

تأثير جزيئات الفضة النانوية المخلفة حيويًا بواسطة مستخلص أوراق السلق على مستوى
الكلوبيولينات المناعية IgM و IgG في دم ذكور الفئران

شفاء عباس حمد، قسم التقانات الإحيائية/كلية العلوم التطبيقية /جامعة سامراء

Email: shefaa.abas@uosamarra.edu.iq, Mobile:+9647732773776,

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3253-8865>.

اسامة ناظم نجرس ، قسم التحليلات المرضية/كلية العلوم التطبيقية /جامعة سامراء

Email: usama.n@uosamarra.edu.iq; Mobile: +9647748053886,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9829-8620>

إيهاب أحمد حمود، قسم التحليلات المرضية/كلية العلوم التطبيقية /جامعة سامراء

Email: Ihab.ahmed.h@uosamarra.edu.iq, Mobile: +9647748060035,

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-2505-8702>.

المؤلف للمراسلة: شفاء عباس حمد، قسم التقانات الإحيائية/كلية العلوم التطبيقية /جامعة سامراء

Email: shefaa.abas@uosamarra.edu.iq, Mobile:+9647732773776,

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3253-8865>.

استلم البحث: 2023/08/16 تم القبول: 2023/10/19 تم الطبع: 2024/1/1

لاعتماده كمصدر: حمد، شفاء عباس: نجرس ، اسامة ناظم: حمود، ايهاب احمد. تأثير جزيئات
الفضة النانوية المخلفة حيويًا بواسطة مستخلص أوراق السلق على مستوى الكلوبيولينات
المناعية IgM و IgG في دم ذكور الفئران . المجلة العالمية للعلوم الطبية المجلد 7 العدد 1:
56-76.

DOI: <https://doi.org/10.32441/ijms.7.1.5>

الخلاصة

مقدمة: تتمثل الوظيفة الأساسية للجهاز المناعي في التفاعل والكشف والتعرف على المواد الغريبة مثل خلايا
البكتيريا والفطريات والطفيليات والقضاء عليها من أجل حماية الجسم المضيف، ويمكن أن تتداخل الجزيئات
النانوية وتتفاعل مع هذه الوظيفة أو يمكن التعرف عليها على إنها مستضدات للمواد الغريبة وبالتالي تحفيز
الاستجابة المناعية، ويمكن أن يؤدي اضطراب الإستجابة المناعية إلى حالات طبية خطيرة.

الهدف: دراسة تأثير جزيئات الفضة النانوية على مستوى تركيز الكلوبيولينات المناعية IgM و IgG

طرق العمل: أجريت هذه الدراسة في مختبر الدراسات التابع لقسم التحليلات المرضية/كلية العلوم التطبيقية/جامعة سامراء للمدة من 15/4/2021 ولغاية 10/6/2022 تم تخليق جزيئات الفضة النانوية بواسطة مستخلص أوراق نبات السلق وتم فحص جزيئات الفضة النانوية على نطاق واسع باستخدام التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية والمرئية (UV-Vis) ومجهر القوة الذرية (AFM) ومطيافية تحويل فورييه للأشعة تحت الحمراء (FT-IR)، تشتت الأشعة السينية (EDX)، في حين أن الجسيمات النانوية الكهربائية الحركية تم تقييم الخصائص باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) والمجهر الإلكتروني النافذ (TEM)، تم الحصول على 20 فأر من ذكور الفئران البيضاء البينو Albino الفرنسية ذات العيون الحمراء من الشركة العامة لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية في سامراء ويتراوح أوزانها ما بين 25-35 غم، تم إيواء الحيوانات في البيت الحيواني لكلية العلوم التطبيقية/جامعة سامراء تحت ظروف بيئية مناسبة ودرجة حرارة مضبوطة 25 ± 5 درجة مئوية مع المحافظة على الضوء والتهوية بشكل ملائم، وتم تقسيمها الى مجموعتين وحقت المجموعة الاولى في التجويف البريتون IP بحجم 0.1 مل وبتركيز 250 ملغم/كغم من محلول جزيئات الفضة النانوية ولمدة 14 يوم، وعينت المجموعة الثانية كمجموعة سيطرة، تم سحب عينات الدم في اليوم التالي من انتهاء مدة الحقن من جميع حيوانات الدراسة من خلال ذبح الحيوان بعد تخدير الحيوانات جزئياً بمادة الكلوروفورم، ثم وضعت في انابيب تحتوي على هلام Gel tube ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي Centrifuge 5000 دورة/دقيقة لمدة عشر جزيئات لغرض فصل مصل الدم Serum عن مكونات الدم لغرض تقدير مستوى الكلوبولينات المناعية IgM و IgG باستعمال عدة التحاليل الخاصة والمجهزة من شركة IGLoud-CLONE CORP الأمريكية بأستعمال طريقة Sandwich-ELISA.

النتائج: بينت نتائج تأثير جزيئات الفضة النانوية على مستوى الكلوبولينات المناعية IgM و IgG هناك إرتفاع معنوي في مستوياتها عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ إذ بلغت 17.58 و 30.64 بيكوغرام/مل على التوالي للمجموعة المعاملة بجزيئات الفضة النانوية، مقارنةً بمجموعة السيطرة التي بلغت 10.74 و 9.79 بيكوغرام/مل على التوالي.

الاستنتاجات: إرتفاع معنوي في مستويات الكلوبولينات المناعية IgM و IgG في مجاميع ذكور الفئران المعاملة بجزيئات الفضة النانوية مقارنة بمجموعة السيطرة.

الكلمات المفتاحية: جزيئات الفضة النانوية، مستخلص السلق، IgM، IgG، ذكور الفئران.

المقدمة

أدت تقنية النانو Nanotechnology الى تصميم أو إستخدام تقنيات بمقياس 1-100 نانومتر⁽¹⁾، والمواد والجزيئات التي تكون بحجم النانو هي أساس تقدم طب النانو وهي تمتلك خصائص فيزيائية وكيميائية وبيولوجية فريدة من نوعها توفر لبنات بناء جديدة لهندسة الأجهزة والأنظمة الخاصة بتشخيص وعلاج الأمراض⁽²⁾.

إن التطور العلمي في مجال تقنية النانو أدى الى استخدام طرق حديثة في تخليق الجزيئات النانوية بالرغم من وجود العديد من التقنيات التقليدية حيث تعد عملية انتاج الجزيئات النانوية من مصدر نباتي وبتقنية التخليق الأخضر Green Synthesis بالثورة الجديدة في مجال البحث العلمي لأنها من التقنيات الأكثر سلامة وتخصص مما ادى الى اتساع دائرة استخدامها في التطبيقات التي تعنى بحياة الانسان وصحته مثل التطبيقات الطبية والزراعية والغذاء⁽³⁾.

تبين إن العديد من الجزيئات النانوية لها أنشطة بيولوجية مثل الأنشطة المضادة للبكتيريا والفطريات وتوصيل الأدوية والتعديل المناعي وأنشطة مضادة للأورام عندما تدخل المواد النانوية إلى جسم الإنسان والحيوان بطرق مختلفة، فإن تفاعلاتها مع الخلايا تكاد تكون لا مفر منها، ويمكن أن تتفاعل الجزيئات النانوية العرضية مع الخلايا المناعية وقد تسبب استجابة مناعية جزيئية ووراثية يمكن أن يكون لها آثار سمية ويمكن أن تكون السبب الرئيسي لزيادة القابلية للإصابة بالأمراض البكتيرية وغيرها من الأمراض الميكروبية وأيضاً مشاكل في الجهاز المناعي تسبب أمراض المناعة الذاتية وتعزز تطور الورم والسرطان، كما تمت دراستها وتبين من خلال العديد من المقالات والدراسات الحديثة فإن تفاعلات الجزيئات النانوية مع أو إلى جسم الكائنات الحية أو تفاعلها مع الأجهزة البيولوجية يمكن أن تحفز دفاعات الجسم القوية التي تؤدي إلى تحفيز الالتهابات أو غيرها من الأمراض الخطيرة مثل الحساسية وتنشيط الخلايا غير النوعية والاستجابة المناعية مثل النظام المكمل⁽⁴⁾.

