INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES; MAY 2024;7(2): 1-22;
ISSNE: 2522-7386; DOI: HTTPS://DOI.ORG/10.32441/IJMS.7.2.1

تأثير جزيئات الفضة النانوية المخلقة حيوياً بواسطة مستخلص أوراق السلق على مستوى الحركيات الخلوية IL-6 و IL-10و TNF-α في دم ذكور الفئران

شفاء عباس حمد[1]
shefaa.abas@uosamarra.edu.iq
ORCID: https://orcid.org/0009-0004-3253-8865
اسامة ناظم نجرس [2]
usama.n@uosamarra.edu.iq
ORCID: https://orvid.org/0000-0002-9829-8620
إيهاب أحمد حمود[2]
Ihab.ahmed.h@uosamarra.edu.iq
ORCID: https://orcid.org/0009-0006-2505-8702

1 قسم التقانات الإحيائية/كلية العلوم التطبيقية /جامعة سامراء
2 قسم التحليلات المرضية/كلية العلوم التطبيقية /جامعة سامراء

استلم البحث: 2023/10/31 قبل للنشر: 2023/12/2 نشر: 2024/5/1

المؤلف للمراسلة: شفاء عباس حمد' Email: shefaa.abas@uosamarra.edu.iq
قسم التقانات الاحيائية/ كلية العلوم التطبيقية/ جامعة سامراء/ العراق
ORCID: https://orcid.org/0009-0004-3253-8865

لاعتماده كمصدر: حمد ، شفاء عباس : نجرس، اسامة ناظم : حمود، ايهاب احمد. تأثير جزيئات الفضة النانوية المخلقة حيوياً بواسطة مستخلص أوراق السلق على مستوى الحركيات الخلوية IL-6 و IL-10 و TNF-α في دم ذكور الفئران. المجلة العالمية للعلوم الطبية المجلد 7 العدد 2: 1-21
DOI: https://doi.org/10.32441/ijms.7.2.1

الخلاصة

مقدمة: 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، وهذه التفاعلات لها احتمال تعديل المناعة، كما يمكنها تنشيط أو قمع الاستجابة المناعية المحددة وغير المحددة

INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES; MAY 2024;7(2): 1-22;
ISSNE: 2522-7386; DOI: HTTPS://DOI.ORG/10.32441/IJMS.7.2.1

والوظيفة المناعية، ويمكن أن تؤدي إلى استجابة التهابية أو زيادة التقبل للأمراض الميكروبية المعدية أو إستمرار أمراض المناعة الذاتية أو تطور الورم والسرطان.

الهدف: دراسة تأثير جزيئات الفضة النانوية على مستوى الحركيات الخلوية IL-6 و IL-10 وTNF-α.

طرق العمل :أجريت هذه الدراسة في مختبر الدراسات التابع لقسم التحليلات المرضية/كلية العلوم التطبيقية/جامعة سامراء للمدة من 15/4/2021 ولغاية10/6/2022، تم تخليق جزيئات الفضة النانوية بواسطة مستخلص اوراق 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 فوريه للأشعة تحت الحمراء(FT-IR) ، تشتت الأشعه السينين (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 35 –25 غم، تم إيواء الحيوانات في البيت الحيواني لكلية العلوم التطبيقية/جامعة سامراء تحت ظروف بيئية مناسبة ودرجة حرارة مضبوطة 5±25 درجة مئوية مع المحافظة على الضوء والتهوية بشكل ملائم، وتم تقسيمها الى مجموعتين وحقنت 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 جزئيا 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 Serumعن مكونات الدم لغرض تقدير مستوى الحركيات الخلوية IL–6 و IL–10وTNF-α باستعمال عدة التحاليل الخاصة والمجهزة من شركة GLOUD-CLONE CORP الأمريكية بأستعمال طريقة-Sandwich ELISA.

النتائج: بينت نتائج تأثير الجزيئات النانوية على مستوى الحركيات الخلوية IL-6 وTNF-α هناك إرتفاع معنوي في مستوياتها إذ بلغت 580.40 و 290.43 بيكوغرام/مل على التوالي وانخفاض معنوي في مستوى-IL 10إذ بلغت 102.11 بيكوغرام/مل للمجموعة المعاملة بجزيئات الفضة النانوية ,مقارنةً بمجموعة السيطرة التي بلغت 291.13 و 152.84و 126.49بيكوغرام/مل على التوالي.

الاستنتاجات :إرتفاع معنوي في مستوى الحركيات الخلوية IL-6 وTNF-α وانخفاض معنوي في مستوى الحركي الخلوي IL-10 في مجاميع ذكور الفئران المعاملة بجزيئات الفضة النانوية مقارنة بمجموعة السيطرة.

الكلمات المفتاحية :جزيئات الفضة النانوية ,مستخلص السلق، IL-6 ، IL-10، TNF-α ، **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 وكيمائية وبايولوجية 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 Synthesisبالثورة الجديدة في مجال البحث العلمي لأنها من التقنيات الاكثر 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 إضطراب 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 اللاأيوني 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 حيوياً Biosynthesis of silver nanoparticles

خلط 10 مل من مستخلص أوراق السلق مع 90 مل من المحلول النانوي ذو تركيز 1ملي مولاري وضبط الأس الهيدروجيني للخليط على7 ، ثم اضافة قارورتين مختبريتين الاولى تحوي على المستخلص فقط دون اضافة المحلول النانوي اما الثانية فتحتوي على المحلول النانوي فقط دون اضافة المستخلص النباتي كعاملي 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 اللاأيوني وعمل له طرد مركزي بسرعة 10000 دورة في

الدقيقة ولمدة 10 دقائق، أخذ الراسب المتكون ليجفف بوساطة الفرن الحراري وبدرجة حرارة°105 م ولمدة تتراوح مابين 6-5 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 فوريه للأشعة تحت الحمراء(FT-IR) ، تشتت الأشعه 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 35 – 25 غم ,وتم إيواء الحيوانات في البيت الحيواني لكلية العلوم التطبيقية/جامعة سامراء تحت ظروف بيئية مناسبة، درجة حرارة مضبوطة 5±25 درجة مئوية مع المحافظة على الضوء والتهوية بشكل ملائم، وقبل اجراء 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 عشوائيا الى مجموعتين ووضعت في اقفاص من البلاستيك مجهزة بمعالف خاصة ومغطاة بغطاء معدني ذات أرضية مفروشة بالنشارة وفي كل مجموعة خمسة حيوانات وتوزعت بالشكل الاتي :

-**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 Sodium Chloride 0.9 ولمدة 14 يوم.

