



جمهورية العراق - وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

دراسة مناعية لبعض المركبات النانوية في الجرذان المصابة بالتهاب المفاصل وتحديد دورها المضاد للبكتريا

اطروحة تقدم بها
الطالب

قيصر عبد السجاد محمد حسين السلطان

بكالوريوس علوم الحياة 2002 ماجستير حيوان 2012 / جامعة كربلاء

إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء وهي جزء
من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم الحياة - علم الحيوان

بإشراف

أ.د. عباس مطرود باشي

أ.م.د. هيام عبد الرضا العواد

2018 م

1439 هـ



الرَّحْمَنُ ۞ عَلَّمَ الْقُرْآنَ ۞

خَلَقَ الْإِنْسَانَ ۞ عَلَّمَهُ الْبَيَانَ

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

سورة الرحمن / آية 1-4

الإهداء

إلى ابن عم المصطفى . . علي المرتضى واله الطيبين الطاهرين

صلوات الله عليهم أجمعين . . .

إلى من تصعد دعواتهما لي في كل صلاة . . أمي وأبي

...

إلى من أثار في نفسي الحماسة والمثابرة . . اخوتي الاعزاء

...

إلى من تحملوا معي كل العناء . . نزوجتي وأولادي

الأوفياء . . .

أهدي هذا الجهد .

قيصرال سلمان

شكر وتقدير

"كن عالماً .. فإن لم تستطع فكن متعلماً ، فإن لم تستطع فأحب العلماء ، فإن لم تستطع فلا تبغضهم"

بسم الله الرحمن الرحيم

لك الحمد ربي كما ينبغي لجلال وجهك وعظيم سلطانك أن يحمد ، اللهم لا أحصي ثناءً عليك أنت كما أثنيت على نفسك والصلاة والسلام على سيد المرسلين وشفيع المؤمنين الحبيب المصطفى سيدنا محمد "صلى الله عليه وعلى آله الطيبين الطاهرين" . والحمد لله الذي أغنانني بفضلته وسخر لي جمعاً من الخيرين ممن كانت رفقتهم عوناً لي لإتمام هذا العمل وفي نهايته لا يسعني إلا أن أقدم خالص شكري وتقديري لهم جميعاً.

يطيب لي أن أقدم كلمة شكر عميقة إلى استاذي الكريمين أ.م.د. هيام عبد الرضا العواد و أ.د. عباس مطرود باشي أعترافاً مني بالجميل لما كان لهما من عظيم الأثر في إنجاح هذا العمل ، وأقدم خالص شكري وتقديري الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة المتمثلة بالاستاذ الدكتور نجم عبد الحسين نجم المحترم امتناناً لهم ، كما اخص بالشكر و التقدير السيدة رئيسة القسم أ.م.د. ياسمين خضير خلف لما ابدته من مساعدة وتسهيل الاجراءات ومن تفاني في دفعي لاكمال عملي ، كما واشكر الاستاذ حسين عبد اللطيف لمساعدته لي في بعض التحليلات الاحصائية والتشجيع فيما يخص الجانب العملي ، وأتقدم بمحبتتي وأمتناني للاخ العزيز الدكتور علاء حسين مهدي لمساعدته الكبيرة في انجاز هذا الجهد ادامه الله عوناً وسنداً لي . وأقدم خالص شكري وتقديري للدكتور رافد عباس العيسى و للاستاذ جاسم عبد العباس لمساعدتي بفتح مختبرات كلية العلوم الطبية التطبيقية لي وكذلك للدكتور حسن علي السعدي لما قدمه من مساعدة طبية في انجاز هذا العمل وايضا د. مازن حامد و الاخ عباس محمد في كلية الصيدلة /جامعة كربلاء للعمل في البيت الحيواني و كذلك اخص بالشكر ا.م.د. علاء طارق الحسناوي في كلية العلوم /جامعة بابل، ولمنتسبي مختبر الاحياء المجهرية في مستشفى الهندية العام اقدم شكري الجزيل. وفي هذا العمل لا يسعني إلا أن أتقدم بمحبتتي وأمتناني إلى من أعانوني في كل لحظة ... وكانوا عوناً لما تحملوه من تقصيري وانشغالي عنهم وأنبتوا في روعي جذوة الأمل كلما خفتت اولادي .. أبقاهم لي الخالق ما أبقاني في هذه الدنيا ، والى رفيقة دربي الذي لأنسى فضلها ما حبيت بما مكنتني من شق هذا الدرب زوجتي .. والذين كانوا المسك الذي أختم به تعداد من شكرت أن كلماتي جُلّها قاصرة عن شكرهم ولا تقيهم إلا جزءاً يسيراً من حقهم الواجب علي شكره وإن أطلت .

واللهما ولي التوفيق

قصر السلام

إقرار المشرف على الرسالة

أشهد ان إعداد هذه الاطروحة الموسومة (دراسة مناعية لبعض المركبات النانوية في الجرذان المصابة بالتهاب المفاصل وتحديد دورها المضاد للبكتريا) قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء وهي جزءٌ من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم الحياة / الحيوان .

التوقيع:

الاسم : د. هيام عبد الرضا كريم

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2018

التوقيع:

الاسم : د. عباس مطرود باشي

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان: كلية العلوم الطبية التطبيقية - جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2018

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الأستاذين المشرفين ، أحيل هذه الاطروحة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع:

الاسم : د. ياسمين خضير خلف

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2018



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية التربية للعلوم الصرفة
شعبة الدراسات العليا

﴿إقرار لجنة المناقشة﴾

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه نشهد بأننا قد أطلعنا على الأطروحة الموسومة بـ (دراسة مناعية لبعض المركبات النانوية في الجرذان المصابة بالتهاب المفاصل وتحديد دورها المضاد للبكتيريا) المقدمة من قبل الطالب (قيصر عبدالسجاد محمد حسين السلمان) كجزء من متطلبات نيل درجة الكتوراه (علم الحيوان)، وبعد إجراء المناقشة العلمية وجد إنها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الرسالة بتقدير (إمتياز).

<u>عضو اللجنة</u>	<u>عضو اللجنة</u>	<u>رئيس لجنة المناقشة</u>
التوقيع:	التوقيع:	التوقيع:
الاسم: د حميدة عيدان سلمان	الاسم: د. حسن فاضل ناجي	الاسم: د. عبد النبي جويد عبد
المرتبة العلمية: استاذ	المرتبة العلمية: استاذ	المرتبة العلمية: استاذ
مكان العمل: جامعة كربلاء كلية التربية للعلوم الصرفة	مكان العمل: جامعة بابل /كلية العلوم	مكان العمل: جامعة بابل /كلية التربية للبيات

<u>عضو اللجنة</u>	<u>عضو اللجنة</u>
التوقيع:	التوقيع:
الاسم: د. فرحان عبود رسن	الاسم: د. وفاء صادق محسن
المرتبة العلمية: استاذ مساعد	المرتبة العلمية: استاذ مساعد
مكان العمل: الجامعة التقنية الوسطى	مكان العمل: جامعة كربلاء /كلية <u>العلوم</u>
التاريخ: 2018/ /	التاريخ: 2018/ /
اسويج:	التوقيع:
الاسم: أ.د. عباس مطرود باشي	الاسم: أ. م. هيام عبدرضا كريم
المرتبة العلمية: أستاذ	المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
مكان العمل: جامعة كربلاء/كلية التربية للعلوم الصرفة	مكان العمل: جامعة كربلاء/كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: 2018/ /	

التوقيع:
الاسم: د. نجم عبد الحسين نجم
المرتبة العلمية: أستاذ
التاريخ: 2018/ /

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى تحضير ومعرفة تأثير ثلاث مركبات نانوية للحد من التهاب المفاصل الرثياني (Rheumatoid Arthritis (RF) المستحث في ذكور الجرذ البيض بمادة Complete Freund's Adjuvant (CFA) من خلال تحضير مركبات نانوية هجينة من ZnO ، Agnano و Xerogel و تشخيصها ودراسة بعض فعاليتها الحياتية (كالسيطرة على التحرر والنسبة المئوية لتحرر العلاج بالاوساط المختلفة) قبل و بعد تحميل علاجي (Methotrxate (MTX و Naproxen (NAP). كما تضمنت هذه الدراسة معرفة التأثير التثبيطي التآزري لمركبي ZnO ، Agnano بعد تحميل المضادين الحيويين Gentamycin(GN) و Erythromycin(ER) بعد اخذ التركيز المثبط الادنى (Inhibition Concentration Minimal- MIC) لكل منها . اذ حضرت المركبات النانوية من اوكسد الزنك و نترات الفضة ZnO و $Ag(NO)_3$ (كلا على انفراد) ، وتم تشخيصها ، اذ اوضحت مطيافية حيود الاشعة تحت الحمراء (FT-IR) عن ظهور مستويات حيود جديدة للمركبات النانوية الهجينة مما يدل بشكل واضح على نجاح عملية التحميل . كما أثبتت صورة مجهر القوة الذرية (AFM) Atomic Force Microscope عن ظهور تغيرات في سطح المركبات النانوية الهجينة المحملة بالعلاجات، وان جميع هذه التغيرات ضمن المقاسات والابعاد النانوية والتي تتوافق مع نتائج طيف الاشعة تحت الحمراء (FT-IR) . وبعد دراسة عملية تحرر العلاج من اسطح المركبات النانوية الهجينة المشار اليها اعلاه بعد التحميل الى الوسط الحامض والقاعدي ، لوحظ ان عملية تحرر المادة العلاجية تحدث بصورة سريعة في بداية التحرر ثم تتباطأ تدريجيا مع مرور الزمن ، اذ اشارت النتائج الى انطباق موديل معادلة الرتبة الثانية الكاذبة في دراسة حركيات التفاعل اكثر من موديل الرتبة الصفرية والرتبة الاولى الكاذبة . كما اوضحت النتائج زيادة نسبة التحرر بزيادة تركيز الوسط فضلا عن زيادة تلك النسبة في الوسط الحامضي مقارنة بالوسط القاعدي لتصل في بعض الاحيان الى اكثر من 99% من المحتوى الكلي .

اشارت النتائج المناعية المحور الى ان استحثاث التهاب المفاصل (RF) في ذكور الجرذ الابيض G2 ادى الى حدوث ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في مستو تراكيز السيتوكينات $IL-1\beta$ ، $TNF-\alpha$ ، $IL-6$ ، والاجسام المضادة IgG و IgM على حد سواء مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G1) . كما حصل انخفاضاً معنوياً ($P<0.05$) لمستوى تركيز $IL-1\beta$ في المجاميع بعد معاملتها بالمركبات النانوية والعلاج باشكالها الحرة والهجينة (اي قبل وبعد التحميل) لمدتي العلاج في حين انخفضت مستويات السيتوكين $TNF-\alpha$ معنوياً ($P<0.05$) في المجموعتين المعاملتين بعلاجي الـ MTX و NAP مقارنة مع (G2) . اما مستويات تركيز $IL-6$ انخفضت معنوياً ($P<0.05$) من (G6 --- G13) لمدة العلاج الكاملة . ، كما اشارت النتائج الى انخفاض مستويات الجسم المضاد IgM في المجموعات (G3 --- G13) وكان هذا الانخفاض معنوياً ($P<0.05$) في المجاميع (G6 --- G13) لفترة العلاج الكاملة. سجلت نتائج الدراسة انخفاضاً معنوياً ($P<0.05$) في مستوى المعايير المناعية المدروسة عند المعالجة بالعلاجات اعلاه بعد تحميلها على المركبات النانوية قيد الدراسة لنصف مدة العلاج بعد حساب قيمة T بالمقارنة عند المعالجة بعلاجي الـ MTX و NAP بشكلهما الحر لمدة العلاج الكاملة مما يشير الى توفير الوقت وكمية العلاج الى النصف تقريبا وهذا يدل على تحسين كفاءة العلاجين وتقليل الهدر بنسبة 50% كما اثبتت الدراسة ان استحثاث التهاب المفاصل في ذكور الجرذ الابيض ادى الى زيادة معنوية ($P<0.05$) في سمك القدم اليمنى لدى مجموعة السيطرة الموجبة G2 مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة ، انخفضت هذه الزيادة بعد المعالجة بعلاجي

الـ MTX وNAP بشكلهما الحر G6 وG7 على التوالي واستمر هذا الانخفاض معنويا ($P<0.05$) بعد تحميل العلاجين اعلاه على المركبات النانوية المحضرة ، كما بلغت نسبة الشفاء وانخفاض الورم في القدم المصابة بحدود 50% بعد تحميل العلاجين على تلك المركبات.

تمت دراسة التأثير التثبيطي لنمو بكتريا *Escheirchia coli* و *Staphylococcus aureus* بواسطة المركبين النانويين ZnO ، Agnano ، بشكلهما الحر (T1 و T2) و مقارنة النتائج مع القابلية التثبيطية للمضادين الحيويين (GN) ، (ER) الحرين (T3 و T4) مع ما سجله التأثير التآزري للمضادين بعد تحميلهما، وكانت النتائج فيها تشير الى ارتفاع معدل قطر حلقة التثبط بشكل معنوي ($P<0.05$) في المجاميع T5 و T7 المعاملتين بمركبين النانويين المحملين بالمضاد GN (GN / ZnO و GN / Agnano) مقارنة العلاجات والمركبات في عزلات بكتريا *E.coli* . كما كان هناك ارتفاع في قطر حلقة التثبيط بشكل معنوي ($P<0.05$) عند معاملة عزلات بكتريا *E.coli* بالمركبين النانويين المحمل عليهما المضاد الحيوي ER في المجاميع T6 و T8 (ER / ZnO و ER / Agnano) مقارنة مع T1 ، T2 و T4 على التوالي . وظهرت النتائج ان معاملة عزلات بكتريا *S. aureus* بـ (ZnO / Agnano و GN / Agnano) T5 و T7 ادى الى ارتفاع مساحة حلقة التثبيط بشكل معنوي ($P<0.05$) مقارنة مع حلقة التثبيط في كل من T1 ، T2 و T3 على التوالي . في حين ارتفع قطر حلقة التثبيط لنمو بكتريا *S. aureus* بعد معاملتها بالمركبين النانويين المحملين بالمضاد ER (ER / ZnO و ER / Agnano) T6 و T8 معنويا ($P<0.05$) مقارنة مع ما سجلته مساحة التثبيط في المعاملات T1 ، T2 و T4 على التوالي المعاملة باقل تركيز مثبط MIC للمركبين النانويين (ZnO ، Agnano) والمضاد الحيوي (ER) .

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
I	الخلاصة
III	قائمة المحتويات
X	قائمة الجداول
XII	قائمة الأشكال والصور
IX	قائمة المختصرات

3-1	1-الفصل الأول المقدمة
50-4	2 -الفصل الثاني استعراض المراجع
4	2.1. لمحة تاريخية
5	2.2. وبائية التهاب المفاصل الرثياني
6	3.2: فسلجة وتقدم المرض
6	1.3.2. تركيب المفصل
7	2.3.2. دور الخلايا وجزيئات الوسائط الالتهابية في تقدم التهاب المفاصل الرثياني
7	1.2.3.2. Role of the cells دور الخلايا
7	1.1.2.3.2. Macrophages البلعميات الكبيرة
8	1.2.3.2. Role of T-Lymphocyte دور الخلايا للمفاوية التائية
9	اولا: الخلايا للمفاوية التائية السامة للخلايا (CD+8) Cytotoxic T- Lymphocyte
9	ثانيا : دور الخلايا للمفاوية التائية المساعدة Role of Lymphocyte T-Helper(CD+4)
10	1.2.3.2. B-Lymphocyte 3. الخلايا للمفاوية البائية
12	2.2.3.2. دور جزيئات الوسائط الالتهابية في تقدم التهاب المفاصل الرثياني
12	1.2.2.3.2: الجذور الحرة الاوكسجينية (ROS) reactive oxygen species
12	2.2.2.3.2: انزيمات الحشوة الخارج خلوية (MMPs) metalloproteinase Matrix
13	3. 2.2.3.2. السيتوكينات Cytokines

14	Inflammatory cytokines اولاً: السيتوكينات المحفزة للتهاب
15	Anti-inflammatory Cytokines ثانياً: السيتوكينات المثبطة للتهاب
15	3.3.2. Physiology of (RA) disease فسيولوجيا مرض التهاب المفاصل الرثياني
17	4.2. اسباب وعوامل خطر مرض التهاب المفاصل الرثياني
18	2. 1.4.2. Genetic risk factors عوامل الخطر الجينية
18	2. 4.2. Other risk factor عوامل الخطر الاخرى
18	1.2.4.2. Sex الجنس
19	2. 2.2.4.2. Smoking التدخين
19	2. 3.2.4.2. Infection العدوى
19	2. 4.2.4.2. Vary factors عوامل متنوعة
19	2. 5.2. الاعراض والمظاهر السريرية التهاب المفاصل الرثياني
19	2. 5.2. 1: Onset of symptoms بداية ظهور الاعراض
20	2. 2.5.2. Non specific symptoms الاعراض غير المحددة
20	2. 3.5.2. Clinical manifestation المظاهر السريرية
20	2. 1.3.5.2. Articular manifestation المظاهر المفصالية
21	2. 2.3.5.2. Systematic manifestation المظاهر الجهازية
22	2. 6.2. تشخيص التهاب المفاصل الرثياني
23	2. 6.2. 1. General examinations الفحوصات العامة
23	2. 6.2. 2. Laboratory tests الفحوصات المختبرية
24	2. 6.2. علاج مرضى التهاب المفاصل RA Treatmentt of patients with RA
25	2. 1.6.2. 1. Non-steroidal anti التهابية غير الستيرويدية المضادة للالتهابات inflammatory drugs (NSAIDs)
25	2. 1.6.2. 1. Voltaren الفولتارين
26	2. 1.6.2. 2. Naproxen النابروكسين
26	2. 1.6.2. 1. التسمية
26	2. 1.6.2. 2. آلية عمل النابروكسين
27	2. 1.6.2. 3. الاستعمالات العلاجية للنابروكسين
28	2. 1.6.2. 4. الآثار الجانبية للنابروكسين
28	2. 2.6.2. الأدوية المعدلة للمرض المضادة للروماتيزم Disease-Modifying Anti Rheumatic drugs (DMARDs).
28	2. 2.6.2. 1. Gold salts املاح الذهب
29	2. 2.6.2. 2. Anti-malarial drugs العلاجات المضادة للملاريا
30	2. 2.6.2. 3. D- البنسيلامين D-penicillamine

30	4. 2.6.2. السلفاسالازين Sulphasalazine
30	5. 2.6.2. اللفلونوميد Leflunomide
31	6. 2.6.2. ميثوتريكسات Methotrxate (MTX)
32	1. 6. 2.6.2. الاثار الجانبية لاستخدام علاج الـ MTX
32	2. 6. 2.6.2. الجرعات Doses
32	7. 2.6.2. علاجات اخرى
33	7.2. علاقة بعض الساييتوكينات الالتهابية بالتهاب المفاصل الرثياني :
34	1. 7.2. عامل النخر الورمي الفا (TNF- α) Tumor necrosis factor
35	2. 7.2. الانترليوكين-1 بيتا (IL- 1 β) Interleukin-1 β
36	3. 7.2. الانترليوكين-6 (Interleukin-6)
36	8.2. علاقة الغلوبولينات المناعية M و G (العامل الرثياني - RF)
37	9.2. تقنية النانو Nanotechnology
38	1. 9.2. المركبات النانوية Nanoparticles-NP
39	2. 9.2. خصائص المركبات النانوية
39	1: 2. 9.2. التبادل الايوني Ionc Exchange
39	2: 2. 9.2. توصيل الدواء بواسطة الـ NP Drug delivery by NP
40	3: 2. 9.2. السيطرة على اطلاق العلاج Control of drug release
41	4: 2. 9.2. تثبيط البكتريا Inhibition of bacteria
43	1. 4. 2. 9.2. المقاومة المتعددة Multidrug Resistance
44	2. 4. 2. 9.2. التغيير في آليات التدفق
45	3. 4. 2. 9.2. التغيير في بنية الموقع المستهدف
45	4. 4. 2. 9.2. بواسطة تغيير المسار الايضي By pass of metabolic pathway
45	5. 4. 2. 9.2. عوامل الخطورة Virulence factors
45	اولا: تشكيل الغشاء الحيوي Biofilm formation
46	ثانيا. مثبطات انزيم ATPase ATPase Inhibitors
47	3. 9.2. تاثير المعالجة بالمركبات النانوية
47	1.3. 9.2. مركب اوكسيد الزنك النانوي (Zinc oxide-ZnO)
48	2.1. 9.2. مركب الفضة النانوية Ag nano
49	3.1. 9.2. مركب Xerogel
49	10.2. النماذج الحيوانية Animal model
78 -51	الفصل الثالث المواد وطرائق العمل

51	1.3. المواد والأجهزة المستعملة Materials and Device
51	1.1.3. المواد الكيميائية المستعملة
52	2.1.3: الأدوات المستعملة
53	3.1.3: الأجهزة المستعملة
54	2.3 تصميم التجربة ومحاور الدراسة
55	3.3 .. تحضير المركبات النانوية .
55	1.3.3. تحضير مركب اوكسيد الزنك النانوي الكروي
65	2.3.3. تحضير مركب الفضة النانوية (بالاتلين كلايكول ، PVP)
57	3.3.3. تحضير مركب Xerogel النانوي
58	3:4: تشخيص المركبات النانوية الهجينة
58	4:3: 1 : التشخيص باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR
58	4:3: 2 : التشخيص باستخدام مجهر القوة الذرية AFM
59	3: 5: دراسة تحرر المادة العلاجية
59	5:3: 1: المحاليل المستخدمة
59	5:3: 2 : تعيين منحنى المعايرة Determination of Calibration Curve
61	5:3: 3: طريقة التحرر الى المحاليل القياسية
61	5:3: 4: الدراسات الحركية (Kinetic studies)
62	5:3: 5: دراسة النسبة المئوية لتحرر العلاج من سطوح المركبات النانوية
63	6.3: تحضير الجرعات من العقار الحر والمادة النانوية الحرة والمحملة بالعلاج
63	6.3. 1. عقار الميثوتركسات Methotrexate
64	6.3. 2. عقار النبروكسين Naoroxen
64	3. 7. الحيوانات المستعملة في الدراسة
65	3. 8. إستحداث التهاب المفاصل الروماتويدي
65	3: 9: جمع عينات الدم
66	3: 10: قياس دليل التهاب المفاصل وتثبيط التهاب المفاصل
66	3: 1.10: قياس دليل التهاب المفاصل
66	3: 10: 2: قياس دليل تثبيط التهاب المفاصل
66	3: 11: مبدأ وطريقة عمل العدة التشخيصية لقياس مستوى $TNF-\alpha$ ، $IL-1B$ ، $IL-6$
67	1.11.3 تحضير الكواشف Reagents preparation
68	2.11.3: طريقة عمل $TNF-\alpha$ ، $IL-1B$ و $IL-8$ $IL-6$

69	12.3 : مبدأ وطريقة عمل العدة التشخيصية للغلوبولينات المناعية IgM و IgG
70	9:3 : الفعالية التثبيطية للمركبات النانوية
70	9:3:1 : العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة
70	13:3:2 : طرق التعقيم Sterilization Methods
71	13:3:3 : الاوساط الزرعية المستخدمة.-
71	13:3:4 : التصبغ (Gram Stain(Staining)
72	13:3:5 : تحضير الكواشف Preparation of reagents
72	13:3:6 : الاختبارات البايوكيميائية Biochemical tests
74	13:3:7 : تحضير اللقاح
74	13:3:8 : طريقة تقدير حساسية البكتريا للمركبات النانوية والمضادات الحيوية
75	13:3:9 : طريقة تقدير الفعالية التثبيطية للمركبات النانوية والمضادات الحيوية
76	14.3: التحليل الاحصائي Statistical analysis
171-77	الفصل الرابع النتائج والمناقشة Results and Discussion
77	1:4:1 : تشخيص المركبات النانوية المهجنة :
77	1:4:1:1 : طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR
77	1:4:1:1:1 : طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لـ (ZnO) الحر :
77	1:4:1:1:2 : طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR للفضة النانوية الحرة (Ag nano) :
78	1:4:1:1:3 : طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لمركب Xerogel الحر :
78	1:4:1:1:4 : طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) الحر :
79	1:4:1:1:5 : طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) الحر :
79	1:4:1:1:6 : طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) مع ZnO الكروي (ZnO/MTX)
79	1:4:1:1:7 : طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) مع Agnano (Agnano/MTX)
80	1:4:1:1:8 : طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) مع Xerogel (Xerogel/MTX)
80	1:4:1:1:9 : طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) مع ZnO (ZnO/NAP) :
81	1:4:1:1:10 : طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) مع Xerogel (Xerogel /Agnano/NAP)
81	1:4:1:1:11 : طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) مع Xerogel (Xerogel/NAP)
87	2:1:4:2 : مجهر القوة الذرية Atomic Force Microscopie(AFM)
78	2:1:4:2:1 : صور مجهر القوة الذرية لمركب اوكسيد الزنك النانوي الحر والمحمل بعلاجي الميثوتركسات والنبروكسين
94	2:1:4:2:2 : صور مجهر القوة الذرية لمركب الفضة النانوي الحر والمحمل بعلاجي الميثوتركسات والنبروكسين :

100	3:2:1:4: صور مجهر القوة الذرية لمركب الزيروجل Xerogel النانوي الحر والمحمل بعلاجي الميثوتركسات والنبروكسين :
105	2:4: دراسة حركيات التفاعل Study Of Release Kintics
105	2:2:4:دراسة حركيات المركبات النانوية المحمل عليها علاج Nap
105	1:2:2:4: الرتبة الصفرية
109	2:1:2:4: الرتبة الاولى الكاذبة
110	3:1:2:4: الرتبة الثانية الكاذبة
112	2:2:4:دراسة حركيات المركبات النانوية المحمل عليها علاج Nap
112	1:2:2:4: الرتبة الصفرية
114	3:2:2:4: الرتبة الثانية الكاذبة
116	3:4: دراسة السيطرة على تحرير العلاجين NAP،MTX من المركبات النانوية المهجنة :
118	3:2:2:4: الرتبة الثانية الكاذبة
119	1:3:4: دراسة النسبة المئوية لتحرر علاجي MTX و NAP من المركبات النانوية المهجنة :
119	1: 1:3:4: دراسة النسبة المئوية لتحرر علاج MTX من المركبات النانوية المهجنة :
121	2: 1:3:4: دراسة النسبة المئوية لتحرر علاج NAP من المركبات النانوية المهجنة :
124	4:4:تأثير المعالجة على المتغيرات المناعية
	1:4:4:تأثير المعالجة بـ NAP، MTX الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج NAP،MTX في مستويات تركيز السيتوكين $IL-1\beta$:
132	2:4:4: تأثير المعالجة بـ NAP، MTX الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاجي MTX NAP، في مستويات تركيز عامل النخر الورمي $TNF-\alpha$.
135	3:3:4: تأثير المعالجة بـ NAP، MTX الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاجي MTX NAP، في مستويات تركيز لانترلوكين-6:IL-6 :
141	4:4:4: تأثير المعالجة بـ NAP،MTX الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج MTX NAP على مستوى تركيز الكلوبيولين المناعي IgG :
145	5:4:4: تأثير المعالجة بـ NAP، MTX الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج NAP،MTX في مستويات تركيز الكلوبيولين المناعي IgM
148	5:4:4: تأثير المعالجة بـ MTX الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج MTX في سمك القدم الأيمن لذكور الجرذان البيض المستحث بها التهاب المفاصل :
151	6:4:4: تأثير المعالجة بـ NAP الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج NAP في سمك القدم الأيمن لذكور الجرذان البيض المستحث بها التهاب المفاصل :
154	5:4: التأثير التثبيطي لمركبي Ag ، ZnO قبل وبعد تحميل المضامين الحيويين Gentamicin ، Erythromicin على بكتريا <i>Escheirchia coli</i> و <i>Staphylococcus aureus</i> :

قائمة الجداول

رقم الصفحة	الموضوع
------------	---------

51	(1-3) المواد الكيميائية المستعملة بحسب اسم الشركة والمنشأ
52	(2-3) الأدوات المستعملة بحسب اسم الشركة والمنشأ
53	(3-3) الأجهزة المستعملة بحسب اسم الشركة والمنشأ.
89	جدول (4-1) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب ZnO النانوي الحر والنسب المختلفة لتلك الحجوم :
91	جدول (4-2) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب ZnO/ MTX والنسب المختلفة لتلك الحجوم :
93	جدول (3-4) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب ZnO/ NAP والنسب المختلفة لتلك الحجوم
93	جدول (4-4) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات ومعدل الجذر التربيعي لخشونة السطح لمركب ZnO قبل وبعد تحميل علاج NAP وMTX:
95	جدول (4-5) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب Ag النانوي الحر والنسب المختلفة لتلك الحجوم
96	جدول (4-6) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب MTX / Ag nano والنسب المختلفة لتلك الحجوم:
99	جدول (4-7) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب NAP/ Ag nano والنسب المختلفة لتلك الحجوم
99	جدول (4-8) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات ومعدل الجذر التربيعي لخشونة السطح لمركب Agnano قبل وبعد تحميل علاج NAP وMTX
102	جدول (4-9) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب Xerogel النانوي الحر والنسب المختلفة لتلك الحجوم:
103	جدول (4-10) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب MTX/Xerogel النانوي الحر والنسب المختلفة لتلك الحجوم:
105	جدول (4-11) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب NAP/Xerogel النانوي الحر والنسب المختلفة لتلك الحجوم
105	جدول (4-12) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات ومعدل الجذر التربيعي لخشونة السطح لمركب Xerogel قبل وبعد تحميل علاج NAP وMTX
112	جدول (4-13) معامل الارتباط وثابت السرعة للتربة الصفيرية والاولى والثانية الكاذبتين لتحرر علاج MTX من المركبات النانوية
119	جدول (4-14) معامل الارتباط وثابت السرعة للتربة الصفيرية والاولى والثانية الكاذبتين لتحرر علاج NAP من المركبات النانوية
132	جدول (4-15): تراكيز السيتوكين IL-1 β pg/ml قبل وبعد المعالجة بـ MTX، NAP الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج NAP، MTX .
137	جدول (4-16): تراكيز السيتوكين TNF.& pg/ml قبل وبعد المعالجة بـ MTX، NAP الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج NAP، MTX .
141	جدول (4-17): تراكيز السيتوكين IL-6 pg/ml قبل وبعد المعالجة بـ MTX، NAP الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج NAP، MTX .
145	جدول (4-18): تراكيز الكلوبولين المناعي IgG mg/dl قبل وبعد المعالجة بـ MTX، NAP الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج NAP، MTX .

148	جدول(4-19): تراكيز الكلوبيولين المناعي mg/dl IgM قبل وبعد المعالجة بـ MTX ، NAP الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج MTX،NAP .
150	جدول(4-20) معدل سمك القدم الأيمن (ملم) لذكور الجرذان البيض المستحث بها التهاب المفاصل الرثياني المعالجة بـ MTX والمركبات النانوية الحرة و بـ MTX المحمل على المركبات النانوية
153	جدول(4-21) : معدل سمك القدم الأيمن (ملم) لذكور الجرذان البيض المستحث بها التهاب المفاصل الرثياني المعالجة بـ NAP والمركبات النانوية الحرة و بـ NAP المحمل على المركبات النانوية .
160	جدول (4-22): التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC) لمركبي Ag , ZnO النانويين و المضادين الحيويين Gentamicin ، Erythromycin على بكتريا <i>Staphylococcus aureus</i> و <i>Escheirchia coli</i>
161	جدول(4-23) قطر حلقة التثبيط عند المعاملة بالمركبين النانويين ZnO ,Ag قبل وبعد تحميل المضادين الحيويين (GN) Gentamycin , (ER)Erythromycin (ER) على بكتريا <i>Staphylococcus aureus</i> و <i>Escheirchia coli</i>

قائمة الأشكال والصور

رقم الصفحة	الموضوع
8	(الشكل 2-1) الخلايا البلعمية ودورها في تنشيط الخلايا للمفاوية T المساعدة CD+4
11	شكل (2-2) : خلايا الجهاز المناعي المشتركة في تقدم مرض التهاب المفاصل
22	الشكل (2-3) مختلف المظاهر الجهازية التي ترافق مرض التهاب المفاصل الرثوي
60	الشكل (3-1) معادلة الخط المستقيم لعلاج الميثوتركسات (MTX)
60	الشكل (3-2) معادلة الخط المستقيم لعلاج النبروكسين (NAP)
82	شكل (4-1) طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لأكسيد الزنك الكروي (ZnO) الحر
83	شكل (4-2) طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR للفضة النانوية الحرة (Ag nano)
83	شكل (4-3) طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لمركب Xerogel النانوي الحر
84	شكل (4-4) يبين طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) الحر
84	شكل (4-5) يبين طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) الحر
85	شكل (4-6) يبين طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) مع المركب النانوي ZnO/MTX الكروي
85	شكل (4-7) يبين طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) مع المركب النانوي Agnano (Agnano/MTX)

86	شكل (4-8) يبين طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) مع المركب النانوي Xerogel (Xerogel/MTX)
86	شكل (4-9) يبين طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) مع المركب النانوي ZnO (ZnO/NAP)
87	شكل (4-10) يبين طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) مع المركب النانوي Ag (Ag nano/NAP)
87	شكل (4-11) يبين طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) مع المركب النانوي Xerogel (Xerogel/NAP)
89	شكل (4-12) صور مجهر القوة الذرية لمركب اوكسيد الزنك الحر a / صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات
90	شكل (4-13) يبين توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب الـ ZnO النانوي الحر :
91	شكل (4-14) صور مجهر القوة الذرية لمركب ZnO/ MTX a / صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات
92	شكل (4-15) يبين توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب الـ ZnO/ MTX :
92	شكل (4-16) صور مجهر القوة الذرية لمركب ZnO/ NAP a / صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات
93	شكل (4-17) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب ZnO/ NAP :
95	شكل (4-18) صور مجهر القوة الذرية لمركب الفضة النانوي الحر a / صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات:
96	شكل (4-19) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب Ag nano الحر
96	شكل (4-20) صور مجهر القوة الذرية لمركب MTX / Ag nano a: / صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات
97	شكل (4-21) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب MTX / Ag nano :
98	شكل (4-22) صور مجهر القوة الذرية لمركب NAP / Ag nano a: / صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات
99	شكل (4-23) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب NAP / Ag nano
101	شكل (4-24) صور مجهر القوة الذرية لمركب Xerogel النانوي الحر a / صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات
102	شكل (4-25) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب Xerogel
103	شكل (4-26) صور مجهر القوة الذرية لمركب MTX/ Xerogel النانوي : a / صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات
104	شكل (4-27) يبين توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب MTX / Xerogel

104	شكل (28-4) صور مجهر القوة الذرية لمركب NAP/ Xerogel النانوي : a / صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات
105	شكل (29-4) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب النانوي NAP /Xerogl
107	شكل (4-30) الرتبة الصفيرية لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي ZnO:
107	شكل (4-31) الرتبة الصفيرية لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي Agnano
108	شكل (4-32) الرتبة الصفيرية لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي Xerogel
109	شكل (4-33) الرتبة الاولى الكاذبة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي ZnO/ MTX
109	شكل (4-34) الرتبة الاولى الكاذبة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي Agnano/ MTX
110	شكل (4-35) الرتبة الاولى الكاذبة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي :Xerogel/ MTX
111	شكل (4-36) الرتبة الثانية الكاذبة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي ZnO/ MTX
111	شكل (4-37) الرتبة الثانية الكاذبة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي :Agnano/ MTX
112	شكل (4-38) الرتبة الثانية الكاذبة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي :Xerogel/ MTX
113	شكل (4-39) الرتبة الصفيرية لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي ZnO/NAP
114	شكل (4-40) الرتبة الصفيرية لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي Agnano/NAP:
114	شكل (4-41) الرتبة الصفيرية لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي Xerogel /NAP:
115	شكل (4-42) الرتبة الاولى الكاذبة لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي ZnO:
116	شكل (4-43) الرتبة الاولى الكاذبة لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي Agnano
116	شكل (4-44) الرتبة الاولى الكاذبة لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي Xerogel
117	شكل (4-45) الرتبة الثانية الكاذبة لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي ZnO
118	شكل (4-46) الرتبة الثانية الكاذبة لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي Agnano
118	شكل (4-47) الرتبة الثانية الكاذبة لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي Xerogel
120	شكل(4-48): النسبة المئوية لتحرر لعلاج الميثوتركسات MTX من المركب النانوي ZnO
121	شكل (4-49) : النسبة المئوية لتحرر علاج MTX من المركب النانوي Ag nano
121	شكل (4-50): النسبة المئوية لتحرر علاج MTX من المركب النانوي Xerogel
123	شكل (4-51): نسبة تحرر علاج NAP من المركب النانوي (ZnO/NAP):
123	شكل (4-52): نسبة المئوية لتحرر علاج NAP من المركب النانوي (Agnano/Nap):

124	شكل (4-53): نسبة تحرر علاج NAP من المركبت النانوي (xerogol / NAP)
132	شكل (4-54) تاثير المدة الزمنية على المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج على معدل تكيز IL-1B
137	شكل (4-55) علاقة المدة الزمنية على المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج على معدل تكيز TNF- α
142	شكل (4-56) علاقة المدة الزمنية على المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج على معدل تكيز IL-6
145	شكل (4-57) علاقة المدة الزمنية على المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج على معدل تركيز IgG
148	شكل (58-4) علاقة المدة الزمنية على المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج على معدل تركيز IgM
151	شكل (4-59) علاقة المدة الزمنية على معدل التثبيط الورمي للقدم اليمنى في الجرذان المستحث بها التهاب المفاصل الرثياني المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج MTX
154	شكل (4-60) علاقة المدة الزمنية على معدل التثبيط الورمي للقدم اليمنى في الجرذان المستحث بها التهاب المفاصل الرثياني المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج NAP.
163	شكل (4-61) يظهر التأثير التثبيطي للمركبات النانوية ZnO ، Ag ، والمضادين الحيويين GN ، ER باشكلها الحرة والتأزيرية قبل وبعد التحميل

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
IL-6	Interleukin-6
ACR	American College of Rheumatology
AFM	Atomic force microscopy
Ag	Antigens
Anti- CCP	Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies
APCs	Antigen-presenting cells
CFA	complete Freund's adjuvant
CIA -II	Collagen induced arthritis-II
COX	Cyclooxygenase
CQP	Chloroquine phosphate
CR	Complement Receptor

DDSS	Drug delivery systems
DHFR	dihydrofolate reductase
DMARDs	Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs
DOX	Doxorubicin
DPPC	Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphocholine
EBV	Epstein Barr Virus
FLS	Fibroblast like synoviocyte
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor
HA	Hyaluronic Acid
HCQ	Hydroxychloroquine
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFN γ	Interferon gamma
IgG	Immunoglobulin-Gamma
IL-1 β	Interleukin-1 beta
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	Mitogen-activated protein kinas
MBC	Minimal bactericidal concentration
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIC	Minimal inhibitory concentration
MMP	Matrix metalloproteinase
M-O	Metal - Oxygen
MR	Mannosereceptor
MTX	Methotrexate
NAP	Naproxin
NPs	Nanoparticles)
NSAIDs	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
PBMC	Peripheral blood derived mononuclear cells
PLG	poly(D,L-lactide-co-glycolide)
PLGA	poly (lactic-co-glycolic acid)
PSA	Polysialic acid
RA	Rheumatoid Arthritis
RF	Rheumatoid factor

ROS	reactive oxygen species
SCW	Streptococci cell wall
SLE	Systemic Lupus Erythematosus
TGF- β	Transforming growth factor beta
Th	T-Helper
TIMP	Tissue inhibitor of MMP
TNF- α	Tumor necrosis factor- alpha
TWHF	Tripterygium wilfordii Hook f
WHO	World Health Organization
ZnO	Zinc Oxide

1-1- المقدمة Introduction

يعد التهاب المفاصل الرثياني (RA) Rheumatoid arthritis من أكثر الأمراض انتشاراً في العالم ، إذ سجلت البيانات العالمية انه يتوزع بنسب تصل الى اكثر من 1% (Scott *et al.*, 2005). يتميز بكونه من امراض المناعة الذاتية ويصيب اجزاء مفاصل مختلفة من الجسم وبصورة متوازية في الجانبين الايمن والايسر ، يؤثر RA في اغلب الاحيان في المفاصل الصغيرة لليد وكذلك القدم والركبة والكاحل ويستهدف بذلك الغشاء المفصلي Synovial (membrane) الذي هو طبقتين او ثلاثة من الخلايا الطلائية يحتوي بداخله السائل الزلالي (Synovial fluid) ، إذ يكون هذا الغشاء في المفاصل المصابة اكثر سماكة مع تجمع كبير للخلايا الالتهابية (الخلايا للمفاوية T، والبلعميات الكبيرة) مما يؤدي الى تلفه (Aletaha *et al.*, 2010 ; Dopkin *et al.*, 2008).