تتمثل الوظيفة الأساسية للجهاز المناعي في التفاعل والكشف والتعرف على المواد الغريبة مثل خلايا البكتيريا والفطريات والطفيليات والقضاء عليها من أجل حماية الجسم المضيف، ويمكن أن تتداخل الجزيئات

النانوية وتتفاعل مع هذه الوظيفة أو يمكن التعرف عليها على إنها مستضدات للمواد الغريبة وبالتالي تحفيز الاستجابة المناعية⁽⁵⁾، ويمكن أن يؤدي اضطراب الإستجابة المناعية إلى حالات طبية خطيرة⁽⁶⁾.

هناك احتمال كبير أن الجزيئات النانوية تتفاعل داخل الجسم مع مكونات الجهاز المناعي مثل الخلايا المناعية مما قد يؤدي إلى اتصالات وتفاعلات الجهاز المناعي للجسيمات النانوية⁽⁷⁾، وهذه التفاعلات لها احتمال تعديل المناعة، كما يمكنها تنشيط أو قمع الاستجابة المناعية المحددة وغير المحددة والوظيفة المناعية، ويمكن أن تؤدي إلى استجابة التهابية أو زيادة التقبل للأمراض الميكروبية المعدية أو إستمرار أمراض المناعة الذاتية أو تطور الورم والسرطان⁽⁸⁾.

طرق العمل

- تحضير مستخلص أوراق نبات السلق

(Chard) *Beta vulgaris* Preparation of

حضر المستخلص المائي لأوراق نبات السلق حسب طريقة Mofid وآخرون⁽⁹⁾، وذلك بوزن 10 غم من المسحوق الجاف للنبات وأضيف إليه 100 مل من الماء اللأأيوني الحار بدل الماء المقطر وترك لمدة 24 ساعة في الثلاجة، ثم على جهاز الرج لمدة 24 ساعة أيضاً، رشح المستخلص بواسطة عدة طبقات من الشاش للتخلص من الأجزاء الكبيرة للنبات ثم باستعمال ورق ترشيح No.1 Whatman بعدها اخذ منه واضيف الى كل من محلول الفضة النانوي ذو تركيز 1 ملي مولاري.

- تخليق جزيئات الفضة النانوية حيويًا Biosynthesis of silver nanoparticles

خلط 10 مل من مستخلص أوراق السلق مع 90 مل من المحلول النانوي ذو تركيز 1 ملي مولاري وضبط الأس الهيدروجيني للخليط على 7، ثم اضافة قارورتين مختبريتين الأولى تحوي على المستخلص فقط دون اضافة المحلول النانوي اما الثانية فتحتوي على المحلول النانوي فقط دون اضافة المستخلص النباتي كعامل سيطرة . وضعت بعد ذلك على هيتير مغناطيسي ولمدة 35 دقيقة نلاحظ بعد ذلك تغيير في اللون وتكون راسب رمادي لنترات الفضة $AgNO_3$ في قعر القارورة المختبرية وهذا يعد مؤشراً على تكون الجزيئات النانوية، تم جمع الراسب وغسل ثلاث مرات باستعمال الماء اللأأيوني وعمل له طرد مركزي بسرعة 10000 دورة في

الدقيقة ولمدة 10 دقائق، أخذ الراسب المتكون ليُجفف بواسطة الفرن الحراري وبدرجة حرارة 105° م ولمدة تتراوح ما بين 5-6 ساعات حتى جفاف الراسب للحصول على الجزيئات النانوية (10).

- تقنيات تشخيص جزيئات الفضة النانوية المحضرة

تم فحص جزيئات الفضة النانوية على نطاق واسع باستخدام التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية والمرئية (UV-Vis) ومجهر القوة الذرية (AFM) ومطيافية تحويل فورييه للأشعة تحت الحمراء (FT-IR)، تشتت الأشعة السينية (EDX)، في حين أن الجسيمات النانوية الكهربائية الحركية تم تقييم الخصائص باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) والمجهر الإلكتروني النافذ (TEM).

- حيوانات التجربة Experiment Animals

تم الحصول على 20 فأر من ذكور الفئران البيضاء البينو Albino الفرنسية ذات العيون الحمراء، من الشركة العامة لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية في سامراء، يتراوح أوزانها ما بين 25 - 35 غم، وتم إيواء الحيوانات في البيت الحيواني لكلية العلوم التطبيقية/جامعة سامراء تحت ظروف بيئية مناسبة، درجة حرارة مضبوطة 25 ± 5 درجة مئوية مع المحافظة على الضوء والتهوية بشكل ملائم، وقبل إجراء الدراسة التجريبية وبده المعاملات تأقلمت الفئران لمدة أسبوعين وتمكنت من الحصول على مياه الشرب واتباع نظام غذائي متمثل بالعليقة الخاصة بها وفحص الفئران المستمر للتأكد من خلوها من الأمراض، وقسمت الحيوانات عشوائياً إلى مجموعتين ووضعت في أقفاص من البلاستيك مجهزة بمعالف خاصة ومغطاة بغطاء معدني ذات أرضية مفروشة بالنشارة وفي كل مجموعة خمسة حيوانات وتوزعت بالشكل الآتي :

- المجموعة الأولى: تضمنت خمسة حيوانات حقنت في التجويف البريتون IP بحجم 0.1 مل وبتركيز 250 ملغم/كغم من محلول جزيئات الفضة النانوية ولمدة 14 يوم.

- المجموعة الثانية: تضمنت خمسة حيوانات وكانت تمثل مجموعة السيطرة التي حقنت في التجويف البريتون IP بالمحلول الفلجي الملحي 0.9 Sodium Chloride ولمدة 14 يوم.

- جمع عينات الدم Collecting of Blood Sample

تم سحب عينات الدم في اليوم التالي من انتهاء مدة الحقن من جميع حيوانات الدراسة من خلال ذبح الحيوان بعد تخدير الحيوانات جزئياً بمادة الكلوروفورم، ثم وضعت في انابيب تحتوي على هلام Gel tube ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي 5000 Centrifuge دورة/دقيقة لمدة عشر دقائق لغرض فصل مصل الدم Serum عن مكونات الدم لغرض الاختبارات المناعية.

- تقدير تركيز كل من IgG و IgM في مصل دم الفئران المختبرية

تم تقدير تركيز كل من IgG و IgM في مصل دم الفئران المختبرية باستعمال عدة التحاليل الخاصة والمجهزة من شركة GLOUD-CLONE CORP الأمريكية، حيث تم قياس مستوى كل من IgG و IgM، تستعمل عدة العمل أعلاه طريقة Sandwich-ELISA، وهي تتضمن صفائح المعايرة الدقيقة التي تم تحميلها مسبقاً بالمستضد الخاص بالكلوبيولينات IgG و IgM، وتضاف المواد القياسية أو العينات إلى الحفر الموجودة في صفائح المعايرة الدقيقة، لكي ترتبط مع المستضد الخاص بالكلوبيولينات اعلاه، ويتم إضافة المستضد المرتبط بالإنزيم HRP والمخصص للكلوبيولينات اعلاه، ثم تغسل الحفر جيداً لإزالة المستضدات غير المرتبطة وتحضن، بعدها يضاف محلول المادة الاساس إلى كل حفرة، فقط تلك الحفر التي تحتوي على احد الكلوبولينات والمستضد المرتبط بالانزيم HRP والخاص به سوف تعطي اللون الأزرق والذي يتحول لاحقاً إلى اللون الأصفر بعد إضافة محلول التوقف، يتم قياس الكثافة الضوئية OD عند الطول الموجي 450 نانومتر، حيث تتناسب قيمة الكثافة الضوئية مع تركيز الكلوبولينات المقاسة وبالتالي نستطيع حساب تركيز الكلوبولينات في العينات بمقارنة الكثافة الضوئية للعينات مع المنحنى القياسي.

- التحليل الإحصائي Statistical Analysis

حللت النتائج احصائياً بتطبيق اختبار تحليل التباين ANOVA التصميم الكامل العشوائي CRD وتم مقارنة المتوسطات الحسابية باختبار دنكن متعدد الحدود بمستوى احتمالية % 0.05⁽¹¹⁾.