جمع عينات الدمCollecting 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 جزئيا بمادة الكلوروفورم، ثم وضعت في انابيب تحتوي على هلام Gel tube

ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي Centrifuge 5000 دورة /دقيقة لمدة عشر دقائق لغرض فصل مصل الدم Serum عن مكونات الدم لغرض الاختبارات المناعية .

الاختبارات المناعية للحركيات الخلويةCytokines examination

اجريت الفحوصات المناعية للفئران المحقونة بجزيئات الفضة النانوية AgNPs بعد اسبوعين من الحقن لكل المجاميع للكشف عن مستويات IL-6 و IL-10و TNF-α باستعمال تقانة ELISA

وتم تقدير تركيز الانترلوكينات IL-6 و IL-10 و TNF-α في مصل دم الفئران المختبرية باستعمال عدة التحاليل الخاصة والمجهزة من شركة GLOUD-CLONE CORP الأمريكية، حيث تم قياس تركيز كل من الانترلوكينات أعلاه في مصل الدم ذلك باستعمال طريقة الاليزا–الامتزاز المناعي المرتبط بالانزيم Sandwich-ELISA والمعتمدة على مبدأ تغيير اللون الناتج عن ارتباط الاضداد النوعية الخاصة بالمستضد.

–التحليل الإحصائي Statistical Analysis

حللت النتائج احصائيا 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 هيأة مسحوق بعد تجفيفه وتم اخذ وزنه وبعد ذلك تم دراسة خصائصه باستعمال تقنية الاشعة فوق البنفسجية والمرئية ومجهر القوة الذري 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 نجحو 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 واساسيا 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 النانويةCharacterization of Nanoparticles

-قياس طيف الأشعة فوق البنفسجية – المرئية لجزيئات الفضة النانوية

UV-visible spectrum of silver nanoparticles

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

أذ تم تحديد الطول الموجي الأعظم λ_{max} لمحلول الفضة النانوية بإستعمال مطيافية الأشعة المرئية – فوق البنفسجيةUV-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 حيويا باستعمال مستخلص مائي لأوراق نبات السلق وكانت ذروة الامتصاص ضمن المعدل 417 نانومتر.

قياس طيف الاشعة تحت الحمراء لجزيئات الفضة النانوية

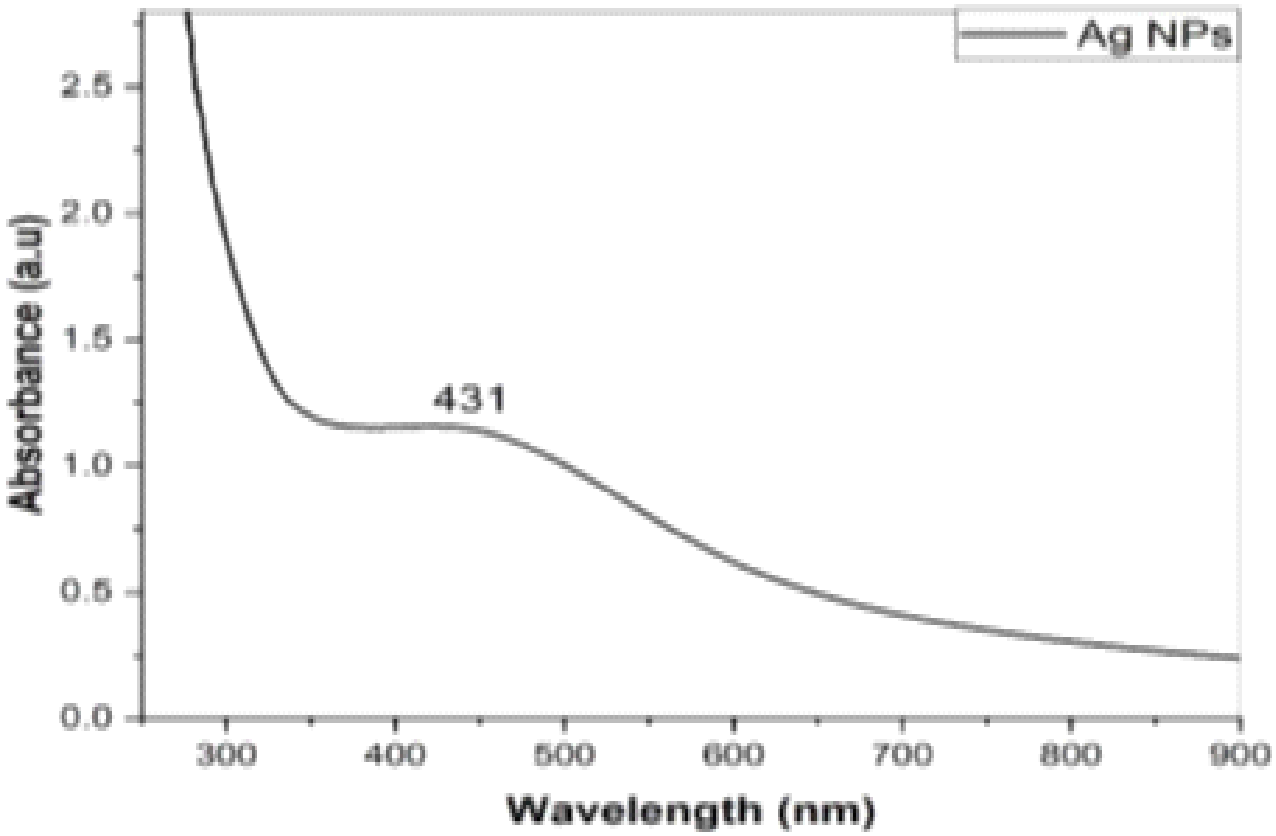
FT-IR of silver nanoparticles

تم تحليل الجزيئات النانوية المخلقة 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 لدقاق الفضة النانوية على التوالي قيد الفحص وفي نطاق من 4000–400 سم وسجلت القمم 761.91 و 1350.22و 1383.01و 1597.11و 1629.90و 2715.86و 2806.52و3404.47.