ان السائل الزلالي يحتوي في حالة الالتهاب على الخلايا العدلة (Neutrophils) التي تقوم بتدمير الغضروف المفصلي (Synovial cartilage) بواسطة الانزيمات التي تفرز من هذه الخلايا ، وفي المراحل المتقدمة يتآكل العظم وفي الواقع ان هذا التآكل يقود الى إمكانية حدوث العجز والاعاقة التامة (Alemanos & Prosos, 2005).

ان اغلب الحركيات الخلوية (Cytokines) التي تتواجد في السائل والنسيج المفصلي هي عامل النخر الورمي الفا (TNF - α - Tumor necrosis factor) هو عبارة عن بروتين تفرزه خلايا الجهاز المناعي في الجسم، او خلية بروتينية، بحيث اذا تم افرازه بكمية زائدة، يمكن ان يؤدي الى نشوء التهاب المفاصل الرثوي والانتروكينات منها (IL- 1,6,8,10 (Interleukin-1, 6, 10, 8) هذه السائتوكينات وبالاخص (TNF- α) تعمل على تنشيط الحالة الالتهابية ، من خلال تنشيط الخلايا للمفاوية T-CD4⁺) سوف يحفز نشاط الخلايا الالتهابية الوحيدة والبلعميات الكبيرة (Macrophage, Monocyte) والتي يطلق عليها في نسيج المفصل Fibroblast like synoviocyte) (FLS) وان تحفيز هذه الوسائط الالتهابية يؤدي الى ظهور الخلايا الهادمة لنسيج الغضروف والعظم في السائل الزلالي .فضلا عن ذلك ان هذه الخلايا يتم تحفيزها بواسطة التعبير السطحي للجزيئات (Expression of cell surface molecules) بواسطة خلايا T وبعده تقوم خلايا T (CD4⁺) بتحفيز الخلايا للمفاوية البائية B-Cell التي تنشط وتتمايز لانتاج البروتينات المناعية مثل العامل الرثياني (RF - Rheumatoid factor) (Klareskog *et al.*, 2006) .

أكدت الأدلة البحثية على وجود ارتباط وثيق للعديد من العوامل البيولوجية والبيئية و السيكولوجية والشخصية بمرض التهاب المفاصل الرثوي (Treharne *et al.*, 2007) ، كما لا يوجد علاج شاف لالتهاب المفاصل لحد الان ، لكن بالامكان العيش حياة طويلة ونشيطة مع مرض التهاب المفاصل الروماتويدي ، اذا تم اعتماد علاج التهاب المفاصل الرثياني المناسب، الذي يشمل حماية المفاصل وتغيير نمط الحياة ومع ذلك فان العلاجات المتاحة في الوقت الحاضر تستعمل للحد من التأثير الالتهابي المدمر للمفصل ومنع المضاعفات الاخرى للمرض وكذلك المحافظة على مرونة وحركة المفصل وبالتالي تقليل الالم. من بين اهم الادوية المستخدمة في علاج التهاب المفاصل مضادات الالتهاب غير الستيرويدية (NSAIDs) والادوية المعدلة للمرض (DMARDs) (Majithia & Geraci , 2007) ، وقد ادت الاضرار الجانبية لهذه الادوية بالتفكير في طرق علاجية جديدة اكثر فعالية و اقل اثر سلبي ومن هذه الطرق استخدام تقنيات النانو (Nanotechnology) (Vijaykumar *et al.*, 2015).

استخدمت النماذج الحيوانية للبحث في اسباب واليات الاصابة بالتهاب المفاصل الرثياني وفي مجال صناعة الادوية ، اذ تتميز النماذج الحيوانية بسهولة استحداث المرض فيها في فترات قصيرة ، وكذلك وجود التشابه الكبير بينها وبين

الانسان اذ اكدت الدراسات ان استحداث الاصابة المرضية لهذا المرض تؤدي الى حدوث تأثير شديد ينتهي بتدمير وتاكل المفصل بعد اسبوعين (Vingsob et al., 1996).

تمتلك العديد من انواع البكتيريا امكانية عالية لمقاومة العلاج بالمضادات الحيوية (multidrug-resistant MDR) تؤدي الى زيادة العدوى بسبب مسببات الأمراض بواسطة البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية الحالية والتي تعد غير فعالة وتمثل مشكلة متنامية. إن مقاومة مضادات الميكروبات هي واحدة من التهديدات الرئيسية لصحة الإنسان لأنها تقود لزيادة معدلات الاصابة والوفيات نتيجة الاصابة بتلك المكروبات . تلعب جينات المقاومة دورا مهما في زيادة مقاومة الاحياء المجهرية للمضادات الحيوية وبالتالي، فإن الخطوة الأولى في مكافحة تطور المقاومة والحد من استهلاك المضادات الحيوية دون فائدة هي اللجوء الى حلول بديلة منها استخدام المركبات النانوية (Cerceo et al., 2016).

2-1- الهدف من الدراسة

هدفت الدراسة الحالية الى تقييم آلية بعض العلاجات المستخدمة في الحد من تأثير (RA) والمحملة على الجزيئات النانوية (Nanoparticles) Zinc Oxide, Ag nano & Xerogel بعد أن تم استحداثه في ذكور الجرذ الأبيض بمادة (CFA) Complete Freund's Adjuvant وذلك لأهمية المرض في مجتمعنا لكونه من الأمراض الشائعة والمنتشرة بكثرة ، ونظرا للآثار الجانبية والتكلفة الكبيرة للادوية المستعملة في علاج هذا المرض والتقليل من الاضرار التي تحدثها الادوية اذ أظهرت العديد من الدراسات أنها تسبب اضطراب في بعض معايير الدم الوظيفية ووظائف الكبد والكلى وانسجة الغضروف في المفاصل ، ولمعرفة التأثير التثبيطي للمركبين النانويين Zinc Oxide و Ag nano الحرين و مع مضادات البكتريا GN و ER بعد تحميلها على المركبين النانويين في نوعين من البكتريا هما *E. coli* و *S. aureus* .

اذ تتحقق الدراسة الحالية من خلال المحاور التالية:

1. تحضير وتشخيص ودراسة بعض الخصائص للمركبات النانوية المحضرة من الزنك والفضة لتحميل العلاجات عليها .
2. استحداث مرض التهاب المفاصل في الجرذان.
3. تجريع الحيوانات فمويا لنوعين من ادوية التهاب المفاصل هما (Naproxin، Methotrexate) بتركيزين ولفترتي معالجة .
4. تجريع الحيوانات فمويا بالمركبات النانوية المحضرة Zinc Oxide, Ag nano & Xerogel باعتبارها مادة حاملة للعلاج بتركيزين ولفترتي معالجة .
5. تحميل العلاجين مع المركبات النانوية المحضرة لعمل منها جزيئات نانوية وتجريعها فمويا لحيوانات التجربة بتركيزين ولفترتين من العلاج .
6. دراسة تأثير المعالجة على بعض المعايير المناعية مثل IL-1 β , TNF- α , IL-6 , IgG , IgM .
7. دراسة تأثير المعالجة على معدل الالتهاب من خلال قياس سمك القدم اليمنى .
8. دراسة الفعل التثبيطي للمركبات النانوية المحضرة على بعض الانواع البكتيرية من خلال استزراع وتشخيص هذه الانواع ودراسة الاثر التثبيطي التآزري للمضاد والمركبات النانوية بعد اخذ اقل تركيز مثبط لكل منها (MIC) .

استعراض المراجع

Literatures Review

2.1. لمحة تاريخية :History

التهاب المفاصل الروماتويدي (الداء الرثياني) (RA) Rheumatoid arthritis

لقد عرف هذا الداء بأنه اضطراب التهابي مزمن يمتاز بالتهاب المفاصل المحيطي المتناظر ، واكتشف هذا الداء منذ العصور القديمة ، ففي حوالي 1500 قبل الميلاد وصف Ebers Papyrus حالة مشابهة لالتهاب المفاصل الروماتويدي (RA) وربما هذه هي أول إشارة إلى هذا المرض (Kevin,2004). هناك أدلة تشير الى إن التهاب المفاصل الروماتويدي (RA) قد عثر في المومياوات المصرية كما اكتشف G. Elliot أن التهاب المفاصل الروماتويدي هو مرض منتشر بين المصريين القدماء، و وصف أبقراط التهاب المفاصل منذ 400 سنة قبل الميلاد بيد انه لم يتطرق الى أنواع معينة من التهاب المفاصل وقال انه تورم المفاصل ينتهي بفقدان الحركة (Short,1974)

في عام 1880 بين Brodie الطابع التدريجي لهذا المرض، وبين كيف ان التهاب المفاصل (Synovial inflammation) يؤثر على الغضروف و الغشاء الزليلي (membrane Synovial) في المفاصل ، كما وأجد كيف كان هناك التهاب للغشاء المفصلي والسائل الزليلي وتلف الغضروف المصاحب لالتهاب المفاصل الروماتويدي (RA) (Haroon,et al. 2007). و أول من ميز بين التهاب المفاصل الروماتويدي (RA) والتهاب المفاصل الناتج عن الانواع الاخرى مثل النقرس (gout) هو Garrod (1858) م (Storey,2009).

وصف مظهر المفاصل المتضررة الناتج من التهاب المفاصل الروماتويدي أول مرة من قبل Bannatyne (1896) و في عام 1949 صاغ Camroe مصطلح Rheumatologist واطلق مصطلح Rheumatology من قبل Hollander في عام 1949، وفي عام 1932 تم تشكيل اللجنة الدولية لمتابعة التهاب المفاصل الروماتيزمي وأصبحت في وقت لاحق جمعية الروماتيزم الأمريكية و ثم الكلية الأمريكية لأمراض الروماتيزم (ACR) American College of Rheumatology (Pouya et al.,2011).

تم الإشارة الى الاصل المناعي للمرض في سبعينيات القرن الماضي وتطورت المفاهيم حول هذا المرض بعد ذلك الى ان تم الاحاطة بمعظم المسببات والمضاعفات الخاصة بالتهاب

المفاصل الروماتويدي (RA)، إذ على الرغم من أن المرض يصيب المفاصل فإن الاستجابات المناعية غير الطبيعية تؤدي إلى تداخلات التهابية خارج مفصليّة ومن أهم مميزات (RA) التهاب السائل الزليلي وتآكل الغضروف والعظم. مراحل تطور هذا المرض معقدة جداً إذ يتم تكاثر للخلايا الزلائية التي تتلف الغضروف والعظم وتتم هذه المراحل المختلفة عن طريق تدخل العديد من الوسائط نذكر منها السيتوكينات، البروستاغلوندينات والأنزيمات المحللة تعد السيتوكينات المحفزة للالتهاب جد مهمة في تحفيز RA (Feledman *et al.*, 1996)

استخدمت علاجات كثيرة لعلاج (RA) إذ تم تطوير مركبات Sulphasalazine في عام 1940 م كمضاد للالتهابات والتي لا تزال تشكل جزءاً من الأدوية المعدلة لنمط المرض (DMARDs) Disease-Modifying Anti Rheumatic Drugs و في عام 1949م Philip Hench and Edward Kendall أول من أظهر نجاح استخدام الكورتيزون في علاج أمراض المناعة الذاتية بما في ذلك التهاب المفاصل الروماتويدي (RA) كما استخدم Baguall الكلوروكين في عام 1957م والآن لا يزال الهيدروكسيكلوروكوين جزءاً من (DMARDs) (Dell *et al.*, 2002). تم تصنيع Methotrexate للمرة الأولى في عام 1950 حيث يعد منشط حمض الفوليك لعلاج سرطان الدم ولم يكن يستخدم لعلاج التهاب المفاصل حتى عام 1980 إذ تم اكتشاف دور الميثوتريكسيت (Methotrexate) في تثبيط عامل النخر الورمي ألفا (TNF- α) الذي العامل الرئيسي في التهاب المفاصل الروماتويدي ولا يزال يشكل كذلك جزءاً من DMARDs (Buer, 2015 ; Neeck, 2002).

2.2. وبائية التهاب المفاصل الرثياني Epidemic of Rheumatoid arthritis

يعد مرض التهاب المفاصل الروماتويدي (RA) من الأمراض الأكثر شيوعاً في الوقت الحاضر إذ يصيب كلا الجنسين ومختلف الأعمار ويستهدف أجزاء متنوعة من الجسم منها الفك والركبتين والذراع، يبلغ معدل انتشار (RA) نحو 3% من السكان، إذ لوحظت إصابة النساء بنحو 2-3 أضعاف أكثر من الرجال قبل سن اليأس وبعده تصبح النسبة متساوية مما يدل على وجود دور للهرمونات الجنسية في فعالية الإصابة وجد أن نسبة الهرمون الجنسي الذكري (Testosterone) تكون ضعيفة عند الرجال المصابين بـ (RA)، كما أن المرض يتحسن أثناء مدة الحمل ويعود أثناء المرحلة المبكرة من النفاس وأن حدوثه يكون بنسبة قليلة عند السيدات اللواتي يتناولن حبوب منع الحمل (Bernnan *et al.*, 1994).

أصبح المرض في العراق احد أهم الأمراض الخطرة والأكثر إصابة من بين الأمراض الأخرى وتبين أن نسبة انتشاره تقارب 1% ، وأن هذه النسبة مماثلة لنسب الإصابة في الدول الأوروبية وأمريكا ودول عديدة أخرى (Mohsen & Dujaily, 2011; Aletaha et al., 2010) ، تشير الدراسات إلى حدوث انتشار عالي في بعض قبائل الهنود الحمر، وانخفاض وتيرة الإصابة بالتهاب المفاصل الروماتويدي في البعض من المناطق الريفية الأفريقية. وتتفاوت معدلات الإصابة السنوية بالتهاب المفاصل الروماتويدي بين 20 و 50 حالة لكل 100 000 شخص في دول أمريكا الشمالية وشمال أوروبا. هناك دراسات قليلة في بلدان جنوب أوروبا مما يدل على حدوث نسبي أقل بالإصابة من شمال أوروبا. وأشارت دراسات في اليابان أعلى معدل نسبي بالإصابة بالمرض ، بينما تصل نسبته في الصين وجنوب أفريقيا الى (0.2 – 0.3) اما في تركيا فيبلغ معدل انتشاره (360 – 380) حالة لكل 100000 شخص (Alamanosa & Drosos, 2005) .

3.2: فسلجة وتقدم المرض

1.3.2. تركيب المفصل Joint structure

يعد الهيكل العظمي الجزء السائد للجسم والذي يكسبه صلابة ويقوم بربط اجزائه المقسمة بالإضافة الى تأمين حرية الحركة لمختلف أعضائه ويتم ذلك بشكل اساسي بواسطة المفاصل التي هي نقطة التقاء عظمين متقابلين وتختلف المفاصل تبعا لموضعها والوظيفة التي تقوم بها (Lindqvist et al., 2005) ، وقسم علماء التشريح المفاصل حسب الانسجة الضامة التي تكونها الى :

1. **المفاصل الثابتة او غير المتحركة (مفاصل ليفية التشابك) Synathrosis** : يتميز هذا المفصل بوجود الياف رابطة تربط الصفائح العظمية غير منتظمة التسنن ومثالها الوحيد هو عظام الجمجمة ، وظيفتها امتصاص الصدمات .
2. **المفاصل الارتفاقية (قليلة الحركة) Amphiarthrosis** : تتحرك هذه المفاصل بشكل قليل كالمفاصل بين الفقرات، وتميز بوجود اقراص غضروفية ليفية مسطحة وعريضة تقوم بوصل السطوح المتمفصلة ، وتكون الاجزاء العظمية للمفصل مغطاة غالبا بغضروف زجاجي (Hyaline cartilage) والبنية الكلية محاطة بمحفظة ليفية.
3. **المفاصل المتحركة (حرة الحركة) Diarthrosis** : تكون الحركة فيها اكثر لقلة التعقيد فيها وتغطي سطوح العظام في هذا النوع من المفاصل بغضروف مفصلي (Synovial cartilage) تحيط

بالمفصل ، وغشاء مفصلي (Synovial membrane) والذي يحوي بداخله مادة زيتية تدعى السائل الزليلي (Synovial fluid) .

• **الغضروف المفصلي (Synovial cartilage)** : هي طبقة من نسيج رابط ابيض تغطي رؤوس العظام و المفاصل المتحركة .

• **الغشاء الزليلي (Synovial membrane)** : هو غشاء يتالف من طبقتين يحيط بالمفصل بصورة كاملة يحتوي بداخله السائل الزليلي .

• **السائل الزليلي (Synovial fluid)** . هو سائل اصفر زيتي يساعد في عملية التزيت والانزلاق داخل الغشاء الزليلي في المفاصل الدهنية والذي يفصل العظم عن الاربطة ويقلل الاحتكاك بين السطوح المفصالية (Goss, 1973)

2.3.2. دور الخلايا وجزئيات الوسائط الالتهابية في تقدم التهاب المفاصل الرثياني

The role of cells and molecules inflammatory mediator in the progress of rheumatoid arthritis

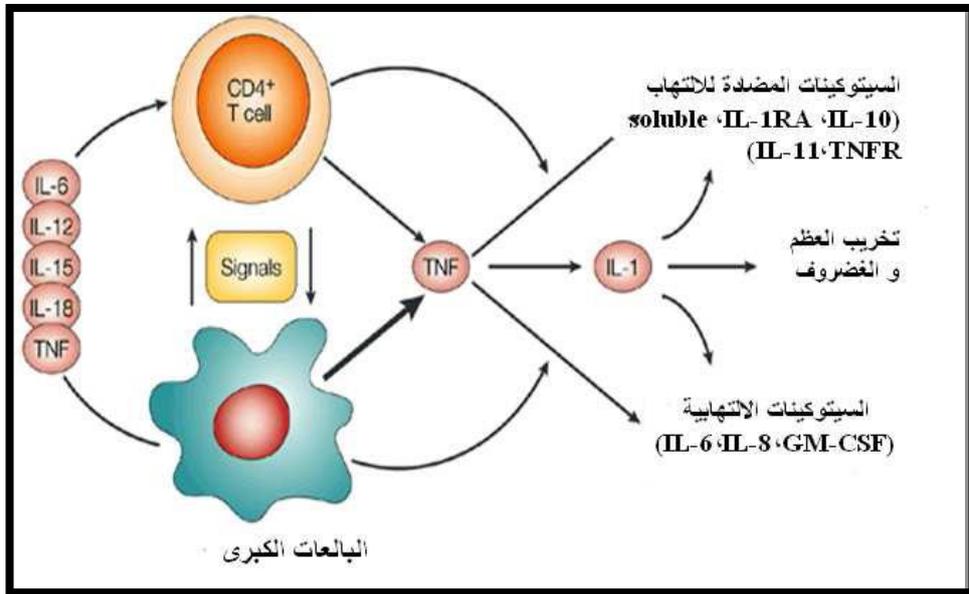
أن المعرفة والفهم الجيد لوظيفة ودور الخلايا المتنوعة للجهاز المناعي الفطري والمكتسب المشتركة في تقدم مرض التهاب المفاصل وكذلك الوسائط المناعية وغير المناعية المتداخلة معها سيؤدي إلى فهم أفضل لاسبابه ، والتي سوف تؤدي في النهاية إلى علاجات أفضل لمواجهة المرض، تتميز الفلسفة المرضية للالتهاب المفاصل الرثياني بوجود خلايا مناعية مختلفة متفاعلة بين كلا من نظام المناعة الفطري مثل Macrophage و Neutrophils وكذلك نظام المناعة المكتسبة مثل خلايا T وخلايا B، والتي بدورها سوف تحفز انتاج البروتينات الجزيئية الذاتية والسايوتوكينات والانزيمات الحالة (Panayi et al.,1992) .

2.3.2.1. دور الخلايا Role of the cells

2.3.2.1.1. البلعميات الكبيرة Mcrophages

إن المستضدات Ag –Antigens اما ان تكون خارجية المنشأ (Exogenous antigen) مثل الفايروسات التي تحفز الخلايا العدة الالتهامية (Macrophages)، او تكون داخلية المنشأ Endogenous antigen وفي الاونة الاخيرة تم تحديد بعض الانتجينات الداخلية المنشأ مثل heavy chain binding protein, citrullinated protein and human cartilage glycoprotein (Blass et al., 2009)، عند ارتباط هذه الانتجينات مع T cells Ag-activated CD4⁺ يتم تحفيز الخلايا وحيدة النواة Monocyte والخلايا البلعمية الكبيرة

macrophages والخلايا المولد الليفية الزليلية synovial fibroblasts وبالتالي تنتج السيتوكينات المحفزة للالتهاب مثل (IL-1، IL-6، TNF- α) على السطح الخارجي لتلك الخلايا بواسطة اشارات كيميائية (CD69 and CD11) هذه السيتوكينات سوف تؤدي الى تنشيط فعالية الخلايا المولدة الليفية الزليلية (Synovial fibroblasts) والخلايا الغضروفية (Chondrocytes) والخلايا الهادمة للعظم (Osteoclasts) التي بدورها تطلق انزيمات بروتينية ذات فعل ضار تدعى Matrix metalloproteinases بالاخص انزيمات Stromelysin and Collagenases التي تعمل على تجزئة النسيج الضام للمفصل (Anderson, 2004) الشكل (1-2).



(الشكل 1-2) : الخلايا البلعمية ودورها في تنشيط الخلايا للمفاوية T المساعدة CD4+ (Brook ,1998).

2.1.2.3.2 دور الخلايا للمفاوية التائية Role of T-Lymphocyte

الخلايا للمفاوية T-Cell تلعب دورا مهما رغم عدم فهمه بشكل كامل بالاخص مع ارتباط شدة وخطورة المرض بنوع مستضدات معقدات التوافق النسيجي العملاقة (Major - MHC histocompatibility complex) البشرية (Human Leukocyte Antigen - HLA) من النوع HLA-DR ، كذلك وجدت أعدادا كبيرة من الخلايا CD4⁺ في الغشاء الزليلي للمرضى المصابين بـ (RA) (Choy & Payani,2001) ، كما وجد ان نقل T-Cell من حيوانات

مصابة بـ (RA) الى النسيج الزليلي لحيوانات خاليه من المرض يؤدي الى حدوث اصابة)
(Kinne et al ., 2000 .

اولا: الخلايا اللمفاوية التائية السامة للخلايا CytotoxicT- (CD8⁺)

تشير الدراسات ان خلايا CD8⁺ T تلعب دور في التهاب المفاصل الرثياني (RA). من خلال التسبب في احداث الاصابة في بعض الاحيان من خلال افرازها كمية لا يستهان بها من السايوتوكينات منها عامل النخر الورمي (TNF- α) وانترفيرون كاما (IFN γ) ، بعد ان تتعرف خلايا T (CD8⁺) على الببتيدات الممرضة التي قدمتها معقدات التوافق النسيجي العملاقة (MHC –Class I) على سطح الخلايا المقدمة للانتجين - (Antigen-presenting cell - APCs) خلال المدة الأولى بعد حدوث الاصابة (Wherry& Ahmed,2004) .

تشير دراسات اخرى (Wong& Pamer, 2003 ; Barry & Beaklely ,2002) الى ان خلايا CD8⁺ T بعد تنشيطها تعمل عملها الاعتيادي (السامة للخلايا) pro-inflammatory في القضاء على الخلايا المصابة والعوامل الممرضة الغريبة الداخلة للجسم و ايضا لها دور تنظيمي بالعوامل الالتهابية لـ (RA) وبذلك لها في الغالب وظيفة وقائية من تلك العوامل ، وقد وجدت CD8⁺ في 50% المرضى المصابين بمرض التهاب المفاصل الرثياني لما لها من دور رئيسي في الحماية من تطور المرض في المراحل الاولى .

ثانيا : دور الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة Role of

Lymphocyte T-Helper(CD+4)

تقسم لخلايا المساعدة الى Th1 ، Th2 تبعا لنوع السايوتوكينات التي تفرزها ان الخلايا المساعدة هي المحور الرئيسي في التسبب في الاصابة بالتهاب المفاصل الرثياني)
(Boissier et al ., 2008) ، الدراسات (Kinne et al., 2000 ; Henderik & Lipsky , 2004) اشارت الى ان خلايا Th1 تنشط عند حدوث اصابة داخلية وتفرز الوسائط الالتهابية pro-inflammatory التي تتضمن السايوتوكينات (IL-2 , TNF- α , IFN γ) اذ تقوم هذه الوسائط بتحفيز الخلايا الملتزمة وتزيد من شراحتها لابتلاع المستضد وافراز جذر الاوكسجين (OR) واكسيد النترريك (NO) لتدمير الخلايا المصابة ، بينما تفرز الخلايا المساعدة Th2 السايوتوكينات المضادة للالتهاب مثل (IL-4 , IL-5 , IL-10 , IL-13) التي تدخل في الاستجابة المناعية الخاطية)
(humoral response) والتي تخفض من نشاط الخلايا الملتزمة)

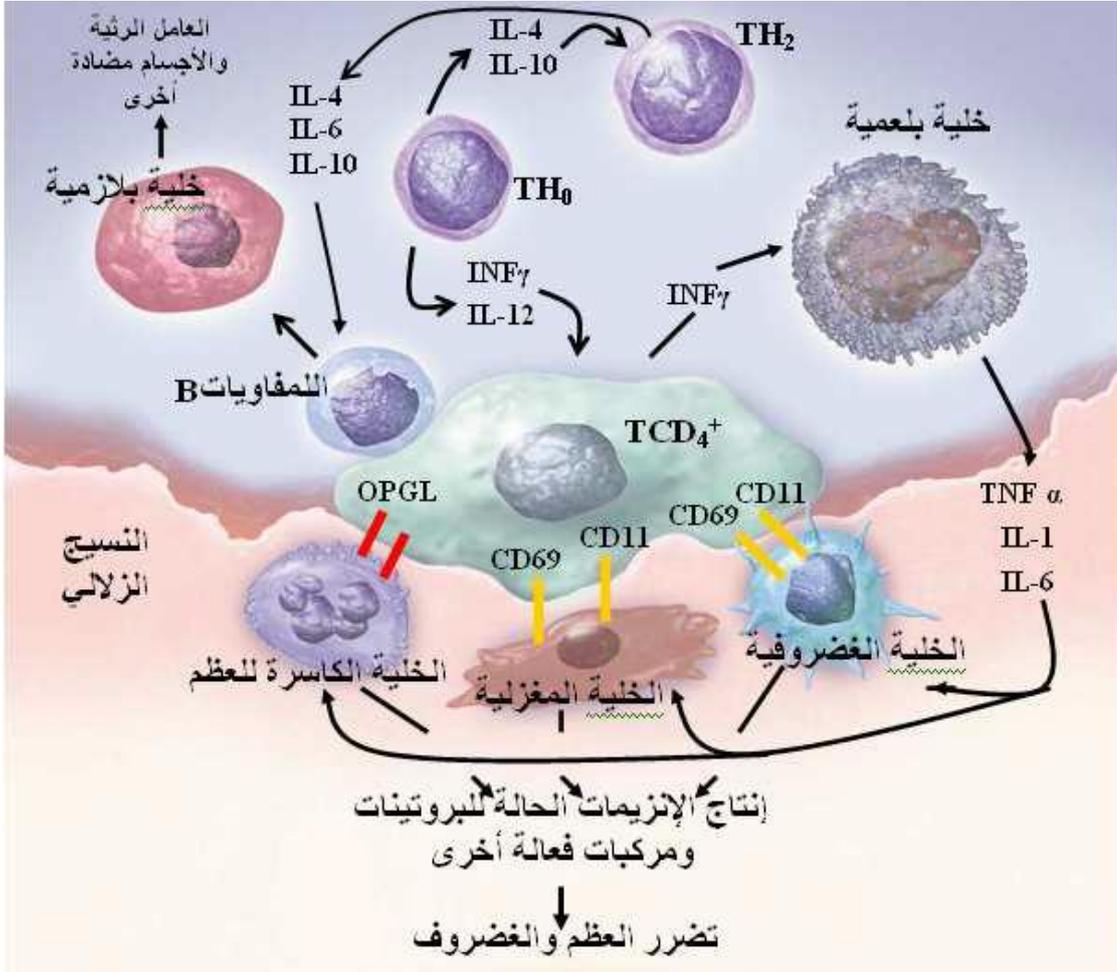
(Macrophage) ، في حالة الإصابة الاعتيادية تكون هناك حالة توازن بين السيتوكينات المحفزة والسيتوكينات المثبطة للالتهاب . لكن حالة الإصابة بالتهاب المفاصل يزيد ارتشاح خلايا Th1 الى الغشاء الزليلي مما يؤدي الى زيادة في افراز السيتوكينات التي تعمل على قلب حالة التوازن لصالحها، كما ان افراز الانترلوكين-2 (IL-2) و IL-17 المفرز من خلايا Th17 التي تعد منظمة لنشاط الخلايا T- و انتاج الاجسام المضادة مثل (RANKL-Antibodies) تكون لهذه الانترلوكينات وظيفة مشابهة لوظيفة عامل النخر الورمي تقوم بافراز الانزيمات الحالة Prostaglandin E2 , Cyclooxygenase-2 و Matrix metalloproteinases وبذلك تعمل على تدمير النسيج المفصلي ، كما ان الـ IL-17 ومستقبلات $IFN \gamma$ تعبر على سطح الخلايا الغضروفية (chondrocytes) والخلايا البانية للعظم (Osteoblasts) وبذلك تعمل على تعزيز عملية هدم العظم (Osteoclastogenesis) وبالتالي تاكل العظم عند مرضى الـ RA (Steinman ,2007) . (; Lundy *et al.*,2007) .

2.3.2.1.3 الخلايا اللمفاوية البائية B-Lymphocyte

اكثر الدراسات المتناولة الاسباب التهاب المفاصل الرثياني ركزت دور T- Cell في احداث وتقدم المرض ، ولم يتم لحد الان الفهم الدقيق لدور B-Cell ويعتقد ان دور هذه الخلايا كبير في احداث وتقدم الـ RA نظرا للكمية الكبيرة من تلك الخلايا الموجودة في الغشاء الزليلي التي تعد عاملاً من عوامل الكشف عن المرض (Mease *et al.*, 2008) ، ويتميز الغشاء الزليلي الذي يعاني من اثر الالتهاب بوجود حويصلات من الخلايا اللمفاوية المترشحة خلاله تمثل تجمعات من الخلايا B اذ اظهرت دراسة (Choy & Panayi ,2001) ان هذه الحويصلات تظهر في 30% من المرضى المصابين بالتهاب المفاصل الرثياني .

تعمل الخلايا اللمفاوية-T المنشطة الموجودة بالغشاء الزليلي على تحفيز وتحويل الخلايا اللمفاوية-B الى خلايا بلازمية Plasma cells التي تقوم بدورها بانتاج الاجسام المضادة الذاتية بالمعقدات المناعية التي تسهم في تحفيز الخلايا العدلة Nutrophil واطلاق الوسائط الالتهابية ، ويتركز دور B-Cell في انتاج الاجسام المضادة الذاتية (Auto-antibody production) ، واهمها (Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies - anti- CCP) وكذلك العامل الرثياني (RF) Rheumatoid factor التي هي عبارة عن اجسام مضادة ذاتية للبروتين المناعي IgG (Immunoglobulin-g) (Buch & Emery , 2002) . اذ ينتج الـ RF في اغلب الاستجابات المناعية مقارنة مع البروتين المناعي IgM الذي يرتبط وجوده بالاستجابات

المناعية الخاصة بأمراض المناعة الذاتية ومنها (RA) (Crrson et al.,1991)، وكذلك تلعب B-Cell فضلا عن إنتاج الاجسام المضادة دورا مشابه للخلايا المقدمة للمستضد (APC) اذ تعرض المستضد على خلايا T- Cell لتنشطها لتقوم بتحفيز العديد من الاستجابات المناعية الخلوية والخلوية (Chaiamnuay & Bridges ,2005).



شكل (2-2) : خلايا الجهاز المناعي المشتركة في تقدم مرض التهاب المفاصل (Ernest et al., 2001).

2.2.3.2. دور جزيئات الوسائط الالتهابية في تقدم التهاب المفاصل الرثياني The role of and inflammatory mediator molecules in the progress of rheumatoid arthritis.

تعد الوسائط الالتهابية احد العوامل الرئيسية في تحريك وادارة الالتهابات فهي تارة تعطي الشرارة الاولى لبداية الالتهاب بعض الحالات لارتباطها بمستقبلات خاصة على اسطح الخلايا المناعية وتارة تعمل على تجزئة العامل الممرض بواسطة فعل انزيماتها وتارة اخرى تطلق مواد مؤكسدة تعمل على التدمير المباشر للعوامل الممرضة ، منها ما هو خارجي المنشأ (Exogenous) مثل Endotoxins ومنها ما هو داخلي المنشأ (Endogenous) (Plasma) تاتي من البلازما او خلايا الدم البيض (Leukocytes) او الخلايا الطلائية (Endothelial cells) او الارومة الليفية (Fibroblasts) . وتعد هذه الوسائط رسائل كيميائية تفرز من العديد من الخلايا تقوم بتحسين الاستجابة المناعية (Hitchon & El-Gabalowy, 2004) .