النتائج والمناقشة

– التخليق الحيوي لجزيئات الفضة النانوية

Biosynthesis of silver nanoparticles

استعمل مستخلص اوراق نبات السلق كعامل مختزل ومثبت في عملية التخليق الحيوي للجزيئات النانوية AgNPs، بينت نتائج الدراسة تغيير اللون الى بني غامق وهذا دليل على عملية تخليق الجزيئات النانوية ومن المحتمل ان يكون هذا التحول اللوني ناتجاً عن ظهور شريط امتصاص رنين البلازمون السطحي (LSPR)، وهي ميزة للجزيئات النانوية المعدنية مثل الفضة والذهب والزنك والنحاس⁽¹²⁾، أن من أهم أسباب استعمال التخليق الحيوي للجزيئات النانوية هي رخص الثمن وامنة على البيئة وعديمة الخطورة وسهولة العمل وقليلة السمية⁽¹³⁾.

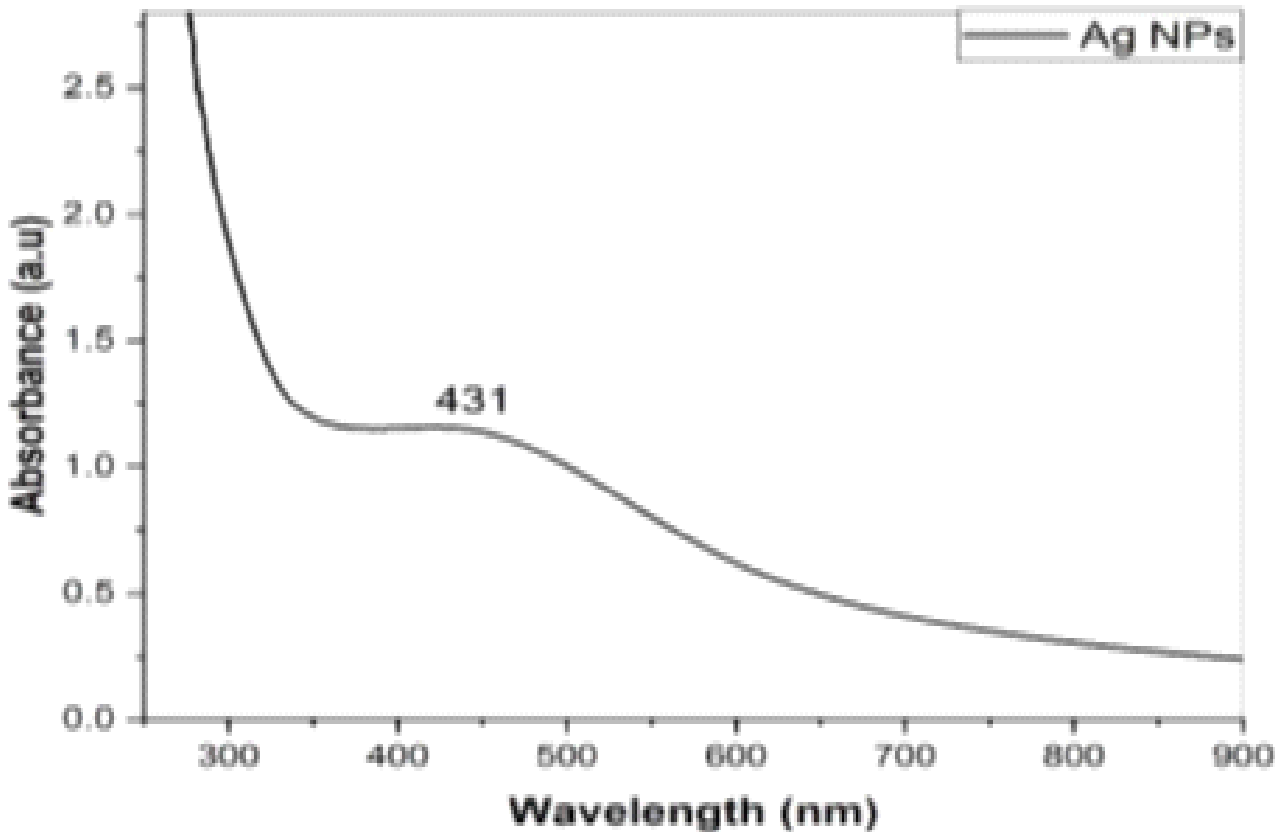
تم الحصول على الجزيئات النانوية على هيئة مسحوق بعد تجفيفه وتم اخذ وزنه وبعد ذلك تم دراسة خصائصه باستعمال تقنية الاشعة فوق البنفسجية والمرئية ومجهر القوة الذرية وحيود الاشعة السينية ومطياف الاشعة تحت الحمراء والمجهر الالكتروني النافذ والمجهر الالكتروني الماسح، وجاءت نتائجنا لهذه الفحوصات المذكورة اخيراً لتتفق مع ما توصل اليه Hashim وآخرون⁽¹⁴⁾ الذين نجحوا في تخليق جزيئات الفضة النانوية بواسطة مستخلص اوراق نبات السلق، وأيضاً تتفق مع العديد من الدراسات التي ذكر فيها ان المستخلصات النباتية تؤدي دوراً مباشراً واسباسياً في عملية التخليق الحيوي وتكوين الجزيئات النانوية وذلك من خلال تقليل النبات أيون المعدن وتشكيل الجزيئات النانوية لأن المستخلصات النباتية تعمل كعوامل اختزال، وتشتمل عوامل الاختزال التي تشارك في عملية الاختزال على العديد من المنتجات الطبيعية القابلة للذوبان في الماء مثل القلويدات والمركبات الفينولية والتربينويدات والفلافونويد والإنزيمات المشتركة⁽¹⁵⁾، تُستعمل العديد من النباتات في التخليق الأخضر لإنتاج الجزيئات النانوية مثل البرسيم الحجازي والصبار والأملا والفليفلة الحولية وإبرة الراعي والكزبرة والشاي⁽¹⁶⁾.

تشخيص الجزيئات النانوية -
قياس طيف الأشعة فوق البنفسجية - المرئية لجزيئات الفضة النانوية

UV-visible spectrum of silver nanoparticles

درس استقرار الجزيئات النانوية في السائل الغروي بواسطة جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis، والشكل 1 يوضح رسم الطيف المرئي للأشعة فوق البنفسجية والمرئية لجزيئات الفضة النانوية المخلقة بواسطة مستخلص أوراق نبات السلق.

أذ تم تحديد الطول الموجي الأعظم λ_{max} لمحلول الفضة النانوية باستعمال مطيافية الأشعة المرئية - فوق البنفسجية UV-Vis، وقد تبين أن الطول الموجي الأعظم لمحلول جزيئات الفضة النانوية هو 431 نانومتر، وتتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة Hashim وآخرون⁽¹⁴⁾، وفيها تم تخليق جزيئات الفضة النانوية حيويًا باستعمال مستخلص مائي لأوراق نبات السلق وكانت ذروة الامتصاص ضمن المعدل 417 نانومتر .