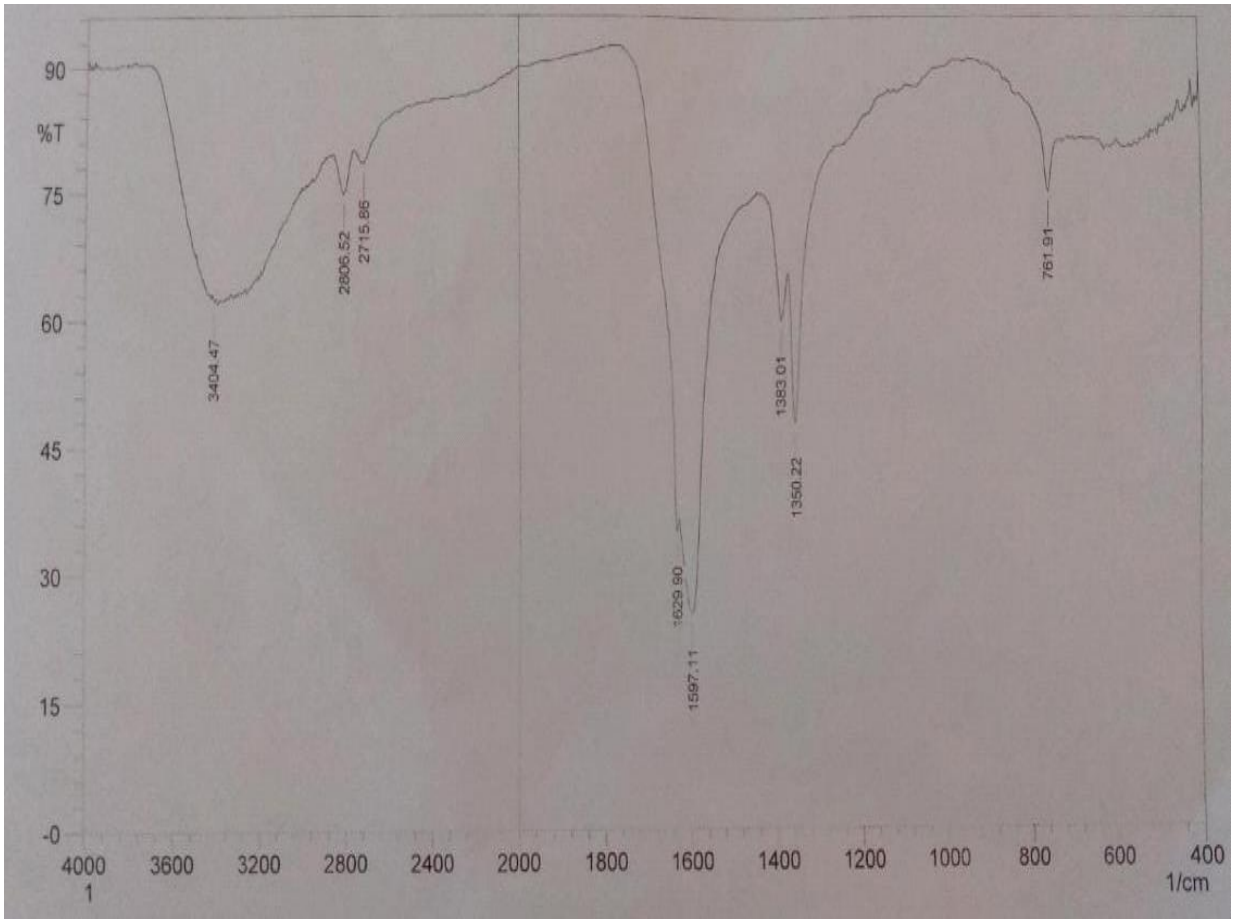
إن القمم التي تظهر بحدود 600 الى 1400 تشير إلى مجاميع الكاربوكسيل -O=C او مجموعة C-N وهي امتداد للأواصر الأمايدية في البروتينات[19]. وهذا يشير إلى المحتوى العالي من البروتينات في ورقة النبات ,وان القمة 1350.22 تشير إلى مجاميع Alcohol والتي تحتوي على الأصرة O-H والمركبات ذات الأواصر C-O التي تشير إلى رابطة ثلاثية بين الكاربون والنتروجين، والقمة 1597.11 تشير الى وجود الاصرة O-C و --C-Cوهي امين اولي وثانوي ,اما القمة 1629.90 تشير الى وجود مجموعة Conjugated alkeneالحاوية على الاصرةC=C ، والقمم 2715.86 و2806.52 تشير الى مركبات Alkaneالحاوي 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].

INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES; MAY 2024;7(2): 1-22;
ISSNE: 2522-7386; DOI: HTTPS://DOI.ORG/10.32441/IJMS.7.2.1