1.2.2.3.2: الجذور الحرة الاوكسجينية Oxygen-derived

radicals reactive oxygen species free

(ROS)

اشارت الدراسات الى ان الجذور الحرة النشطة للاوكسجين (ROS) التي تتضمن () (H_2O_2) ، (OH^\cdot) and (O^\cdot) تساهم في التدمير المباشر للنسيج الغضروفي المفصلي من خلال تثبيط عوامل النمو (Inhibit antiproteases) الضرورية لترميم الغضروف المتآكل ، كما وتقوم الخلايا البلعمية والخلايا الغضروفية الموجودة بالغشاء الزليلي بواسطة فعل انزيم Xanthine oxidase بانتاج هذه الوسائط التي تساهم في تعزيز حدة الاصابة لدى مرضى (RA) كما تعمل هذه الوسائط على تخريب مكونات الحشوة الخارجية للخلايا المكونة لنسيج الغضروف المفصلي (Puent *et al.*, 2003).

2.2.2.3.2: انزيمات الحشوة خارج الخلية

metalloproteinase Matrix

(MMPs)

تعرف أيضا باسم (Matrixins)، تنتمي إلى مجموعة من البروتينات التي تعتمد على الزنك (Zinc-dependent proteins)، تفرز بواسطة الخلايا البلعمية (Macrophages) و خلايا الارومة الليفية (FLS) Fibroblast-like synoviocytes اذ يوجد مايقارب 20 نوع منها والتي يعتقد أنها تلعب دورا رئيسيا في انهيار الحشوة خارج الخلية للانسجة . ان الكولاجين، الإيلاستين، والجيلاتين و هي المكونات الرئيسية التي تشتق بواسطة انزيمات الـ MMPs ، اذا ان انهيار هذه المكونات ضروري لكثير من العمليات الفسيولوجية مثل التطور الجنيني، التشكل، والاستنساخ والتجديد. تشارك انزيمات الـ MMPs أيضا في العمليات المرضية مثل التهاب

المفاصل الرثياني والسرطان والقلب والأوعية الدموية والأمراض العصبية، وهذه البروتينات تشارك في الأدوار الفسيولوجية والمرضية في جسم الكائن من خلال التحفيز والتنشيط وكذلك الكبح (Samia et al.,2016).

3. 2.2.3.2 . السيتوكينات Cytokines

السيتوكينات (Cytokines) هي وسائط مهمة في الجهاز المناعي، وتنظيم كلا من الاستجابة المناعية الفطرية Innate و التكيفية Adaptive. تفرز الخلايا المناعية الـ Cytokines التي تعمل على تنشيط وتنظيم النمو (Activation and regulate growth) ، التوالد Proliferation و التمايز (Differentiation) ، ويمكن أن يكون للسيتوكينات خصائص الجذب الكيميائي . أيضا يوجد هنالك أنواعا أخرى من الخلايا تفرز Cytokines ، مثل الخلايا البطانية والخلايا الليفية. من الممكن ان يكون للسيتوكينات المختلفة تأثيرات بيولوجية متشابهة وفي الوقت نفسه و من المحتمل ان يكون هناك سايتوكينات خلوية منفردة لها تأثيرات مختلفة على خلية او عدة خلايا من الخلايا الهدف المختلفة ، وتعمل Cytokines من خلال الارتباط بمستقبلات معينة على الخلايا المستهدفة و التعبير لهذه المستقبلات على خلايا الهدف يحدد مقدار الاستجابة ونوعها من عدمها (Angiolilli et al.,2016) ، عادة ادارة وتنظيم العملية الالتهابية بإحكام يكون من قبل هذه الوسائط اذ ان هناك توازنا بين الـ Cytokine التي تبدأ وتحافظ على استجابة مناعية مستمرة Pro-inflammatory cytokines والسيتوكينات التي تكبح نشاط الوسائط الالتهابية الضار تدعى السيتوكينات المضادة للالتهابات Anti-inflammatory cytokines ، و خلال الالتهاب المزمن (التهاب المفاصل الرثياني) التوازن بين تأثير السيتوكينات المحفزة والمضادة للالتهابات تكون مسؤولية هذه الوسائط لان دفع كفة التوازن باتجاه السيتوكينات المحفزة ستؤدي الى ظهور الاثار المدمرة للمفاصل (Feldman & Maini , 2001 ; Bingham) (2002). وجائت اهمية هذه الوسائط ودورها في تطور المرض من خلال كميات هذه الوسائط المترشحة في الاغشية الزليلية في مفاصل مرضى (RA) ، اذ اشارت دراسة (Van 2015) (Nieuwenhuijze et al. ان التعبير الجيني للسيتوكينات المحفزة مثل Granulocyte- (GM-CSF) و IL-1 ، IL-6 ، TNF- α و macrophage-colony-stimulating factor يظهر بشكل واسع في الغشاء الزليلي لمفاصل مرضى (RA) ، ومع ذلك يظل هذا الدور التخريبي لأنسجة المفاصل المصابة غير واضح بشكل دقيق.

اولا:السيتوكينات المحفزة للالتهاب Inflammatory cytokines

يعد كل من عامل النخر الورمي- α (TNF- α) ، Tumor necrosis factor ، انترلوكين-1 (IL-1 β) Interleukin-1 β و انترلوكين-6 (IL-6) Interleukin-6 النموذج الأساسي للسيتوكينات الالتهابية ، ينتج TNF- α بواسطة الخلايا البلعمية و وحيدات النوى والخلايا اللمفاوية – T ، ويمتلك مستقبلين هما كل من (P55 و P75) التي توجد بصورة دائبة ، يحفز TNF- α باقي السيتوكينات الاخرى مثل IL-1 ، IL-6 ، IL-8 ، و GM-CSF يمكن أيضا أن يحفز الخلايا المولدة الليفية (Fibroblast) للتعبير عن جزيئات الالتصاق (Adhesion molecules) وتفعيل بشكل غير مباشر للخلايا الهادمة للعظم التي تكون مسؤولة عن تآكل العظام (Ceccarelli et al.,2015). اثبتت الدراسات (Piguët et al., 1992 ; William et al., 1991) ان حقن TNF- α سيؤدي الى استحثاث المرض في النماذج الحيوانية بصورة اسرع من الاستحثاث بالكولاجين فضلا عن ذلك فان إعطاء العلاجات المضادة لـ TNF- α سوف يؤدي الى تخفيف الاصابة بـ RA (Moreland et al., 1999) .

كما يتم إنتاج IL-1 β أيضا بواسطة الخلايا البلعمية و وحيدات النوى الذي هو احد مجموعة سايتوكينات هي IL-1 α ، IL-18 و IL-4 لها مستقبلات تدعى (IL-1RA) على اغشية خلايا الغشاء الزليلي يمكن أن تحفز إنتاج IL-6 وافرازها عوامل جذب اخرى، كلا من TNF- α و IL-1 β لها دور اساسي في تدهور الغضروف ، كما ان IL-1 β لها علاقة بتحرير انزيمات Matrix metalloproteinases من الخلايا الغضروفية والخلايا الليفية ، ويساهم كذلك كلا من TNF- α و IL-1 β في تثبيط عوامل النمو للانسجة بواسطة افراز انزيم كولاجينيز (Collagenase) الذي يسمى انزيم تثبيط بروتين الحشوة الخارج خلوية للانسجة Tissue inhibitor of MMP (TIMP) مما يؤدي الى تحفيز تآكل العظام والغضاريف وتدهور الاغشية الزليلة في مفاصل النماذج الحيوانية (Robert et al., 2016) .

يفرز IL-6 بشكل أساسي من الخلايا وحيدات النوى ، و يعمل IL-6 على تحفيز خلايا-T وكذلك خلايا-B للنمو والتمايز والحث على إنتاج الأجسام المضادة، فضلا عن ذلك فان IL-6 ينشط الخلايا الهادمة للعظم (Osteoclasts) على الرغم من أن IL-6 يعد من السيتوكينات المحرزة للالتهابات فهو كذلك يعمل على تقليل من نسبة (TIMP) مما يقزد لحماية الأنسجة من الاصابة ، وعلاوة على ان IL-6 يعد من العوامل والسبببات الثانوية في التهاب المفاصل الا ان الدراسات بينت ان اعطاء المثبطات لهذا السيتوكين ومستقبله سوف يعمل على تقليل التهاب المفاصل يكون عامل مقاومة للاصابة في النماذج الحيوانية، كما ان IL-6 يستحث بروتينات الطور الحاد Acute phase proteins مثل CRP او حتى يمكن اعتبارها نفسها من بروتينات الطور الحاد التي هي من المظاهر الدموية التي تعد كدالة لنشاط المرض

. (Van den Borne *et al.* ,1977 ; Wendling *et al.*,1993)

كما يظهر IL-6 في السائل الزليلي لمرضى التهاب المفاصل، يمكن أن يفرز من قبل خلايا وحيدات النوى والخلايا الحبيبية العدلة وكذلك الليفية اذ من الممكن عده Chemokine مسؤول عن الانجذاب الكيميائي للخلايا الحبيبية والعدلة ، وبالإضافة إلى ذلك IL-8 يعزز زيادة الأوعية الدموية (Angiogenesis) ، اما فيما يخص GM-CSF التي تفرز من الخلايا-T ووحيدات النوى وكما يشير اسمها تحفز الـ GM-CSF نمو وتمايز المحببة والخلايا البلعمية لدى مرضى (RA) (Liew&McInnes , 2002).

ثانياً: السيتوكينات المثبطة للالتهاب Anti-inflammatory Cytokines

ان الفعل التنشيطي لسيتوكينات المحفزة والمحفزة للالتهاب يقابله فعل تثبيطي بواسطة القسم الاخر من السيتوكينات مثل IL-10 الذي يفرز من قبل T-Cell و وحيدات النوى العديد من الخلايا المكونة للدم (Hemopoietic cells) تعبرل على سطحها عن مستقبلات IL-10 ، الـ IL-10 له عدة وظائف تثبيط السيتوكينات من قبل الخلايا - T وتثبيط نشاط الخلايا وحيدات النوى ، وبالتالي تثبيط قابلية التحفيز بواسطة الخلايا المقدمة للانتجين APC مما يؤدي الى تقليل انتاج السيتوكينات المحفزة للالتهاب ، وعلى الخلايا - B الـ IL-10 يحث تلك الخلايا على التوالد والبقاء حية لمدة اطول (De wall & Moore ,1998) .

يعد عامل النمو المتحول- بيتا (TGF-β) Transforming growth factor beta أيضاً من السيتوكينات المضادة للالتهابات. يمتلك الـ(TGF-β) مجموعة واسعة من الوظائف التي تمتد من تنظيم التعبير عن جزيئات الالتصاق بواسطة الكريات البيض (Leukocytes) والخلايا البطانية (Endothelial cells) الى تعديل وظيفة الخلايا البلعمية والسيطرة على تنشيط وتوالد الخلايا اللمفاوية ، ان حقن الـ(TGF-β) في المفصل الملتهب يؤدي الى منع تدمير النسيج الغضروفي ، ولكنه يزيد الحالة الالتهابية، كما تعد كل من السيتوكينات (IL-4 و IL-13) التي تفرزها الخلايا T- محفزات لخلايا B- كما انها مثبطات تمنع تشكيل خلايا-T من فرع Th1 ،بالإضافة الى ذلك يقوم IL-4 بتثبيط إنتاج IL-6 و-IL (Rindfleisch& Muller,2005) .8

3.3.2. فسجلة مرض التهاب المفاصل الرثياني Physiology of rheumatoid arthritis disease.

إن الآليات المناعية المرضية لمرض التهاب المفاصل الرثياني غير واضحة، فبوجود

عوامل ممرضة مجهولة السبب تحدث استجابة مناعية غير نوعية إذ تبدأ Immunopathologic

المفصلية في هذا المرض باستجابة التهابية ضمن الغشاء الزليلي تكون عبارة عن تضخم في النسيج الزليلي مع ارتشاح الخلايا وحيدات النواة و الخلايا للمفاوية T فتغزو هذا النسيج وتدمر السطح الغضروفي والعظمي للمفصل مؤديا لحدوث تآكلات فيه ، تغزو بعد ذلك الأنسجة الأخرى كالأوتار (Bresnhan ,1999)

يمكن تقسيم الآليات المرضية إلى ثلاثة مراحل رئيسية الأولى هي مرحلة البداية حيث يتم فيها هجرة بعض الخلايا إلى نسيج الغشاء الزليلي Synovial membrane وتتميز هذه المرحلة على أنها غير نوعية وتعتمد على مختلف العوامل البيئية التي لها صلة بالتهاب المفاصل الرثياني (RA) في مراحل متأخرة للحالات غير المعالجة وهذا النوع من الالتهابات ينهي في كثير من الحالات الى الشفاء الكامل في وقت قصير او طويل أو يقود إلى التهاب مزمن قليل الحدة مسؤول عن المرحلة الثانية التي تتميز بالتهاب نسيج الغشاء الزليلي Synovial membrane و إرتشاح خلوي مع تطور الالتهاب وانتقاله الى نسيج الغضروف المفصلي Synovial cartilage وتعد هذه الحالة مشابهة الالتهاب المفاصل الرثياني (RA) المزمن ولكن يكون التهاب غير نوعي . المرحلة الثالثة مهمة جدا ، و تتضمن تحفيز البروتينات المناعية بواسطة النشاطات الخلوية ، وبعدها تطور وانتشار التهاب النسيج الغشاء الزليلي بالكامل وتدمير المفاصل .تتسبب هذه المرحلة في تحطيم والغضروف العظام بشكل مباشر ، كل هذه المظاهر تمثل الأعراض المميزة لـ RA (Combe& Dougdos,2001).

ينتج الضرر الذي يحدث على مستوى الغشاء الزليلي جراء أربعة أنواع من الآليات التي تتمثل في آليات إنزيمية غير نوعية بواسطة تحرير كمية كبيرة من الإنزيمات المحللة للبروتينات collagenases ، metalloproteases التي تعمل على تدهور الغضروف ، وآليات مناعية خلطية humoral مع إنتاج العامل الرثياني (FR) (غلوبولينات مناعية مضادة للـ IgG) ، أجسام مضادة ذاتية لعدد من المستضدات (antibodies, anti-nuclear, anti-cytoplasm) وبوساطة خلوية مع فرط نشاط الخلايا للمفاوية المساعدة في غشاء النسيج الزليلي، فضلا عن آليات يقوم بها مختلف السيتوكينات ولا سيما IL-1 ، IL-6 ، و TNF α بوساطة أثرها الالتهابي و IL-8 و اثره على الخلايا العدة متعددة النوى Neutrophil (Raissauni et al. , 2005) ، وتلعب السيتوكينات المحفزة دورا مرضيا اساسيا في العمليات الالتهابية وعلى التهاب النسيج الزليلي وتحطيم الغضروف ، حيث يحدث داخل المفاصل الملتهبة اختلال في التوازن بين السيتوكينات المحفزة مثل IL-1 ، IL-6 ، و TNF- α والسيتوكينات المضادة للالتهاب والمتمثلة بـ IL-13 ، IL-4 ، IL-10 كما أن مستقبلات TNF- α الذاتية و IL-1 والمقدمة بكمية قليلة غير كافية بسبب الفعل التنافسي لـ (IL-1 -RA) على مستقبل IL-1 وبهذا

لا يمكنها إيقاف الفعل الالتهابي (Golbach & Lipsky , 2003) . على مستوى الغشاء الزلالي تتميز الآليات المناعية للتهاب المفاصل الرثياني على أنها معقدة ، حيث يوجد تداخل كبير بين الخلايا للمفاوية B و T والبالعات الكبيرة (Macrophages) والسيتوكينات . ويعتقد أن أول آلية تبدأ بتفعيل أو تنشيط الخلايا للمفاوية CD4⁺ ويتم هذا التنشيط بواسطة الخلايا المقدمة للانتجين (APC) (Denarie *et al.*, 2017) .

على مستوى السائل المفصلي Synovial fluid (SF) تكون الخلايا العدلة هي المسيطرة ويتم جذبها بواسطة عدد من عوامل الجذب الكيميائي تعمل هذه الخلايا على اطلاق الانزيمات المنشطة مثل collagenases التي تلعب دورا في تآكل الغضروف السطحي والعظم (Ferrara *et al.*,1991) . يوجد في السائل الزلالي غلوبولينات مناعية مكونة بشكل أساسي من العامل الرثياني Rheumatoid Factor (RF) من النوع IgG وIgM تشكل معقدات مناعية وتؤدي إلى تنشيط نظام المتمم Complement system التي تزيد من الحالة الالتهابية ، ومنه فان RA ينطلق بدءا بنشاط CD4⁺ التي تضاعف الاستجابة المناعية وذلك بتحفيز خلايا مناعية أخرى وهي الخلايا أحادية النواة Monocyte وخلايا Fibroblastes والخلايا الغضروفية Chondrocytes والخلايا الهادمة للعظم Osteoclastes كما ان تحرير سيتوكينات خاصة (IL-1 ، IL-6 و TNF α) تحدث إتهابا على مستوى النسيج الزليلي (Weyand , 2000) .

4.2. اسباب وعوامل خطر مرض التهاب المفاصل الرثياني Etiology and risk factor of rheumatoid arthritis diseases.

1.4.2 . عوامل الخطر الجينية Genetic risk factors

يعد التهاب المفاصل الرثياني RA هو احد امراض المناعة الذاتية الذي يتسبب به اشتراك عدد من العوامل الوراثية والمناعية المعقدة، وقد أظهرت الدراسات على التوائم معدلات الإصابة تزداد ما بين (12% - 15%) في التوائم Monozygotic مقارنة مع 4% في التوائم Dizygotic، بينما قدرت الحسابات بناء على هذه البيانات ان حوالي 60% من الاشخاص يورثون قابلية تطور التهاب المفاصل الرثياني (Pierer *et al.*,2006) . أقوى تأثير للأشكال الوراثية على عوامل خطر الـ RA يتعلق قسم منها بجينات (HLA) ، وكذلك ان جينات اخرى غير

جينات (HLA) وايضا العوامل البيئية تؤثر بهذا المرض (Skogh , 2005 ; Reveille , 2006).

2.4.2. عوامل الخطر الاخرى Other risk factor

على الرغم من أن العوامل الوراثية مهمة في تطوير RA ليس فقط هم الذين يكونون عرضة للاصابة بهذا المرض. وقد أظهرت دراسة للتوائم في المملكة المتحدة واستراليا ان نسبة الاصابة بالمرض في التوائم من الزوجات الواحدة ما بين (15- 21%). وأظهرت أيضا انه يوجد توافق بسيط لإنتاج الغلوبولين المناعي والاجسام المضادة ضمن أزواج التوائم . هناك ادلة بسيطة تشير زيادة الاصابة بالتهاب المفاصل الرثياني وظهور العامل الرثياني (RF) وغيرها من البروتينات المناعية الاخرى ضمن الاشخاص المتزوجين مع تاريخ وراثي للمرض ، وقد شجعت هذه الملاحظات في البحث عن المسببات البيئية وغيرها للاصابة بهذا المرض (Jawaheer et al, 2004 ; Kary , 2004).

1.2.4.2. الجنس Sex

التهاب المفاصل الرثياني هو أكثر شيوعا بضعفين في النساء منه في الرجال . ، تشير التقارير ان المعايير الهرمونية مثل مستويات الهرمونات الجنسية الذكرية (Sex hormones) وبخاصة هرمون التستوستيرون (Testosterone) تكون أقل لدى الرجال مع التهاب المفاصل الرثياني، كما أن النساء اللاتي يتناولن حبوب منع الحمل (Contraceptive pill) عن طريق الفم تنخفض لديهن اخطار الإصابة بالتهاب المفاصل، من هذا تشير الملاحظات إلى أن العوامل الهرمونية قد تلعب دورا في تطور هذا المرض . أن الحمل باعتباره عامل خطر لالتهاب المفاصل الرثياني فأن بداية الـ RA أمر نادر الحدوث أثناء فترة الحمل، ولكن الزيادات في نسب الاصابة بعد فترة الولادة (Robert et al.,2016).

2.2.4.2. التدخين Smoking

بينت الدراسة الوبائية (Klarekog et al.,2004) أن التدخين هو عامل خطر مستقل لالتهاب المفاصل الرثياني ، لا سيما ارتفاع العامل الرثياني الإيجابي (RF) للمرض ، كما وجدت دراسة ان التدخين يعد مؤشرا مرتبب بظهور التراكيب الوراثية HLA-DRB1 بالدرجة الأولى في مجموعة كبيرة من المرضى الذين يعانون التهاب المفاصل الرثياني، كما اكدت على تداخل العوامل الوراثية والبيئية في التهيئة للـ RA .

3.2.4.2. العدوى Infection

هناك عدد كبير من العوامل المعدية التي قد تساهم بشكل او باخر في تطور الاصابة بـ (RA) بما في ذلك Epstein Barr Virus (EBV) و Parvovirus ، فضلا عن غيرها من العوامل، مثل ذلك البكتيريا Proteus و Mycoplasma (Silman & pearson , 2002) .

2.4.2.4 عوامل متنوعة Vary factors

توجد العديد من العوامل المهمة في استحداث وتطوير مرض التهاب المفاصل الرثياني كالتعرض للحقن بالسليكون والمواد العضوية والزيوت المعدنية ، والعوامل الغذائية مثل شرب القهوة أو تناول اللحوم المفرط وكذلك نقل الدم يعد من عوامل خطر الاصابة بـ RA (Klareskog et al., 2006) .

2.5. The symptoms and clinical manifestation of rheumatoid arthritis

2.5.1: بداية ظهور

الاعراض The onset of symptoms

تختلف بداية ظهور الاعراض لدى المرضى المصابين بالتهاب المفاصل الرثياني ، ولكن بشكل عام تظهر الاعراض بالتهاب محدود سرعان ما يتحول للالتهاب شديد يقوم بتدمير انسجة المفصل وبالتالي تاكل العظم Erosive ، أو قد يكون بداية حادة مفاجئة Insidious acute وهو النوع الأكثر شيوعا او التهابا تحت الحاد (Sub acute) ، التهاب المفاصل الروماتويدي قد يبدأ Monoarthritis من مفصل واحد ثم ينتشر تدريجيا إلى المفاصل الأخرى، وبالتالي يصبح التهاب المفاصل مزمن Chronic (Amy & Wasserman, 2011)

2.5.2. الاعراض غير المحددة Non specific symptoms

يظهر في 60% من المرضى الذين يعانون من الـ RA أعراض عادةً ما تتلخص في الشعور بالخمول العام وفقر الدم والضعف وفقدان للطاقة وفقدان للشهية وارتفاع خفيف في درجة حرارة الجسم وآلام في العضلات والمفاصل وتيبس فيها. وعادةً ما يحدث الألم والتيبس في المفاصل بعد فترات الراحة وليست بعد فترات النشاط فالمرضى أو المريضة قد يشتكي من الألم في الأصابع عند الاستيقاظ من النوم ، كما أن المفاصل تصبح متورمة ومؤلمة ومحمرة وهذه الأعراض كلها قبل ظهور التهاب الغشاء المفصلي (Appelboom, 2005) .

2.5.3. المظاهر السريرية Clinical manifestation

كثيرا ما تختلف أعراض التهاب المفاصل الرثياني في الوقت المبكر من الالتهاب وتلك التي تظهر عند تطور المرض ، فضلا عن ذلك يمكن للأعراض أن تختلف على نطاق واسع من شخص لآخر (Scott , 2010).

1.3.5.2 المظاهر المفصالية Articular manifestation

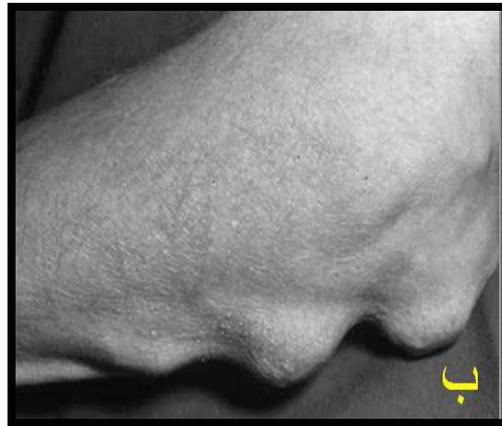
تتمثل أهم المظاهر والأعراض التي ترافق هذا المرض في حدوث تورمات مع آلام على مستوى المفاصل المصابة وقد يحدث في أي مفصل ولكن عادة تؤثر على المفاصل الصغيرة لليد والقدم وكذلك الرسغين والركبتين والكتفين والمرفقين والكاحل ، فتتأثر حركة المفصل المصاب مع استمرار الالتهاب فيصعب على المريض تحريك المفصل مما يؤدي مع مرور الوقت إلى ضمور في العضلات المحيطة به ، فضلا عن تصلب المفاصل لأكثر من 30 دقيقة في الصباح عند الاستيقاظ من النوم (التصلب الصباحي) ، ويؤثر الـ RA على فقرات العنق وخصوصا الفقرتين الأولى والثانية ويؤدي إلى ألم وتيبس العنق كما قد يعاني المريض من ارتفاع درجة الحرارة وتعب وإرهاق ونقص في الوزن خصوصا في فترات ازدياد النشاط (الهيجان) و يحدث في المفاصل المتأثرة بـRA تنكس الغضروف و تقرحات العظمية وتدمير الأربطة والأوتار (Smolen et al.,2017).

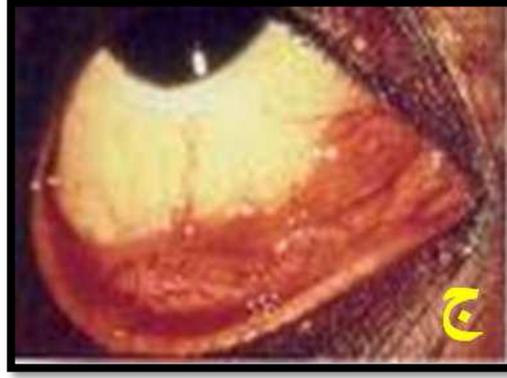
2.3.5.2 المظاهر الجهازية Systematic manifestation

أن التهاب المفاصل الرثياني يؤثر بشكل رئيسي على المفاصل إلا أنه قد يؤثر على أعضاء أخرى، ويمكن أن يحدث بشكل حاد مع أعراض جهازية عند المصابين، حيث يعتبر RA مرضا جهازيا يكون عادة مصحوبا بفقدان الشهية (anorexia) ونقص الوزن وآلام عضلية (Myalgia) ، وفي بعض الحالات يمكن أن تسبق الأعراض المفصالية ظهور ضخامة العقد اللمفاوية Lymphadenopathy بشكل شائع قريبة من المفاصل المصابة وتكون عادة غير مؤلمة (Scott et al., 2010) ، يظهر عند بعض المصابين تخلخل العظام (Osteoporosis) والضعف العضلي حول المفصل بشكل مباشر قريبا من المفصل المخرب، أما تخلخل العظام والضعف العضلي العام فيظهر في المراحل المبكرة للمرض كنتائج ثانوي للالتهاب الجهازى . تظهر العقيدات تحت الجلدية (Subcutaneous nodules) عند 20 % من المرضى، تتموضع عادة في مناطق الضغط والاحتكاك عادة ما يكون ظهور تلك العقيدات مترافقا مع ايجابية العامل الرثياني (RF) (Leipe et al., 2005) ، وهناك العديد من المظاهر الجهازية الاخرى التي ترتبط بالتهاب المفاصل الرثياني (جدول 1-2).

جدول(1-2) المظاهر الجهازية المرافقة لالتهاب المفاصل الرثياني

المظاهر المصاحبة	العضو
التهاب الأوعية الدموية الصغيرة	الأوعية الدموية
العقيدات الرئوية	الرئتين
التهاب التامور	القلب
العقيدات تحت الجلد (العقيدات المفاصل)	البشرة
التهاب القرنية والملتحمة الجاف، Episideritis و Sceleritis	العيون
التهاب كبيبات الكلى (GN)، الداء النشواني، وسمية الدواء.	الكلى
الاعتلال النخاعي، انضغاط الحبل، التهاب	الجهاز العصبي





الشكل: 2-3 مختلف المظاهر الجهازية التي ترافق مرض التهاب المفاصل الرثوي.
أ- تشوه على مستوى المفاصل الصغيرة لليدين، ب- تموضع العقيدات تحت الجلدية في
الاسطح الباسطة للذراع (Leipe *et al.*, 2005)، ج- التهاب واحمرار ملتحمة العين، د-
الالتهابات الخارج مفصلية (Deng & Lenavdo, 2006).

6.2. تشخيص التهاب المفاصل الرثياني Rheumatoid Arthritis Diagnosis

تشخيص التهاب المفاصل الرثياني (RA) يعتمد أساسا على وجود العلامات والأعراض، وبوجود مجموعة واسعة وبدرجة شدة مختلفة لهذه الأعراض والعلامات، فضلا عن العديد من الحالات الالتهابية المرافقة للعديد من الأمراض التي تكون مشابهة لأعراض وعلامات التهاب المفاصل الرثياني وهذا يجعل التشخيص صعبا إلى حد ما (Smolen *et al.*, 2017).

1. 6.2 الفحوصات العامة General examinations

يتم الحصول على معلومات مفصلة حول ظهور وشدة الأعراض وكذلك معلومات عن التاريخ العائلي لالتهاب المفاصل الرثياني أو اضطرابات المناعة الذاتية الأخرى من خلال الاستفسار عن تورم المفاصل ومواقع الإصابة، كما ويتم الفحص البدني التفصيلي ويشمل ذلك

فحص المفاصل المصابة وغيرها من التورم والألم والالتهاب. ويشمل الفحص المعايير القياسية لتقييم تورم مفاصل الجسم في ما يقارب (66-68) من الأماكن بما في ذلك اليدين والأطراف العلوية والركبتين والقدمين (Combe *et al*, 2016).

2.6.2. الفحوصات المختبرية Laboratory tests

توجد اختبارات يمكن أن تؤكد وجود التهاب المفاصل الرثياني بشكل عام وغير دقيق ، هذه الاختبارات قد تساعد في تمييز هذا المرض من الأمراض والاضطرابات الأخرى التي تؤثر على بنفس الاتجاه التقليدي لاكثر من نوع من المرض منها اختبارات الدم (Harrison *et al*, 2002) . وتشمل هذه:-

• معدل ترسيب كريات الدم Erythrocyte sedimentation rate (ESR) -

وهذا هو فحص الدم الاعتيادي اذ ليست دلالة نهائية على وجود التهاب المفاصل الرثياني ، وبه يسمح للعينة من الدم المرور في أنبوب فإذا كانت خلايا الدم تنزل الى الأسفل بسرعة مكونة عمود أكبر من الخلايا بعد 1 و 2 ساعة يقال إن ESR التي مرتفع ، اذ ان الاصابة بالتهاب المفاصل الرثياني هو شرط رفع ESR .

• تعداد الدم Blood count - وهذا هو فحص دموي روتيني آخر. فإنه يمكن الكشف عن فقر

الدم أو النقص في خلايا الدم الحمراء وخلايا الدم البيضاء التي أثرت و قد تكون الكريات البيضاء التي أثرت دلالة على حالة التهابات.

• بروتين سي التفاعلي C-reactive protein (CRP) - و هو اختبار الدم الذي يعد

علامة للالتهاب. رفع معدل CRP ليس مؤشرا نهائيا على التهاب المفاصل الرثياني ولكن هو علامة على وجود التهاب في أي مكان من الجسم.

• العامل الرثياني Rheumatoid factor - وهذا هو اختبار محدد نسبيا للتهاب المفاصل

الرثياني. هناك وجود هذا العامل دلالة في ما يقرب من 80% من جميع الأشخاص المصابين بالتهاب المفاصل الرثياني في المراحل المبكرة من المرض. وبالإضافة إلى ذلك حوالي 1 من كل 20 شخص من الأصحاء قد يكون لديهم اختبار إيجابي للعامل الرثياني ، وبالتالي وجوده لا يدل تماما على وجود التهاب المفاصل الرثياني (Palosuo *et al*, 2003 ; Sharif *et al*, 2007).

6.2. علاج مرضى التهاب المفاصل Treatment of patients with RA

في العقدين الأخيرين تم تغيير الاستراتيجيات العلاجية التقليدية لمرضى التهاب المفاصل الرثياني ، إذ يتم علاج مرضى التهاب المفاصل الرثياني وفقا لنهج الهرم pyramid approach

. في هذه الطريقة يبدأ العلاج مع الادوية غير الستيرويدية المضادة للالتهابات Non-steroidal anti inflammatory drugs (NSAIDs) كمسكنات تستعمل للحد من الألم والالتهاب ، وهذه المسكنات ليست لديها القدرة على منع تطور المرض ، وفي الوقت الذي تكون (NSAIDs) غير فعالة بالقدر الكافي توصف الأدوية المعدلة للمرض المضادة للروماتيزم (DMARDs) Disease modifying anti-rheumaticc drug ، وعادة ما يكون تأثير (DMARDs) هو تاخير ظهور فعل العوامل المرضية وايضا تكون قادرة على تعديل المرض (Scott *et al.*, 2010). استخدام الـ DMARDs وفقا لمنهج الهرم في البدء يكون باستعمال ادوية خفيفة الى معتدلة نسبيا مثل استخدم Hydroxychloroquine ، و ثم تليها علاجات أقوى مثل MTX (Bijlsma *et al.*, 2016) . اشارت الدراسات الى ان الاثر العلاجي لالتهاب المفاصل الرثياني يكون ذو نتائج افضل بواسطة الفعل التكاملي في الوقت نفسه للعديد من المجموعات من الادوية وقد اثبتت عدة مسارات عشوائية لهذا النوع أن العلاج المباشر بـ DMARDs يعطي نتائج أفضل من النهج الهرمي (Saag *et al.*, 2008 ;Vrstappen, 2003) . يتم ذلك بمزيج اثنين أو أكثر من DMARDs ، اذا ان ستة أشهر من العلاج المكثف المكون من الجمع بين بريدينزولون Prednisolone والميثوتركسات Methotrxate ، والسلفاسالازين (SSZ) Sulfasalazine يؤدي إلى رفع امكانية السيطرة على المرض وانخفاض معدل ايجابية الفحص الإشعاعي ومن خلال تقييم انخفاض المعايير السريرية التي تعكس نشاط المرض اكثر من العلاج بـ SSZ وحده (Kaneko *et al.*,2016;Lanndeew *et al.*,2002).

1.6.2. الادوية غير الستيرويدية المضادة للالتهابات Non-steroidal anti inflammatory drugs (NSAIDs)

تملك هذه الأدوية فعالية كبيرة في تخفيف الألم والتصلب المفصلي وتستخدم عادة مترافقة مع الأدوية المعدلة للمرض Disease-Modifying Anti Rheumatoiddrugs (DMARDs) تقوم هذه الأدوية بتثبيط إفراز إنزيم السيكلو اوكسيجيناز 1و2 (Cyclo-oxygenase 1,2 inhibitors) وبالتالي فهي تثبط البروستاغلاندينات مؤدية إلى تأثيرات جانبية عديدة أهمها الاضطرابات الهضمية ، حيث يعد النزيف الهضمي من أشهر التأثيرات السمية خاصة عند كبار السن . تبين أن 5% من حالات النزيف الهضمي في المستشفيات كانت عند المرضى فوق 60 سنة ، ويمنع استعمال هذه الأدوية في حالة وجود قرحة هضمية ، ومن التأثيرات السامة الأخرى احتباس السوائل والطفح الجلدي والسمية فقط الكبدية ، وقد تم اكتشاف مجموعة جديدة من هذه الأدوية تعمل على تثبيط إنزيم Cox-2 تدعى

مجموعة الكوكسيب (Coxib) (Coxib) (Mobicox) (Meloxicam) (Celebrex) (Celecoxib) تتميز هذه الأدوية بقلّة حدوث التقرحات الهضمية مقارنةً بالجيل القديم ، كما أنها أقلّ تأثيراً على الصفائح الدموية ، لكن يجب الحذر عند استعمالها لدى مرضى الأمراض الكلوية (Elsaman *et al.*, 2016) . كما تعدّ الأدوية المصنّعة من مشتقات حامض الخليك التي تشمل مشتقات الاندول (Acetic acid derivatives)(including indole derivatives) Diclofenac (Voltaren Rapide) (potassium) من أدوية الـ (NSAIDs) التي يعتد بها لتخفيف الألم وإدارة علاج التهاب المفاصل والتي تعمل على تثبيط إنزيم Cox-2 أيضاً كما ولها آثار جانبية عديدة (Beatrix & Gary, 2010) كما تعدّ مشتقات حامض البروبان (Propionic acid derivatives) ومنها النابروكسين (Naproxen (Naprosyn) والايبو بروفين (Ibuprofen) من احد اصناف الادوية غير الستيرويدية (Zawidlak *et al.*, 2010).