الشكل 1: طيف الأشعة فوق البنفسجية - المرئية لجزيئات الفضة النانوية

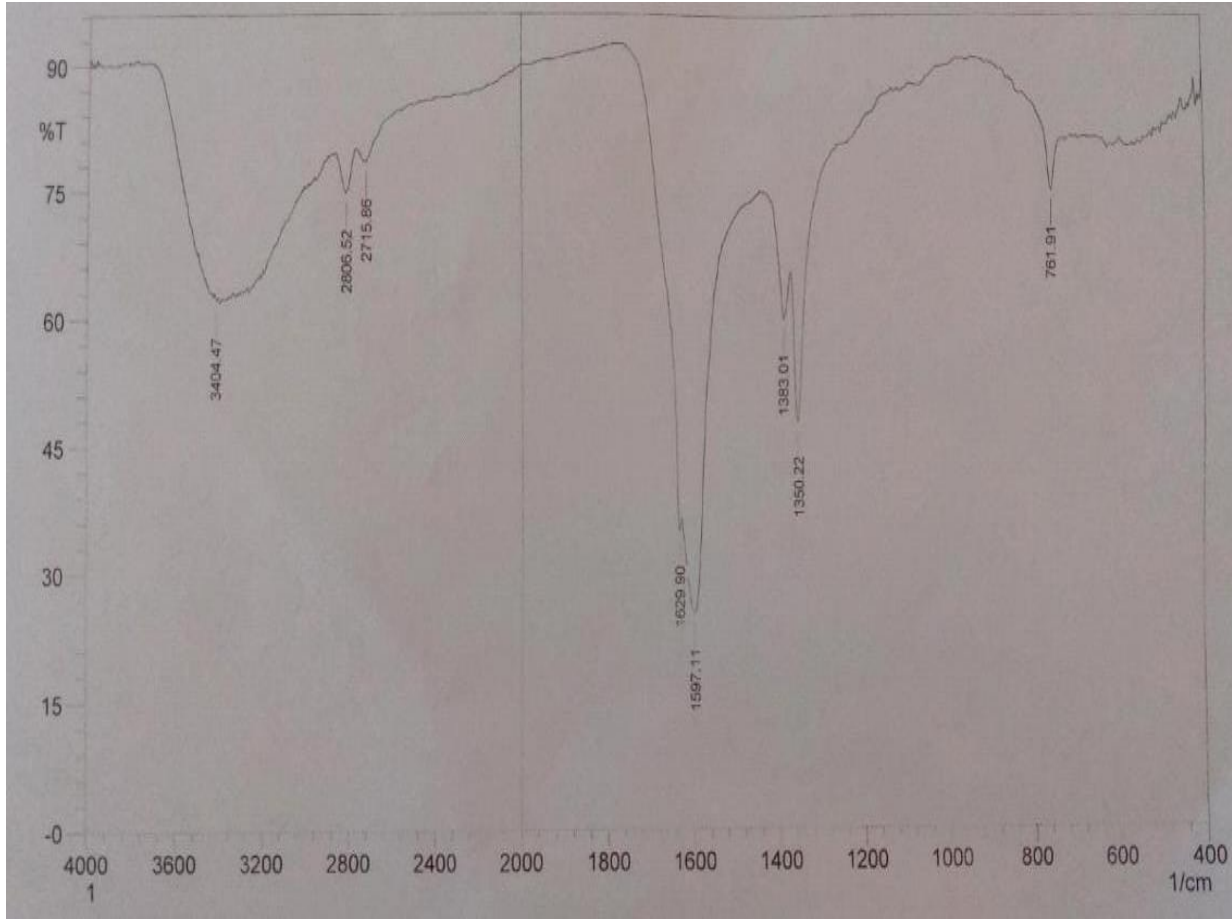
- قياس طيف الاشعة تحت الحمراء لجزيئات الفضة النانوية

FT-IR of silver nanoparticles

تم تحليل الجزيئات النانوية المخلفة بواسطة مستخلص اوراق نبات السلق بواسطة باستعمال مطياف فيوريه لتحويل الاشعة تحت الحمراء للتحري عن المجاميع الفعالة الموجودة في مستخلص اوراق السلق التي شاركت في عملية اختزال الجزيئات النانوية وثباتها.

يعتبر قياس طيف الاشعة تحت الحمراء أداة مهمة لملاحظة المجموعات الوظيفية والتي تدعى المجاميع الفعالة Functional group التي تشارك في تثبيت(تخليق) الجزيئات النانوية (17). يوظف هذا القياس في دراسة البنية النانوية وتجمع البروتينات فضلا عن تركيب الكربوهيدرات والاحماض النووية والتي تظهر بشكل منحنيات تبين المجاميع الكيميائية (18)، يوضح الشكل 2 طيف فيوريه للأشعة تحت الحمراء المسجل لدقائق الفضة النانوية على التوالي قيد الفحص وفي نطاق من 400-4000 سم وسجلت القمم 761.91 و 1350.22 و 1383.01 و 1597.11 و 1629.90 و 2715.86 و 2806.52 و 3404.47.

ان القمم التي تظهر بحدود 600 الى 1400 تشير إلى مجاميع الكربوكسيل -O=C او مجموعة C-N وهي امتداد للأواصر الأمايدية في البروتينات (19) وهذا يشير إلى المحتوى العالي من البروتينات في ورقة النبات، وان القمة 1350.22 تشير إلى مجاميع Alcohol والتي تحتوي على الأصرة O-H والمركبات ذات الأواصر C-O التي تشير إلى رابطة ثلاثية بين الكربون والنتروجين، والقمة 1597.11 تشير الى وجود الاصرة O-C و C--C وهي امين اولي وثانوي، اما القمة 1629.90 تشير الى وجود مجموعة Conjugated alkene الحاوية على الاصرة C=C، والقمم 2715.86 و 2806.52 تشير الى مركبات Alkane الحاوي على اصرة C-H، والقمة 3404.47 تشير الى وجود مجموعة Alcohol الحاوي على الأصرة O-H، وهذه النتائج تتفق مع ماوجده Rajan وآخرون(20).

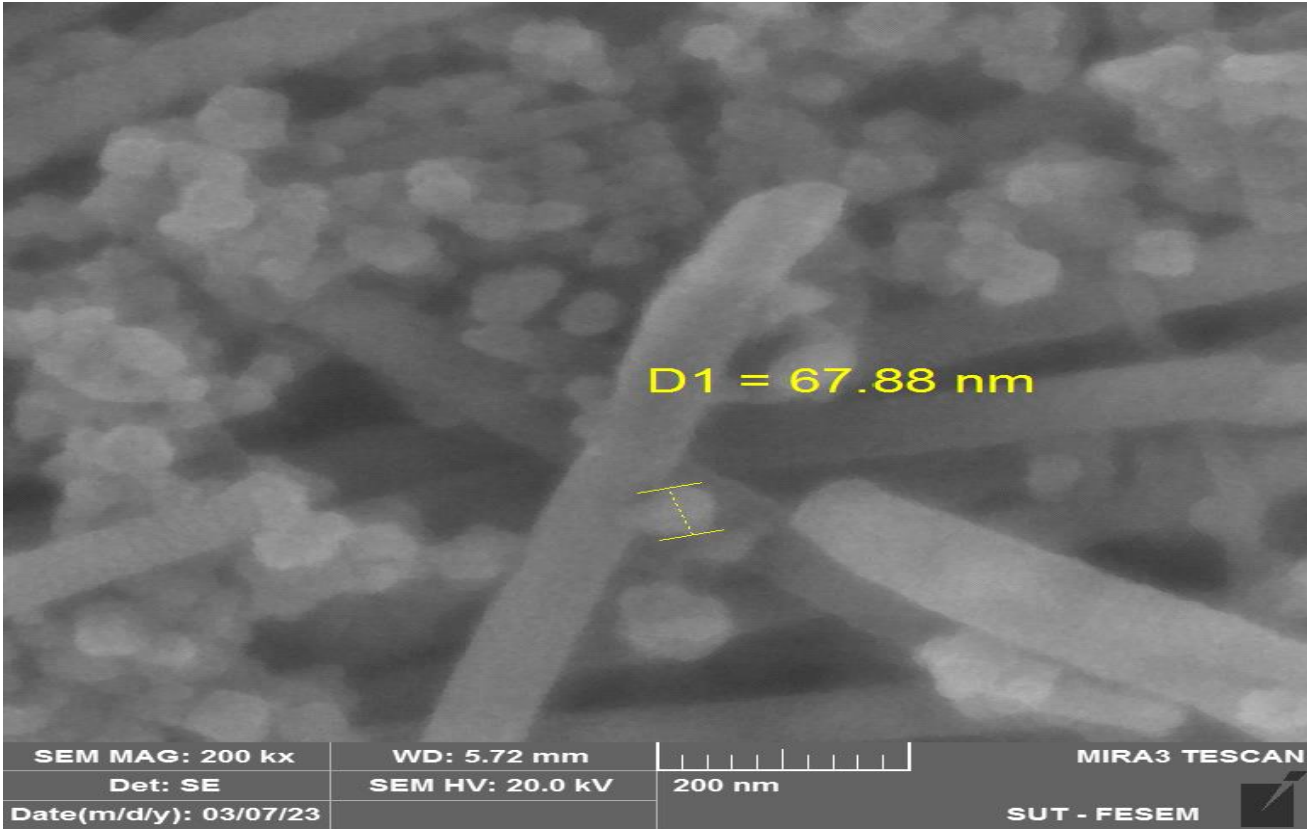


شكل 2: طيف فيوريه للأشعة تحت الحمراء لجزيئات الفضة النانوية

• قياس المجهر الإلكتروني الماسح لجزيئات الفضة النانوية

Scanning electron microscope for silver nanoparticles (SEM)