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

–



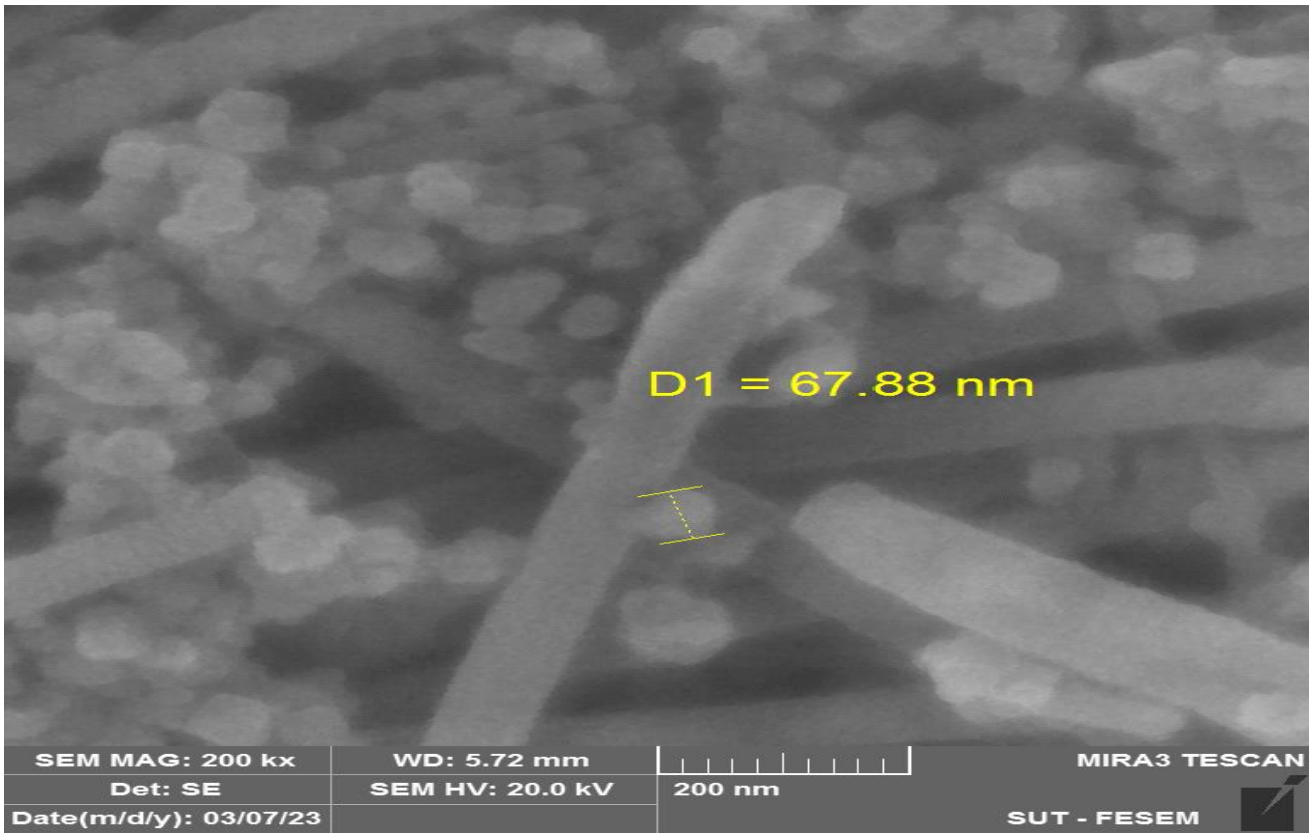
شكل :2 طيف فيوريه للأشعة تحت الحمراء لجزيئات الفضة النانوية

- **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 االفضة 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 المخلقة حيويا بواسطة مستخلص اوراق نبات السلق يتراوح مابين 50−30 نانوميتر .

INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES; MAY 2024;7(2): 1-22;
ISSNE: 2522-7386; DOI: HTTPS://DOI.ORG/10.32441/IJMS.7.2.1



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 ديباي شرر Debye-Scherrer، تم مقارنة القمم المتحصلة مع قاعدة بيانات حيود الاشعة السينية العالمية JCPDS إذ دعمت هذه القاعدة وبقوة وجود الجزيئات النانوية.

$$D_{hki} = \frac{k \times \lambda}{\beta hki \times Cos\ \theta hki}$$

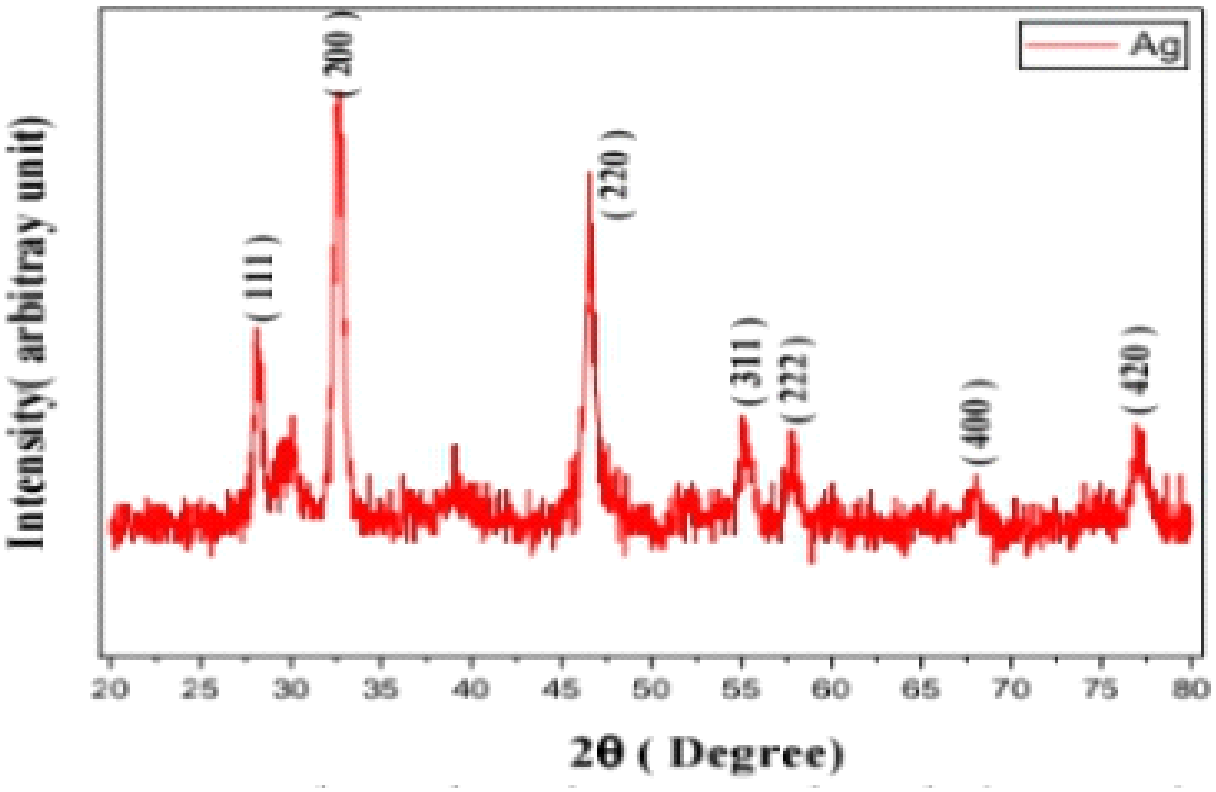
$$K = 0.94$$

$$\lambda = 1.05418 A^{\circ}$$

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

حيث إن :D الحجم الحبيبي و :λالطول الموجي للإشعاع و :θزاوية الحيود للأشعة السينية و :βالعرض عند منتصف القمة.

