease and other neurologic disorders associated with trace metal imbalance. *Neuroscience Letters*, 406(3): 189-193.

14. Long T.C., Saleh N., Tilton R.D., Lowry G.V., Veronesi B., 2006. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environmental Science and Technology*. 40(14):4346-4352.

15. Maneerung T., Tokura S., Ruiravanit R., 2008. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrates Polymeres*, 72(1): 43-51.

16. Melayie A., Youngs J.W., 2005. Silver and its application on antimicrobial agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 15(2): 125-130.

17. Moncada S., Higgs A., 1993. The L-Arginine- Nitric Oxide pathway. *The New England Journal of Medicine*, 329(27): 2002-2012.

18. Nourooz-Zadeh J., Ziegler D., Sohr C., Betteridge J., Knight J., Hothersall J., 2006. The use of pholasin as a probe for the determination of plasma total antioxidant capacity. *Clinical Biochemistry*, 39(1): 55-61.

19. Oxford G.E., Tayari L., Barfoot M.D., Peck A.B., Tanaka Y., Humphereys-Beher M.G., 2000. Salivary EGF levels reduced in diabetic patients. *Journal of Diabetes Complications*, 14(3): 140-5.

20. Rastogi I.D., 2012. Nanotechnology: Safety paradigms. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 4(1): 1-12.

21. Robbins RA, Grisham MB. Molecules in focus: Nitric Oxide. Int J Biochem Cell B 1997; 29:857-860.

22. Stone V., Donaldson K., 2006. Nanotoxicology: signs of stress. *Nature Nanotechnology*, 1(1): 23-24.

23. Sun Y., Oberley L.W., Li Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34(3): 497-500.

24. Sundaramoorthi C., Devarasu S., 2011. Antimicrobial and wound healing activity of silver nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 2(12): 69-75.

25. Timmins G., Master S.H., Rusnak F., Deretic V., 2004. Nitric oxide generated from isoniazid activation by KatG: source of nitric oxide and activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8: 3006-3009.