1.1.6.2 الفولتارين Voltaren

مضادات الالتهاب غير الستيرويدية بضمنها الفولتارين لديها مدى واسع من الاستخدامات وخصوصاً في الحالات التي يكون فيها الألم والالتهاب موجودة . إذ اثبتت فعاليتها بشكل جيد من خلال الاستخدام اليومي في مثل هذه الحالات (Beak *et al.*, 2005) . إذ يستعمل الفولتارين لعلاج التهاب المفاصل الرثياني ، التهاب المفاصل العام ، الاضطرابات العضلية الحادة (مثل التهاب الأوتار والالتواء والخلع) والتهاب الفقار اللاصق والنقرس الحاد والألم ما بعد العملية الجراحية والمغص الكلوي وتسكين الألم في حالات حصى الكلى وحصى المرارة وعلاج الصداع النصفي الحاد وألم الاسنان. يستعمل الفولتارين أيضاً لعسر الطمث (Hardman & Limbird , 2001) . على الرغم من الفائدة العلاجية الكبيرة للفولتارين إلا أنه له تأثيرات جانبية كثيرة منها تأثيرات معوية وتفاعلات فرط الحساسية (تشنج القصبات وطفح جلدي و حكة وذمة وعائية) ويؤثر على الجهاز العصبي المركزي فيؤدي إلى (صداع و دوار وخمول) . (Gibbon , 2003) . بما أن الفولتارين من مضادات الالتهاب غير الستيرويدية فإنه يمكن أن تؤدي الى زيادة الخطورة بالإصابة بالربو أو تفاقمه وهذا التأثير يمكن أن ينسب إلى تثبيط COX-1 بواسطة الفولتارين والذي يسبب تغير في أيض حامض الأراكيدونيك مما يؤدي إلى الإفراط في leukotrienes (Sabry, 2010) .

1.1.6.2.2 النابروكسين Naproxen

يعد النابروكسين من أدوية علاج التهاب المفاصل غير الستيرويدية المضادة للالتهابات ويستخدم لعلاج حالات الألم بما في ذلك ألم ما بعد الجراحة، لجرعة الأولية من النابروكسين هي

25-500 ملغ مرّة باليوم عن طريق الفم لمدة 8 أسابيع، والجرعة يمكن أن تصل إلى 15000 ملغ عن طريق الفم مرتين باليوم (عند الحاجة). والجرعة بشكل عام هي 2.5-10 ملغ/كغ (Zhangv et al.,1998).

1.2.1.6.2 التسمية

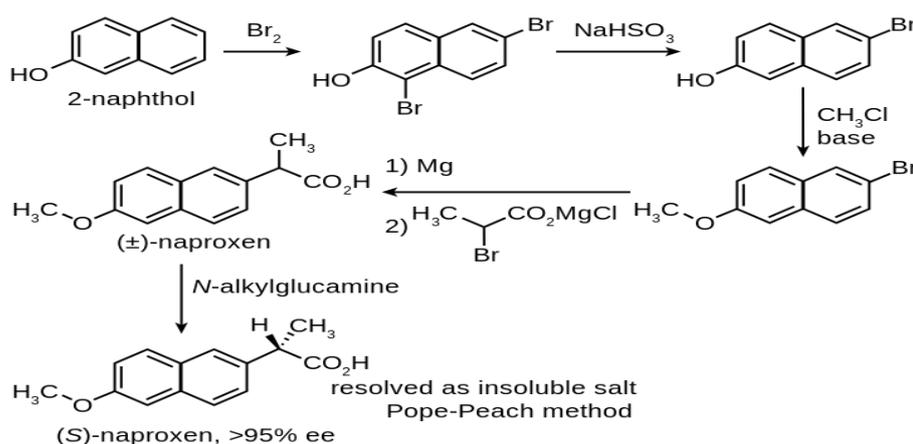
■ الاسم العلمي : (S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl) propanoic acid

acid

■ الاسماء التجارية :

Anaprox, Antalgin, Feminax Ultra, Flanax, Inza, Extended, Aleve, Proxen, ReliefNalgesinNaposin , Naprelan , Naprogesic , Naprosyn Midol , Narocin, , Synflex , Miranax,Nexorpan.Nopain.Desman Xenobid.inaprol .

■ التركيب الكيميائي



1.6.2.2.2.2 الية عمل النابروكسين

النابروكسين يقلل من إفراز البروستاغلاندين الذي يسبب الالتهاب والألم والتورم، ويستخدم لتخفيف الألم والحمى والالتهاب الناجم من التهاب المفاصل الروماتويدي. وتعمل هذه المسكنات من خلال إعاقة عمل إنزيم السيكلوأكسجيناز (Cyclo-oxygenase) الذي يساهم في إنتاج البروستاغلاندين. ولكن هذه الأدوية تؤثر في بطانة المعدة وبطانة الأمعاء (Angiolillo & Weisman, 2017)

1.6.2.2.1.3 الاستعمالات العلاجية للنابروكسين

يستعمل هذا العلاج لتخفيف شدة الألم والالتهاب والحمى وكذلك يستعمل لتخفيف شدة الألم في الدورة الشهرية (عسر الطمث) ، كما اثبت العلاج فعالية كبيرة في معالجة نوبات النقرس و الصداع النصفي (Mannheimer *et al.*,1985).

إذا كان لدى المريض تحسس تجاه النابروكسين أو أي مكون آخر في هذا الدواء يجب تركه و بالإبلاغ عن التحسس الذي أصاب المريض والكيفية التي اثر بها فيه ، ويتضمن ذلك الكشف عن وجود طفح أو بثور أو حكة جلدية أو ضيق في التنفس أو صفير عند الشهيق أو سعال أو تورم الوجه أو الشفتين أو اللسان أو الحلق، أو أية أعراض أخرى مصاحبة لإستعمال الدواء ، و إذا كانت المريضة حاملاً بأكثر من أربعة وعشرين أسبوعاً ينصح بعدم تناولها لهذا العلاج (Zahradnik *et al*, 2010).

2.1.6.2. 4. الآثار الجانبية للنابروكسين

للادوية اللاسترويدية المضادة للالتهابات سواءً تلك اللانتقائية Non-selective او الانتقائية Selective anti-cox II لها علاقة بزيادة الخطورة وقد تكون مميتة في مشاكل عديدة في القلب والاعوية الدموية. ومع ذلك النابروكسين يعد أقل هذه الأدوية في مشاكل القلب والاعوية الدموية مثل احتشاء عضلة القلب (Steven *et al.*, 2016). وبحسب جمعية القلب الأميركية يعد النابروكسين هو الاكثر أماناً مقارنة مع الديكلوفيناك الذي زادت التحذيرات مؤخراً من مخاطره الشديدة على القلب لتصل خطورته لخطورة الادوية الانتقائية او المعروفة بالـ anti-cox II مثل سيليكوكسيب (سيليركس) و اتوريكوكسيب (أركوكسيا) حيث تربط الدراسات زيادة الانتقائية على COX-II بزيادة المخاطر على القلب. النابروكسين مثله مثل باقي هذا النوع من الادوية يسبب مشاكل في الجهاز الهضمي مثل حرقان المعدة والتهاب المعدة ، امساك، أو إسهال، وقرحة معدة في الجرعات العالية لذا ينصح باستخدامه مع مثبطات مضخات البروتون مثل لانسوبرازول او امبيرازول (Jin , 2015).

2.6.2. الأدوية المعدلة للمرض المضادة للروماتيزم Disease-Modifying Anti Rheumatic drugs (DMARDs).

هناك طرق أخرى لعلاج الـ RA متمثلة بمجموعة من العوامل المضادة للروماتيزم هي (DMARDs) مثل ميثوتريكسات، إنفليباكسيمب و ريتوكسيماب . ان الـ DMARDs قادرة على إبطاء تطور المرض وخفض الاثار المدمرة في حالة تطور المرض الغير معالج ، ، توصف هذه الأدوية غالباً في حال وجود أعراض أو علامات على الحالة الالتهابية الفعالة ، أدوية (DMARDs) ليس لها تأثيرات مباشرة مضادة للالتهاب ، لكنها تحسن

من الألم المفصلي والتصلب والتورم كما تقلل من الأعراض الجهازية والعامل الرثوي خلال عدة أشهر من استعمالها . إن الاستخدام المبكر لهذه الأدوية مترافقة فيما بينها له تأثيرات قوية في تخفيف الالتهاب من خلال قابليته التثبيطية العالية للعديد من محرضات الالتهاب وبالتالي تحسين ادارة المرض و تم تطبيق العديد من الـ DMARDs في علاج التهاب المفاصل الرثياني بعضها بشكل مفرد والاخرى مجتمعة (Kremer et al.,2004) .

2.6.2.1. املاح الذهب Gold salts

استخدمت أملاح الذهب لمدة طويلة في علاج التهاب المفاصل الرثياني . المكون الرئيسي (حوالي الثلث) هو الملح القابل للذوبان في الماء الذي يسمى أوروثيومالات الصوديوم (Myocrisin) العديد من المرضى الذين يستخدمون املاح الذهب كعلاج يعانون من آثار جانبية أكثرها شيوعا الطفح الجلدي و قلة العدلات ، البول البروتيني أقل شيوعا بنسبة (1-3) على التوالي ، هذه الفئة من المرضى والمستمرين سنوات طويلة بعد وصف املاح الذهب كعلاج لهم يمكن ان يحصلوا على قدر محدود من الفائدة في منع تطور المرض . وصفت أملاح الذهب كعلاج أول مرة عشوائيا مرض السل (Tuberculosis) ، و بعدها لالتهاب المفاصل إذ تتشابه وتداخل الاعراض بين المرضى بتمويل جمعية الروماتيزم (مجلس لجنة بحوث السيطرة على الروماتيزم 1961) . نادرا ما تستخدم املاح الذهب الآن في المملكة المتحدة ، إلا في حالات معينة لمرضى اعتادوا تعاطي هذا النوع لا تزال مستفيدة منها ، وقد تم انتاج مركب فموي من املاح الذهب في أواخر الثمانينيات أورانوفين (Auranofin) ولكن على الأرجح يكون أقل فعالية من العلاج المستخدم بشكل حقن (Emery & Seto , 2003) .

2.6.2.2. العلاجات المضادة للملاريا Anti-malarial drugs

تستخدم العلاجات المضادة للملاريا منذ فترة طويلة كانت تسمى سابقا فوسفات الكلوروكين (Chloroquine phosphate-CQP) وفي الوقت الحاضر تدعى وهيدروكسي كلوروكوين (Hydroxychloroquine-HCQ) و تستخدم هذه العلاجات على نطاق واسع في الأمراض الروماتيزمية ، سواء كعلاج لالتهاب المفاصل الروماتويدي وأمراض الأنسجة الضامة واثبتت الدراسات المختبرية (In vitro) ان للأدوية المضادة للملاريا عدة تأثيرات على جهاز المناعة وبذلك يجب أن تكون فعالة جدا ضد اضطرابات امراض المناعة الذاتية ، كما بينت النتائج العملية مساهمتها في السيطرة على نشاط مرض التهاب المفاصل الرثياني بصورة محدودة نسبيا ، ولكنها لا تزال تستخدم كعلاج فعال من ضمن مجموعات العلاجات المستخدمة للسيطرة على RA ، ان الآلية التي تعمل بها هذه العلاجات لتقليل انتاج TNF- α تكون من خلال تثبيط اشارة Mitogen-

activated protein kinas (MAP) signaling وان تثبيط TNF- α بفعل الـ CQP يؤثر على نشاط الجسيمات الحالة الذي يسبب تاكل خلايا الالتهاب المفصل , Maxwell & Webb , (2005).

تعد هذه الأدوية آمنة نسبيا ولكن قد تسبب حساسية للضوء، الغثيان ومع زيادة الجرعات على المدى الطويل تتسبب باعتلال الشبكية الدائم (Retinopathy) . وللاسباب المذكورة ينصح باخذ جرعات أقل 5 ملغ / كغ يوميا وكذلك يوصى المرضى بالفحص الدوري للعيون ، أذ قد يرجع اعتلال الشبكية على الأرجح لكثرة التعرض لفوسفات الكلوروكين . يعد الهائيدروكسيكلوروكوين هو الدواء الامثل عند الاشارة للعلاجات المضادة للملاريا (Weberr et al., 2000).

2.6.2.3. د- البنسيلامين D-penicillamine

بأسلوب مماثل للمرضى الذين يتعاطون علاج من أملاح الذهب لفترات طويلة تمتد لسنوات يمكن ان يعد علاج فاعل وذي فائدة جيدة. ايضا كما في علاجات أملاح الذهب ومضادة الملاريا، هناك القليل من الأدلة البحثية التجريبية العشوائية لاثبات فعاليته فيتأخر تقدم المرض لذلك استخدامه يكون محدود بطبيعته الحالية في المملكة المتحدة. الآثار الجانبية الشائعة للعلاج هي الغثيان ، والطفح الجلدي الخفيف ومن الآثار الاقل شيوعا و الأكثر أهمية هي قلة الصفائح Thrombocytopenia والبول البروتيني Proteinuria (Aggarwal et al., 2016) .

2.6.2.4. السلفاسالازين Sulphasalazine

على الرغم من أن هذا الدواء لا يزال يستخدم على نطاق واسع في المملكة المتحدة وامريكا تتوفر علاجات أكثر فعالية هذا يعني أن يتم نقل المرضى بسرعة من الدواء الذي هو دون المستوى الأمثل أو بطيئ التأثير الى اخر افضل ، اذ يعد الـ Sulphasalazine هو من العلاجات المثيرة للاهتمام و كيميائيا يتكون من مزيج من ، الاسبرين (5-amino salicylic acid) و المضاد الحيوي (Sulphonyl pyridine) Sulphonamid antibiotic يتم استخدامها بنجاح لالتهاب الأمعاء ومفيدة بشكل خاص لالتهاب المفاصل الفقاري (Spondyloarthritis) يعود السبب بذلك الى ارتفاع معدل العوامل الالتهابية خصوصا في المراحل المتقدمة وقد أظهرت دراسة أن نشاط جزء من العلاج يستهدف التهاب الامعاء (Sulphonamide) والجزء الاخر يستهدف المفصل والامعاء معا (الاسبرين) (Buer , 2015). وتتركز فعالية في التهاب المفاصل الآثار الجانبية المرافقة لاستخدام هذا العلاج هي الغثيان والطفح الجلدي، ولكن أهم الآثار الجانبية هو Agranulocytosis اي الانعدام شبه التام للخلايا الحبيبية يمكن أن تحدث هذه التأثيرات بشكل

مميز لكنها في العادة تظهر في غضون أول ثلاثة أشهر من العلاج (Neumann *et al.*, 1986)

2.6.2.5. اللفلونوميد Leflunomide

تم اقتراحه في أواخر التسعينيات كمثبط لتصنيع البيريميدين (Pyrimidine synthesis) لذلك يعد من العلاجات الحديثة ، وكان يعتقد أن اللفلونوميد يكون مثالي كعلاج مصاحب للميثوتريكسات. في الواقع ان الجمع وعلى الرغم من فعالية الا انه يسبب تفاعلات سامة شديدة في الكبد بعد اختباره بشكل مركز ، منذ ذلك الحين يوصي باستخدام جرعات صغيرة منه بالمزج مع الميثوتريكسات مما يعطي نتائج جيدة. اللفلونوميد يتميز بعمر نصف طويل نسبيا يصل لعدة أسابيع مما يؤدي الى انهك الخلايا وظهور التأثيرات السمية التراكمية ، ومن الآثار الجانبية لاستخدام هذا العلاج ارتفاع ضغط الدم والاسهال وارتفاع انزيمات الكبد هي من الآثار الجانبية الكبيرة (Olsen & Stein , 2004) .

2.6.2.6. ميثوتريكسات (MTX) Methotrxate

الميثوتريكسات (-Amethopterin, 4-amino 4-deoxy-N10-methylpteroyl) glutamic acid هو مضاد للفولات (Folate antagonist) طور قبل أكثر من 50 عاما مع عدة علاجات مضادة للفولات استخدمت لمحاربة الاورام الخبيثة (Bertino *et al.*, 1993) ، يستهدف الـ (MTX) انزيم Dihydrofolate reductase (DHFR) (Kameda *et al.*,) (2010) ، حمض الفوليك هو فيتامين قابل للذوبان الماء لا يمكن تصنيعه من قبل جسم الإنسان وبالتالي المحتوى الغذائي أمر ضروري للحصول عليه ويكون هو واحد من الاشكال العديدة من الفولات التي هي جزء من عملية الأيض داخل الجسم شكل حمض الفوليك الرئيسي في البلازما هو (5-methyl tetra-hydrofolate THF) . ان الفولات، وكذلك المواد المضادة للفولات مثل ميثوتريكسات يمكن أن تدخل الخلايا عن طريق حوامل حمض الفوليك المنخفضة (RFC -Reduced folate carrier) أو مستقبلات حمض الفوليك (FR) folate receptor ، كما وجد ان الـ RFC لديها الفة كبيرة لـ MTX أكبر من حمض الفوليك والعكس الصحيح (Anderson *et al.*, 2012 ; Jansen *et al.*, 2014) . بالإضافة لتنشيط انزيم (DHFR) بواسطة MTX نتيجة خفض تنافس الفولات بهذه التفاعلات الميثوتريكسات هو المسؤول عن التنشيط المباشر أو غير المباشر للعديد من التفاعلات التي تعتمد على حمض الفوليك من خلال تأثيره على الأنزيمات الأخرى المشاركة في مسار تخليق الحمض النووي مثل

Transformylase Amidophosphoribosyltransferase ،Thymidine synthetase
(Fairbank *et al.*, 1999; Smolen *et al.*, 2013).

رغم معرفة العديد من الإنزيمات المستهدفة من قبل الـ MTX الا ان هناك جدل حول الآلية التي يعمل بها الـ MTX ، اشارت الدراسات (Seitz *et al.*, 1998; Dolhain *et al.*, 1998) الى وجود تأثير للـ MTX على السيتوكينات اذ بينت هذه الدراسات من خلال التحليل المناعي لخزعات الانسجة المفصلية أن تراكيز كلا من $IL-1\beta$ و $TNF-\alpha$ تقل و في نخاع العظم يتم زيادة تجهيز الخلايا وحيدات النوى بعد استعمال الـ MTX كعلاج لمرضى التهاب المفاصل الرثياني كما ان اختبارات المزارع المختبرية *In vitro* تشير الى ان العلاج بالـ MTX يعزز تكوين مستقبلات IL-1RA ويثبط انتاج $IL-1\beta$ ، كما بين Barrera وآخرون (1994) أن جرعة واحدة من الـ MTX تعطى لمرضى التهاب المفاصل الرثياني تؤدي إلى الانخفاض فقط في إنتاج $IL-1\beta$ و خلايا وحيدات النوى المجهزة بواسطة الدم المحيطي (Peripheral blood derived mononuclear cells-PBMC) وليس في إنتاج $TNF-\alpha$ او خلايا الدم البيض الاخرى عندما يتم تحفيز الخلايا بواسطة الدهون متعددة السكر (LPS)-Lipopolysaccharide بعد 48 ساعة من اعطاء العلاج . من الجدير بالذكر ان فعالية الخلايا T- يمكن ان تتأثر بعد فترة ستة اسابيع من اخذ جرعات من الـ MTX اذ ان نسبة انتاج خلايا $CD4^+$ T من من السيتوكاين $TNF-\alpha$ يتراجع بشكل كبير بينما تزداد نسبة انتاج $IL-10$ بواسطة تلك الخلايا (Rudwaleit *et al.*, 2000).

2.6.2.1. الآثار الجانبية لاستخدام علاج الـ MTX

للـ MTX تأثير على جهاز المناعة وبسبب وجود مخاطر ظهور اثار جانبية صعبة يتم توفير هذا العلاج فقط للحالات الحادة عندما لا يستجيب المريض لعلاجات اخرى سابقة. قد يسبب الـ MTX ضررا بالغاً للجنة لذا يمنع استعماله اثناء الحمل، وكذلك يلحق الـ MTX ضررا بخصوبة المرأة والرجل ، الا ان هذا الضرر قابل للإصلاح لذلك يتوجب الامتناع عن بدء الحمل حتى انقضاء ثلاثة شهور من الانتهاء من العلاج ، لذا يترافق مع العلاج بالـ MTX الخضوع لفحوص روتينية لعد خلايا الدم وظائف الكبد والكلى (Ranganathan *et al.*, 2006).

يعد حامض رباعي هيدرو الفوليك (Tetrahydrofolic - THF Acid) ، مركب ضروري لانقسام الخلية وبناء المادة الوراثية للخلية (DNA) تتمثل فعالية الـ MTX في منع حدوث هذه العمليات، ويؤثر بشكل خاص على الخلايا سريعة الانقسام، و بهذه الطريقة يضر الـ MTX ايضاً بالخلايا السليمة مثل الخلايا الموجودة في الاغشية المخاطية للنفم والامعاء، وكذلك بخلايا نخاع العظم (Bone Marrow) لهذا السبب في العلاجات التي تشمل جرعات دوائية مرتفعة

للـ MTX عادة يتم اضافة علاجات تحتوي على حمض الفوليك والمعروف ايضا باسم (لوكفورين Leucovorin) - والذي يعد من مشتقات رباعي هيدرو حامض الفوليك بهذه الطريقة بالامكان تعويض نقص حمض الفوليك الذي يتم تحلله، وبالتالي منح الخلايا السليمة فرصة في التعافي و ان للـ MTX كباقي كافة الادوية المضادة للاورام، تأثيرا مثبطا لانتاج انواع خلايا الدم المختلفة في نخاع العظم، الامر الذي يؤدي الى الاصابة بفقر الدم (Anaemia) ويزيد من قابلية الجسم للاصابة بالتلوثات و حدوث نزف دموي غير طبيعي. كما وقد يؤدي الـ MTX الى حدوث تغيرات في انسجة الرئة، التي تستلزم التوقف الفوري عن العلاج، لذا من الضروري ابلاغ الطبيب المعالج في حال حدوث سعال متكرر وضيق في التنفس. من بين الاثار الجانبية الشائعة الاخرى للـ MTX اوجاع وقروح في الفم، الاسهال، تغير في حاسة الذوق، فرط تصبغ الجلد Pigmentation ، هيجان في الجلد والعينين، سقوط الشعر بشكل مؤقت للتاثير السام لخلايا (عند تناول الدواء بجرعات مرتفعة)، غثيان، تقيؤ، تحسس لاشعة الشمس ورد فعل تحسسي للعلاج (Bingham et al., 2010).

2.6.2.6.2. الجرات Doses

لعلاج الصدف تعطى جرة واحدة اسبوعيا الى ثلاث جرات يتم تناولها بفواصل زمني مدته 6 ساعة بشكل اقراص ، حقن وريدية او شريانية 10 - 25 مليغراما مرة في الاسبوع ، او ثلاث جرات، كل جرة تعادل 2.5 - 5 مليغرامات كل 6 ساعة، مرة اسبوعيا. الجرعة القصوى 30 مليغراما للاسبوع لمرة واحدة في الاسبوع ، ولالتهاب المفاصل الروماتويدي تعطى اقراص (7.5 مليغرام) مرة واحدة اسبوعيا ، او ثلاث جرات تعادل 2.5 مليغرام كل 6 ساعة، مرة واحدة اسبوعيا. الجرعة القصوى: 20 مليغراما للاسبوع ، اما لعلاج السرطان يختلف مقدار الجرعة ، تواتر (عدد الجرات) وكيفية تناولها وفق نوع السرطان ومرحلة تقدم المرض وبالنسبة للاطفال يؤخذ بشكل قرص او حقن عضلية تتراوح الجرعة بين 0.1 و 1.1 مليغرام لكل كيلوغرام للاسبوع . (Bello et al., 2017)

2.6.2.6.7. علاجات اخرى

من هذه العلاجات ادوية الستيرويدات كالادوية الكورتيكوستيرويدية (Corticosteroids) ،مثل بريدنيزون (Prednisone) ، تخفف الالتهاب والالم وتبطن عملية تلف المفاصل تلعب هذه المركبات دورا هاما في تثبيط الحالة الالتهابية الشديدة ، لكنها كمضادات غير الستيرويدية (NSAIDs) ليس لها دور في الالتهاب تطور المرض عادة ما يتم استخدامها للسيطرة على المرافقات الجهازية للمرض يفيد الحقن الموضعي داخل المفصل في إزالة الألم وتخفيف الأعراض الالتهابية لمدة أيام إلى أسابيع ، لكن يجب عدم تكرار هذه الحقن في فترات

متقاربة ، بسبب خطورتها على الغضروف ويؤدي (Beck *et al.*, 2005) . الاستخدام المستمر للستيروئيدات إلى تأثيرات جانبية عديدة أهمها تخلخل العظام والتقرحات الهضمية (Kirwan,1995) تم تطوير علاجات حيوية حديثا لتعمل على تثبيط تأثيرات كل من IL-1 و TNF- α وتشمل هذه العوامل مثبطات عامل النخر الورمي (TNF Blockers) ومنافسات مستقبل الانترلوكين IL-1 (Receptor antagonists) ، ويتم استعمال هذه الأدوية في حال عدم الاستجابة لـ DMARDs . كما يتم استخدام المسكنات لعلاج الالتهاب الحاد والحد من الألم ، ومن الجدير بالذكر فشل هذه العلاجات في منع تدمير المفاصل وفي الحالات الأكثر سوءا هناك حاجة إلى عملية جراحية (Beatrix & Gary, 2010) .

7.2. علاقة بعض السايوتوكينات الالتهابية بالتهاب المفاصل الرثياني :

Relationship of some pro- inflammatory cytokines to rheumatoid arthritis (RA) :

7.2.1. عامل النخر الورمي الفا (TNF- α) Tumor necrosis factor :

عامل نخر الورم- الفا (TNF- α) ينتمي لعائلة السيتوكينات، التي هي بروتينات سكرية صغيرة (الوزن الجزيئي أقل من 30 كيلو دالتون)، التي تنتجها كل من الخلايا المكونة للدم (Hematopoietic) والخلايا Nonhematopoietic ، تعد TNF- α من السيتوكينات المحرصة للالتهابات (Pro-inflammatory cytokine) ، وينتج في الغالب عن طريق تفعيل خلايا الجهاز المناعي منها وحيدات النوى ، والخلايا البلعمية ، القاتلة الطبيعية (NK) ، الخلايا البائية و خلايا التائية ، تربط TNF- α بمستقبلات موجودة على جميع الخلايا في جميع أنحاء الجسم تقريبا باستثناء الموجودة على خلايا الدم الحمراء (Ceccarelli *et al.*, 2015) ، . الظروف المعروفة لحدث إنتاج TNF- α هي الالتهاب والحمى وتعفن الدم . يتم تنشيط وحيدات النوى من قبل السموم الداخلية ، مثل عديدات سكر شحمية (LPS)، السموم المعوية، سمية صدمة ، منتجات جدار الخلايا الفطرية (Lipoarabinomannan) ، والأجسام المضادة وكذلك تنشيط نظام المتمم مما يؤدي الى انتاج عامل النخر الورمي (Inagaki *et al.*, 2007) ، كذلك ينتج بواسطة تحفيز الخلايا للمفاوية بعد تحفيزها بواسطة المستضدات (Antigenic or mitogenic) (Merrill *et al.*, 2011) ، وقد تطور الجهاز المناعي لحمايتنا من مسببات الأمراض فالمناعة النوعية تحدث استجابات محفزات مختلفة (المستضدات) يتم معاملتها بواسطة بواسطة الخلايا المقدمة للانتجين Antigen presenting cells (APC) على سبيل المثال، وحيدات النوى Monocytes و الخلايا البلعمية Macrophages ، العدلات Neutrophils ، الخلايا متعددة اشكال النوى

Polymorphonuclear والتي بدورها تقدم المستضدات إلى خلايا لمفاوية خاصة لتتعرف على المستضد مما يسبب بدء الاستجابة المناعية والقضاء على العوامل المسببة للأمراض والخلايا الليمفاوية لها وظائف محددة فالخلايا التائية المساعدة على تنسيق الاستجابة المناعية بواسطة التفاعلات المباشرة وتحرير السيتوكينات وكذلك تساعد للمفاويات B- لإفراز الأجسام المضادة بالاستجابة المناعية الخلطية (Tang *et al.*, 2006) وتفعيل الخلايا اللمفاوية التائية لتتكاثر لقتل الخلايا المستهدفة بواسطة خلايا T- السامة للخلايا ، وان الدور الرئيسي لـ TNF- α هو تضخيم الاستجابة المناعية فعند كبح إنتاج الـ TNF- α يعطي نتائج ايجابية لتحديد نشاطه المدمر في التهاب المفاصل الرثياني (Thirunavukkarasu *et al.*, 2006) ، اما إيقاف إنتاج الـ TNF- α بشكل كامل في حالات تسمم الدم والسرطانات سوف يكون له تأثيرات سلبية على المرضى (Brun *et al.*, 2005) .

2.7.2. الإنترليوكين-1 بيتا (IL-1 β)

إنترليوكين-1 بيتا (IL-1 β) هو واحد من احد عشر بروتينات في عائلة الإنترليوكين-1 (وزنه الجزيئي 31 k D) ، ويتم إنتاج هذا السيتوكين بعد تحفيز عدد من خلايا الجهاز المناعي الفطري منها الخلايا البلعمية الكبيرة ، الخلايا الطلائية ، الخلايا اللمفاويات T و B (Tassi *et al.*, 2010) ، ويعد البروتين في هذه المرحلة غير فعال يدعى Pro-IL-1 β يتم معاملته وتحويله الى الشكل الفعال بواسطة انزيم caspase 1 (CASP1 / ICE) هذا السيتوكين هو وسيط مهم من الاستجابة الالتهابية ، والجين المشفر لهذا البروتين مع ثمانية جينات اخرى مشفرة لانواع اخرى من الإنترليوكينات تشكل مجموعة الجينات الموجودة على الكروموسوم رقم 2 (Takechi *et al.*, 2010) ، ويشترك في مجموعة متنوعة من الأنشطة الخلوية بما في ذلك تكاثر الخلايا Proliferation cell ، التمايز Differentiation ، وموت الخلايا المبرمج (Apoptosis) . يعمل IL-1 β على تحفيز انزيمات الأوكسدة الحلقية 2 (PTGS2 / COX2) في الجهاز العصبي المركزي (CNS) للمساهمة في فرط الم التهابات (Gloria & Divid , 2011) ، وقد أظهرت الدراسات التي أجريت على التهاب المفاصل الرثياني عند الحيوانات الدور الكبير للـ IL-1 β في إصابة المفاصل حيث أدى حقن الـ IL-1 β في مفصل الركبتين عند الأرانب إلى تآكل الغضروف في حين أن حقن الأجسام مضادة الموجهة ضد هذا السيتوكين بعد إستحداث مرض التهاب المفاصل لديها بواسطة Collagen أدى إلى تحسين وضعها والتقليل من الأضرار اللاحقة بالغضروف مما يشير الى أن الخلايا البلعمية الكبيرة في الأنسجة الزلالية لدى مرضى الـ RA تمثل عنصرا مهما كمصدر لإنتاج هذا السيتوكين ، وكما هو الحال

بالنسبة لـ TNF- α فان الـ IL-1 β يمكنه إحداث الأضرار بتحفيز تحرير الإنزيمات الحالة لبروتينات ابتداء من خلايا Chondrocytes و Fibroblastes كما نجد أن تركيز منافسات مستقبلات IL-1 β مرتفعة في السائل الزلالي لدى مرضى الـ RA ولكن تركيزها لا يكفي لايقاف الالتهاب (Ernest et al.,2001).

7.2.3. الانترليوكين-6 (Interleukin-6)

انترلوكين 6 (IL-6) هو سيتوكين يحفز نشاط العديد المظاهر البيولوجية ويساهم الـ IL-6 في المشاركة بالدفاع ضد العوامل المعدية وإصابات الأنسجة عن طريق إحداث تفاعلات الطور الحاد المناعية والاستجابات الجنينية، يعد هذا الانترلوكين من السيتوكينات الالتهابية يفرز من اللمفاويات T وحيدات النوى والبلعميات الكبيرة وخلايا Fibroblastes الموجودة في السائل الزلالي إذ تم التعرف عليه في بادئ الأمر كعامل يحث التمايز النهائي للخلايا B-، ومع ذلك الإنتاج المستمر غير المنضبط للـ IL-6 قد يؤدي إلى تطوير العديد من الأمراض المناعية (Yuji & Toshio, 2014)، التهاب المفاصل الروماتويدي (RA) هو من الامراض المزمنة مع التهابات مفصلية وجهازية الناتجة عن الشذوذ المناعي الذي تبين أن IL-6 يلعب دورا رئيسيا في تطوير هذه الامراض ، وقد أثبتت التجارب السريرية في مختلف أنحاء العالم من ان استخدام الـ Tocilizumab كعلاج مفرد أو مع الادوية المضادة للروماتيزم المعدلة للمرض (DMARDs) وتنشيط مستقبلات IL-6 بواسطة تحفيز الأجسام المضادة ذو فعاليته وتأثير مقبول ونتيجة لذلك يتم استخدامه حاليا كخط دفاعي بيولوجي أول لعلاج التهاب المفاصل الرثياني المتدرج بين المتوسط إلى الشديد في أكثر من 100 دولة (Smolen et al., 2010). ان توضيح الآلية التي من خلالها الـ IL-6 يمارس تأثيره على الـ RA والسبب في استمرارية إنتاجه في مرضى الـ RA يمكن أن تؤدي إلى استخدام أفضل ادارة لهذا العامل لمرضى التهاب المفاصل الروماتويدي والمساعدة في اكتشاف علاج فعال وشفاف لالتهاب المفاصل الروماتويدي (Tanaka et al.,2010; Tanaka et al.,2013).

8.2. علاقة الغلوبولينات المناعية G و M بـ RA (العامل الرثياني - RF) :

Relationship of Immunoglobulin - G,M (Rheumatoid factor- RF) to

RA :

إن مصلى مرضى الـ RA يحتوي على مجموعة متنوعة من الاجسام المضادة الموجهة ضد المستضدات الذاتية وأكثرها تواجد هي الاجسام المضادة التي تدعى العامل الرثياني (Rheumatoid factor- RF) ، وتعد هذه الاجسام المضادة من

معايير التشخيص للـ RA التي تتضمنها الـ ACR (Vasishtha, 2002). بما ان الـ RF يعتمد على التغير في تركيز الاجسام المضادة وبالتالي هذه الاجسام المضادة تكون تراكيزها مختلفة تبعاً للاصابة بانواع الامراض المختلفة لذلك تكون عامل تشخيص اولي وغير محدد لمرضى التهاب المفاصل الرثياني ، و الـ RF جسم مضاد موجهة ضد جزء الـ FC من جزيئات الـ IgG تحديداً (Tsavaris *et al.*, 2007). بمعنى اخر ان الجسم المضاد IgM الذي يعد العامل الرثياني الرئيسي يرتبط بمنطقة الـ FC الموجودة على الجسم المضاد الذاتي (IgG) (Halldorsdottin *et al.*, 2000)، ويتضمن الدور الفسلجي للعامل الرثياني (IgM) في الارتباط بسطح الخلايا للمفاوية لزيادة فعاليتها في عرض الانتجين من خلال تكوين معقد الـ Ag مع الجسم المضاد IgG (Ag- IgG complexes) ، كما ان افراز الـ IgM يزيد من الالفة الواطئة لـ Ag- IgG complexes مع نظام المتمم (Complement system) مما يؤدي الى ازالة هذا المعقد بواسطة تنشيط المتمم وزيادة الاستساغة (Opsonization) للخلايا البلعمية (Tesija) (Kuna, 2006 –).

على الرغم من ان 60-80 % من مرضى الـ RA يتم تحرير الـ RF لديهم الا انه لا يمكن اعتباره صفة مميزة لهم (Palosuo *et al.*, 2003) ، اذ ان نسبة عالية منهم (70-80%) تكون حساسية الفحص لديهم واطئة وان الفحص في حوالي 80% من مرضى الـ RA للعامل الرثياني IgM يكون موجب وذلك لامكانية أن يستغرق هذا العامل سنوات عديدة للظهور وبعبارة أخرى ان حساسية الفحص للـ RF (IgM) منخفضة في المراحل المبكرة من التهاب المفاصل الرثياني (Sharif *et al.*, 2006) ، وعلاوة على ذلك، المرضى قد يعانون من أمراض أخرى التهابية بما في ذلك متلازمة سجوجرن (Sjogren's syndrome) ، التهاب الكبد المزمن النشط Chronic Active hepatitis ، الذئبة الحمراء SLE واصابات البكتيريا Bacterial infections والتي ترتبط على نطاق واسع مع ارتفاع مستوى من الجلوبيولين غاما ، وجدت الـ RF أيضا بتراكيز منخفضة (5%) في الأشخاص الطبيعيين و تزايد هذه التركيز بتقدم العمر، وهكذا فان هذه الاجسام المضادة تمتلك نوعية منخفضة نسبيا لدى مرضى الـ RF مما ادى للبحث عن الاجسام المضادة والجزيئات التي يمكن أن تكون مفيدة لتشخيص التهاب المفاصل الرثياني (Yen *et al.*, 2009).