وتم تشخيص التركيب البلوري لمسحوق نترات الفضة النانوي المحضر بتقنية حيود الأشعة السينية ومواقع القمم الموضحة في الشكل4 ، تبين إن متوسط حجم حبيبات جزيئات الفضة النانوية 37.4 نانومتر.



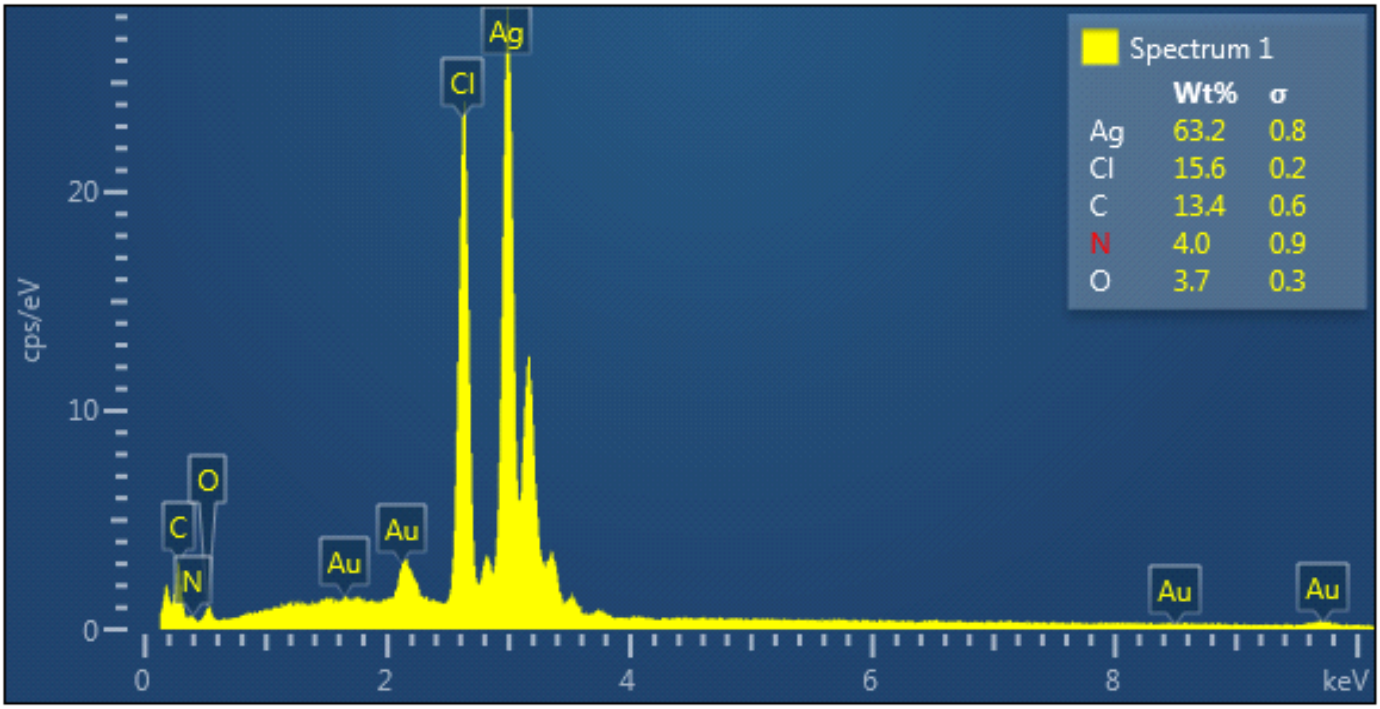
شكل :4 حيود الأشعة السينية لجزيئات الفضة النانوية

- **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 و 4 دليل على وجود حبيبات الفضة المحضرة كما موضح بالشكل5 ، أذ تبين النتائج ان العينة تحتوي على الفضة بحدود63.2% ، وجاءت هذه النسبة اعلى بكثير من النسبة التي توصل اليها Garcidueñas-Piña وآخرون [21] التي كانت39.76% .

INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES; MAY 2024;7(2): 1-22;
ISSNE: 2522-7386; DOI: HTTPS://DOI.ORG/10.32441/IJMS.7.2.1

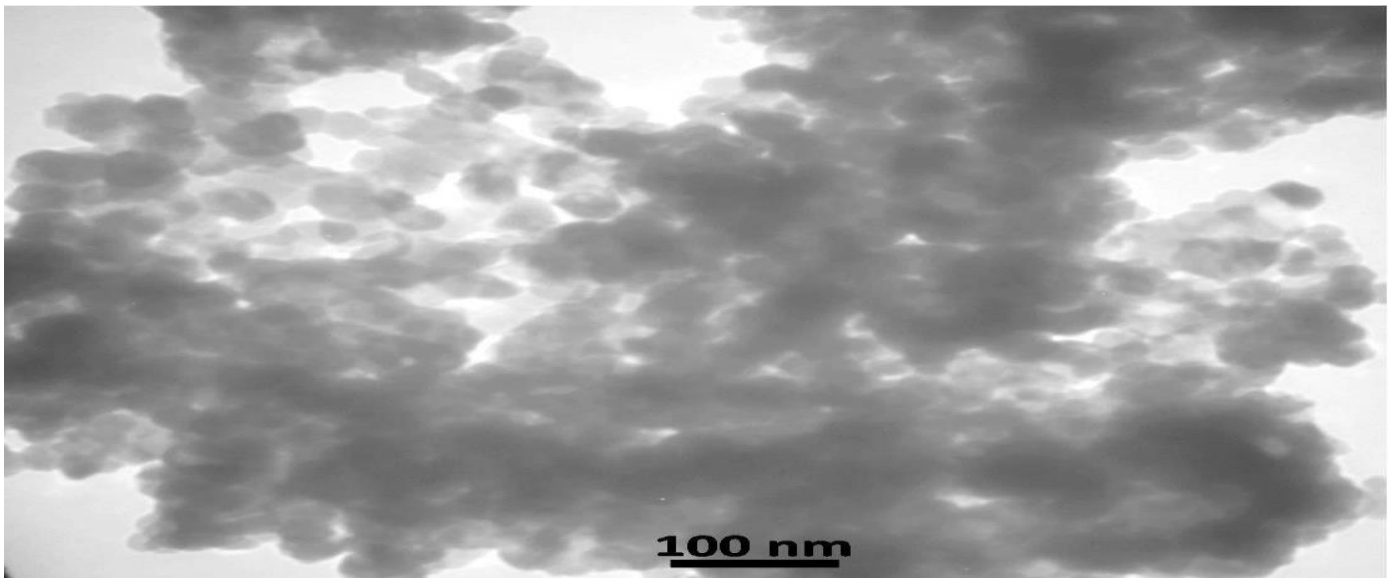


الشكل :5 تشتت الطاقة بالأشعة السينية EDX لجزيئات الفضة النانوية

- **قياس المجهر الإلكتروني النافذ لجزيئات الفضة النانوية**

nanoparticles (TEM) silver Transmission electron microscope for

تبين النتائج الموضحة بالشكل6 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 تكبير100 نانومتر

INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES; MAY 2024;7(2): 1-22;
ISSNE: 2522-7386; DOI: HTTPS://DOI.ORG/10.32441/IJMS.7.2.1

-تأثير جزيئات الفضة النانوية على الحركيات الخلوية 6 و 10 وعامل النخر الورمي-الفا

Effect silver nanoparticles on IL-6, IL-10 and TNF-α

اظهرت نتائج الدراسة الحالية المبينة في الجدول 1 والشكل 7 ارتفاعا معنوياً في مستوى الحركي الخلوي- 6 وعامل النخر الورمي-ألفا وانخفاظاً معنوياً في مستوى الحركي الخلوي-10 عند مستوى إحتمالية P≤0.05 لدى المجاميع المعاملة مقارنةً بمجموعة السيطرة، اذ كانت المعدلات 580.40±44.73 و 290.43±49.00 و102.11±17.33 بيكوغرام/مل على التوالي للمجموعة المعاملة بجزيئات الفضة النانوية و 291.13±22.88 و 126.49±8.32و 152.84±22.42 بيكوغرام/مل على التوالي لمجموعة السيطرة ,وإن هذه النتائج تتوافق مع ماوجده Ashour وآخرون [22] الذين لاحظوا ارتفاع معنوي في مستوى IL-6 وTNF-α في دم الأرانب التي حقنت تحت الصفاق بجزيئات الفضة النانوية ولاحظوا ايضاً ارتفاعاً معنوياً IL-10 وهذا لاتتفق مع الدراسة الحالية التي سجلت انخفاظاً معنويا في مستوى هذا الحركي الخلوي ,كما تتفق مع ماتوصل إليه السلمان[23] الذي لاحظ حدوث إرتفاع معنوي P≤0.05 في مستوى تراكيز IL-6 و TNF-α عند ذكور الجرذان البيض المحقونة بجزيئات الفضة والزنك النانوية،كما لاحظ Zayerzadeh وآخرون [24] إرتفاع معنوي في مستويات تراكيز IL-6 و TNF-α في سيروم دم الجرذان التي جرعت فموياً بجزيئات الفضة النانوية لمدة 7 و14 و28 يوم، ولا تتفق مع نتائج Frial[25] الذي لاحظ إرتفاع في مستوى تركيز IL-10 الذي قام بدراسة تأثير جزيئات الفضة النانوية على الكبد والسيتوكينات التنظيمية في الأرانب.

كما أثبت Liu وآخرون [26] إن الجزيئات النانوية تسبب إثارة الاستجابة المناعية وإفراز الإنترلوكين IL-1β وعامل نخر الورم ألفا TNF-α .

أشارت نتائج دراسة Seiffert وآخرون [27] ان جزيئات الفضة النانوية أكبر من 100 نانومتر تميل إلى التجمع نسبيا بسرعة في المختبر بالمقارنة مع الجزيئات النانوية أصغر من 100 نانومتر وانها تكون عينات جديدة في غضون أسبوعين بعد التوليف في الخلايا البشرية الظهارية والضامة من الجلد أو الرئة، كما ان جزيئات الفضة النانوية ذات الحجم 20 –5 نانومتر تسبب السمية الخلوية وتكوين ROS ويشكل أكبر من الجزيئات النانوية فوق 80 نانومتر التي تحفز الاستجابات المناعية الالتهابية بتراكيز أقل وتسبب تلك الاحجام بانتاج السيتوكينات الالتهابية منها وبشكل رئيسي IL-8-11 ، TNF-α، IL-6 هي كبرى السيتوكينات التي يسببها التعرض للفضة النانوية في المراحل المبكرة ,وشارت تلك الدراسات الى الوظيفة الأساسية للجهاز المناعي هو الكشف والتعرف على المواد الغريبة من أجل حماية المضيف والجزيئات النانوية يمكن أن تتداخل مع هذه الوظيفة

أو يمكن أن تشخص بنفسها كمستضدات خارجية وبالتالي تستحت الاستجابة المناعية ,وقد أظهرت العديد من الدراسات أن جزيئات 200 من التركيب الكيميائي نفسه ولكن باحجام مختلفة تشكل مخاطر عديدة وتزداد تلك المخاطر بصغر حجم الجزيئات وتكون أكثر ضررا، وقد ركزت الدراسات النانوية على السمية الخلوية لجزيئات الزنك النانوية والتي تحدث في تراكيز مختلفة اعتمادا على حجم تلك الجزيئات، اذ يمكن أن تحدث آثار شبه قاتلة وطويلة الأجل على الخلايا اذا كانت باحجام نانوية منخفضة[28] .

أكد Mohanan وآخرون [29] ان السيتوكينات المحفزة للالتهاب Pro-inflammatory cytokines تستعمل كمعايير للتنبؤ بالآثار المناعية لاستخدام المركبات النانوية وإمكانية احداثها للتسمم الخلوي من خلال الالتهابظ , ويعزى السبب في زيادة إنتاج كميات كبيرة من السيتوكينات المحفزة للإلتهاب TNF-α و1L-1 و IL-12 وIFN-γإلى استنساخ الحمض النووي الخاص بانتاج تلك السيتوكابنات في مصل الفئران نتيجة معاملتها بتلك المركبات النانوية المحورة[23] .