أظهر الشكل 3 قياسات المجهر الإلكتروني الماسح التي بينت شكل وحجم جزيئات الفضة النانوية المحضرة وبقوة تكبيرية 200 نانومتر، ظهرت جزيئات الفضة النانوية بشكل صفائح ومكعبات مع وجود تجمعات من الجزيئات بدون هيئة محددة، إذ ظهرت أحجامها بصورة تقريبية 67.88 نانومتر، نجحت الدراسة الحالية في تحقيق نتائج جيدة في الوصول الى مجموعة ضيقة من احجام جزيئات الفضة النانوية وإن هذه النتائج تتفق مع نتائج Hashim وآخرون⁽¹⁴⁾ إذ وجدو حجم جزيئات الفضة النانوية المخلفة حيويًا بواسطة مستخلص أوراق نبات السلق يتراوح ما بين 30-50 نانومتر .



شكل 3 : صورة من المجهر الإلكتروني الماسح SEM بقوة تكبيرية 200 نانومتر لجزيئات الفضة النانوية المحضرة

• حيود الأشعة السينية لجزيئات الفضة النانوية

X-ray diffraction of silver nanoparticles

تؤكد هذه النتائج أن المادة المفحوصة هي جزيئات نانوية وانها ذات نقاوة عالية، وتم استخراج معدل حجم الجزيئات النانوية للفضة باستعمال معادلة ديبيي شرر Debye-Scherrer، تم مقارنة القيم المتحصلة مع قاعدة بيانات حيود الاشعة السينية العالمية JCPDS إذ دعمت هذه القاعدة وبقوة وجود الجزيئات النانوية.

$$D_{hki} = \frac{k \times \lambda}{\beta_{hki} \times \cos \theta_{hki}}$$

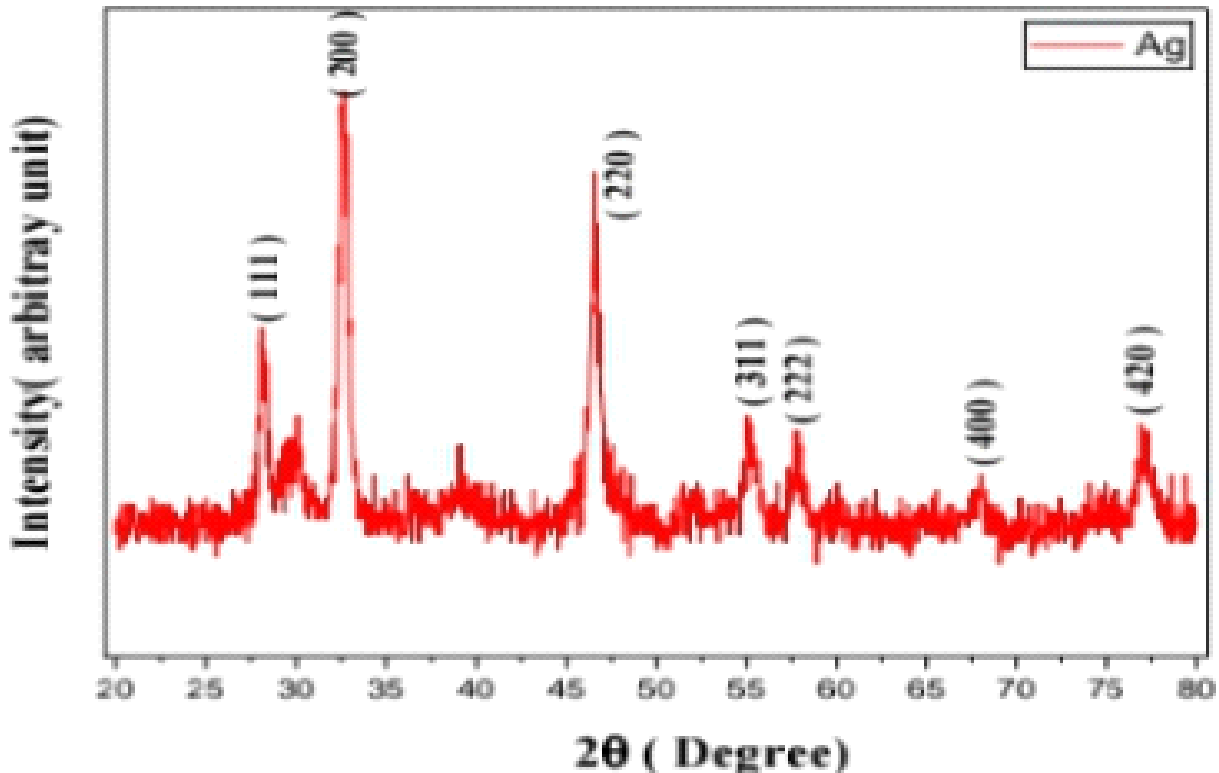
$$K = 0.94$$

$$\lambda = 1.05418 \text{ \AA}$$

$$\beta_{hki} = \text{deg} \times \frac{\pi}{180}$$

حيث إن D : الحجم الحبيبي و λ : الطول الموجي للإشعاع و θ : زاوية الحيود للأشعة السينية و β : العرض عند منتصف القمة.

وتم تشخيص التركيب البلوري لمسحوق نترات الفضة النانوي المحضر بتقنية حيود الأشعة السينية ومواقع القمم الموضحة في الشكل 4، تبين إن متوسط حجم حبيبات جزيئات الفضة النانوية 37.4 نانومتر.