9.2. تقنية النانو Nanotechnology

مصطلح الـ Nanotechnology استخدم أول مرة من قبل Norio Taniguchi أستاذ جامعة طوكيو عام 1999، اذ استخدم هذه الكلمة لوصف الادوات التي تستخدم الجزيئات متناهية الصغر . وتعرف تكنولوجيا النانو على انها القدرة على مراقبة وقياس ومعالجة وتصنيع الأشياء

ذات المقياس المتناهي في الصغر، والنانومتر Nanometer-nm هو واحد من المليار من المتر، وهذا المقياس غاية في الصغر (Albrecht *et al.*, 2006)، وتستعمل الـ Nanotechnology لوصف المواد والأجهزة والنظم ذات التركيب والمكونات الجديدة والمحسنة بشكل كبير و تشمل هذه التحسينات الخصائص البيولوجية الفيزيائية والكيميائية و أصبحت تكنولوجيا النانو تقريبا الكلمة المتداولة بهذه الأيام، أو على الأقل بعض المصطلحات مع مقطع - نانو ، مثل الجسيمات متناهية الصغر Nanoscale ، المواد النانوية Nanomaterials والجزيئات النانوية Nanoparticle (Miyazaki& Islam , 2007) .

تمتلك المواد النانوية Nanomaterials خصائص عديدة منها خاصية ثنائية الأبعاد (two-dimensional- 2 D) او مايسمى الطبقات النانوية (Nanosheets) مما اكسبها الكثير من الاهتمام نظرا لمزاياها الفيزيائية والكيميائية الفريدة منها قابلية الإقحام الممتازة للـ D2 مما قدم فرصا جديدة لتطوير المواد المختلفة في الأبعاد النانوية أو ما يسمى بمركب نانوي وهذا النوع من المركبات يقدم مجموعة متنوعة من التطبيقات لهذه التقنية في الصناعات والبيئة وكذلك في العلوم الطبية والبيولوجية من خلال التبادل الايوني والتحفيز او التغليف وغيرها من صفات (Nalawade *et al.*, 2009 ; Borm , 2006)

9.2.1. المركبات النانوية Nanoparticles-NP

تقنية النانو Nanotechnology تتعامل مع المواد ذات الاحجام النانوية (Nanoscale materials) والتي تسمى أيضا الجزيئات النانوية Nanoparticles هي المواد التي تمتلك بلورات بأحجام جزء من المليار من المتر . NP فهو يستخدم لوصف ذات واحد أو أكثر من المكونات التي لها بعد واحد على الأقل في مجموعة من 1- 100 نانومتر (Tjong & Chen , 2004) ، تتميز ذرات الـ NP بان لها خصائص سطحية كبيرة ، والسطح لأي من هذه المواد لها تفاعلات عديدة ، بسبب نسبة المساحة السطحية الضخمة الى الحجم للـ NP يكون فيها النشاط السطحي عالي جدا ، ومن المحتمل أن تستخدم هذه المواد بكميات أقل بكثير من الحالة الاعتيادية و كمية المساحة السطحية الكبيرة مما يسمح لها برد فعل سريع مع وقت أقل ، لذلك العديد من الخصائص للمواد المختلفة يمكن تغييرها على المقياس النانوي وهنا تكمن قوة تقنية النانو (Williams , 2008) . في الوقت الحاضر بسبب التطبيق واسع النطاق للجزيئات النانوية هناك فهم كبير لآلية عملها وآثار هذه المواد على كل ما يتعلق بصحة الانسان والبيئة اذ يمكن للجزيئات النانوية تمر عبر غشاء الخلية بسهولة وحتى يمكن ان تمر عبر حاجز الدم في الدماغ وحاجز الدم في الخصيتين، لذلك يمكن أن تؤثر على

كل اجزاء الجسم. من الجدير بالذكر سمية ال NP للخلايا من جهة واستجابة الخلايا الأخرى من جهة ثانية تعتمد على طبيعة المواد والجرعات المستخدمة وهذا يثبت أن لخلايا الكبد دورا كبيرا في ايض هذه المركبات وازالتها من الدم بسهولة هناك العديد من الدراسات التي أثبتت تطبيق جرعة عالية من ال NP يشكل خطرا على صحة الإنسان (Zhoua et al., 2012).

2. 9.2: خصائص المركبات النانوية :

Nnanoparticles-NP

Properties of

2. 9.2: التبادل الايوني Ionic Exchange

المركبات العضوية التي اكتسبت اهتمامات واسعة في مجموعة من التطبيقات ، لا سيما بعد المعرفة لخصائص التبادل الايوني الفريدة من نوعها، الزنك الهيدروكسيلي ذوات الطبقات (Zinc-LH) لقي اهتماما كبير الأونة الأخيرة بسبب التطبيق الواسع النطاق وفي مختلف المجالات ، هذه الجسيمات النانوية غير العضوية ذات الميزات الممتازة منها الحاملات النانوية (Nanocarriers) في نظم توصيل الدواء ، وذلك بسبب امكانيته الهامة التي من خلالها يمكن زيادة تحميل الدواء ، وتخفيض الآثار الجانبية للدوية لان لديها القدرة الواسعة على التبادل الأيوني غير المحدد ، وتم تحميل العديد من العقاقير الصيدلانية العضوية على هذا المركب ، وبالتالي اصبحت ادوية نانوية Nanodrugs جديدة أو تسمى العقاقير الذكية التي قد تحدث ثورة في علاج الأمراض (Nair et al., 2009). كما تعد الهيدروكسيدات ذات الطبقات كمخزن نانوي Nanoreservoirs لإطلاق الدواء المستدام لتحسين خصائص الخلية المستهدفة وتحسين الصحة وإطالة مدة بقاءه بالجسم .

اذ قامت دراسة بتحميل علاج 5-Fluorocytosine-5-FC المستخدم لتنشيط نمو بكتريا *Candida albicans* على جزيئات اوكسيد الزنك الطبقي LHs \ Zinc \ Nanoparticl وادت النتائج الى تثبيط قدرة البكتريا على التمايز والانتشار اذ لوحظ أن أعلى منطقة للتثبيط كانت عند 25 ملغم / لتر للعلاج وحده اصبحت بتركيز في 5 ملغ / لتر بعد تحميله على الزنك الطبقي ليصبح 5- FC-ZnO-LHs (Maekay & Jishnu , 2014).

2. 9.2: توصيل الدواء بواسطة ال NP Drug delivery by NP

في كثير من الحالات لا يتم الكشف عن الامراض إلا في مراحل متقدمة وذلك يستدعي جرعات كبيرة من العلاج الكيميائي ، وان اخذ هذه العلاجات على نحو متزايد ذو تأثيرات سامة للخلايا السليمة بالإضافة الى تطوير الجسم مقاومة الى تلك المواد و لتحسين هذه الحالة اي اتصال

العلاج الى الخلايا المستهدفة باقل تراكيز وحماية انسجة وخلايا الجسم السليمة الاخرى من تاثير هذه المواد الكيميائية فالعلاجات الكيميائية الحالية المضادة للسرطان غالبا ما تظهر آثارا ضارة سامة وفعالية منخفضة نظرا إلى عدم التفريق بين الخلايا السرطانية والطبيعية من قبل العلاجات نفسها، فضلا عن تطوير مقاومة الادوية ولهذا برزت الحاجة لاستخدام نظم توصيل الدواء Drug delivery systems (DDSS) (Jaracz et al., 2005). اذ تعبر الخلايا التي تكون مصابة او غير الطبيعية عن مستقبلات لبعض المواد يتم استخدام هذه المواد لايقصال العلاج الى تلك الخلايا من خلال اتحاده بطريقة تحمي هذا العلاج من البيئة الداخلية للجسم وايصاله الى الهدف من دون احداث تفاعلات جانبية ضارة (Antony, 1996). ان نظم ايصال الادوية اعتمدت على أساس تكنولوجيا النانو ذات الإمكانيات الكبيرة في العلاج المضاد للعديد من الامراض ، اذ اكدت الدراسات (Jin et al., 2013 ; Ke et al., 2011) إلى ان خارج الخلية أقل ما يقال ان البيئة شديدة الحموضة في أنسجة الخلايا بفعل الإندوسومات والجسيمات الحالة لذلك ان الخلايا البلعمية تسمح بدخول الـ ZnO-NP اذ انها تظهر المزيد من الاستقرار في الحالة الفسيولوجية عند درجة الحموضة 7.4 ولكن تنحل بسرعة في درجة الحموضة 5 ~ 6 . استخدمت الـ ZnO-NP لتغطية العلاجات الى ان تصل الهدف ، وعندما يتحد الـ DDS مع الأحماض يقوم ZnO-NP باطلاق جزيئات من العلاج تكون في كثير من الاحيان حسب الحاجة بحيث لا يمكن تحرير العلاج تماما وتسمى تلك العملية بـ السيطرة على تحرر او اطلاق العلاج Control drug release ، وتقوم استراتيجية أخرى على تحميل العلاجات على الـ ZnO-NP مباشرة وبالتالي عندما يلتقي المركبات النانوية بالحمض تتحلل تماما مما يقود إلى اطلاق جميع جزيئات العلاج (Zhang et al., 2013). على الرغم من أن مركبات أكسيد الزنك اظهرت استقرارا في البيئات المختلفة وسمية منخفضة للخلايا بعد التحلل لأكسيد الزنك Zn^{2+} ، لذلك كانت تستخدم مباشرة لعلاج السرطان أو تعزيز سمية الخلايا القاتلة (Rasmussen et al., 2010).

2.9.2.3: السيطرة على اطلاق العلاج Control of drug release

تعد الـ ZnO-NP كنواقل نانوية (Nano carriers) متعددة الوظائف تستخدم انظمة ايصال العلاج الذكية Smart drug delivery لتقليل سميتها، اذ يعد نظام ZnO-chitosan-folate مثال للنواقل النانوية لايقصال علاج Doxorubicin (DOX) الذي هو احد العلاجات المستخدمة في علاج التهاب المفاصل والمضادة للاورام Antineoplastic agent المستخدمة في علاج السرطان من خلال التفاعلات الفيزيائية والكيميائية (Yuan et al., 2010). ان معدل تحرر الدواء من الـ Nanocarrier يعتمد على عدة عوامل منها درجة الحموضة ، حجم الجسيمات ، الخصائص السطحية ، معدل التحلل ، قوة التفاعل السطحي بين

الادوية و سطح الجزيئات النانوية ومعدلات الرطوبة لتلك المركبات (Yuan *et al.*, 2008 ; Zhang & Misra , 2007). اذ يتم تحميل العلاج إلى جسيمات متناهية الصغر من خلال التفاعلات الضعيفة ، على سبيل المثال الامتزاز الفيزيائي، والتفاعل الكهربائي ، ونتيجة لذلك يتحقق التحرير للعلاج عن طريق كسر هذه التفاعلات فان حمض الفوليك في الناقل ZnO-chitosan-folate يضعف التفاعل الكهربائي بين DOX وأكسيد الزنك نقاط الارتباط مما يؤدي الى تحرير ال-DOX ، اذ في استخدام ال-ZnO-NP كناقل نانوية يتم التركيز على كمية نقاط الارتباط لأكسيد الزنك التي تتحلل في الظروف الحمضية وتؤدي للتناثر بين Zn^{2+} و DOX ، مما يقود إلى تحرير جزيئات DOX إلى العصارة الخلوية و قتل الخلايا السرطانية، وبالتالي فإن هذا الية توجيه Nanovector تستند الى كمية نقاط الارتباط لأكسيد الزنك ، ويمكن أن نعرف في نفس الوقت طريقة الاستهداف للتهاب المفاصل والتشخيص والعلاج للخلايا السرطانية بواسطة المركبات النانوية (Weng , 2008) .

9.2. 4: تثبيط البكتريا Inhibition of bacteria

تستخدم تكنولوجيا النانو حاليا كأداة لاستكشاف افضل السبل لتطوير العلوم الطبية في عدة مجالات مثل انظمة توصيل العلاج وأنظمة توصيل الجينات والاستنباتات الاصطناعية ، الجيل الجديد للعلاجات هي الجسيمات النانوية للبوليمرات والمعادن ، اشارت دراسة (Khameneh *et al.*, 2016) الى ان السبب الرئيسي لتوقع استخدام المواد النانوية كحل بديل لتطوير العلاج بالمضادات لقدرتها على منع مقاومة البكتريا للمضاد لوجود هذه القابلية لدى العديد من انواع البكتريا وهذا يشكل خطورة في بعض الانواع ويجعلها غير مستجيبة لاي علاج متوفر وان هذا المركب يفقدها قابليتها لتطوير مقاومة مما يجعلها غير وبائية الى حد كبير وبها ايضا اصبح بالامكان مكافحة امراض مثل السرطان ومحاربة مسببات الأمراض البشرية (Mohammad *et al.*,2012) اذ أن تطوير سلالات جديدة من البكتيريا مقاومة للمضادات الحيوية الحالية أصبح مشكلة خطيرة في الصحة العامة وبالتالي هناك حاجة ماسة لتطوير طرق جديدة لتثبيط البكتريا (Gunalana *et al.*,2012). البكتيريا لديها هياكل غشائية مختلفة والتي تستعمل في التصنيف العام هي سالبة أو موجبة لصبغة كرام ، الاختلافات الهيكلية تكمن في تنظيم المكونات الرئيسية للغشاء ببتيديوغليكان البكتيريا سالبة لصبغة كرام تحمل فقط طبقة رقيقة من الببتيديوغليكان (2-3 نانومتر) بين الغشاء السيتوبلازمي والغشاء الخارجي (Wesam *et al.*,2015) ، وفي المقابل البكتريا الموجبة لصبغة كرام تفتقر إلى الغشاء الخارجي ولكن لديها طبقة ببتيديوغليكان سميكة من حوالي 30 نانومتر ، المعروف منذ وقت طويل الفضة واوكسيد الزنك تظهر سمية قوية لمجموعة واسعة من انواع البكتريا لهذا السبب تم استخدام المركبات المستندة على الفضة والزنك

على نطاق واسع في العديد تطبيقات للجراثيم كما استخدمت هذه المركبات في المجال الطبي لعلاج الحروق والتهابات مختلفة (Pati et al., 2014). (NP) لها تأثير واسع مضاد للجراثيم لمجموعة من البكتيريا السالبة والموجبة Gram-negative and Gram-positive إذ إن تثبيط الأحياء المجهرية يعتمد على حجم وتركيز جزيئات تلك المركبات عادة يؤدي ارتفاع تركيز الجسيمات النانوية (NP) إلى نشاط تثبيطي للميكروبات أكثر فعالية، في حين أن جزيئات الأحجام الصغيرة يمكن أن تقتل البكتيريا في تركيز أقل، وبالإضافة إلى الحجم والتركيز فإن الشكل أيضا يؤثر على كفاءة النشاط المضاد للميكروبات ، فالنشاط المضاد للميكروبات يتم بواسطة عدد من الأشكال لجسيمات الفضة المختلفة، والتي تشمل طبقات الفضة النانوية وقضبان نانو الفضة، وجسيمات الفضة Silver Nano plates, silver Nano rods, and silver NPs ، على *S.aureus*. و *E.coli* وجد الباحثون أن نشاط طبقات الفضة النانوية كان أفضل نشاط مضادات للميكروبات (Sadeghi et al., 2015).

أظهرت النتائج أن الفعل التآزري للـ SNP مع المضادات الحيوية المختلفة لها آثار مضادات الميكروبات أفضل من SNP أو المضادات الحيوية الحرة (Li et al., 2012) ، إذ وجد أن تأثير استخدام مضاد الأموكسيسيلين للجراثيم يكون أكبر على *E . coli* عندما تم تحميله مع جزيئات الفضة فيما لو تم تطبيقها بشكل منفصل ويمكن خفض استهلاك كميات العلاج عموما والآثار الجانبية بشكل كبير عن طريق توجيه النشاط في المنطقة المتعرضة للآذى فقط ودون أي جرعة أعلى من الحاجة (Chen et al ., 2013). وان توصيل العلاج drug delivery إلى المناطق المستهدفة يهدف للحد من الآثار الجانبية للأدوية مع ما يصحب ذلك من انخفاض في الجرعات العلاجية ، ويركز توصيل العلاج على زيادة التوافر البيولوجي سواء في أماكن محددة في الجسم وعلى فترة من الزمن. ويمكن تحقيق ذلك عن طريق الاستهداف الجزيئي بواسطة أجهزة تعمل على هندسة جزيئات نانوية ذات أشكال محددة . كما أن المعادن مثل البلاتين والفضة والذهب قابلة للتطبيق على نطاق واسع في أجهزة الاستشعار التشخيصية ، ومضادات الميكروبات، وكعوامل في توصيل العلاج والجينات (Roy et al., 2016).

أجريت دراسة (Galdiero et al., 2011) على مقاومة المضادات الحيوية مثل مقاومة الـ Ampicillin لسلاسل غير مقاومة سالبة كرام Gram-negative (G^-ve) *Escherichia coli* وسلاسل غير مقاومة موجبة كرام Gram-positive (G^+ve) *Staphylococcus aureus* . وكذلك لسلاسل مقاومة سابة لصبغة كرام G^-ve (*Salmonella and typhus*) ومقاومة للمضادات الحيوية (Chloramphenicol, amoxycilin and trimethoprim) لفهم الآلية الجزيئية الكامنة وراء تأثير مثل هذه الأفعال المضادة للميكروبات إذ تم العثور على جسيمات النانو

وبشكل ملحوظ وأكثر وضوحاً على سلالات G-ve بغض النظر عن ما إذا كانت سلالات مقاومة أم لا مقارنة بسلالات G⁺ ve يعزو هذا تأثير المضاد للجراثيم لتعزيز الجسيمات النانوية فعالية المضادات الحيوية وبسبب استقرار هذه المركبات في الوسط الغروي وكذلك تغيير صورة الانزيم المسؤول عن تكوين البروتينات البكتيرية Phosphotyrosine kinase مما يؤدي الى إيقاف النمو في البكتيريا . الدراسات (Xu et al.,2004; Samberg et al.,2011) بينت التأثير التثبيطي لمركب الفضة AgNP من خلال استخدام التصوير بالمجهر Scanning SEM electron microscope ، اذ ان استخدام جزيئات الفضة بحجم 10 nm لمعاملة بكتريا *E.coli* ادى الى انكماش واضح وعدم انتظام الشكل بصورة عامة ، كما بينت وجود جزيئات الفضة النانوية على طبقة الـ Lipopoyasacharid بجدار البكتريا *E.coli* السالبة لكرام وكذلك كمية ذات دلالة معنوية من المركب المقترن بالعلاج توجد في الجهة الداخلية من الجدار البكتيري تمت ملاحظتها بالمجهر الالكتروني النافذ (Scanning tunneling electron microscope-) وكذلك باستخدام تحليل (STEM Energy-dispersive X-ray EDX (مقياس تشتت الاشعة السينية) اذ يظهر القمة الخاصة بمركب الفضة (Ag peak) عند (2.9 K_v ~) ، في حين دراسة اجراها Agnihotri وآخرون (2014) اثبتت انتشار جزيئات الفضة في اغلب السطح الخارجي للبكتريا وان الخلية البكتيرية بالكامل اظهرت جزيئات الفضة بعد اختراقها كما عانت الخلايا من الانكماش بدرجة كبيرة بعد فحصها بالمجهر الالكتروني الماسح SEM .

2.9.2.1. المقاومة المتعددة Multidrug Resistance

مقاومة المضادات الحيوية المتعددة Multidrug Resistance MDR تعرف على انها المقاومة للأدوية المتعددة وهي المقاومة لمضادات الميكروبات التي تظهرها نوع من الكائنات الحية المجهرية اتجاه طيف من المضادات الحيوية والعلاجات المتعددة، وتشمل أنواع أخرى كالفيروسات والفطريات والطفيليات المقاومة للعديد من الأدوية المضادة (resistant to multiple antifungal, antiviral, and anti-parasitic drugs) ، ويمكن تمييز انواع من هذه المقاومة MDR تبعاً لدرجتها ومنها مقاومة للأدوية الشاملة (extensively drug resistant (XDR) و المقاومة الدورية (PDR) pan drug-resistant (PDR) وبما ان البكتيريا التي تشكل خطراً العدوى واخماج سريعة يمكن أن تصيب المرضى في المستشفيات وخاصة المرضى في وحدات العناية المركزة والعدوى الناجمة عن تكوين هذه السلالات المقاومة يترافق معها زيادة معدلات الاعتلال والوفيات وطول مدة العلاج ، وبالتالي فإن هذه البكتيريا لا تشكل تهديداً للصحة العامة العالمية فحسب بل تخلق عبئاً كبيراً على نظم الرعاية الصحية، حيث تشكل هذه البكتيريا خطراً كبيراً على الصحة العامة بسبب محدودية وخيارات العلاج المتاحة، فضلاً عن نقص العقاقير المضادة

للميكروبات المطورة حديثا (Cerceo et al.,2016). ان بعض السلالات أصبحت مقاومة تقريبا لجميع العوامل العلاجية المتاحة عادة. وهناك حالة شائعة هي مقاومة بكتريا *S. aureus* للميثيسيلين (Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ، مقاومة ليس فقط للميثيسيلين (الذي تم تطويره لتثبيط إنتاج انزيم البنسليناز بواسطة *S.aureus*، ولكن بالعادة تكون مقاومة aminoglycosides, macrolides, tetracycline and chloramphenicol وهذه السلالات هي أيضا ومقاومة للمطهرات، وان الـ MRSA يمكن أن تكون بمثابة اهم مصادر العدوى المكتسبة في المستشفيات، وحتى المضادات الحيوية القديمة يمكن اعادة تطويرها واستخدامها لتثبيط نمو الـ MRSA اذ ان المضاد Vancomycin تم إحياءه لعلاج الالتهابات البولية، ولكن المقاومة بقيت موجودة في الامعاء ، وهناك العديد من العوامل التي يمكن أن تسهم في وجود وانتشار البكتيريا سالبة الجرام MDR كإفراط في استخدام العوامل المضادة للميكروبات الموجودة، مما أدى إلى تطوير آليات المقاومة التكيفية من قبل البكتيريا. عدم وجود إشراف مسؤول عن مضادات الميكروبات بحيث يساعد استخدام عوامل واسعة النطاق على إدامة دورة العلاج لتجنب المقاومة المتزايدة وكذلك عدم وجود ممارسات صحيحة لمكافحة العدوى ، وايضا يمكن للكائنات الدقيقة مقاومة المضادات الحيوية من خلال العديد من آليات الدفاع (Cerceo et al., 2016)

البكتيريا يمكن أن تنتج انزيمات التعديل التي لها القابلية على تكسير المضادات الحيوية التي أهمها سريريا المضادات الحيوية غير النشطة التي تسمى بيتا لاكتاماز β -lactamase هذه الانزيمات يمكن أن تتحلل حلقات β -lactam المتصلة بواسطة إنتاج β -lactamase ، بيتا لاكتاماسيس هي الانزيمات التي هي سبب للمقاومة البكتيرية الرئيسي لعائلة بيتا لاكتام -beta-lactam من المضادات الحيوية مثل البنسلين والسيفالوسبورين والسيفاميسين والكاربابينيمات penicillins, cephalosporins, cephamycins, and carbapenems. هذه الانزيمات تحفز التحلل اواصر أميد (amide) من أربعة حلقات بيتا لاكتام العضوية وجعل المضادات الحيوية غير نشطة اتجاه هدفها الخلوي الأصل وهو تحليل اوثبيط انزيم جدار الخلية transpeptidase وعلى أساس هيكلها الأساسي، يتم تقسيم بيتا لاكتاماز في أربعة أصناف انزيمية A، B، C و D ومن الانزيمات الهامة الأخرى يمكن أن تدمر الـ chloramphenicol عن طريق إنتاج كلورامفينيكول أسيتيل ترانسفيراز chloramphenicol acetyl transferase (Eftekhari et al., 2012).

2.9.2.4.2. التغيير في آليات التدفق

العديد من الكائنات الحية يمكن أن تظهر ميكانيكية مقاومة β -lactam, the aminoglycosides group and macrolides التي بواسطتها يمكن ان تقاوم تأثير مضاد

tetracycline التي عادة ما تتوسط مضخات التدفق Efflux pumps في الخلية البكتيرية التي تحدث بشكل طبيعي والتي وظيفتها في المقام الأول تقوم بإزالة الفضلات، ولكن التغيرات في التشكل يمكن أن تمكن هذه الكائنات من إزالة العقاقير المضادة للميكروبات بواسطة هذه المضخات (Sun et al., 2014).

9.2. 2. 3. التغيير في بنية الموقع المستهدف

Alteration in the structure of target site

التغيير في الموقع المستهدف من قبل البكتيريا هو آلية مقاومة لـ Betelactam antibiotic تمثل (penicillin-binding proteins- PBPs) مواقع الارتباط مع anti-Betelactam (Atlas, 1995). كما ان البكتيريا قادرة ليس فقط على تغيير الإنزيمات التي تستهدفها المضادات الحيوية، ولكن أيضا عن طريق استخدام الإنزيمات لتعديل المضادات الحيوية نفسها وبالتالي تجنب تأثيرها. مثال على الاحياء التي يتم تغيير مواقع الاستهداف بها هي *S. aureus* لمقاومة مضاد الفانكوميسين (vancomycin – resistant) في حين أن الأمثلة على الاحياء المعدلة للمضادات الحيوية هي *P. aeruginosa* (Hussain, 2015).

9.2. 2. 4. بواسطة تغيير المسار الايضي By pass of metabolic

pathway

بعض المضادات الحيوية تعمل على الإنزيمات في المسارات الايضية، ان الكائنات المجهرية تستطيع تطوير مسارات ايضية جديدة تجعلها قادرة على تغيير تأثير نشاط المضاد البكتيري وتجعلها غير ذي فائدة. ان المقاومة اتجاه المضادين sulphonamides و trimethoprim تعتمد على الية لتغيير المسار الايضي من خلال اتجاه البكتيريا الى تصنيع انزيم dihydropteroate synthetase و dihydrofolate reductase والذان يعملان على خفض الحساسية والالفة لـ sulphonamide s و trimethoprim على التوالي. (Floyd et al., 2010).

9.2. 2. 5. عوامل الخطورة Virulence factors

اولا: تشكيل الغشاء الحيوي Biofilm formation

البيوفيلم Biofilm مصطلح يطلق على أي مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة والتي تلتصق خلاياها بعضها ببعض لتصبح هذه الخلايا الملتصقة جزءا من مصفوفة matrix خارج الخلية غروية القوام التي تتكون من المواد البوليمرية خارج الخلية Extracellular polymeric substances -EPS يتم إنتاج مكونات EPS من قبل الخلايا داخل بيوفيلم وعادة ما تكون التكتلات من المواد البوليمرية خارج الخلية من الحمض النووي والبروتينات

والسكريات ولأن لها بنية ثلاثية الأبعاد وتمثل نمط حياة الكائنات الحية الدقيقة توصف عادة هذه الأغشية الحيوية مجازاً بأنها Scities for microorganisms، البيوفيلم تكون مقاومة للظروف الفيزيائية مثل قوى الانجراف الناتجة عن تدفق الدم والغسل بواسطة اللعاب ، ان الكائنات الحية داخل البيوفيلم يمكن أن تصمد أمام قلة المغذيات، والتغيرات في درجة الحموضة، الجذور الأوكسجينية والمطهرات والمضادات الحيوية أفضل من الكائنات الأخرى كما تقاوم الكائنات المنتجة للبيوفيلم عملية البلعمة، والملتهبات التي تحاول خرق وتجاوز البيوفيلم وهذا الواقع يسبب المزيد من الضرر للأنسجة المحيطة أكثر مما يؤثر على بيوفيلم نفسه (Jayaraman *et al.*, 2008).

تمتلك الـ MRSA القدرة على تشكيل بيوفيلم الذي هو آلية فوعة مهمة تزيد من تعقيد الالتهابات وخاصة تلك التي تنتج من استخدام مواد واجهزة الجراحة والقسطرة وتركيب المفاصل الاصطناعية، وبينت إحدى الدراسات (Hassan *et al.*, 2011) أن ما بين عامي 2006 و 2007 كان 56% من جميع الإصابات المرتبطة بالاجهزة الطبية في الولايات المتحدة التي تسببها الـ *S. aureus* هي التهابات كانت البكتريا MRSA وتم عزل تكتلات البيوفيلم في سلالة MRSA من وحدة الحروق (Gurunathan *et al.*, 2014).

تشير اغلب النتائج الى ان بكتريامعظم اجناس بكتريا *P. mirabilis* تشكل تركيب البيوفيلم عندما يتم استزراعها من الادرار ، اذ تفقد نتائج النمو المزرعي إلى ميزات فريدة من نوعها بما في ذلك احتشاد الخلايا وتكوين تراكيب تشبه الحصى *struvite* وكذلك تكوين بلورات الهيدروكسيبتيت *hydroxyapatite crystals* العوامل ذات الصلة بتكوين البيوفيلم من قبل *P. mirabilis* كعوامل الالتصاق والبروتينات الداخلة في انتاج LPS والنواقل وعوامل الاستنساخ، وأنظمة المكونات، وعوامل الاتصال والإنزيمات (Jayaraman *et al.*, 2008).

ثانياً. مثبطات انزيم ATPase ATPase Inhibitors

يسمى هذا الانزيم F-ATPase او F-Type ATPase وكذلك يطلق عليه ATP synthase يوجد في الأغشية البلازمية للبكتيريا وفي الأغشية الداخلية الميتوكوندريا (في الفسفرة التأكسدية، اذ يعرف (Complex -V)، وفي الأغشية الكلوروبلاست ، تستخدم هذه الطاقة للنقل السلبي للبروتونات عبر الغشاء عكس التدرج الكهروكيميائية واستخدام الإنزيمات التي تحفز التحلل ATP to form ADP ومصحوب بالطاقة التي يمكن استخدامها للعديد من التفاعلات والنقل الغشائي الأيوني Transmembrane. ونتيجة لذلك يمكن أن يكون لمثبطات ATPase آثار على العديد من العمليات البيولوجية والمسارات الأيضية اذ تستخدم هذه العملية على نطاق واسع في جميع أشكال الحياة المعروفة والافعال الأيضية اللازمة لاستقلاب الدهون في الخلية وطرده السموم

والفضلات التي يمكن أن تعيق العمليات الخلوية، مثال مهم لهذا الإنزيم هو إنزيم مضخة الصوديوم والبوتاسيوم (Na⁺/K⁺ATPase) الذي يحافظ على الجهد الكهربائي لغشاء الخلية المثال آخر هو إنزيمات مضخة بوتاسيوم-هيدروجين أو مضخة البروتون المعدي (H⁺/K⁺ATPase or gastric proton pump) الذي يطلق الحامض الى المعدة يعمل هذا الإنزيم عندما يتحرك بروتون عكس تدرج التركيز، يعمل هذا الإنزيم على إيقاف تلك الحركة . يعمل على إيقاف حركة ارتباط الفسفور P مع ADP لانتاج الـATP وكذلك إيقافها بالاتجاه المعاكس أي استخدام الطاقة الصادرة عن التحلل المائي للـATP لمضخة البروتونات ضد التدرج الكهروكيميائي Jung & Lee, (Glavinas et al.,2008:2008).

9.2.3. تأثير المعالجة بالمركبات النانوية

9.2.1.3: مركب اوكسيد الزنك النانوي (Zinc oxide-ZnO)

يتم امتصاص الجسيمات النانوية لأوكسيد الزنك ZnO-NP بواسطة الجسم مما يرفع مستوى الزنك في الكبد والأنسجة الدهنية والبنكرياس، سمية الـ ZnO-NP على فعالية الإنزيمات المضادة للاكسدة وإنزيم التعبير للـ mRNA ونشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة في الخلايا الشحمية تعتمد على الجرعة المعطاة من الـ ZnO-NP (Muthuraman et al.,2015). يعد الـ ZnO مادة غير عضوية ذات وظيفية استراتيجية واعدة مع مجموعة واسعة من التطبيقات ومتعددة لهذه المادة و الخصائص الكهربائية لـ ZnO-NP هي ميزة أخرى أساسية في التطبيقات الطبية الحيوية ، وعادة ما تمتلك مجموعة الهيدروكسيل على سطح هذه الجزيئات دورا أساسيا في السلوك السطحي لها (Gertrude et al.,2007).

في الوسط المائي وعند درجة الحموضة العالية والمتوسطة البروتونات (H⁺) تقوم بالخروج من اسطح الجسيمات وتترك السطح سالب الشحنة وتتحد مع ذرات الأوكسجين المستعبدة جزئيا من الـ (-ZnO)، اما مع انخفاض الرقم الهيدروجيني من المرجح نقل البروتونات من البيئة إلى سطح لـ ZnO-NP مما يؤدي إلى شحنة موجبة على سطح ZnOH₂ + (Degen & Kosec , 2000) ، وتشير الدراسات (Guo et al.,2008 ; Nair et al.,2009) إلى أن لـ ZnO-NP شحنة سطحية موجبة قوية في ظل الظروف الفسيولوجية وتستخدم جزيئات أوكسيد الزنك كبير لخصائصه الكيميائية والكهربائية والضوئية لـ ZnO-NP لديها ميزة أخرى كبيرة تساهم في التطبيق العملي هي المساحة السطحية الكبيرة ونشاط تحفيزي سطحي عالي ، فالخلايا السرطانية في كثير من الأحيان تحتوي على نسبة عالية من الدهون الفوسفاتية على الغشاء الخارجى وتعد مستقبلات غشائية كبيرة ومن المتوقع التفاعل مع الجسيمات النانوية لأوكسيد الزنك

الموجبة لتكون محث كهربائي لتعزيز الاستساغة الخلوية والبلعمة وفي النهاية تحفيز الخلايا القاتلة الطبيعية ، وتظهر ميزة هامة أخرى لـ ZnO-NP هي امكانية السيطرة النسبية على حجم وتوزيع هذه الجزيئات أن الخصائص القاتلة للخلايا بواسطة الـ ZnO-NP تجاه الخلايا السرطانية يرتبط ارتباطا مباشرا بالحجم اذ كلما كان الحجم صغير كانت امكانية القضاء على هذه الخلايا عالية (Maekay et al., 2014).

2.1.9.2. مركب الفضة النانوية Ag nano

بلورات الفضة النانوية Silver nanocrystals تكون في اغلب الاحيان مذابة مائيا (Hydrosols) هي واحدة من أكثر المواد غير العضوية استخداما ليس فقط لما لها من تطبيقات هائلة في التصوير الفوتوغرافي و التحفيز الخلوي (Tao & Karl, 1994) ، كذلك في اجهزة الاستشعار البيولوجي والكشف الجزيئي البيولوجي والتشخيص وكمضادات الميكروبات وكثير من الأنشطة العلاجية أيضا بسبب طبيعتها الصديقة للبيئة

(Chun-Hao & Chuh-Yung, 2007 ; Brigger et al., 2002) ، وكذلك التوليفة

الكبيرة للاشكال السطحية المختلفة لجزيئاتها النانوية Silver nanoparticles Ag-NP من هذه الاشكال nanotubes, nanowires, nanocubes, nanorods, and nanosheets التي كانت الشغل الشاغل لكثير الباحثين في العديد من المختبرات تم استخدام عدد من الأساليب في الماضي لتحضير الفضة النانوية على سبيل المثال اختزال السوائل والتحضير بمساعدة الإشعاع والاختزال الكيميائية الضوئي والتحلل الحراري من مركبات الفضة (Liu et al., 2005) . تستخدم العديد من طرق الاختزال الكيميائية تطبيق لتحضير الأشكال المستقرة والمختلفة من الفضة النانوية في المياه عن طريق استخدام مركبات منها حمض الاسكوربيك ، الهيدرازين ، أمونيوم فورمات ، ثنائي ميثيل الفورماميد والصوديوم بوروهيدريد (Sharma et al.,2009) .

يعتمد الشكل والحجم والتوزيع الحجمي بقوة على الميل القوي اوالضعيف للمواد العضوية الى أملاح الفضة. من طرق البيولوجية استخدام إما الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا والفطريات والخميرة او المستخلصات النباتية التي ظهرت كبديل للطرق الكيميائية الفيزيائية وهي ذات كفاءة عالية (Ning et al., 2014 ; Haverkamp et al.,2009) .

اختزال الفضة بالطرق الكيميائية يتم من خلال عملية في خطوة واحدة لإنتاج الفضة الذائبة النانوية وبوجود الإلكترونات الحرة في نطاق التوصيل والنوى موجبة الشحنة يتم وتشكيل مجموعات تدوم فترة طويلة من الفضة النانوية بالطريقة الكيميائية

reaction in presence of polyanion (Ag⁺ ions - sodium borohydride)
(Linnert *et al.*,2009 ; Zaheer *et al.*,2010) .