أشاروا Elsabahy و Wooley [30] إلى ان الجزيئات النانوية التي تدخل في الجسم عن طريق التجريع تتعرض لتفاعلات معقدة من خلايا الدم والبروتينات وفور دخولها تتكاتف بروتينات الدم على أسطحها وإمتزاز البروتينات على اسطح الجزيئات النانوية يكون شكل الأكليل Protein corona وهذه التفاعلات تحدد التوزيع البيولوجي والفعالية العلاجية للجزيئات النانوية وكما تسهم في نوع الإستجابة المناعية وهنا جاءت بتعزيز إفراز عامل النخر الورمي TNF-α و IL-13 كذلك كما مر في معالجة الجرذان بجزيئات الفضة النانوية AgNPs كما أشار السلمان [23] ان الاستماعة Opsonization تعد أحد أهم العوامل المحددة لوصول وتوزيع الجزيئات النانوية في جسم الكائن الحي وان تحفيز المكونات البروتينية الأكثر شيوعا الى الإحاطة بالجزيئات النانوية وتكوين الهالة البروتينية هي بروتينات المتمم والألبومين والبروتينات الشحمية والفيبرينوجين اذ ان اسطح الجزيئات النانوية تحمل علامات مستضدية تجعلها عرضة للهجوم من قبل Mononuclear phagocytic system اذ ان خلايا الدم تتعرض لبعض الجزيئات النانوية قد تنتج السيتوكينات ولكن الآليات الدقيقة لإنتاج السايتوكين غير معروفة لحد الآن على عكس المستضدات التقليدية Lipoproteins polysaccharides, DNA, RNA والتي تحفز السيتوكينات بعد استثارة، TLRs فمن غير المعروف ما إذا كان التعرف على الجزيئات النانوية من قبل الخلايا المناعية عن طريق TLRs محددة أو بواسطة مستقبلات أخرى[31] .

اثبتت دراسة Heng واخرون [32] عند مقارنة تأثير شكل الجزيئات النانوية لأوكسيد الزنك الكروية مقابل الورقية ذات مساحة سطحية متماثلة تقريبا وجد ان الجزيئات الكروية على الرغم من كونها ذات فعالية لم تكن

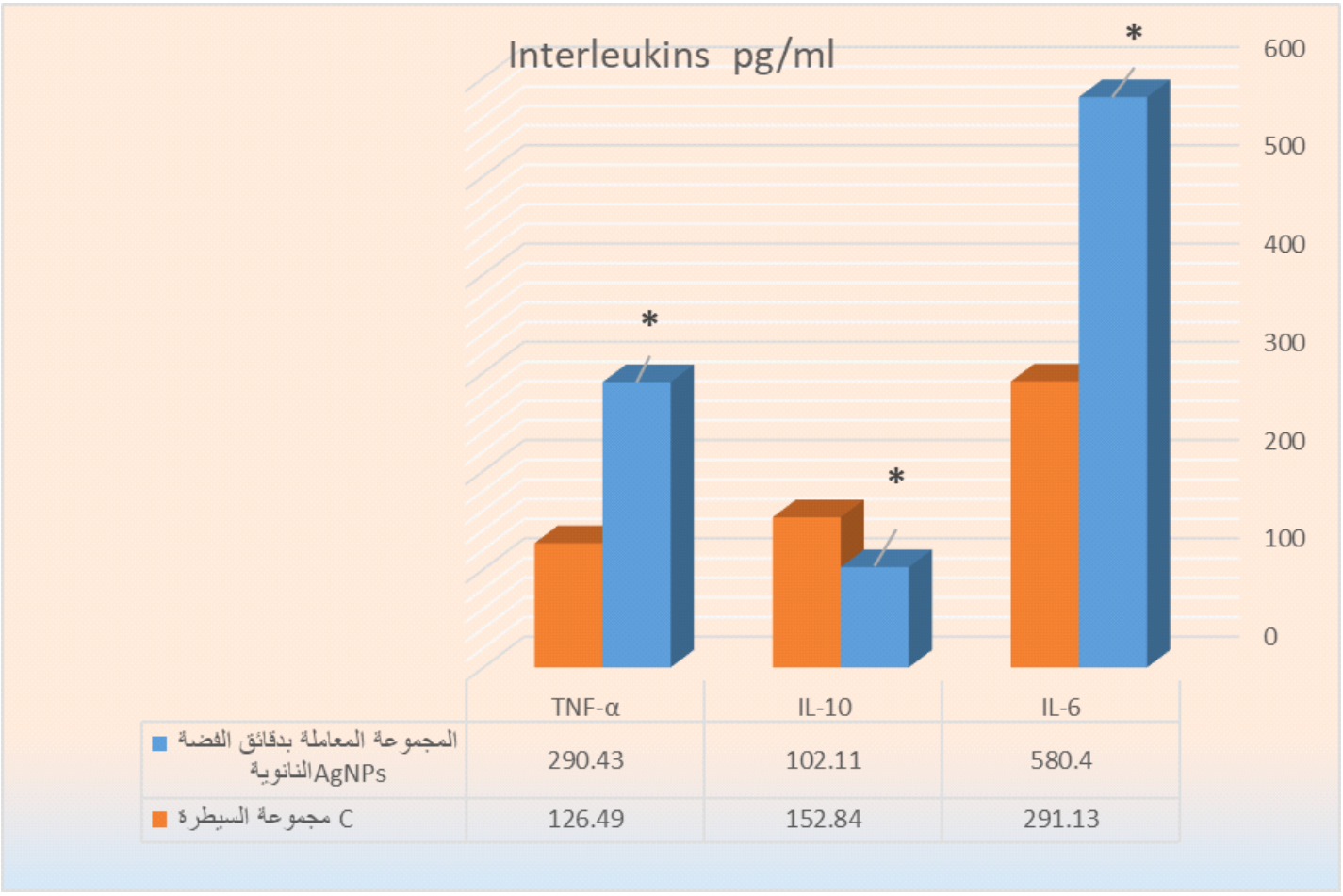
هناك تاثيرات في تحفيز إفراز IL-6 وكذلك ارتفاع طفيف لإفراز TNF-α تنتج بسبب ارتفاع معدل الخلايا البلعمية للفئران المعاملة بجزيئات الزنك النانوية الكروية، بالمقارنة مع الفئران التي تمت معاملتها بجزيئات الزنك النانوية الورقية إذ لوحظ ان الخلايا الأولية Dendritic cells هي التي سببت إنتاج السيتوكين TNF-α بكميات اعلى من الجزيئات الكروية، وبالتالي فإن استهداف انواع محددة من الخلايا هو عامل مهم في تحديد الإستجابة المناعية للجزيئات النانوية.