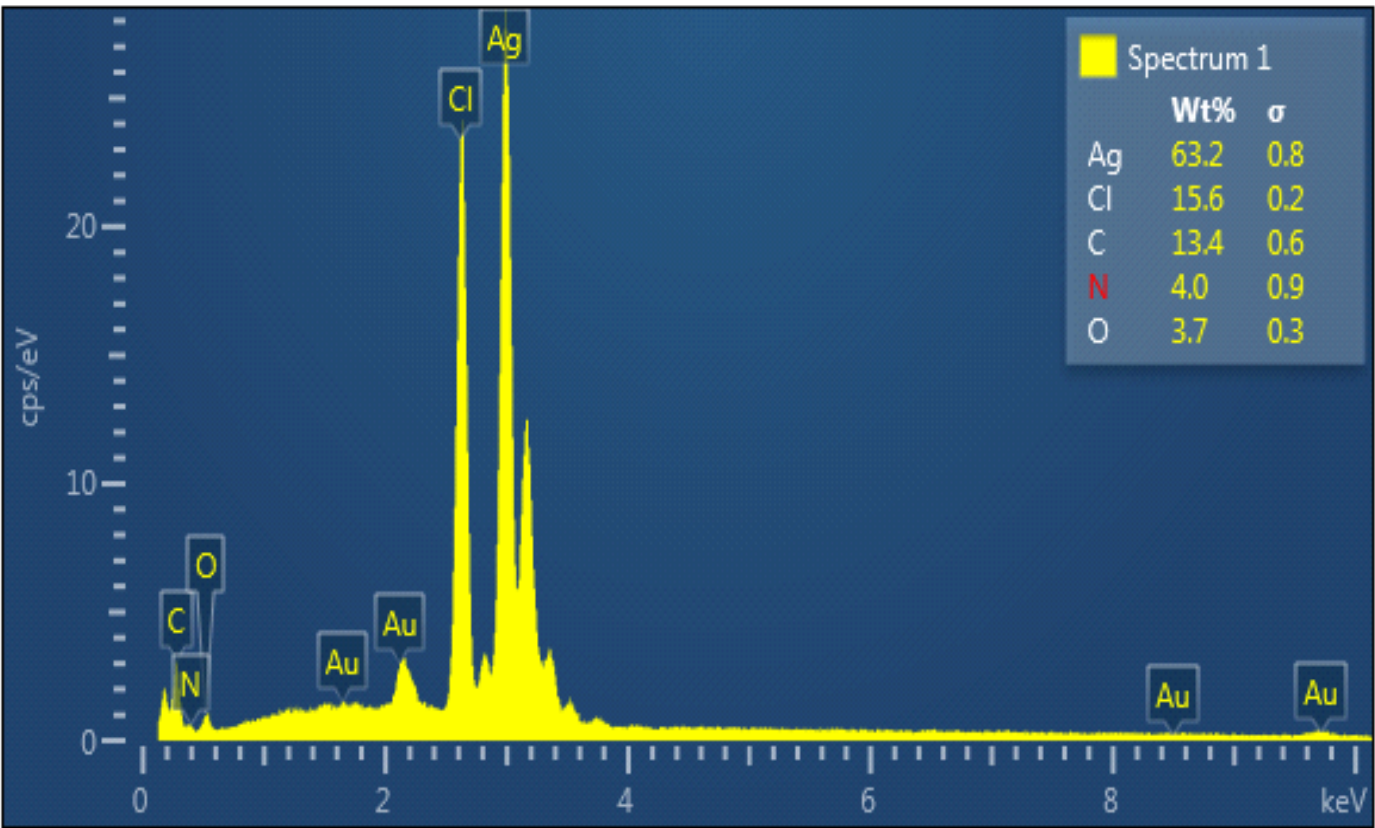


شكل 4 : حيود الأشعة السينية لجزيئات الفضة النانوية

• تشتت الطاقة بالأشعة السينية لجزيئات الفضة النانوية

Energy- dispersive of silver nanoparticles (EDX)

يظهر قياس تشتت الطاقة بالأشعة السينية تواجد حبيبات الفضة النانوية بكميات كبيرة جداً، إذ نلاحظ الحزمة ضمن المنطقة 2 و4 دليل على وجود حبيبات الفضة المحضرة كما موضح بالشكل 5، أذ تبين النتائج ان العينة تحتوي على الفضة بحدود 63.2%، وجاءت هذه النسبة اعلى بكثير من النسبة التي توصل اليها Garcidueñas-Piña وآخرون⁽²¹⁾ التي كانت 39.76%.

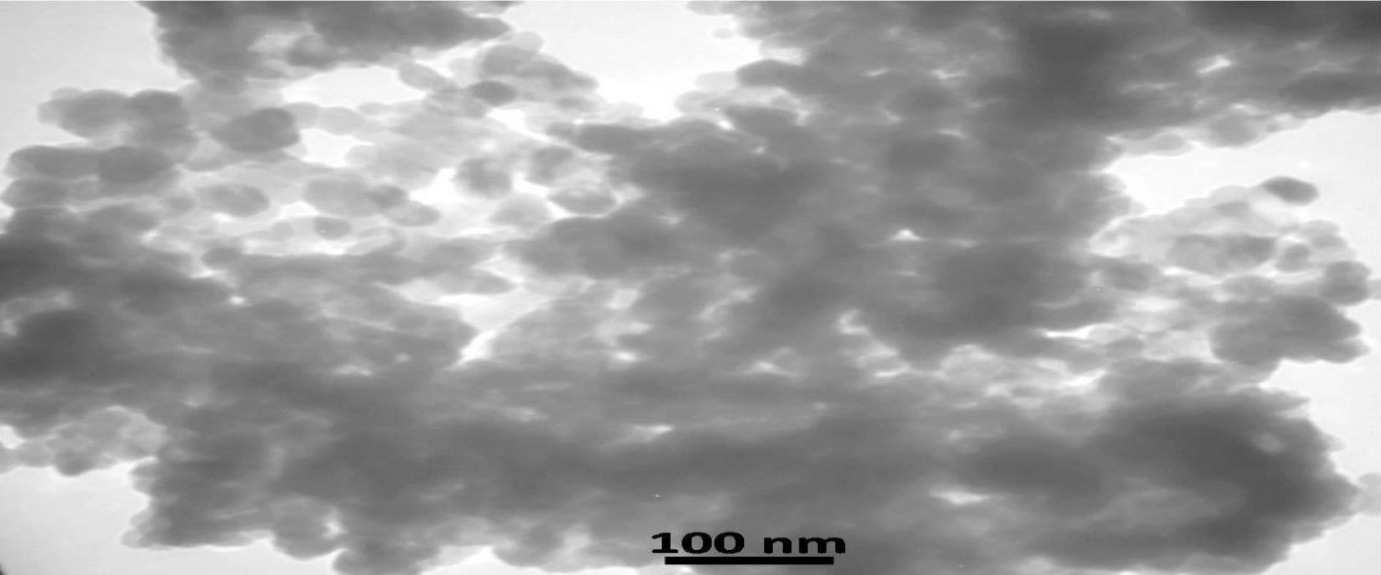


الشكل 5: تشتت الطاقة بالأشعة السينية EDX لجزيئات الفضة النانوية

• قياس المجهر الإلكتروني النافذ لجزيئات الفضة النانوية

Transmission electron microscope for silver nanoparticles (TEM)

تبين النتائج الموضحة بالشكل 6 عند القوة التكبيرية 100 نانومتر أن جزيئات الفضة النانوية المحضرة ضمن الحجم النانوي وعلى شكل جزيئات كروية غي متجانسة.



الشكل 6: تجمع جزيئات الفضة النانوية تحت المجهر الالكتروني النافذ عند قوة تكبير 100 نانومتر

–تأثير جزيئات الفضة النانوية على مستوى الكلوبولينات المناعية IgG و IgM

Effect silver nanoparticles on level of IgG and IgM

اظهرت نتائج الدراسة الحالية المبينة في الجدول 1 والشكل 7 ارتفاعاً معنوياً في مستوى IgG و IgM عند مستوى إحصائية $P \leq 0.05$ لدى مجاميع ذكور الفئران المعاملة مقارنة بمجموعة السيطرة، إذ كانت مستويات المجموعه المعاملة بجزيئات الفضة النانوية 3.28 ± 17.58 و 5.95 ± 30.64 بيكوغرام/مل على التوالي ومجموعة السيطرة 2.20 ± 10.74 و 1.74 ± 9.79 بيكوغرام /مل على التوالي، وتتفق هذه النتائج مع نتائج دراسة Ahmed⁽⁸⁾ التي لاحظت ارتفاع في مستويات IgG و IgM في مجاميع ذكور الفئران المعاملة بجزيئات الفضة النانوية مقارنة بمجموعة السيطرة، وذكرت ان جزيئات الفضة النانوية تعتبر كمحفز لجهاز المناعة وتستحث استجابة مناعية نوعية قوية، وكما يمكن استعمالها في تحضير اللقاحات، كما اتفقت النتائج مع ما وجده Kulak وآخرون⁽²²⁾ الذين اكدوا زيادة تحفيز الجهاز المناعي من خلال دفع الخلايا للمفاوية لزيادة انتاج بروتينات المناعة، كما اتفقت هذه النتائج مع ما جاء به Abd-Elhakeem وآخرون⁽²³⁾ الذين اكدوا زيادة نشاط الجهاز المناعي وارتفاع مستوى الكلوبولينات المناعة في مجاميع الجرذان التي حقنت بجزيئات الفضة النانوية.

اكد Elsabahy وآخرون⁽²⁴⁾ اعتماداً على الخصائص الفيزيائية للجزيئات النانوية يمكن أن تحفز الاستجابة المناعية الفطرية والتكيفية، ومع ذلك فإنه لا يزال من غير الواضح كيف تؤثر الجزيئات النانوية في تحفيز

الاستجابة المناعية بشكل واضح، إذ إن الجزيئات النانوية يمكن أن تتفاعل مع بروتينات المصل بما في ذلك الأجسام المضادة، وغالبا ما يكون استهداف الجزيئات النانوية إلى خلايا وأنسجة محددة، وأن فهم كيفية استخدام السيتوكينات كمؤشرات حيوية ضد المواد غير المرغوب فيها والمرتبطة بالمواد النانوية المهندسة يعد في غاية الأهمية كونها عنصرا أساسيا في اختبار سلامة تلك الجزيئات النانوية وتقييم السمية المناعية للمواد النانوية عن طريق قياس مستويات هذه السيتوكينات والبروتينات المناعية، وعلى وجه الخصوص السيتوكينات الالتهابية الأولية يمكن أن تكون أدوات مفيدة في تقييم التحفيز المناعي بواسطة الجزيئات النانوية، وعادة ما ترتبط مستويات عالية من السيتوكينات عند العلاج بالجزيئات النانوية ووجود سمية عالية، وكذلك ردود فعل سلبية وفعالية علاجية منخفضة، فالسيتوكينات يمكن استخدامها للتنبؤ جزئياً بفعالية الجزيئات النانوية من عدمها في توجيه الاستجابة المناعية.