3.1. 9.2. مركب Xerogel

استخدمت هذه المركبات في تعزيز الفعالية العلاجية لكثير من الادوية لما تتمتع بها من خصائص عديدة ، اذ اشارت الدراسات (Winter *et al.*,1962; Atiyeh *et al.*.,2000) الى فعالية بوليمرات الـ Xerogel في علاج الجروح وتضميدها وكذلك معالجة التقرحات فهي قادرة على الحفاظ والتحكم في البيئة المحيطة في مكان الجرح وتعزيز القدرة على التئام الجروح والأنسجة تجديدها لتسريع الشفاء ، اذ وضعت ضمادات الجرح المحتوية على هذه المركبات التي اثبتت قدرتها على المحافظة على الجروح من خلال خلق بيئة رطبة والتوصيل الموقعي للعوامل العلاجية مع إزالة الإفرازات مما يمنع الغزو البكتيري والسماح للأوكسجين تخلل المنطقة . من الناحية الاخرى تحافظ على التركيز العلاجي الأمثل، تليها استدامة التجهيز المستمر للدواء (أي من الصفر) للوصول الى التركيز الموقعي على مستوى الجرعة الأمثل لعدة أيام اللازمة لتحقيق التأثير الكامل والفعال. العديد من البوليمرات الاصطناعية والبوليمرات الحيوية تم استخدامها في انظمة ايصال العلاج منها في ذلك البولي يوريثين(Polyurethane) و الشيتوزان Chitosan بولي أوكسيد الاثيلين (Poly (ethylene oxide) ، ملح الجاينات (Alginate) والسليولوز (Cellulose) ، والكولاجين (Collagen) (Yoshii *et al.*, 1999; Matthew *et al.*,1995) . استخدام هذه المركبات البوليمرية ادى الى الاستمرار في تحرير العوامل العلاجية و أنها عادة ما تبدي تحكما محدودا في حركة تحرير الادوية مع اطلاق العلاج بكميات كبيرة خلال الساعات القليلة الأولى تليها مدة أبطأ بكثير. ان مرحلة تحرير العلاج في وقت مبكر يمكن أن تسبب جرعة زائدة من العلاج وسمية في حين قد يكون الإبطاء في مرحلة الجرعة العلاجية للدواء ناتج من قوة اتحاد البوليمر في هذه المركبات ، مع ان البوليمرات العضوية يمكن أن توفر مرونة اكثر في التحلل ، اذ ان بعض البوليمرات يصبح العلاج جزءا لا يتجزأ منها في مرحلة الانفصال الثانية من جزيئات العلاج المحملة على هذه المركبات (Costache *et al.*, 2011).

10.2 . النماذج الحيوانية Animal model

تستعمل النماذج الحيوانية في التهاب المفاصل الرثياني (RA) على نطاق واسع في الكشف عن المسببات والآلية المرضية التي تقود الى الالتهاب المفصلي وكذلك في مجال البحوث الدوائية لتقدير العوامل المضادة للالتهاب . ومن بين أهم المميزات التي تم من خلالها اختيار هذه النماذج والتي تتضمن سهولة استحداث المرض عند الحيوانات وفي مدة مقبولة وايضا تشابه العوامل

وآليات تتطور هذا المرض بين البشر وتلك الحيوانات. ومن أهم هذه النماذج هو Adjuvant Arthritis إذ يعد أول نموذج تم استحداث المرض بواسطته من خلال مساعد فروند الكامل المحتوي Frund's complete adjuvant (FCA) الحاوي على بكتريا *Mycobacterium tuberculosis* المقتولة بالحرارة ، تم اقتراحه عام 1952 ويحدث تطور الالتهاب المفصلي في مدة أسبوعين من بداية الحقن، ويتميز هذا النموذج بالتهاب قوي ، سهل القياس ومتعدد المفاصل (Liu et al., 2011). كما يعد Schwab اول من استحث التهاب المفاصل بواسطة الجدار الخلوي لبكتريا المكورات العقدية Streptococci اذ وجد امكانية احداث الالتهاب بواسطة حقن مكونات الجدار الخلوي المحتوي على البيبتيدوغليكان والسكريات PG-PS المعزولة من الجدار لبعض أجناس البكتيريا (Van Eden & Waksman, 2003). معظم الأبحاث تستعمل (PG-PS) المعزولة من بكتريا Streptococci مجموعة *Streptococcus pyogenes* A كما يمكن استحداث المرض بواسطة انواع بكتيرية اخرى تدعى هذه الطريقة باستحداث التهاب المفاصل بواسطة الجدار الخلوي للبكتريا العقدية Streptococci cell wall (SCW) بواسطة حقن المعلق المائي للبكتيريا داخل الصفاق Intraperitoneal وبعد 24 ساعة سوف يكون هناك التهابا حادا في المفاصل يقود لالتهاب مزمن بعد 14 يوم من الحقن (Bernardi et al., 2009)، كما يعد التهاب المفاصل المحرض بالكولاجين نمط II -II Collagen induced arthritis CIA احد نماذج استحداث المرض في الحيوانات المختبرية لفهم الآليات المرضية واختبار العلاجات عليها ، ويتميز هذا النموذج بالتهاب متعدد للمفاصل مصحوب بتخريب الغضروف المرتبط بالمعقدات المناعية المترسبة في السائل المفصلي ، ولوحظ أن الأضرار التي يسببها الـ CIA -II تكون على مستوى المفصل اكثر شمولا وارتباطا بالغضروف (Laste et al., 2014).

1.3.1 المواد والأجهزة المستعملة Materials and Device

1.1.3. المواد الكيميائية المستعملة:

جدول (1-3) المواد الكيميائية المستعملة طبقاً إلى اسم الشركة والمنشأ .

ت	المواد Materials	الشركة Company	المنشأ Origin
1	نترات الفضة (silver nitrate) AgNO ₃	Sigma	Germany
2	Complete Freund's adjuvant	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Canada
3	اثلين كلايكول Ethelen glycol	BDH	England
4	او كسيد الزنك Zinc oxid	Sigma	Germany
5	بولي فنابل PVP	BDH	England
6	حامض النتريك HNO	BDH	England
79	حامض الهيدروكلوريك Hydrochloric acid HCl	BDH	England
8	السكروز	BDH	England
9	فورمالين Formalin	BDH	England
10	كحول أنثيلي مطلق Absolute Ethanol Alcohol	BDH	England
11	هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxid	BDH	England
12	كلوروفورم Chloroform	Radox Lab	France
13	ميثل الكحول Methanol	BDH	England
14	الميثوتريكسات Methotrexate	Kocak farma	Turkey
15	النابروكسن Naproxen	Hmofarm	Serbia
16	نترات الزنك Zinc nitrate	Sigma	Germany

2. 1.3: الأدوات المستعملة:

جدول (2-3) الأدوات المستعملة بحسب اسم الشركة والمنشأ .

ت	الأدوات Tools	الشركة Company	المنشأ Origin
1	اداة التجريع Ingestion device	Oxford	USA
2	اطباق بتري Petry dish	Gold star	Jordan
3	انابيب اختبار Plain tube	Gold star	Jordan
4	سيت تشريح Anatomy set	S.I.E.	Pakistan
5	عدة تقدير تركيز IL- 1 β	BIOSORURCE	Europe S.A.
6	عدة تقدير تركيز IgG	LTA.s.r.i	Italy
7	عدة تقدير تركيز IgM	LTA.s.r.i	Italy
8	عدة تقدير تركيز IL-6	BIOSORURCE	Europe S.A.
9	عدة تقدير تركيز TNF- α	BIOSORURCE	Europe S.A.
10	عدسة الجواهر Jewelers viewer	Sonny	Japan
11	ماصات Micro pipette	Bio Basic	Canada
12	محاقن نبيذة Evacuated syringes	Medical ject	S.A.R.
13	هاون خزفي Ceramic mortar	Volac	England

3.1.3: الأجهزة المستعملة :

جدول (3-3) الأجهزة المستعملة بحسب اسم الشركة والمنشأ .

ت	الاجهزة Devices	الشركة Company	المنشأ Origin
1	فرن تجفيف Oven	Daihan-lab. Tech	Korea
2	ثلاجة Refrigerator	Concord	France
3	جهاز pH-meter	Mauritius	Germany
4	جهاز ELISA	Biotteck Washer ELX -50 Rwedeer ELX-800	U.S.A

Germany	Hermile	Fourier Transform جهاز Infrared (FTIR)	5
Germany	Heraeus Christ	Outoclave جهاز التعقيم	6
Germany	Heraeus Christ	Centrifuge جهاز الطرد المركزي	7
Japan	Unico 2800	Micro-Flow جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer	8
Germany	GFL	(Distiller) جهاز تقطير	9
Germany	Binder	(Incubator) حاضنة	10
Korea	Labtech	(Shaker incubator) حاضنة هزازة	11
USA	Chicago Surgical	water path حمام مائي	12
India	Lassco	Hot plate صفيحة ساخنة	13
England	Gallen kamp	Electric oven فرن كهربائي	14
Korea	Jeio – Tech	كابينة معقمة (Laminar flow cabinet)	15
Italy	Rome	Vortex مازج	16
USA	Oxford	FAM مجهر	17
japan	National	Magnatic stirrer محرك مغناطيسي	18
Japan	National	مضخة تفريغ (Vacuum pump)	19
United Kingdom	Clever scientific	Caplier verneir مقياس	20
Germany	Sartorius	Electric Balance ميزان حساس	21
Italy	PEAK	Shaker هزاز الأطباق المناعية	22

2.3 تصميم التجربة ومحاور الدراسة:

وزعت ذكور الجرذ الأبيض عشوائيا إلى مجاميع وبقاوع 10 من الحيوانات لكل مجموعة وتجرع فمويا حسب وزن جسم الجرذ لفترتي تجريع الاولى ستة اسابيع (مدة تجريع كاملة) والثانية ثلاث اسابيع (نصف مدة تجريع) لكل مجاميع الدراسة على التوالي وعلى النحو التالي :

1. المجموعة الاولى G1 : جرعت يوميا بمحلول الملح الفسلجي وعدت مجموعة سيطرة سالبة.
2. المجموعة الثانية G2 : استحثت بها التهاب المفاصل بحقن مادة Complete Freund's adjuvant- CFA (0.1) مل باخمص القدم اليمنى وعدت مجموعة سيطرة موجبة.
3. المجموعة الثالثة G3 : استحثت بها التهاب المفاصل وجرعت فمويا بعد مرور 14 يوما من استحثاث التهاب المفاصل بمركب اوكسيد الزنك النانوي الكروي الحر ZnO nano.
4. المجموعة الرابعة G4 : استحثت بها التهاب المفاصل وجرعت فمويا بعد مرور 14 يوماً من استحثاث التهاب المفاصل بمركب الفضة النانوية الحر Ag nano.
5. المجموعة الخامسة G5 : استحثت بها التهاب المفاصل وجرعت فمويا بعد مرور 14 يوماً من استحثاث التهاب المفاصل مركب الزيرو جل النانوي الحر Xerogel nano.
6. المجموعة السادسة G6 : استحثت بها التهاب المفاصل وتجرع فمويا بعد مرور 14 يوماً من استحثاث التهاب المفاصل بعقار الميثوتركسات الحر MTX .
7. المجموعة السابعة G7 : استحثت بها التهاب المفاصل وجرعت فمويا بعد مرور 14 يوماً من استحثاث التهاب المفاصل بعقار النابروكسين الحر NAP .
8. المجموعة الثامنة G8 : استحثت بها التهاب المفاصل وجرعت فمويا بعد مرور 14 يوماً من استحثاث التهاب المفاصل باوكسيد الزنك الكروي النانوي محملا بعقار الميثوتركسات MTX / ZnO .
9. المجموعة التاسعة G9 : استحثت بها التهاب المفاصل وجرعت فمويا بعد مرور 14 يوماً من استحثاث التهاب المفاصل بمركب الفضة النانوية محملا بعقار الميثوتركسات MTX / Ag .
10. المجموعة العاشرة G10 : استحثت بها التهاب المفاصل وجرعت فمويا بعد مرور 14 يوماً من استحثاث التهاب المفاصل بمركب الزيروجل النانوي محملا بعقار الميثوتركسات MTX / Xerogel nano .
11. المجموعة الحادية عشر G11 : استحثت بها التهاب المفاصل وجرعت فمويا بعد مرور 14 يوماً من استحثاث التهاب المفاصل بمركب الزنك الكروي النانوي محملا بعقار النابروكسين NAP / ZnO .
12. المجموعة الثانية عشر G12 : استحثت بها التهاب المفاصل وجرعت فمويا بعد مرور 14 يوماً من استحثاث التهاب المفاصل بمركب الفضة النانوية محملا بعقار النابروكسين NAP / Ag .
13. المجموعة الثالثة عشرة G13 : استحثت بها التهاب المفاصل وجرعت فمويا بعد مرور 14 يوماً من استحثاث التهاب المفاصل بمركب الزيروجل النانوي محملا بعقار النابروكسين NAP / Xerogel .

قسمت محاور الدراسة الى ما يلي :

اولا: تحضير المركبات النانوية :

ثانيا: تشخيص المركبات النانوية :

ثالثا: دراسة السيطرة على تحرر العلاج من المركب النانوي :

رابعا : دراسة نسبة تحرر العلاج في المختبر :

خامسا: استحثاث التهاب المفاصل :

سادسا: قياس تركيز عامل النخر الورمي $TNF-\alpha$.

سابعا : قياس تركيز الانتروكينات IL-6 ، IL- 1β .

ثامنا: قياس مستوى تركيز الاجسام المضادة IgM ، IgG .

تاسعا: قياس دليل تثبيط التهاب المفاصل .

عاشرا : تقدير الفعل التثبيطي للمركبات النانوية على البكتريا .

3.3. تحضير المركبات النانوية .

1.3.3. تحضير مركب اوكسيد الزنك النانوي الكروي :

1. اذيب 29.748 غم من نترات الزنك $Zn(NO_3)$ في 1000 مل من الماء المقطر .
2. اضيف 5غم من المنشأ الى المحلول ويرج الى ان ينوب نترات الفضة بشكل تام .
3. حضر 100 ml محلول 1 مولاري من هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) و اضيف الى المحلول على شكل قطرات قطرة/ ثانية على جدران الوعاء وتقاس الدالة الحامضية (PH) للمحلول الى ان تصل الى 8.5 يتم إيقاف التفاعل .
4. ترك المحلول لمدة ساعتين.
5. ترك المحلول لمدة 24 ساعة ، بعدها يركد ويرسب بوساطة بجهاز الطرد المركزي 10000 دورة لمدة 5 دقائق .
6. غسل الراسب بالماء المقطر ثلاث مرات بعدها جفف بدرجة حرارة 80 ° م .
7. حرق الناتج بالفرن الكهربائي بدرجة 400° م ويتم حفظ الناتج بعد تبريده للاستخدام اللاحق.

(Chen et al., 2009) .

2.3.3. تحضير مركب الفضة النانوية (بالاثلين كلايكول ، PVP) :

1. اذيب 0.21 غم من نترات الفضة ($AgNO_3$) في 5 مل من الاثلين كلايكول (محلول رقم1) .
2. اذيب 0.315 غم من PVP في 5 مل من الاثلين كلايكول (محلول رقم 2) .
3. اذيب محلول من 20 مل الاثلين كلايكول بالتسخين والرج المستمر وكان التسخين تدريجيا وصولا الى 150 ° م (محلول رقم 3) .
4. اضيف المحلول رقم 1 والمحلول رقم 2 في ان واحد الى المحلول رقم 3 (قطرة /ثانية) بدرجة حرارة 150 ° م الى ان تحول المحلول من عديم اللون الى اللون الاصفر الشاحب ثم الى الغامق وذلك بعد مرور 30 دقيقة (محلول رقم 4).
5. استمرار التسخين و الرج للمحلول رقم 4 بدرجة حرارة 150 ° م وبعد مرور 65 دقيقة يتحول المحلول من اللون الاصفر الغامق الى اللون الرمادي اللامع (Pearl gray) .
6. برد المحلول بعد 80 دقيقة وغسل بالماء المقطر وكررت العملية ثلاث مرات بعدها حرق المحلول بالفرن الحراري بدرجة حرارة 400 ° م .
7. جمع النتائج وحفظ لحين الاستعمال وتحميل العلاج عليه . (Zhu et al., 2011) .

3.3.3. تحضير مركب Xerogel النانوي

1. اذيب 29.7 غم من نترات الزنك المائية $ZnO(NO_3)$ المائية في 167 مل من الايثانول.
2. اضيف 2 مل من الاثلين كلايكول الى المحلول (المحلول رقم 1) .
3. حضر 4.2 غم من نترات الفضة ($AgNO_3$) في 100 مل من الماء المقطر
4. (المحلول رقم 2).

5. حضر محلول يحتوي على 26 مل من الماء المقطر مضافا اليه 0.6 مل من HNO₃ (محلول رقم 3) .
6. اضيف مكونات المحلول رقم 3 الى المحلول رقم 1 ويرج المحلولين جيدا (المحلول رقم 4).
7. اضيف مكونات المحلول رقم 2 الى المحلول رقم 4 .
8. اضيف للمحلول الاخير 2غم من مادة PVP .
9. سخن المحلول الناتج عند درجة حرارة تصل الى 120 °م لتبخير ثلثي المحلول اعلاه .
10. ركذ وفصل المحلول بجهاز الطرد المركزي وجمع بعدها تم حرقه بالفرن الحرار بدرجة 400 °م .
11. حفظ الناتج لحين الاستخدام وتحميل العلاج عليه (Tuncer & Seker, 2011) .

3:4: تشخيص المركبات النانوية الهجينة :

تشتمل الطرائق المتبعة لتشخيص المركبات النانوية الهجينة على طيف الاشعة تحت الحمراء Fourier transform spectroscopy (FT-IR) infrared وطيف حيود الاشعة السينية X-ray diffraction (XRD) ، فضلا عن استخدام مجهري القوة الذري Atomic Force Microscope (AFM) والالكتروني الماسح Scanning Election Microscope (SEM) .

3:4:1 : التشخيص باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR

تم دراسة طيف الاشعة تحت الحمراء لكل مركب من المركبات النانوية الحرة قيد الدراسة وكذلك المواد العلاجية بشكلها الحر فضلا عن المركبات النانوية بعد تحميل العلاج عليها ، اذ تم عمل قرص من كل مركب من هذه المركبات مع بروميد البوتاسيوم (KBr) بعد طحنها بصورة جيدة وتم قياس طيف الاشعة تحت الحمراء في مدى من الاعداد الموجي (400-4000)سم⁻¹ وتم تثبيت جميع الحزم الظاهرة كما تم تشخيص معظم الحزم الرئيسية .

3:4:2 : التشخيص باستخدام مجهر القوة الذرية AFM

استخدم مجهر القوة الذرية في فحص المركبات النانوية الحرة وعلاجي الميثوتركسات والنيروكسين بعد تحميلهما على المركبات النانوية ، وقياس اقطار وحجوم وتجمعات الجزيئات النانوية ، اذ تم ارسال النماذج الى د. عبد الكريم السامرائي / كلية العلوم / جامعة بغداد لغرض فحصها .

وتم استخراج معامل البلورية (Crystallinity Index) بالاستعانة بالمعادلة التالية)

$$\text{Crystallinity Index} = D_p / L$$

اذ ان :

Dp = حجم الجزيئية المراد قياسها بجهاز AFM

L = معدل حجم البلورة ، الذي يتم حسابه بالاستعانة بمعادلة Scherrer .

3:5: دراسة تحرر المادة العلاجية :

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Wang and Zhang (2013) في دراسة تحرر المادة العلاجية الى عدد من

المحاليل المائية .

1: 5:3: المحاليل المستخدمة:

1- محلول رقم (1) : محلول كربونات الصوديوم (0.5M) Na_2CO_3

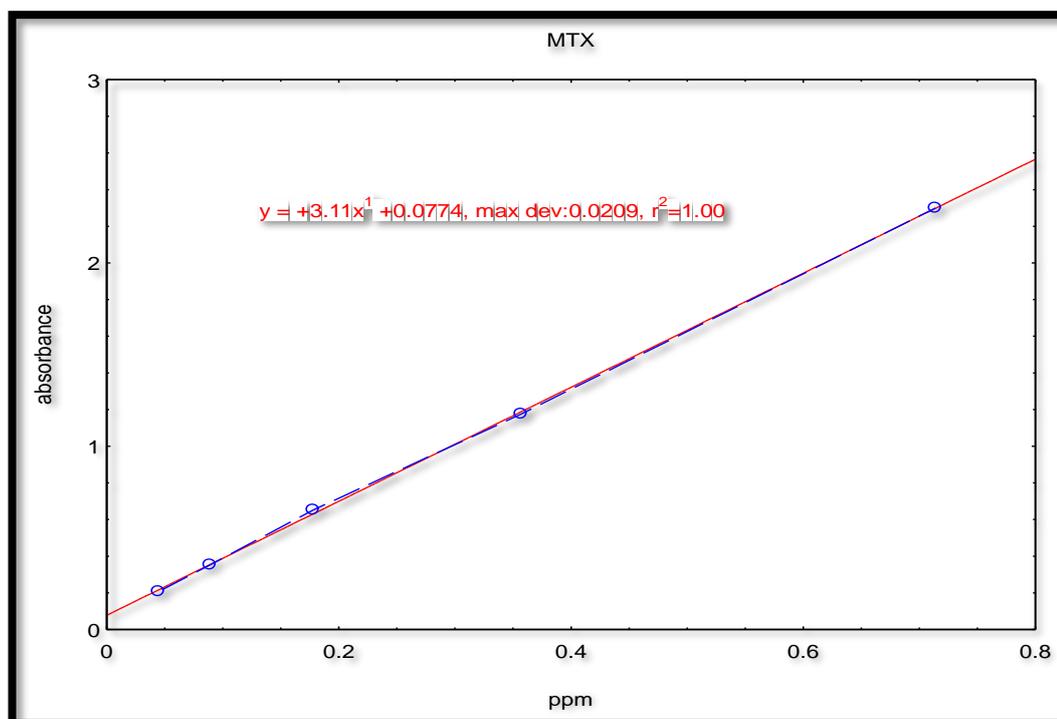
حضر هذا المحلول بإذابة 2.65 غم من كربونات الصوديوم في كمية من الماء المقطر المزال منه الايونات وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 50 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات ايضا، ومن هذا التركيز تم تحضير التركيز 0.5M.

2- محلول رقم (2) : محلول حامض الهيدروكلوريك (2M) HCl

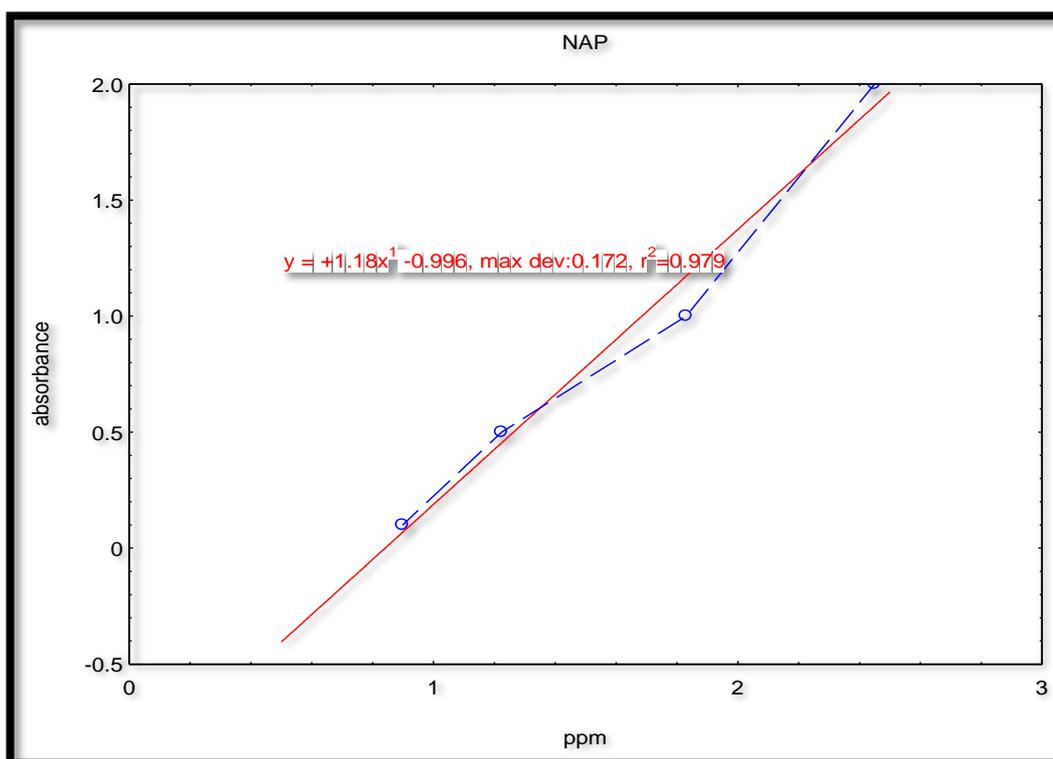
حضر هذا المحلول بمزج 4.2 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز مع كمية من الماء المقطر المزال من الايونات ومن ثم اكمل الحجم الى 50 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات ايضا .

2: 5:3 : تعيين منحنى المعايرة Determination of Calibration Curve

تم تعيين منحنى المعايرة الذي يمثل العلاقة بين الامتصاص والتركيز عن طريق تحضير اربعة تراكيز متتابعة ضمن المدى (5- 20 ppm) من محلول المادة العلاجية MTX و NAP المستخدمة في الدراسة وتم قياس الامتصاص لهذه التراكيز عند الطول الموجي الأعظم (λ_{max}) 213 nm ■ وبعدھا رسم المنحنى القياسي بين الامتصاص والتركيز كما مبين في الشكل (1-3، 2-3) ومن معادلة الخط المستقيم التالية $Y = mx + b$ يتم ايجاد قيمة التركيز مع مرور الزمن.



الشكل (1-3) معادلة الخط المستقيم لعلاج الميثوتركسات (MTX)



الشكل (2-3) معادلة الخط المستقيم لعلاج النبروكسين (NAP) :

3: 5:3: طريقة التحرر الى المحاليل القياسية :

تم دراسة نسبة التحرر للمادة العلاجية من المضيف (او كسيد الزنك والفضة النانوية ومركب الزيروجل) بواسطة مطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية (Uv-Visib) اذ يعين الطول الموجي الاعظم للمادة العلاجية ثم يعمل منحنى معايرة وتعين معادلة الخط المستقيم وعلى اساسها يتم متابعة تحرر المادة العلاجية الى المحاليل المستخدمة في الدراسة من خلال زيادة مقدار الامتصاص بدلالة الزمن استنادا الى قانون بير لا ميرت $A = acx$.

إذ أن A: الامتصاص

a : الامتصاصية

c : التركيز

x: طول المسار الضوئي

4: 5:3: الدراسات الحركية (Kinetic studies)

تم استخدام مطياف الاشعة فوق البنفسجية لدراسة حركية التحرر للعلاج الى نوعين من المحاليل اشتملت على كربونات الصوديوم بتركيز (و 0.5) مولاري ، والمحلول الحامضي برقم هيدروجيني(2). تم تعديل الرقم الهيدروجيني الحامضي باستخدام حامض الهيدروكلوريك.

اضيف 1 ملغم من المركب النانوي الهجين الى 3.5 مل من كل من المحلولين المشار اليها اعلاه وتم قياس الامتصاص لها عند قيمة الامتصاص العظمى للانيون (العلاج) وتمت متابعة الزيادة في مقدار الامتصاص في مدد زمنية مختلفة لمعرفة رتبة التفاعل وتحديد اعلى سرعة لتحرر المادة العلاجية.

5:5:3: دراسة النسبة المئوية لتحرر العلاج من سطوح المركبات النانوية :

تم متابعة دراسة النسبة المئوية لتحرر المادة العلاجية (الميثوتركسات والنيروكسين) بوساطة مطياف الاشعة فوق البنفسجية وذلك بإضافة 1 ملغم من المركب النانوي الهجين الى 3.5 مل من محلول حامض الهيدروكلوريك(2 مولاري) اذ تم قياس الامتصاص لها عند قيمة الامتصاص العظمى للعلاج لمعرفة التركيز الكلي للمادة العلاجية (CT) وبقسمة التركيز عند كل زمن (Ct) نطبق معادلة الخط المستقيم التالية ($Y = mx + b$) على التركيز الكلي وحسب المعادلة الآتية يتم حساب النسبة المئوية للتحرر.

$$\text{Release\%} = \frac{Ct}{CT} \times 100 \dots\dots(1)$$

كما تم دراسة مسار التحرر لتحديد الرتبة التي يسلكها هذا المسار. فاذا كان المسار المذكور يستند إلى موديل الرتبة الصفرية فإنه يخضع للمعادلة الآتية

$$Ct = k_0 t \dots\dots\dots(1)$$

اما في حالة سلوكه الرتبة الاولى الكاذبة فإنه يخضع للمعادلة الآتية

$$\text{Log} (1 - Ct/ CT) = K_1 t/ 2.303 \dots\dots\dots(2)$$

بينما في حالة سلوكه الرتبة الثانية الكاذبة فإنه يخضع للمعادلة الآتية

$$t/ Ct = 1/ K_2 CT^2 + t/ CT \dots\dots\dots(3)$$

إذ أن :

t: زمن التحرر

Ct : التحرر عند زمن t

CT : التحرر الكلي عند زمن ∞

K0 : ثابت السرعة للرتبة الصفرية

K1 : ثابت السرعة للرتبة الاولى

K2 : ثابت السرعة للرتبة الثانية

6.3: تحضير الجرعات من العقار الحر والمادة النانوية الحرة والمحملة بالعلاج:

1. 6.3 عقار الميثوتريكسات Methotrexate

تم استخدام هذا العقار على هيئة حبوب حيث إن تركيز المادة الفعالة فيها 5 ملغم/حبة تم طحنها وإذابتها في الماء المقطر لعمل عالق تركيزه 0.125 ملغم / 0.5 مل ماء وإعطائها عن طريق الفم بجرعة مقدارها 0.125 ملغم / 250 غم من وزن الحيوان بواقع جرعتين اسبوعيا بعد وزن الحيوان مقدما لحساب الجرعة المقررة بحسب الوزن ولمدة ستة اسابيع بعد أن تم أستحداث المرض ، إذ تم إحتساب جرعة العقار المعطاة بالاعتماد على الجرعة المستخدمة للإنسان وهي 5 ملغم .
حساب جرعة العقار حسب المعادلة التالية :

$$\text{Animal dose (Mg/Kg)} = \text{Human equivalent dose} \times \text{Conversion factor}$$

$$\text{for rats } 250 \text{ mg} = 0.083 \times 6.17 = 0.512 \text{ mg} / 1000 \text{ mg}$$

$$= 0.512 \div 4 = 0.125 \text{ mg} / 250 \text{ mg}$$

اذيبت في 19.5 مل ماء مقطر لكل من المركبات النانوية الحاوية

$$\text{mg } 1961.7 = \text{Xerogel} \text{ و } \text{mg } 136.5 = \text{Ag nano} \text{ و } \text{mg } 19.5 = \text{ZnO}$$

اي في حالة تحميل العلاج مع المركبات النانوية تكون الجرعة في 0.5 مل كما يلي :

$$1. \text{ MTX / ZnO} \text{ ----- } \text{Zno} / 0.5 \text{ mg} \text{ مع } \text{MTX} / 0.125 \text{ mg} \text{ في } 0.5 \text{ مل}$$

$$2. \text{ MTX / Ag nano} \text{ ----- } \text{Ag nano} / 3.5 \text{ mg} \text{ مع } \text{MTX} / 0.125 \text{ mg} \text{ في } 0.5 \text{ مل.}$$

$$3. \text{ MTX / Xerogel} \text{ ----- } \text{Xerogel} / 50.3 \text{ mg} \text{ مع } \text{MTX} / 0.125 \text{ mg} \text{ في } 0.5 \text{ مل.}$$

2. 6.3 عقار النبروكسين Naoroxen

تم استخدام هذا العقار على هيئة حبوب حيث إن تركيز المادة الفعالة فيها 500 ملغم/حبة تم طحنها وإذابتها في الماء المقطر لعمل عالق تركيزه 12.8 ملغم / 0.5 مل ماء وإعطائها عن طريق الفم بجرعة مقدارها 12.8 ملغم / 250 غم من وزن الحيوان بواقع جرعتين يوميا بعد وزن الحيوان مقدما لحساب الجرعة المقررة بحسب الوزن ولمدة ستة اسابيع بعد أستحداث المرض ، إذ تم إحتساب جرعة العقار المعطاة وفق ما جاء به (2016) Nair & Jacob وبالاعتماد على الجرعة المستخدمة للإنسان وهي 500 ملغم .
حساب جرعة العقار حسب المعادلة التالية :

$$\text{Animal dose (Mg/Kg)} = \text{Human equivalent dose} \times \text{Conversion factor}$$

$$\text{for rats } 250 \text{ mg} = 8.33 \times 6.17 = 51.40 \text{ mg} / 1000 \text{ mg}$$

$$= 51.40 \div 4 = 12.8 \text{ mg} / 250 \text{ gm}$$

اذيبت في 20 مل ماء مقطر لكل من المركبات النانوية الحاوية

$$\text{mg } 2012 = \text{Xerogel} \text{ و } \text{Ag nano} = 140 \text{ mg} \text{ و } \text{ZnO} = 20 \text{ mg}$$

اي في حالة تحميل العلاج مع المركبات النانوية تكون الجرعة في 0.5 مل كما يلي :

$$1. \text{ NAP / ZnO} \text{ ----- } \text{Zno} / 0.5 \text{ mg} \text{ مع } \text{NAP} / 12.8 \text{ mg} \text{ في } 0.5 \text{ مل}$$

$$2. \text{ NAP / Ag nano} \text{ ----- } \text{Ag nano} / 3.5 \text{ mg} \text{ مع } \text{NAP} / 12.8 \text{ mg} \text{ في } 0.5 \text{ مل.}$$

$$3. \text{ NAP / Xerogel} \text{ ----- } \text{Xerogel} / 50.3 \text{ mg} \text{ مع } \text{NAP} / 12.8 \text{ mg} \text{ في } 0.5 \text{ مل.}$$

3. 7. الحيوانات المستعملة في الدراسة :

تم استخدام 130 من ذكور الجرذان البيض المختبرية البالغة في هذه الدراسة ، التي كانت أوزانها تتراوح من 350-250 غرام وأعمارها 10-12 اسبوعا والتي تم جلبها من مختبر البيت الحيواني لكلية الطب البيطري جامعة القادسية ومختبر البيت الحيواني لكلية الصيدلة جامعة كربلاء -ومركز السيطرة والرقابة الدوائية/ وزارة الصحة /بغداد ، وضعت هذه الحيوانات في أقفاص بلاستيكية خاصة للتربية ذات أبعاد 25×40×15 سم مغطاة بمشبكات معدنية في البيت الحيواني التابع لكلية الصيدلة جامعة كربلاء ، كما تم فرش أرضية هذه الاقفاص بنشارة الخشب ومن حين إلى آخر يراعى تبديلها ، وكذلك توفير الماء والغذاء الذي هو عبارة عن العليقة الحيوانية التي تعطى بصورة حرة *ad libitum* تحت ظروف تهوية مناسبة وبدرجة حرارة 25م ، تركت الحيوانات لمدة اسبوعين للتأقلم في المختبر واعتمدت الإضاءة الطبيعية 12ساعة نهارا و 12ساعة ليلا ، و للتأكد من خلوها من الأمراض المختلفة تم التجريع الفموي بمحلول 0.5 ملغم من Sulfadimidine - Sodium في 1 لتر من الماء و 0.5 ملغم من Ampicillin 20% في 1 لتر من الماء ولمدة 5 أيام متتالية .

3.8. إستحداث التهاب المفاصل الرثياني

استحدث التهاب المفصلي بمادة (CFA) Complete Freund Adjuvant من شركة (Biotechnology, Santa Cruz Inc. Canada) وطبقا لطريقة العمل المستخدمة من قبل (Adeneye et al., 2014). واجريت عملية استحداث التهاب بحقن 0.1 مل من مادة Complete Freund Adjuvant التي تحتوي على البكتريا المقتولة بالحرارة *Mycobacterium tuberculosis* في القدم اليمنى بمنطقة الأخص للجرذ بعد أن وزنت هذه الحيوانات وبعد اخذ قياس حجم القدم بواسطة آلة القياس (Caplier verneir) قبل البدء بالحقن وكذلك يتم اخذ قياس حجم القدم بعد مدة 14 يوما من الحقن وبعد مدة ستة اسابيع من العلاج . إذ تم ملاحظة ان بعد انقضاء 24 ساعة من الاستحداث ظهور الأعراض المختلفة مثل التورم الشديد و الاحمرار والزيادة في سمك القدم والتصلب. إذ يتم تقدم التهاب المفاصل المستحدث بفترة من 10- 45 يوما من البدء بعملية الحقن (Van et al., 1988) .

اقترح نموذج استحداث التهاب المفاصل بواسطة (CFA) الان الاستحداث بهذه ينتج الالتهابات المزمنة التي تعد من مميزاته التشابه الكبير لتلك المميزات الناتجة في حالة التهاب المفاصل الرثياني الذي يصيب الانسان (et al., 2005 ; Mizushima et al., 1970) .