دراسة Elsabahy و Wooley [30] بينت آلية الاستجابة المناعية إتجاه امتلاك الجزيئات النانوية محددات مستضدية مختلفة ترتبط مع مستقبلات خلوية محددة بعدها تتم عملية الإدخال الخلوي Endocytosis الذي يحدد الاستجابة المناعية، وهناك أربعة طرق رئيسية للبلعمة بوساطة مستقبلات بواسطة نظام المانول Complement receptor (CRs) Fey receptor (FeγRs) Mannose receptor (MRs) Scavenger receptor (SRs) وتتوسط الاستجابة المناعية وتحدد طبيعة هذه الاستجابة سواء بالمانوز او ببروتينات المتمم او البروتينات المناعية Immunoglobulins بعد أن تتم استساغة الأجسام الغريبة الهدف (NP) بوساطة المستقبلات MR و CR وFeγR على التوالي أما مستقبلات SRs فيعتقد أنها تتفاعل مع السطوح سالبة الشحنة، كما يمكن للخلايا البلعمية القضاء على تلك المواد الغريبة بواسطة طرق أخرى .

جدول1 : تأثير جزيئات الفضة النانوية على الحركيات الخلوية 6 و 10وTNF-α

الانترلوكينات المجاميع المعاملة	IL-6 pg/ml)) المعدل ± الانحراف القياسي	IL-10 pg/ml)) المعدل ± الانحراف القياسي	TNF-α pg/ml)) المعدل ± الانحراف القياسي
المجموعة المعاملة بدقائق الفضة النانوية AgNPs	44.73±580.40 *	17.33±102.11 *	49.00±290.43 *
مجموعة السيطرةC	22.88±291.13	22.42±152.84	8.32±126.49

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



شكل 7: تأثير جزيئات الفضة النانوية على الحركيات الخلوية 6 و 10وTNF-α

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. Sindhwani 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 SA, Kadhem HA, Hadeethi SA, Jabir MS, Grigore R, Popa M, 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 S, 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 MS, 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 I, 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 thegenotoxicity 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 P, 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. Garcidueas-Piña C, Tirado-Fuentes C, Ruiz-Pérez J, Valerio-Garcيa RC, Morales-Domيnguez 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. Ashour I, Saleh S, Shalhy A, Ibrahim E, Doiwdar M. Silver nanoparticles effect on cytokines in rat. Biochemistry Letters. 2017 Dec 1;13 (1): 172-182.
23. 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.
24. Zayerzadeh E, Attar F, Shabanian M. Toxicity assessment of silver nanoparticles oral administration on immune system in rats. 5th international congress on Nanoscience and Nanotechnology (1CCN 2014); 520: 3.
25. Frial GA. Ecophysiological study of silver- nanoparticles effect on the liver and regulatory cytokine in rabbit. Mesop. Environ. J .2016; 2 (3): 27-33.
26. Liu X, Lu B, Fu J, Zhu X, Song E, Song Y. Amorphous silica nanoparticles induce inflammation via activation of NLRP3 inflammasome and

HMGB1/TLR4/MYD88/NF-kb signaling pathway in HUVEC cells. Journal of Hazardous Materials, 2021; 404: 124050.

27. Seiffert J, Hussain F, Guo C, Chang Y, Zhang J, Smith R, Chung F. Inhaled silver nanoparticles induce pulmonary oxidative injury and inflammation: Differential effects between rat strains. European Respiratory Journal,2014; 44(Suppl 58).
28. Ingle AP, Duran N, Rai M. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology.*2014 ; 98:1001-1009.
29. Mohanan D, Slütter B, Henriksen-Lacey M, Jiskoot W, Bouwstra J A, Perrie Y, ... Johansen P. ministration routes affect the quality of immune responses: a cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems. Journal of Controlled Release,2010:147(3), 342-349.
30. Elsabahy M, Wooley K. L. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. Chemical Society Reviews, 2013;42(12):552-5576.
31. Junho CVC, Panico K, Nakama K K, Sonoda M T, Christoffolete MA, Beserra SS, ... Carneiro-Ramos M S. Time Course of Gene Expression Profile in Renal Ischemia and Reperfusion Injury in Mice. In Transplantation Proceedings,2020, December;52(10):2970-2976. Elsevier.
32. Heng BC, Zhao X, Tan EC, Khamis N, Assodani A, Xiong S, Ruedl C. Loo JS. Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles. *Arch. Toxicol.* 2011:1517-1528.

INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES; MAY 2024;7(2): 1-22;
ISSNE: 2522-7386; DOI: HTTPS://DOI.ORG/10.32441/IJMS.7.2.1

Effect of Silver Nanoparticles Biosynthesized by Chard Leaf Extract (*Beta vulgaris*) on the Levels of Cytokines IL-6, IL-10, and TNF-α in the Blood of Male Mice

Shefaa Abas Hamad[1]
Shefaa.abas@uosamarra.edu.iq
Osama Nadhom Nijris[2]
usama.n@uosamarra.edu.iq
Ihab ahmad hammod[3]
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: There is a high probability that nanoparticles interact within the body with components of the immune system, such as immune cells, which may lead to immune system connections and reactions to nanoparticles. These reactions have the potential to modify immunity, activate or suppress the specific and nonspecific immune response and immune function, and can lead to an inflammatory response, increased receptivity to infectious microbial diseases, persistence of autoimmune diseases, or tumor and cancer progression.

Aim: To study the effect of silver nanoparticles on the levels of the cytokines IL-6, IL-10, and TNF-α.

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 groups, 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 cytokines IL-6, IL-10, and TNF-α 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 nanoparticles on the level of cytokines IL-6 and TNF-α showed a significant increase in their levels, reaching 580.40 and 290.43 pg/ml, respectively, and a significant decrease in the level of IL-10 to 102.11 pg/ml for the group treated with silver nanoparticles, compared to the control group of 291.13, 152.84, and 126.49 pg/ml, respectively.

Conclusions: There was a significant increase in IL-6 and TNF-α and a significant decrease in IL-10 in male groups of mice treated with silver nanoparticles compared to the control group.

Keywords: silver nanoparticles, chard extract, IL-6, TNF-α, IL-10, male mice.