أكدت نتائج Al-Salman⁽²⁵⁾ إن جزيئات الكربون الأسود النانوية Carbon black وثاني أكسيد التيتانيوم النانوية TiO₂ تسبب تحرير السيتوكينات الالتهابية بواسطة الخلايا الظهارية للشعب الهوائية بسبب الإجهاد التأكسدي وأشار إلى إمكانية تثبيط تأثير الالتهابات وتحرير السيتوكينات بواسطة تحرر إنزيم الكاتالاز Catalase الذي يعمل كمضاد للإجهاد التأكسدي عن طريق تحفيز تحلل بيروكسيد الهيدروجين إلى الأكسجين والماء، يعزى زيادة الالتهاب بزيادة ROS إلى أن الجزيئات النانوية تنتج كميات كبيرة من أنواع الأوكسجين الفعال Reactive (ROS) oxygen species التي يمكن أن تؤدي تحرير البروتينات الالتهابية من خلال تفعيل NF-κB، وإن إنتاج ROS يكون أعلى بالجزيئات النانوية (النانومترية) من الجزيئات الدقيقة المايكرومترية وذلك بسبب زيادة المساحة السطحية المتفاعلة، والجزيئات النانوية للسيليكا البلورية Crystalline silica nanoparticles تنتج ROS التي تثير مستقبلات TNF وكذلك تنشيط عامل النسخ الخلوي NF-κB Transcription factor NF-κB مما يؤدي ارتفاع الغلوبولينات المناعية Immunoglobulins ورفع الحالة الالتهابية⁽²⁶⁾.

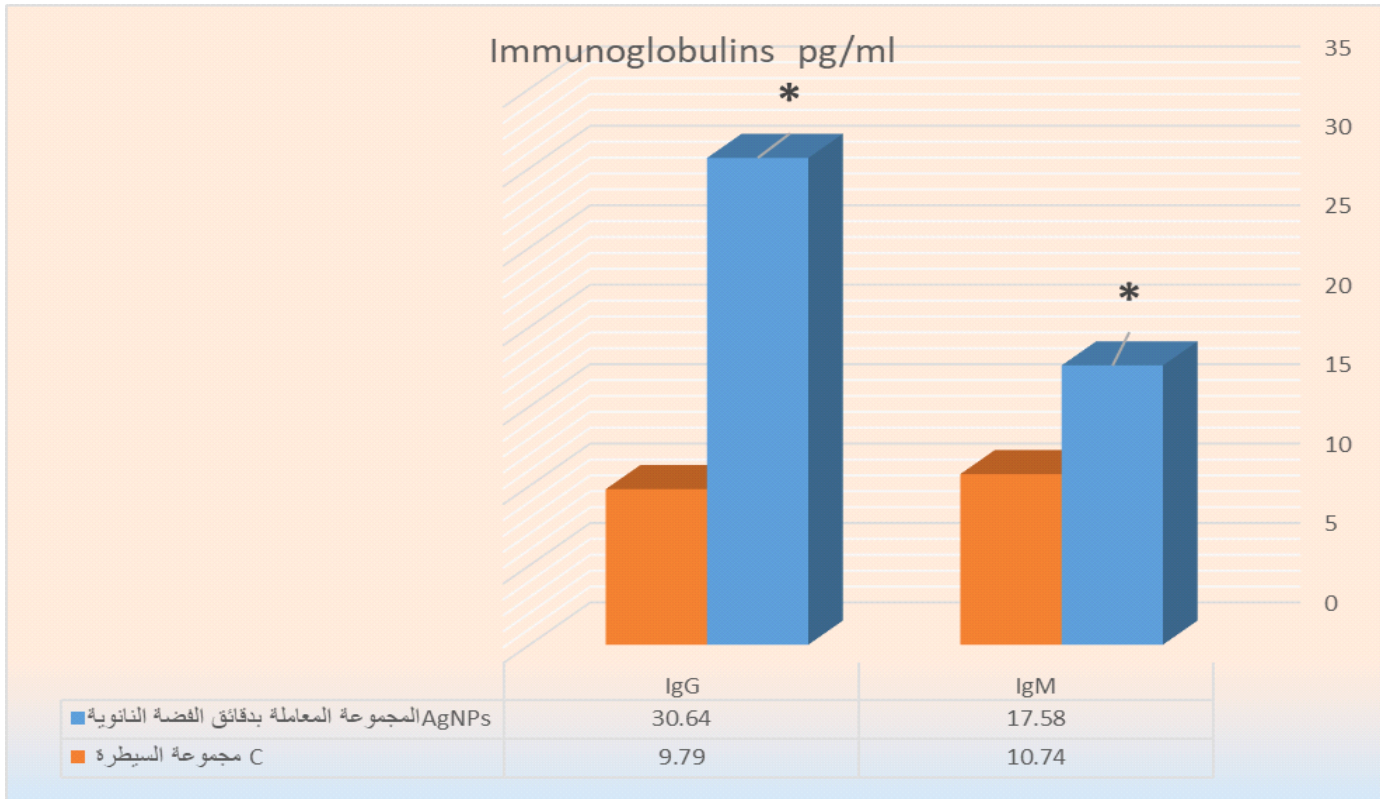
الاستنتاجات: إرتفاع معنوي في مستويات الكلوبولينات المناعية IgG و IgM في مجاميع ذكور الفئران المعاملة بجزيئات الفضة النانوية مقارنة بمجموعة السيطرة.

التوصيات: دراسة تأثير جزيئات الفضة النانوية على الجانب النسيجي والوظيفي في الحيوانات المختبرية لمعرفة تأثيرها السمي على تلك الأنسجة وأماكن تراكمها وآلية التخلص من تلك المركبات.

جدول 1: تأثير جزيئات الفضة النانوية على الكلوبولينات المناعية IgM و IgG

المعدل \pm الانحراف القياسي	المعدل \pm الانحراف القياسي	الكلوبولينات المناعية
5.95 \pm 30.64 *	3.28 \pm 17.58 *	المجاميع المعاملة
1.74 \pm 9.79	2.20 \pm 10.74	المجموعة المعاملة بجزيئات الفضة النانوية AgNPs
		مجموعة السيطرة C

*تشير الى وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$



شكل 7: تأثير جزيئات الفضة النانوية على الكلوبولينات المناعية IgM و IgG

ETHICAL APPROVAL

The research protocol was approved by the Ethical Committee of College of Applied Sciences, Samarra University, Samarra, Iraq.

CONSENT TO PARTICIPATE:

Informed consent was taken from each subject before their enrolment in the study.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

The study conducted in adherence with Helsinki Ethical standards.

FUNDING

No funding

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

References

1. Gupta A, Mumtaz S, Li CH, Hussain I, Rotello VM. Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials. *Chemical Society Reviews*. 2019; 48(2):415-27.
2. Sindhvani S, Chan WC. Nanotechnology for modern medicine: next step towards clinical translation. *Journal of Internal Medicine*. 2021; 290(3):486-498.
3. Kavitha KS, Baker S, Rakshith D, Kavitha HU, Yashwantha Rao HC, Harini BP, Satish S. Plants as green source towards synthesis of nanoparticles. *International Research Journal of Biological Sciences*. 2013; 2(6):66-76.
4. Ibraheem S, Kadhem HA, Hadeethi SA, Jabir MS, Grigore, Popa, Florin MD. Effects of silver nanoparticles on nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains—an alternative approach for antimicrobial therapy. *Romanian Biotechnological Letters*. 2019; 24(2): 286-293.
5. Khashan KS, Jabir MS, Abdulameer FA. Carbon Nanoparticles prepared by laser ablation in liquid environment. *Surface Review and Letters*. 2019; 26(10):1950078.
6. Younus A, Al-Ahmer, Jabir M. Evaluation of some immunological markers in children with bacterial meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Research Journal of Biotechnology*. 2019; 14:131-133.