3:9: جمع عينات الدم:

بعد تجويع الحيوانات لمدة 12 ساعة وزنت وخدرت بالايثر و تجمع عينات الدم 5 مل لكل حيوان من القلب مباشرة بطريقة طعنة القلب Cardiac Puncture . تسحب نماذج دم منها باستخدام محاقن طبية نبيذة سعة 5 مل في مدة 8 اسابيع من استحداث التهاب المفاصل وبعد المعالجة العقار الحر والمركب النانوي الحر والعقار المحمل على المركب النانوي وكذلك بالنسبة لمجموعة السيطرة السالبة والموجبة . توضع في أنابيب بلاستيكية خالية من مانع التخثر بغية الحصول على الكمية الكافية من المصل وتفصل فيما بعد في جهاز الطرد المركزي Centrifuge بسرعة 3000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق، ويتم فصل المصل الخالي من كريات الدم الحمر بواسطة الماصة الدقيقة Micropipette ويوزع المصل إلى أنابيب نظيفة ومعقمة ويحفظ في حالة التجميد عند درجة حرارة -20م في مجمدة المختبر لغرض قياس المعايير الوظيفية الاخرى والتي تشمل عامل النخر الورمي والانترولوكينات والبروتينات المناعية.

3.10. قياس دليل التهاب المفاصل وتثبيط التهاب المفاصل:

3.10.1 قياس دليل التهاب المفاصل

تم حساب حجم القدم الأيمن للحيوان الذي تم استحداث التهاب المفاصل بمادة CFA بواسطة مقياس Verneer Caliper بالمليمتر بقياسها قبل يوم الحقن اي اليوم صفر وفي اليوم 14 من عملية الاستحداث ويتبع دليل التهاب المفاصل طريقة (Coelho *et al.*, 2004) وحسب المعادلة الآتية :

$$\text{دليل التهاب المفاصل \%} = \frac{\text{حجم القدم في اليوم (14)} - \text{حجم القدم في اليوم (صفر)}}{\text{حجم القدم في اليوم (صفر)}} \times 100$$

3.10.2: قياس دليل تشييط التهاب المفاصل

تم حساب حجم القدم الأيمن للحيوان الذي تمت معاملته بمادة CFA بواسطة آلة Verneer Caliper بالمليمتر بقياس سمك القدم الأيمن في اخر يوم (اليوم 44) من العلاج ويتبع طريقة (Bonta *et al.*, 1978) وحسب المعادلة الآتية :

$$\text{تشبيط التهاب المفاصل \%} = \frac{\text{حجم القدم في اليوم (14)} - \text{حجم القدم في اليوم (44)}}{\text{حجم القدم في اليوم (44)}} \times 100$$

3:11: مبدأ وطريقة عمل العدة التشخيصية لقياس مستوى $\text{TNF-}\alpha$ ، $\text{IL-1}\beta$ ، IL-6 :

قدرت مستويات $\text{TNF-}\alpha$ ، $\text{IL-1}\beta$ و IL-6 بتقنية الاليزا ELISA ، التي هي من أنزيمات الطور الصلد (Solid phase Enzyme) للمعايرة الدقيقة (التقدير الكمي المناعي الدقيق) Microtiterplate حيث تستخدم الأجسام المضادة وحيدة النسيلة مباشرة ضد محددة مستضدية معينة للـ $\text{TNF-}\alpha$ ، $\text{IL-1}\beta$ و IL-6 ، ترتبط العينات مع الأجسام المضادة المغلفة لسطح الحفر Wells إذ تحتوي الصفيحة على 96 حفرة (Wells) كل منها مغطى بالمستضد النوعي (Specific antigen) المرتبط بالسطح الصلد (Solid phase) للجدار الداخلي، هذا الاختبار يعتمد على مبدأ عمل إضافة النموذج Sample المراد تحديد وجود الضد النوعي سيؤدي إلى التصاقه بالجدار الداخلي ، بعدها تغسل الحفر باستخدام محلول الغسل (Working wash solution) الذي سيؤدي إلى إزالة الجزء غير المرتبط من النموذج أما إضافة محلول الارتباط (Revelation solution) سيؤدي إلى ارتباط ارتباط conjugation النموذج مناعيا مع تلك العوامل مكون ما يسمى معقد الشطيرة (Sandwich complex) . بعد مدة الحضان تغسل الحفر مجددا لإزالة محلول الارتباط غير المقترن تتبعتها خطوة إضافة المادة الأساس (Substrate) إلى الحفر والتي تؤدي بتفاعلها مع محلول الارتباط إلى ظهور كاشف لوني والذي يظهر بعد الإضافة والحضان . يتم إيقاف التفاعل بإضافة محلول الايقاف (Stop solution) إذ يؤدي هذا المحلول إلى إيقاف التفاعل وتغيير اللون . بعدها يتم قياس تركيز $\text{TNF-}\alpha$ ، $\text{IL-1}\beta$ و IL-6 على الطول الموجي 450 nm ، حيث تتناسب شدة اللون الظاهر طرديا مع كمية العامل المراد قياس تركيزه.

3.11.1: تحضير الكواشف Reagents preparation

1. المحلول القياسي Standard : حضر بإضافة المحلول القياسي Standardb مع 1 مل من الماء المقطر Distilled water .
2. محلول السيطرة Control : خفف بإضافة محلول السيطرة Control مع 1 مل من الماء المقطر Distilled water .
3. محلول تخفيف العينة Specimen diluents : خففت العينة بإضافة ما موجود في العبوة vial إلى 1 مل من الماء المقطر Distilled water .
4. محلول الغسل Working wash solution : حضر محلول الغسل Wash solution بإضافة 199 مل من الماء المقطر إلى 1 مل (عبوة واحدة vial) من Wash solution بالتخفيف إلى (200x) باستخدام المازج Magnetic stirrer للخلط أو التجانس ويكون استعماله أنيا.

5. محلول الارتباط Revelation solution: حضر بإضافة 0.2 مل من Chromogen إلى 6 مل (عبوة واحدة vial) من المادة الأساس الدارئة Substrate buffer والمتكونة من (بيروكسيد الهيدروجين الذائب في دارئ acetate / citrate buffer).

2.11.3 : طريقة عمل TNF- α ، IL-1 β و IL-8 IL-6

procedure TNF- α , IL-1 β and IL-6 :

1. تم تحضير كل الكواشف ووضعها على مكان نظيف تحت درجة حرارة الغرفة.
2. ثبتت الصفيحة Plate على مكان مستوي.
3. أضيف 100 مايكروليتر باستخدام الماصة الدقيقة Micropipette من دارئ الحضان Incubation buffer إلى كل حفرة Well .
4. أضيف 100 مايكروليتر من المحلول القياسي (Calibrators) ، محلول السيطرة (Control) ، العينات (Sample) إلى كل الحفر Wells.
5. أضيف 50 مايكروليتر من محلول الاقتران conjugate إلى كل حفرة Wells.
6. حضنت لمدة 2 ساعة تحت درجة حرارة الغرفة محمول على هزاز الأطباق المناعية (Shaker) عند 100± rpm.
7. تم إزالة السائل الزائد من كل حفرة .
8. غسلت الصفيحة ثلاثة مرات خلال :
 - أضيف 0.4 مل من محلول الغسل إلى كل حفرة .
 - إزالة كل المكونات من الحفر.
9. أضيف 200 مايكروليتر من محلول الاقتران المحضر حديثا إلى كل حفرة لمدة 15 دقيقة متبوع بغسل الحفر.
10. حضنت الصفيحة لمدة 30 دقيقة تحت درجة حرارة الغرفة محمول على هزاز الأطباق المناعية Shaker عند 100± rpm بالظلام.
11. أضيف 50 مايكروليتر من محلول الايقاف (Stop solution) إلى كل حفرة.
12. قرأ طيف الامتصاصية عند طول موجي 450 nm.

12.3 : مبدأ وطريقة عمل العدة التشخيصية للغلوبولينات المناعية IgM و IgG

principle and procedure of IgG , IgM and IgA kits.

استخدمت العدة التشخيصية kit من قبل شركة LTA.s.r.i لتقدير مستويات كل من الغلوبولينات المناعية IgG , IgM بطريقة الانتشار المناعي الشعاعي المفرد Signal Radial Immune Diffusion ويعتمد مبدأها على تكوين حلقة الترسيب المناعي إذ أن الغلوبولينات IgM و IgG ستنتشر في هلام الاكاروز Agarose gel الحاوي على الأضداد النوعية بعد إضافة عينات المصل بأحجام متساوية بمقدار 5 مايكروليتر من مصل الجرذان المصابة والمعاملة ومصل مجموعة السيطرة السالبة والموجبة إلى الحفر Wells الموجودة في الأطباق Plates، تتفاعل هذه الأجسام المضادة مع ذلك الوسط وتكون معقد مناعي Immune-complex بعد الحضان لمدة 72 ساعة تحت درجة حرارة 8- م إذ يظهر هذا المعقد بشكل حلقة دائرية مرئية حول

كل حفرة Well يقاس قطر حلقة الترسيب المناعي المتكونة حول الحفر باستخدام عدسة الجواهر Jewellers Viewer إذ يقابل قطر كل حلقة متكونة حول الحفر Wells تركيز البروتين المفحوص IgG, IgM وقد تم التعبير عن القيمة بـ ملغم/ديسي لتر.

واتبعت طريقة العمل بحسب تعليمات العدة التشخيصية الموصى بها من قبل الشركة المصنعة وكالاتي :

1. تم إزالة الغطاء من الصفيحة Plate وتركها تحت درجة الحرارة لبضع دقائق للسماح لقطرات الماء المكثف في الحفر Wells أن يتبخر.

2. أضيف 5 مايكروليتر من المصل باستخدام الماصة الدقيقة Micropipette إلى كل حفرة من الصفيحة من النموذج المصاب أو نموذج السيطرة بعد تدويبه تحت درجة حرارة الغرفة أيضا ، وتركها لفترة وجيزة ليكتمل امتصاصها وحدث تفاعل قبل حمل الصفيحة إلى مكان آخر.

3. غطيت الصفيحة بالغطاء بصورة محكمة ووضعت في مكان رطب تحت درجة حرارة (2-8) مئوية لمدة (72) ساعة ولتسريع وقت التحلل توضع هذه الصفائح في درجة حرارة (30) م.

4. تم قراءة النتائج بعد مرور 72 ساعة من الحضان باستخدام العدسة Jewellers viewer لتحديد قطر الحلقة (Ring) المتكونة حول كل حفرة (Well) ومن خلال قطر الحلقة نستدل على تركيز الأجسام المضادة Antibodies بوجود ملحق بكل صفيحة (kit) تحوي على التراكيز (Concentrations) التي تقابل تلك الأقطار.

3: 13: الفعالية التثبيطية للمركبات النانوية :

3: 13: 1: العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة :

استخدمت عزلتان بكتيرية قياسية منها عذلة موجبة لصبغة كرام و عذلة سالبة للصبغة وذلك لاختبار الفعالية التثبيطية للمركبات النانوية قيد الدراسة وحسب ما هو موضح في الجدول (3-4) .

3: 13: 2: طرق التعقيم (Benson,2002) Sterilization Methods :

أ- التعقيم بالحرارة الرطبة (Wet-heat sterilization)

تم تعقيم الاوساط الزرع الجاهزة والتركيبية في الأوتوكلاف مع درجة حرارة 121 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة.

ب - التعقيم بالحرارة الجافة (Dry- heat sterilization)

تم تسخين الزجاجيات المستخدمة في الفرن عند درجة حرارة 120 درجة مئوية لمدة ساعة ونصف.

ج- التعقيم بالأشعة (Ultra Violet)

تم استخدام التعقيم بالأشعة UV للمواد البلاستيكية كالمصاصات والمواد احادية الاستخدام كلانايبب والاطباق .

3: 13: 3: الاوساط الزرع المستخدمة:-

3: 13: 1: الوسط المغذي السائل (Nutrient broth):

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة 13 غم من الوسط في 1 لتر من الماء المقطر ، و تم تعقيم الوسط باستخدام جهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121م° و لمدة 15 دقيقة و قد تم استخدام هذا الوسط لتنشيط العزلات البكتيرية.

13:3 :2: وسط MacConky agar :

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة 50 غم منه في 1 لتر من الماء المقطر ، و عقم باستخدام المؤصدة ثم صب في أطباق بتري معقمة. استخدم هذا الوسط لتنمية بكتريا *Escherichia coli*.

13:3 :3: وسط Mannitol Salt agar :

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة 111غم في 1 لتر من الماء المقطر و عقم بالمؤصدة و تم صبة في أطباق بتري و قد استخدم هذا الوسط لتنمية بكتريا *Staphylococcus aureus*.

13:3 :3:4: المحلول الملحي الفسلجي :

حضر بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 50 مل ماء مقطر و بعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ايضا.

13:3 :4: التصبغ : Gram Stain :

تم فحص جميع العزلات البكتيرية تحت المجهر الضوئي Light microscope بعد تصبغها بصبغة كرام Gram stain وفقا لطريقة تصبغ وتفريق البكتيريا على أساس تفاعلها مع الصبغة (MacFaddi, 2000).

13:3 :5: تحضير الكواشف Preparation of reagents :

1 : 5: 13:3 : كاشف الكاتاليز (Catalase reagent)

تم تحضير بيروكسيد الهيدروجين 3% من محلول (stock solution) و يستخدم للكشف عن قدرة العزلات على إنتاج انزيم الـ Catalase (Forbes et al., 2007).

2 : 5: 13:3 : كاشف انزيم الاوكسيديز (Oxidase reagent)

تم تحضير الكاشف في زجاجة مظلمة عن طريق إذابة 0.1 غم من Tetramethyl p-phenyl diamine-dihydrochloride في 10 مل من الماء المقطر (Forbes et al., 2007).

3 : 5: 13:3 : كاشف كوفاس (Kovacs reagent)

تم إعداده عن طريق إذابة 5 غم من P-dimethyl-aminobenzylaldehyde في 75 مل من الكحول الأميلي. يتم إضافة 25 مل من حمض الهيدروكلوريك إلى هذا الخليط. تم وضع الكاشف في زجاجة مظلمة حتى الاستخدام. وقد استخدم هذا الكاشف للكشف عن حلقة الإندول (Forbes et al., 2007).

13:3 :6: الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests :

13:3 : 6 : 1 : اختبار الأوكسيداز (Oxidase test)

تم غمر شريط من ورق الترشيح مشبع بمحلول Tetramethyl-P-phenylene-diamine dihydrochloride بتركيز M 0.01 ووضعه على المستعمرة التي سيتم اختبارها مع عصا خشبية معقمة لتجميعها على طول ورق الترشيح. تظهر النتيجة الإيجابية من خلال تمييز اللون الأرجواني الغامق الذي يظهر في غضون 5-10 ثوان. (MacFaddin, 2000).

13:3 : 6 : 2 : اختبار التجلط (Tube coagulase test) Coagulase test

تم استخدام هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتيريا على إنتاجها الـ coagulase وهو enzyme-like protein الذي يجلط أوكسالاند أو سيتراوند بلازما oxalated or citrated plasma. يتم إجراء الاختبار من خلال تخفيف البلازما البشرية 1:5 ثم يخلط ويحضان مع حجم مساو من مرق البكتيريا لمدة 24 ساعة في 37 درجة مئوية. إذا تشكلت جلطات خلال 1-4 ساعات دلالة على ان الاختبار هو إيجابي مع وضع أنبوب مقارنة يحتوي خليط من البلازما مع المرق المعقم كسيطرة (Brooks et al., 2007).

13:3 : 6 : 3 : اختبار التجلط على الشريحة Coagulase slide test

يستخدم للكشف عن انزيم coagulase (Clumping factor) عن طريق خلط قطرة واحدة من الماء المقطر المعقم مع المستعمرة البكتيرية على شريحة زجاجية ثم تم إضافة قطرة واحدة من البلازما البشرية وتخلط بعناية و النتيجة تقرأ بعد 10-15 دقيقة. مع إعداد ضوابط إيجابية وسلبية بنفس الطريقة للمقارنة.

13:3 : 6 : 4 : اختبار كاتاليز Catalase test

باستخدام ماصة معقمة يتم اضافة من M 0.03 H₂O₂ الى مستعمرة بكتيرية حديثة (24 ساعة) موضوعة على شريحة زجاجية نظيفة سيتم مباشرة اطلاق فقاعات الاوكسجين دلالة على ان النتيجة موجبة (MacFaddin, 2000).

13:3 : 6 : 5 : اختبار الإندول Indole Test

يتم بتلقيح البيبتون المائي مع مزرعة بكتيرية حديثة وتحضن عند 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة بعد اضافة (0.5 مل) من كاشف كوفاس ، ان ظهور اللون الأحمر في طبقة الكحول دلالة على إيجابية الاختبار (MacFaddin, 2000).

13:3 : 7 : تحضير اللقاح :

استخدم الوسط المغذي السائل لغرض تحضير اللقاح اذ وزع الوسط في انابيب اختبار بواقع 10 مل لكل انبوبة وعقم بالمؤصدة. وحضر اللقاح لكل عزلة بكتيرية بنقل قطعة من الاغار ذات قطر 5 ملم من كل عزلة من العزلات المنماة على وسط المغذي الصلب بعد التأكد من نقاوتها(كلا على انفراد) الى الانابيب المخصصة لها وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ولمدة 24 ساعة .

13:3 : 8 : طريقة تقدير حساسية البكتريا للمركبات النانوية والمضادات الحيوية

تم استخدام طريقة التخفيف وفيها يتم تقدير كلا من التركيز المثبط الأدنى (Minimal inhibitory concentration - MIC) وهو اقل تركيز يؤدي الى تثبيط نمو البكتيريا قيد الاختبار ، وكذلك تم تقدير حساسية البكتيريا اتجاه التركيز القاتل الأدنى (Minimal bactericidal concentration - MBC) وهو اقل تركيز يؤدي الى قتل البكتيريا قيد الاختبار.

طريقة العمل

1- تزرع كمية ثابتة من البكتيريا في وسط سائل هو وسط Muller Hinton Broth في انابيب اختبار معقمة بعدد التراكيز المطلوب تحضيرها من المضاد (عدد البكتيريا يتراوح بين 10^5 - 10^6 خلية/مل).

2- يتم اضافة المضاد الحيوي بتراكيز متزايدة بحيث يحتوي الانبوب الاول (رقم 1) على التركيز (صفر) من المضاد Control ثم يليه الانبوب الثاني (رقم 2) الذي يحتوي على اوطا تركيز من المضاد ويليه الانبوب الثالث (رقم 3) الذي يحتوي تركيز ضعف ما موجود في الانبوب رقم 2 وهكذا بالنسبة لبقية الانابيب.

3- تحضن الانابيب جميعا في درجة حرارة ملائمة للبكتيريا المدروسة ويتم فحص الانابيب بعد الحضانة للتعرف على أي منها يحتوي نمو بدلالة العكورة اما الانابيب الراققة فتشير الى عدم حدوث نمو نتيجة فعالية المضاد.

* لتحديد الـ MIC : يتم اختبار اول انبوب رائق ياتي بعد سلسلة انابيب عكرة فيكون تركيز المضاد فيه هو الـ MIC.

* لتحديد الـ MBC : يتم اخذ كمية من الوسط الزرع (0.1 مل) من الانابيب الراققة الى طبق فيه وسط زرعي Muller Hinton agar ثم تحضن الاطباق بدرجة 37 م لمدة 24-48 ساعة ثم تلاحظ المستعمرات النامية في كل طبق. يعتبر اول طبق لم يظهر فيه نمو هو MBC (Ansari et al.,2009).

9:13:3: طريقة تقدير الفعالية التثبيطية للمركبات النانوية والمضادات الحيوية ضد البكتيريا:

تم اختبار الفعالية التثبيطية للمركبات النانوية ZnO NP و Ag NP الحرة وكذلك لمضادي Erythromycin و Gentamycin من خلال قياس حلقة التثبيط ضد العزلات البكتيرية المبينة في الجدول (3-4) وبتراكيز MIC مايكروكرام / مل باستخدام طريقة الانتشار في الاكار (Egorove, 1985) بحسب الآتي :

- 1- تم عمل سلسلة من التخفيف العشرية لكل عذلة بكتيرية و لغاية الحصول على التخفيف المناسب لكل عذلة منها.
- 2- سحب 0.1 مل من التخفيف المناسب لكل عذلة بكتيرية ، و اضيف الى اطباق حاوية على من وسط Muller Hinton agar الصلب وتم نشره جيدا على سطح الطبق بواسطة الناشر L-Shape و تركت الاطباق مدة ساعة في الثلاجة .
- 3- خففت المركبات النانوية باستعمال المذيب Dimethyl sulfoxide (DMSO) للحصول على تراكيز متدرجة بالمايكروغم/مل وكذلك تحضير المضادات الحيوية المحملة على المركبات النانوية وبكلا التركيزين .
- 4- تم عمل اقراص مشبعة بالمركبات النانوية الحرة والمضاد الحيوي والمركبات النانوية مع المضاد الحيوي لوضعها على سطح الاكار بقطر 5 ملم اذ كانت المسافة متساوية بين قرص و اخر.
- 5- وضع الاقراص المشبعة من تراكيز المركبات النانوية الحرة والمحمل عليها المضادين الحيويين قيد الدراسة في على الطبق الحاوي على المزروع البكتيري و حضنت لمدة ساعة في الثلاجة و من ثم حضنت في الحاضنة بدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة و تم استخدام المضادين الحيويين Erythromycin و Gentamycin كسيطرة موجبة .

6- تم قياس اقطار تثبيط نمو البكتريا (ملم) باستعمال المسطرة بعد اكتمال مدة الحضان.

Statistical analysis

14.3: التحليل الاحصائي

تم إجراء تحليل التباين لتجربة عاملية $13 \times 2 \times 5$ مكررات وفق التصميم العشوائي الكامل لدراسة تأثير المعاملة بالعلاج والمركب النانوي والمدة الزمنية في المعايير المدروسة ، واستعمال تحليل التباين وفق التصميم التام العشوائي لدراسة تأثير المعاملة بالعلاج والمركب النانوي في سمك القدم الايمن واختبار معنوية الفروقات بين المتوسطات باستعمال اختبار (L.S.D.) Revised Least Significant Differences واختبار T لاختبار الفروقات بين تأثير المعالجة لمدة العلاج الحر و نصف مدة العلاج بعد تحميل العلاج على المركب النانوي (الساھوكي و وھيب،1990).

Result and Discussion

1:4:1: تشخيص المركبات النانوية المهجنة :

1:1:4: طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR

تمت دراسة طيف الأشعة تحت الحمراء لتشخيص المركبات النانوية المحضرة والمحمل عليها علاجي التهاب المفاصل قيد الدراسة ، اذ تم تشخيص مركبات اوكسيد الزنك والفضة النانوية وكذلك مركب الزيرو جل المحضرة وعلاجي الميثوتركسات والنيبروكسين على التوالي (ZnO,Ag nano , Xerogel MTX and NAP) قبل وبعد تحميل العلاج.

1:1:1:4 : طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لأكسيد الزنك الكروي

(ZnO) الحر :

يلاحظ في طيف الامتصاص للزنك النانوي شكل (1-4) ان القمة العائدة لامتطاط رابطة الهيدروكسيل OH تقع عند التردد 3400 سم⁻¹ وهذا ما يؤيده وجود الحزمة لامتطاط الهيدروكسيل عند التردد 1631 سم⁻¹ اما الحزم الممتدة بين 1028-1543 سم⁻¹ فهي تعود لروابط المادة المثبة للجزيئات النانوية من الاثلين كلايكول والكحول الايثيلي ، الحزم الموجودة بين 437-860 سم⁻¹ فهي لاهتزاز الروابط الزنك -اوكسيجين في المركب ZnO النانوي (Li et al.,2005)

1:1:1:4 : 2: طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR للفضة النانوية الحرة (Ag nano) :

تشير نتائج الشكل (2-4) الى وجود قمة مستعرضة كبيرة حادة جدا متراكبة بين 3362-3554 سم⁻¹ والتي يعود سببها مجاميع الهيدروكسيل التي يحتويها تركيب الكحول الاثلين كلايكول الداخلة في تحضير مركب الفضة النانوية، الحزمة 1633.9 سم⁻¹ تعود الى تحول مجاميع الكاربونيل حامض الكلوكونيك ، كذلك الحزم (1393 ، 1371 ، 1360) سم⁻¹ تعود جميعها الى حامض الكلوكونيك ، الحزمتان (1148 ، 1105) سم⁻¹ كذلك تعودان الى تركيب الحامض المذكور المكون للفضة ، والحزمة الكبيرة المستعرضة بين (619-682) سم⁻¹ تعود الى رابطة Ag-O المعدنية (Kora et al.,2014) .

1:1:1:4 : 3: طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لمركب Xerogel الحر :

تم الحصول على أطياف الأشعة تحت الحمراء الشكل (3-4) لمحلل الزيروجيل لمركب Xerogel النانوي اذ اظهر الطيف الحزم المستعرضة عند الترددات (3000-3500) سم⁻¹ والتي تعود لرابطة الهيدروكسيل (O-H) في الكحول او الماء H₂O ، وهنا نلاحظ التراكم بين القمم مما ادى الى استعراض الحزمة هذه الجزيئات المائية هي من الكحول ، جلايكول الإيثيلين والماء ، اما الحزم الواقعة بين (2976-2789) سم⁻¹ تعود إلى الاهتزاز العائد لمجموعات CH₃، في حين أن هذه الاهتزازات بين (1599-1550) سم⁻¹ تتوافق مع الاهتزازات العائدة للرابطة C-C. القمم عند الاهتزازات بين (1375-1400) سم⁻¹ تتوافق مع الاهتزاز للرابطة من CH₂ من مجموعة الإيثيلين، اما الحزم التي تقع بين (1080-1145) ، (1125-1210) و (1294-1205) سم⁻¹ فهي تعود إلى الاهتزازات لروابط C-O من المجموعات العضوية (الإيثيل، الأثانول والحامض العضوي). الحزم التي تقع بين (744-837) و (1100-1152) سم⁻¹ تتوافق مع الاهتزازات للرابطة C-C ،

وأخيرا القمة القوية تقع في 400-516 سم⁻¹ تتوافق مع الاهتزازات Zn-O و Ag-O في التركيب النانوي لمركب الـ Xerogel

4:1:1:4 : طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) الحر :

إن تحليل FTIR من MTX النقي شكل (4-4) يظهر حزمة امتصاص مستعرضة عند 3080 سم⁻¹ وهي تعود لاهتزازات مجموعة الهيدروكسيل (O-H) و مجموعات C-H الأروماتية، وامتطاط الرابطة لمجاميع الأمين (N-H) تظهر عند الترددات (1500-1634) سم⁻¹، كما اشارت نتائج الدراسة (Fulisa et al.,2014) ان وجود الامتصاص عند (1466-1509) سم⁻¹ يدل على وجود التفرع لمركب 1,3 فنيل الامين، كما تظهر مجاميع الـ C=O امتطاط في نطاقاتها مقابل لانحناء مجموعة N-H في النطاق الطيفي (1500-1550) سم⁻¹ والذي يتداخل جزئيا مع الرابطة العطرية C=C التي تمتط في الترددات الأخرى والتي تكون بارزة عند (1200-1400) سم⁻¹ اذ تتوافق مع امتطاط رابطة الكربونيل -C-O في المجموعة الكربوكسيلية، والحزمة التي تظهر عند التردد (930 سم⁻¹) تعزى إلى (O-H) تراج عند (820 سم⁻¹) لرابطة (C-H₂) المجاورة على للحلقة العطرية، وإن جميع النطاقات المحددة في الطيف FTIR هي في توافق جيد مع التركيب الجزيئي للـ MTX وتأكيد نقائها.

5:1:1:4 : طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) الحر :

الشكل (4-5) لطيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) يظهر الترددات لعلاج الـ NAP، الحزمة (3208) سم⁻¹ يعود سببها لاهتزازات مجاميع الهيدروكسيل (OH) المختلفة لعلاج النبروكسين (NAP) الكحولات والماء الممتز، في حين ان الحزمة (2970) سم⁻¹ تعود تردداتها لوجود مجاميع الـ CH₃، والحزمة (2939 سم⁻¹) تعود لمجاميع CH التي يتضمنها تركيب العلاج، الحزمة عند 1726 سم⁻¹ تعود لمجاميع الكاربوكسيل (COOH) اما الحزمة عند (1684 سم⁻¹) فهي تعود الى الالدهايد الداخل في تركيب النبروكسين، الحزمة 1925 سم⁻¹ لامتطاط الروابط C-NAP، اما الحزم (1267,1227) سم⁻¹ على التوالي فهي تعود لمجاميع الكاربونيل ضمن تركيب علاج النبروكسين، والحزم (1082,1028) سم⁻¹ تعود لاهتزاز الرابطة CH=CH المتماثل وغير المتماثل، اما الحزم (860-480) سم⁻¹ تعود لاهتزاز C=CH₂ المتماثلة وغير المتماثلة.

6:1:1:4 : طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) مع المركب النانوي ZnO

:الكروي ZnO/MTX

يظهر الشكل (4-6) طيف الأشعة للزنك النانوي المحمل بالميثوتريكسات و يلاحظ فيه اضافة الى حزم اوكسيد الزنك النانوي الحر المحضر انفة الذكر ظهور ترددات روابط MTX المتداخلة مع ترددات ZnO النانوي وهي (1558، 1606)، (1384، 1508) سم⁻¹ والتي تعود الى مجاميع الامين والفنيل التي يتضمنها تركيب علاج MTX إذ تظهر متداخلة مع طيف ZnO النانوي، مما يدل بشكل واضح على ان تحميل الـ MTX قد تم فعلا على سطح الزنك النانوي عن طريق روابط مجاميع الامين (NH₂) الهيدروجينية (Li et al.,2005).

7:1:1:4 : طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) مع المركب النانوي

:(Agnano/MTX) Agnano

ان أطياف FTIR لتراكيبات الجسيمات المتناهية الصغر المحملة على سطوح نانوية تتوافق مع تركيبات الشكلان(4-7,4 أن الجسيمات النانوية ذات الخصائص الكيميائية الممتلة لمركب MTX قد اظهرت اختلافات في أطياف FTIR بين تركيبات جسيمات الفضة النانوية و MTX المحمل (الشكل 4-7). وكانت القمم الإضافية التي لوحظت في تركيبات المركب النانوي المحمل بـ MTX وجود الحزم عند الترددات (1459-1638 سم⁻¹) الممتلة لمجموعة الأمين وكذلك مجموعة الفينيل العائدة للتركيب الكيميائي MTX والتي ظهرت عند الترددات (1633 سم⁻¹). هذه الاطياف تثبت بشكل قاطع ان الـ MTX قد تم تحميله على سطح جسيمات الفضة النانوية بواسطة روابط هيدروجينية H-NH₂ ومجموعات الامين من MTX (Sintubin et al., 2009).

8:1:1:4 طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) مع المركب النانوي Xerogel (Xerogel/MTX):

نتائج الشكل (4-8) لطيف الاشعة تحت الحمراء لمركب Xerogel المحمل بعلاج MTX تظهر وجود حزمة كبيرة مستعرضة عند (3333 سم⁻¹) تعزى الى مجاميع الهيدروكسيل لمركب Xerogel والكحولات المستخدمة في تحضيره ، تتخلل هذه الحزمة ترددات تعود الى إمتزاز (Adsorption) جزيئة الماء فيزيائيا اذ تتراكم في هذه المنطقة ، الحزمة (1634 سم⁻¹) تعزى الى مجاميع الامين (NH) وكذلك لامتطاط رابطة الهيدروكسيل (OH) ، اما الحزمة المستعرضة عند (1341 سم⁻¹) هي لاهتزازات رابطة الكربونيل الموجودة ضمن تركيب الـ MTX ، الحزم (1083 ، 1043) سم⁻¹ على التوالي تعزى الى رابطة (C=C) ، الترددات (800-400) سم⁻¹ تعود لاهتزاز الرابطة المعدنية (MO) (Ibrahim & Ibrahim, 2013).

يستدل من خلال هذا الطيف تأكيد تحميل علاج الميثوتركسات على مركب Xerogel من خلال اختفاء الاهتزازات التي تخص مجموعة الكربونيل اذ اختزلت بسبب اختزال الفضة او اختزال مركب الـ Xerogel الى مركب نانوي (Schiavon, 2000).

9:1:1:4 طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) مع المركب النانوي ZnO (ZnO/NAP):

يظهر الشكل (4-9) تأكيد تحميل مركب ZnO النانوي بعلاج النبروكسين من خلال وجود الحزمة الكبيرة المستعرضة عند 3331 سم⁻¹ والتي تعود لاهتزاز مجاميع الهيدروكسيل وبتراكيب معها مجاميع CH₂,CH₃ التي تعود للنبروكسين ، ونجد ان حزم النبروكسين قد تم ازاحتها عن مواقعها قليلا التي ظهرت في طيف مركب ZnO للنبروكسين تم ازاحتها الى 1604 سم⁻¹ ، الحزمة 1458 سم⁻¹ ، قد تم ازاحتها الى 1538 سم⁻¹ ، الحزمة 1390 بقيت في مكانها تقريبا ، ان هذه الازاحات للحزم انفة الذكر يعزى سببها الى وجود تآصر بين مجاميع النبروكسين وسطح الزنك النانوي عن طريق مجاميع الرابطة الهيدروجينية المتواجدة على ذرات الاوكسجين والهيدروجين ، بينا بقيت الحزم 1267 و 1226 سم⁻¹ التي تعود للنبروكسين في نفس تردداتها تقريبا على سطح مركب الزنك (ZnO) النانوي .

ان الحزمة 1082 سم⁻¹ قد تم ازاحتها الى الموقع الجديد (1076 سم⁻¹) ، الترددات بين (400-923 سم⁻¹) تمثل اهتزازات مجاميع الكربوكسيل وكذلك مجاميع تعود لرابطة الزنك النانوي المعدنية (MO) (Satvekar et al., 2012).

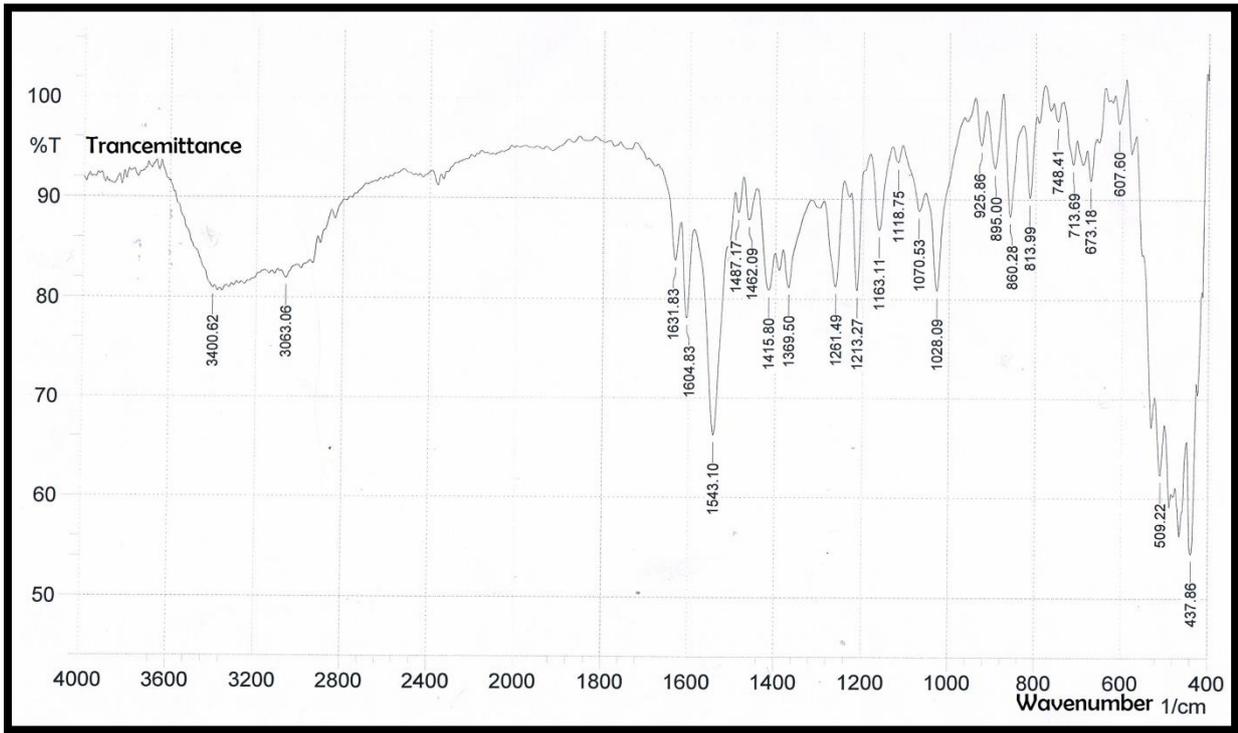
4:1:1:10: طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) مع المركب النانوي Xerogel (Agnano/NAP):

تعود الحزمتان (3213 ، 3194) سم⁻¹ إلى الفضة النانوية (Agnano) المثبتة بالكلوكوز مع طيف علاج النبروكسين، كما تعود الحزم (3001 ، 2972 ، 2939) سم⁻¹ على التوالي والعائدة لاهتزازات روابط النبروكسين (NAP) اذ تميزت هذه الحزم مع طيف الفضة النانوية مع بعض الازاحات ، كذلك الحزمة الكبيرة الموجودة في طيف الفضة عند (1633 سم⁻¹) قد ازيحت الى الموقع الجديد (1728) سم⁻¹ بسبب الترابط السطحي للفضة النانوية بالنبروكسين (NAP-Agnano) ، كما ظهرت الاهتزازات الناتجة عن تراكب النبروكسين الحر بين (600-1502) سم⁻¹ مع الفضة النانوية بعد تحميلها بالعلاج ، كما ان الحزمة (682 سم⁻¹) المستعرضة في طيف الفضة النانوية تظهر البدء باهتزازات واضحة بروابط النبروكسين وهذا ما يؤكد بشكل قاطع تحميل العلاج على المركب النانوي المحضر.