7. Jabir M, Nayef UM, Jawad KH, Taqi ZJ, Ahmed NR. Porous silicon nanoparticles prepared via an improved method: a developing strategy for a successful antimicrobial agent against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2018 December; 454:012077. IOP Publishing.
8. Ahmad S, Hameed A, Khan K, Tauseef, Ali M, Sultan F, Shahzad M. Evaluation of synergistic effect of nanoparticles with antibiotics against enteric pathogens. Applied Nanoscience, 2020; 10(8): 3337-3340.
9. Mofid O, Mobayen S, Wong WK. Adaptive terminal sliding mode control for attitude and position tracking control of quadrotor UAVs in the existence of external disturbance. IEEE access, 2020; 9:3428-3440.
10. Baskar G, Chandhuru J, Fahad KS, Praveen AS. Mycological Synthesis, Characterization and Antifungal Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. Asian Pharma Press, 2013; 3(4):142-146.
11. SAS J. Statistical Analysis System, Journal of Cary, North Carolina. USA, 2012; 45(5):1977-1983.
12. Huang CL, Huang HJ, Chen SH, Huang YS, Kao PC, Chau YFC, Chiang HP. Localized surface plasmon resonance enhanced by the light-scattering property of silver nanoparticles for improved luminescence of polymer light-emitting diodes. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2021; 103: 283-291.
13. Heer ASK, Mansooria SM, Chamria N. Biosynthesis and characterization of ZnO nanoparticles using ficus religiosa leaves extract. World Journal of Pharmaceutical Res, 2017; 6(10): 818-826.
14. Hashim R, Oda AM, Fadhil I. Green synthesis of Silver Nanoparticles by Beta vulgaris (Chard) Extract: Characterization and Antibacterial Activity. Asian Journal of Chemistry, 2019; 31(8):1881-1884.
15. Abdel-Wahhab MA, Ahmed H, El-Nekeety AA, Abdel-Aziem SH, Shara HA, Abdelaziz M, Sallam MF, Mannaa FA. Chenopodium murale essential oil alleviates the genotoxicity and oxidative stress of silver nanoparticles in the rat kidney. Egyptian Journal of Chemistry, 2020; 63(7):2631-2646.
16. Singh OV, editor. Bio-nanoparticles: biosynthesis and sustainable biotechnological implications. John Wiley and Sons. 2015 Jun 22.
17. Huq, MA. Green synthesis of silver nanoparticles using Pseudoduganella eburnea MAHUQ-39 and their antimicrobial mechanisms investigation

- against drug resistant human pathogens. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(4): 1510.
18. Ami D, Mereghetti , Natalello A. Contribution of infrared spectroscopy to the understanding of amyloid protein aggregation in complex systems. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022 Apr 8; 9: 822852.
19. Sampaio S, Viana JC. Production of silver nanoparticles by green synthesis using artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extract and measurement of their electrical conductivity. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2018; 9(4):045002.
20. Rajan A, Cherian E, Baskar G. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Aspergillus fumigatus* JCF and its antibacterial activity. *International Journal of Modern Science and Technology*. 2016;1(2):52-57.
21. Garcidueñas-Piña C, Tirado-Fuentes C, Ruiz-Pérez , Valerio-García RC, Morales-Domínguez JF. Silver Nanoparticles Synthesized with Extracts of Leaves of *Raphanus sativus* L. *Beta vulgaris* L. and *Ocimum basilicum* and Its Application in Seed Disinfection. *Nanomaterials and Nanotechnology*. 2023 Aug 11;2023.
22. Kulak E, Sembratowicz I, Stępniewska A, Ognik K. The effect of administration of silver nanoparticles on the immune status of chickens. *Annals of animal science*. 2018; 18(2):401-416.
23. Abd-Elhakeem MA, Badawy I, Raafat A. Efficacy of Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agent against *Salmonella* Infection and Accompanied Biochemical, Immunological and Histopathological Changes in Rats. 2016; 54(2):13-19.
24. Elsabahy M, Wooley, KL. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(12):5552-5576.
25. Al-Salman QAMH. Immunological study of some nanocomposites compounds in infected rats with arthritis and determining their antibacterial role. Doctoral thesis. Department of Biology, College of Education for Pure Sciences, University of Karbala, 2018.
26. Minigo G, Scholzen A, Tang CK, Hanley JC, Kalkanidis M, Pietersz GA, Plebanski M. Poly-L-lysine-coated nanoparticles: a potent delivery system to enhance DNA vaccine efficacy. *Vaccine*. 2007; 25(7): 1316-1327.

Effect of Silver Nanoparticles Biosynthesized by Chard Leaf Extract (*Beta vulgaris*) on the Levels of IgM and IgG Immunoglobulins in the Blood of Male Mice

Shefaa abas hamad¹

Shefaa.abas@uosamarra.edu.iq

Osama Nadhom Nijris²

usama.n@uosamarra.edu.iq

Ihab ahmad hammod³

Ihab.ahmed.h@uosamarra.edu.iq

¹ Department of Biotechnology/Faculty of Applied Sciences/Samarra University

² Department of Pathological Analysis/Faculty of Applied Sciences/Samarra University ³ Department of Pathological Analysis/Faculty of Applied Sciences/Samarra University

ABSTRACT

Background: The basic function of the immune system is to interact, detect, and identify foreign substances such as bacteria, cells, fungi, and parasites and eliminate them in order to protect the host body. Nanoparticles can interfere with and interact with this function, or they can be recognized as antigens of foreign substances and thus stimulate the immune response. Disruption of the immune response can lead to serious medical conditions.

Aim: To study the effect of silver nanoparticles on the concentration level of IgG and IgM immunoglobulins.

Material and methods: This study was conducted in the studies laboratory of the Department of Pathological Analysis/Faculty of Applied Sciences/Samarra University for the period from 4/15/2021 until 6/10/2022. Silver nanoparticles were synthesized using chard leaf extract, and the silver nanoparticles were examined on a large scale. Using ultraviolet and visible spectroscopy (UV-Vis), atomic force microscopy (AFM), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and X-ray scattering (EDX), nanoparticle electrokinetic properties were evaluated using microscopy. Scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Twenty male French Albino mice with red eyes were obtained from the General Company for the Manufacture of Pharmaceuticals and Medical Supplies in Samarra. Their weight ranged between 25 and 35 grams. The animals were housed at home. Animals for the College of Applied Sciences/University of

Samarra under appropriate environmental conditions and a controlled temperature of 25 ± 5 degrees Celsius while maintaining appropriate light and ventilation, They were divided into two group, and the first group was injected into the peritoneal cavity with a volume of 0.1 ml and a concentration of 250 mg/kg of silver nanoparticle solution for a period of 14 days. The second group was designated as a control group. Blood samples were drawn the next day after the end of the injection period from all study animals. During the slaughter of the animal, after the animals were partially anesthetized with chloroform they were placed in tubes containing gel tubes, and then the tubes were placed in a centrifuge at 5000 rpm for ten particles for the purpose of separating the blood serum from the components of the blood for the purpose of estimating the level of immunoglobulins IgM and IgG using... A special analysis kit was prepared by the American company GLOUD-CLONE CORP using the Sandwich-ELISA method.

Results: The results of the effect of silver nanoparticles on the level of immunoglobulins IgM and IgG showed that there was a significant increase in their levels at the $P\leq 0.05$ level, reaching 17.58 and 30.64 pg/ml, respectively, for the group treated with silver nanoparticles, compared to the control group, which reached 10.74 and 9.79 pg/ml, respectively.

Conclusions: A significant increase in the levels of IgG and IgM immunoglobulins in groups of male mice treated with silver nanoparticles compared to the control group.

Keywords: Silver nanoparticles, chard extract, IgM, IgG, male mice.