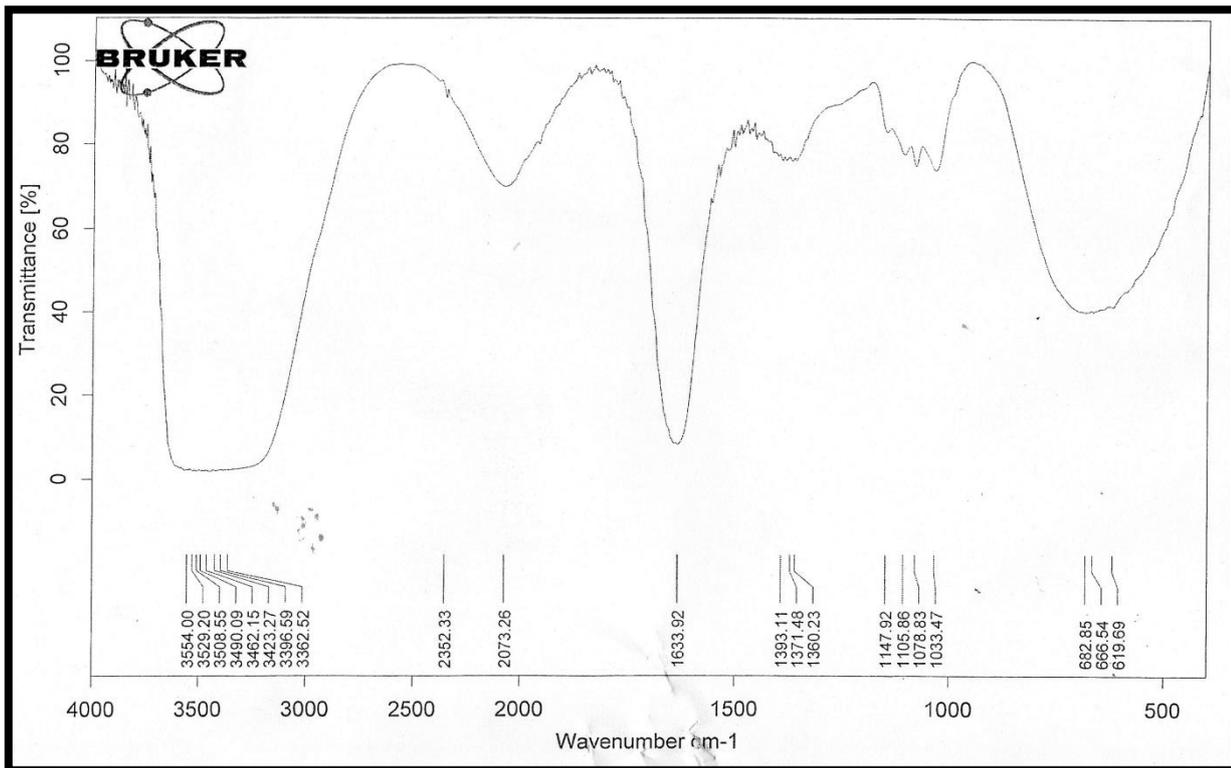
4:1:1:11: طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) مع المركب النانوي Xerogel (Xerogel/NAP):

ان ظهور الحزمة الكبيرة المستعرضة عند (3319 - 3258) سم⁻¹ تمثل الاهتزازات التابعة لمجموعة الهيدروكسيل ومجاميع الماء الممتز فيزيائيا ومجاميع الروابط الهيدروجينية ، والحزمة (1603 سم⁻¹) تعود لامتطاط رابطة الهيدروكسيل ظهرت في طيف الأشعة تحت الحمراء لمركب Xerogel النانوي المحمل بعلاج النبروكسين عند (1633 سم⁻¹) .

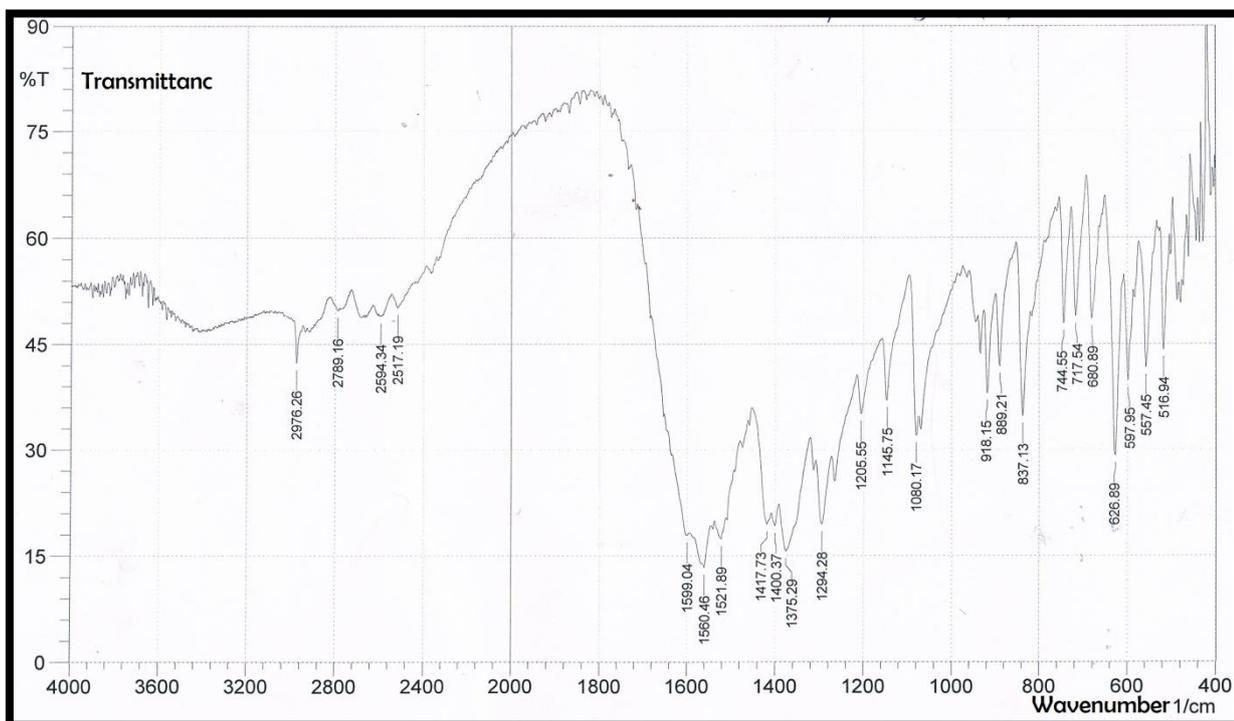
الحزمة (1390) سم⁻¹ الحادة والمتناظرة قد تراكبت مع حزم الـ Xerogel تم ازاحتها إلى 1342 سم⁻¹، الحزمة (1226.77 سم⁻¹) بقيت في مكانها تقريبا اذ ظهرت عند (1227 سم⁻¹) ، اما الحزمة (1267.27 سم⁻¹) قد تراكبت وازيحت الى موقع جديد عند (1193 سم⁻¹) ، في حين ان الحزمة 1168.9 سم⁻¹ ازيحت الى الموقع (1193.9 سم⁻¹) وهذا سببه يعود الى وجود ترابط بين مجاميع النبروكسين وسطح مركب الـ Xerogel النانوي ، والحزم بين (400-900) سم⁻¹ التي تعود لمجاميع MO وهذه حزم طبيعية ()
.Wiley et al., 2005 ; Lefton et al., 2005 ; Wang , 2000



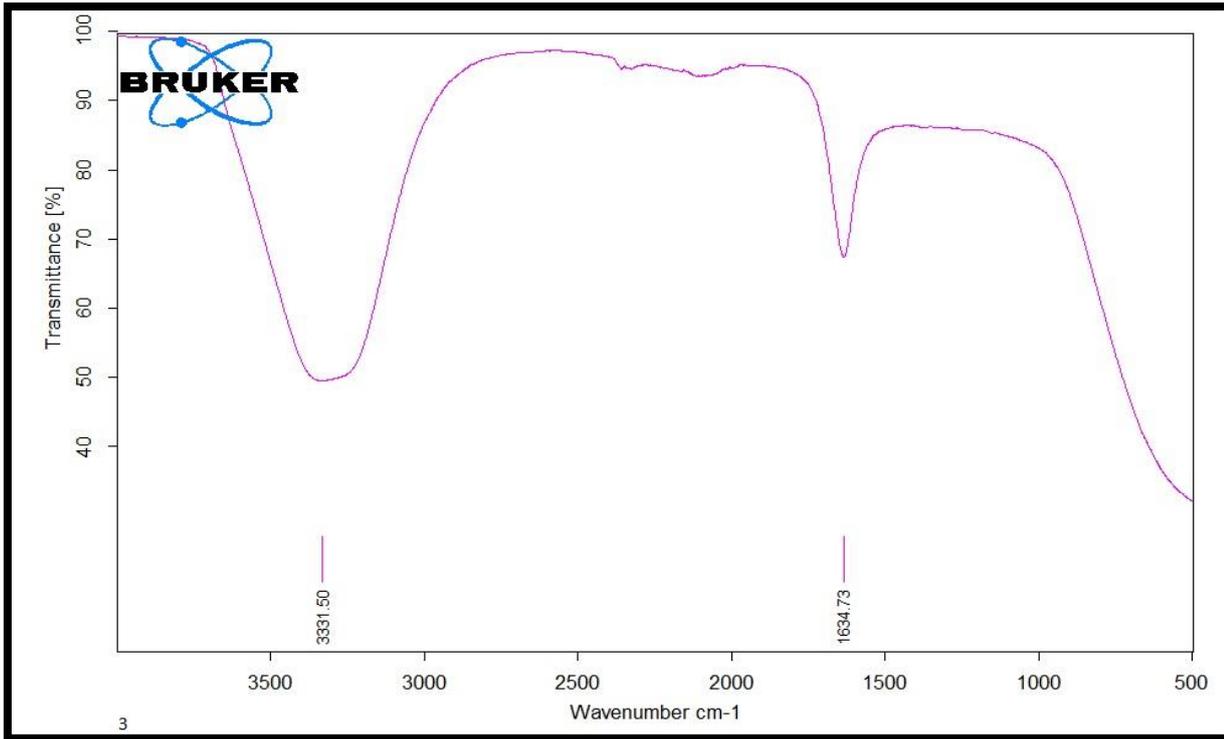
شكل (4-1) طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لأكسيد الزنك الكروي (ZnO) الحر :



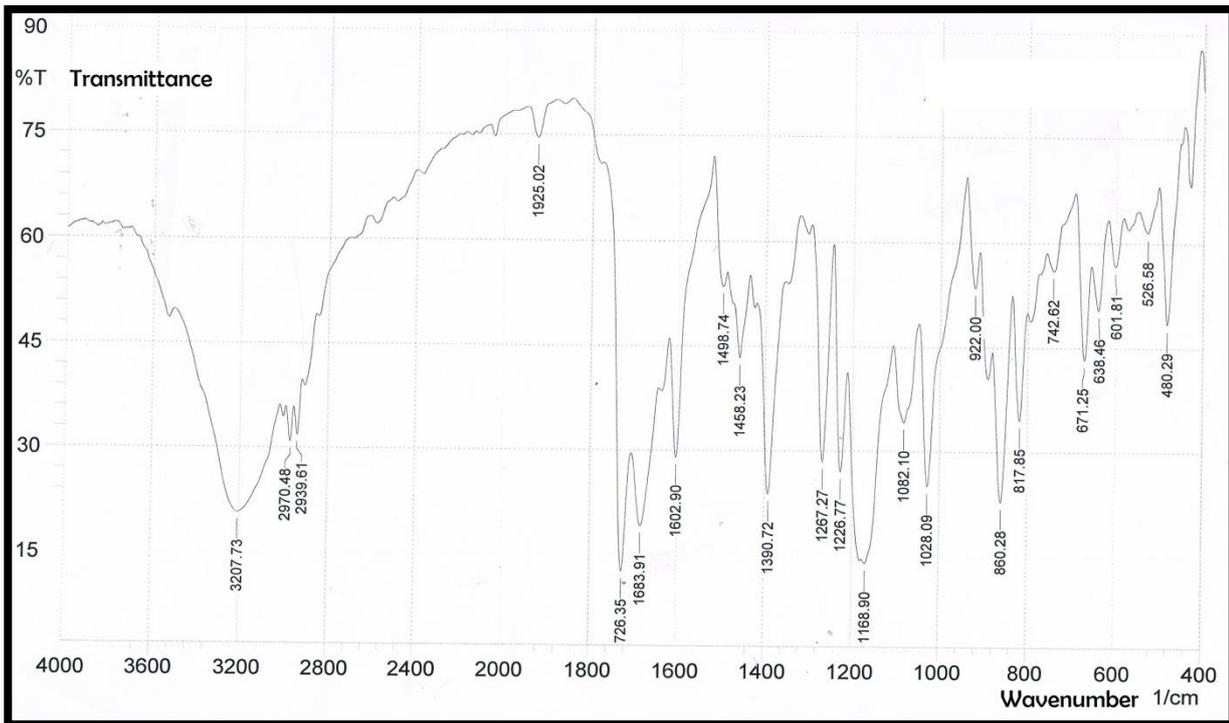
شكل (4-2) طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR للفضة النانوية الحرة (Ag nano) :



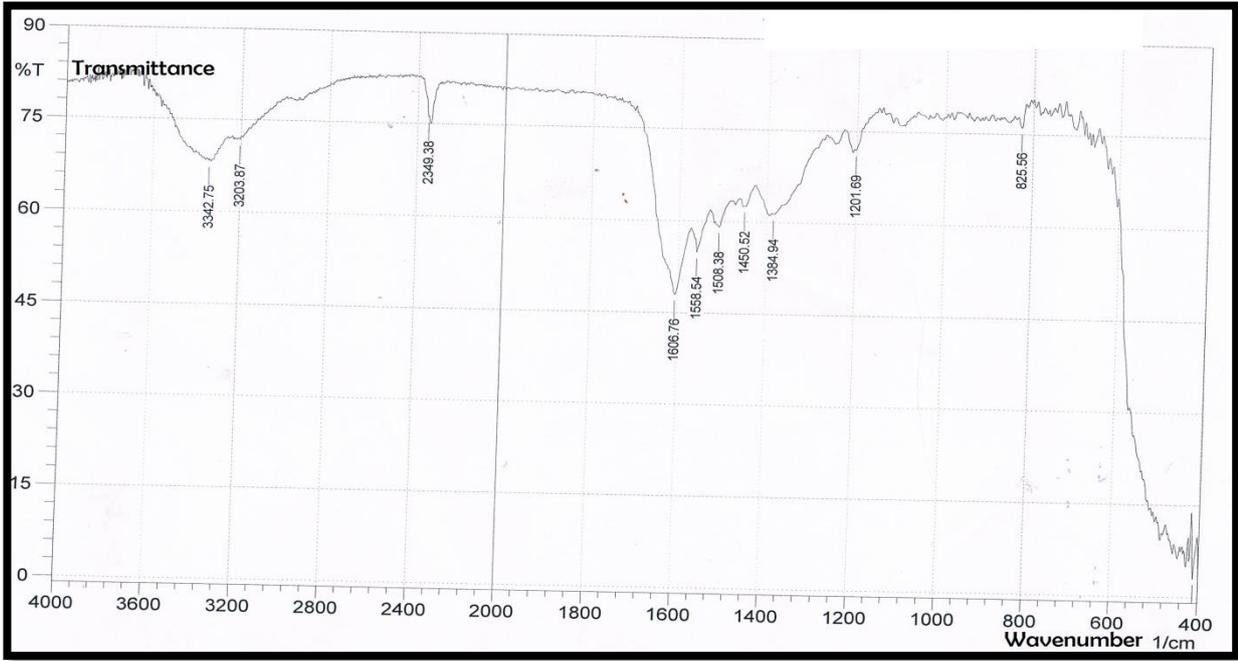
شكل (4-3) طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لمركب Xerogel النانوي الحر :



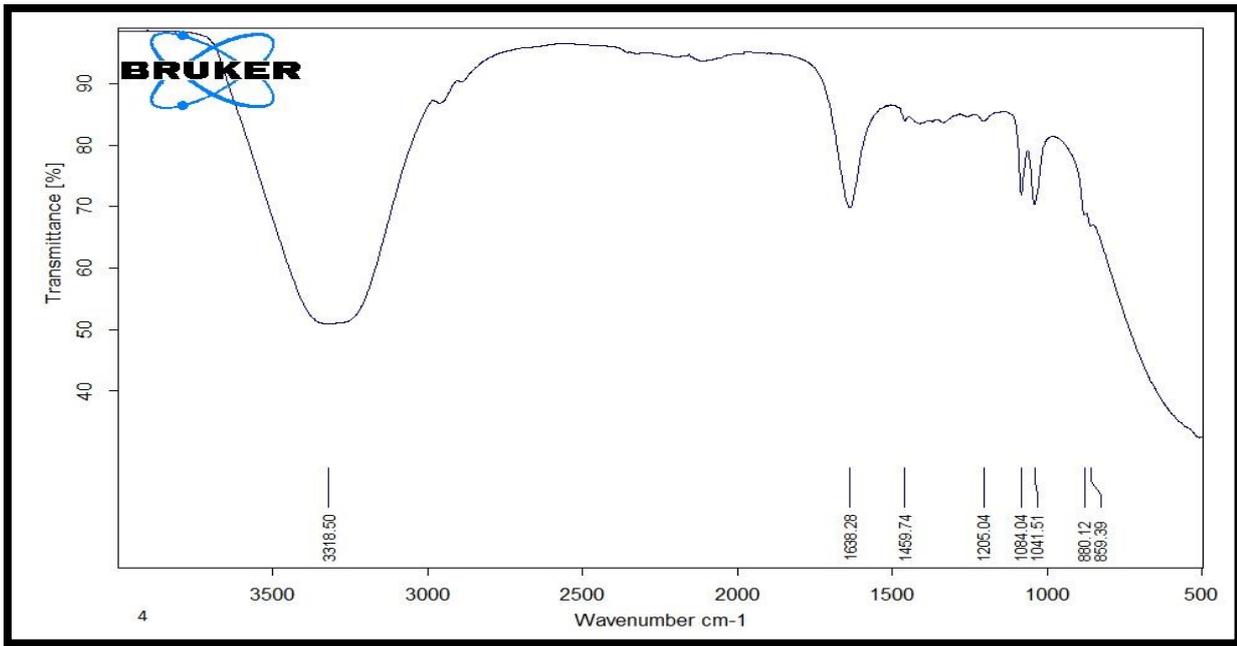
شكل (4-4) طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) الحر



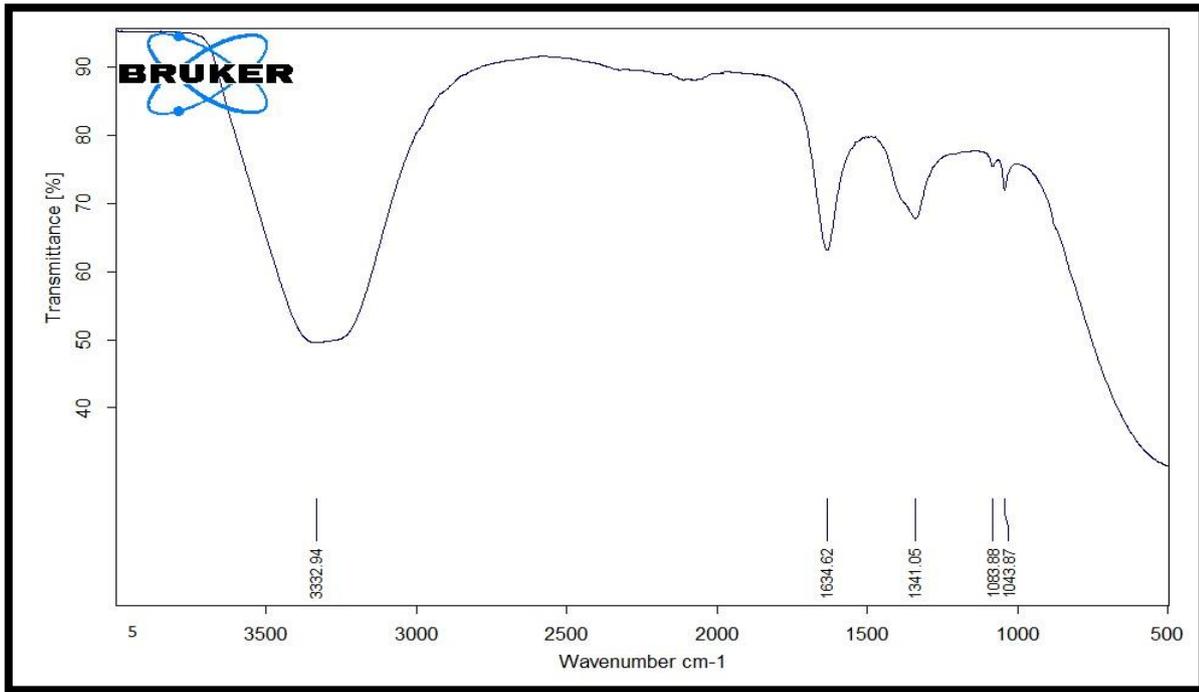
شكل (4-5) طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) الحر:



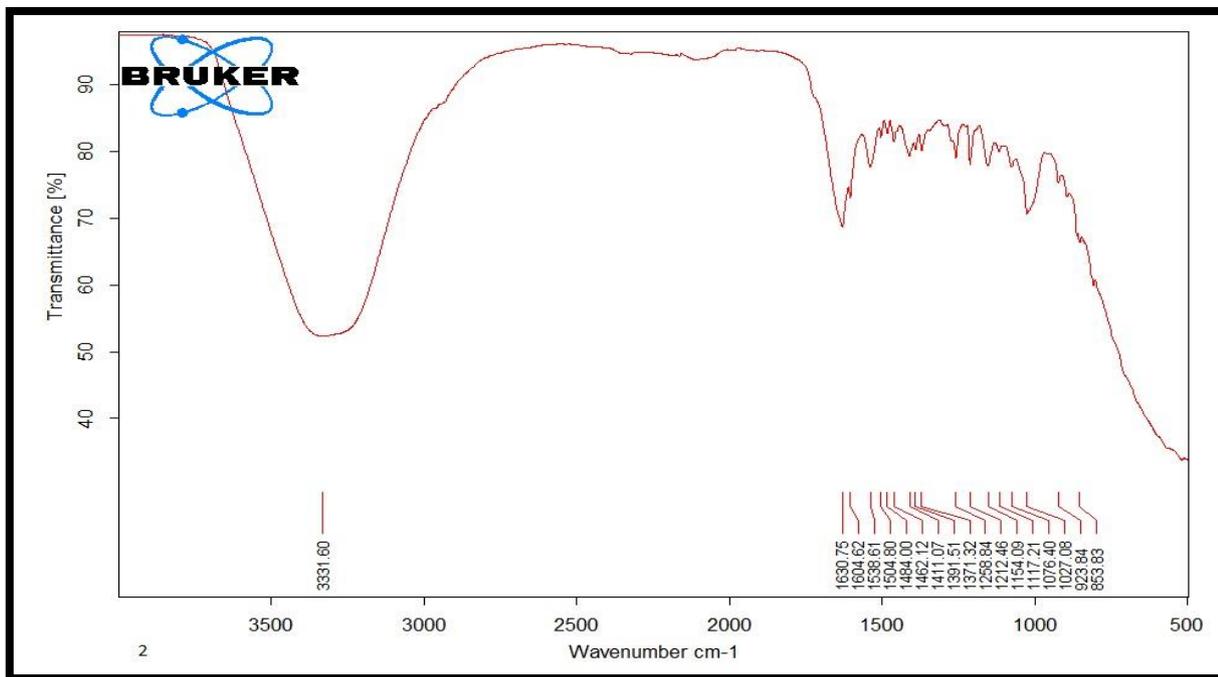
شكل (4-6) طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) مع المركب النانوي ZnO الكروي ZnO/MTX:



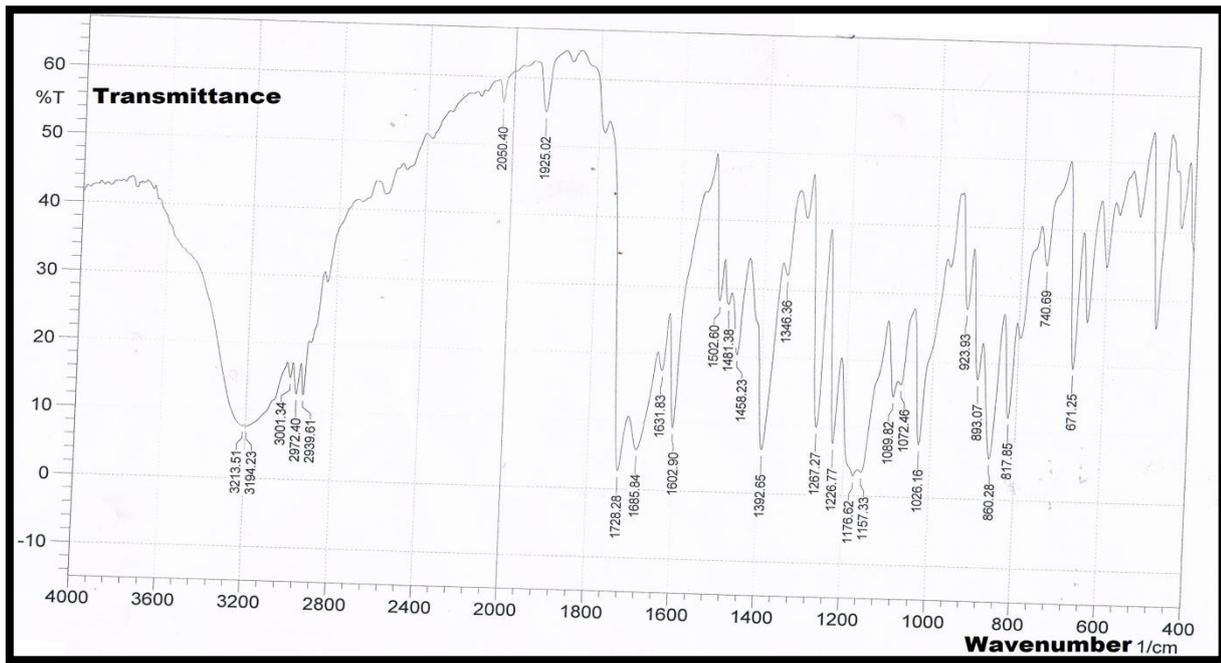
شكل (4-7) طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) مع المركب النانوي Agnano (Agnano/MTX):



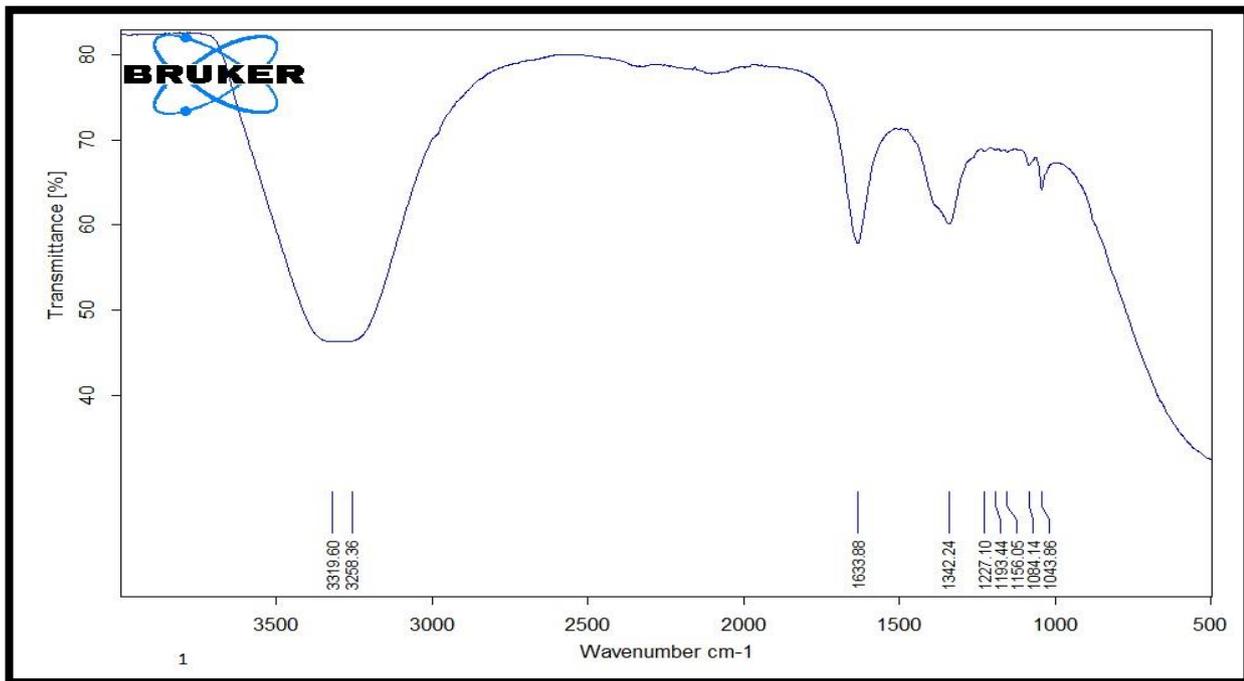
شكل (4-8) يبين طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (MTX) مع المركب النانوي Xerogel/(Xerogel/MTX):



شكل (4-9) يبين طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) مع المركب النانوي ZnO (ZnO/NAP):



شكل (4-10) يبين طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) مع المركب النانوي Ag (Agnano/NAP):



شكل (4-11) يبين طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR لعلاج (NAP) مع المركب النانوي Xerogel (Xerogel/NAP):

2:1:4: مجهر القوة الذرية Atomic Force Microscopie(AFM)

4:1:2:1: صور مجهر القوة الذرية لمركب اوكسيد الزنك النانوي الحر والمحمل بعلاجي الميثوتركسات والنبروكسين :

الشكل (4-12) يوضح السطح الخارجي للجزيئات النانوية لمركب ZnO النانوي الحر ، اذ يتم حساب خشونة هذا السطح ومربع الجذر التربيعي حسب المعادلة :

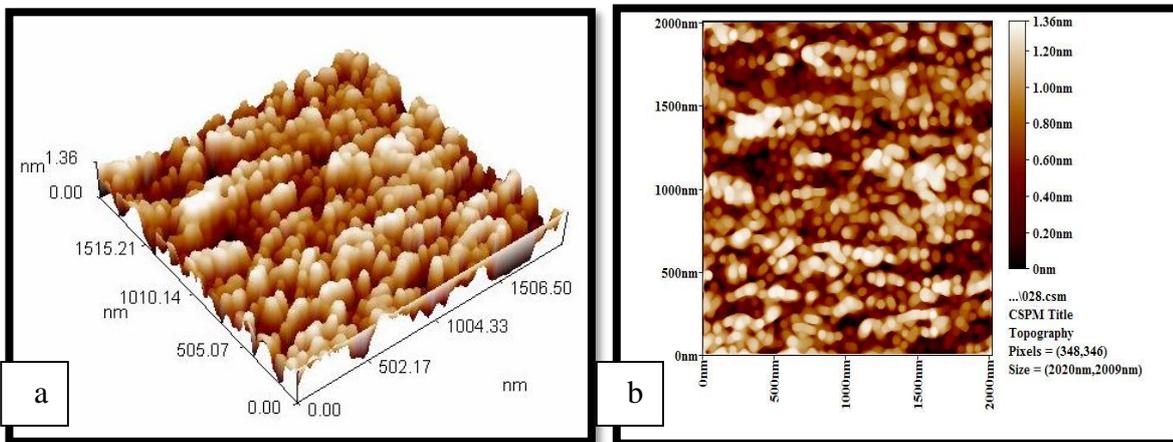
$$Rm \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(Z_i - Z_{av})^2}{N}}$$

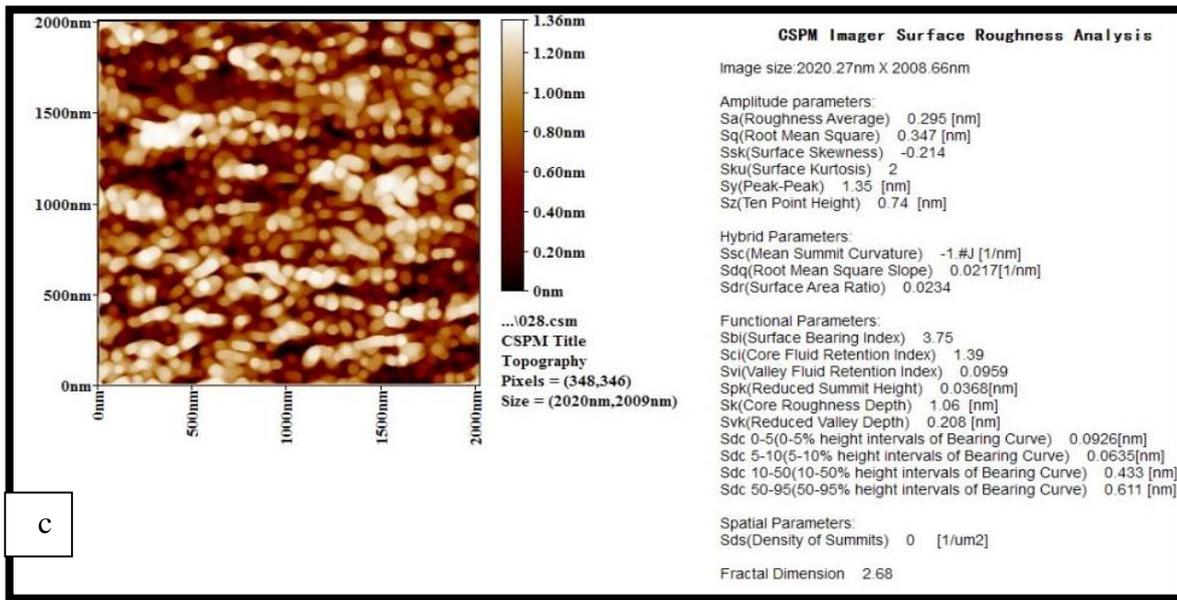
حيث ان $Z = N$ = عدد النقاط المقاسة :

كان معامل الخشونة لسطح المركب النانوي الحر يساوي 0.295 nm (جدول 1-4) وعند تحميل علاج الميثوتركسات فقد اصبح هذا المعامل المقاس 1.35 nm اي اصبح الفرق قبل وبعد التحميل 1.055 nm ، اما اوكسيد الزنك المحمل بالنبروكسين وصل قياس معامل الخشونة الى 0.78 nm والفرق بين القياس قبل وبعد التحميل وصل 0.485 nm ، وهذا يدل دلالة واضحة على ان حجم الجزيئة المحمل على السطوح النانوية يلعب دورا هاما في خشونة السطح ونظامه البلوري المنتظم وكذلك التجانس السطحي.

ان معدل الجذر التربيعي لاوكسيد الزنك النانوي الى 0.347 nm (جدول 1-4) بينما لاوكسيد الزنك المحمل بالميثوتركسات 1.58 nm ليكون الفرق بمعدل الجذر التربيعي قبل وبعد التحميل 1.233 nm ، اما في حالة تحميل اوكسيد الزنك بالنبروكسين وصل معدل الجذر التربيعي لـ 0.905 nm وهنا يكون الفرق بين معدل الجذر التربيعي لاوكسيد الزنك قبل وبعد التحميل 0.558 nm وكلما زاد هذا الفرق كانت هناك زيادة في التركيب البلوري الناتج بعد التحميل عما هو قبل التحميل.

تشير نتائج الجداول (4-1 ، 2 ، 3 ، 4) الى ان معدل الحجم الجزيئي لمركب ZnO النانوي قبل التحميل كان بحدود 70.76 nm ، اما بعد تحميله على علاج الـ MTX اصبح 91.75 nm في حين كان هذا الحجم بحدود 105.62 nm بعد تحميل علاج الـ NAP عليه ، فيما كانت نسب الحجم الجزيئية لمركب الـ ZnO النانوي التي بحدود الاقل من 50.00 nm بنسبة 10% ، والتي بحدود الاقل من 70.00 nm تصل الى 50% اما التي ضمن الحدود الاقل من 85.00 nm بنسبة 90% ، وكانت الحجم الجزيئية للمركب النانوي MTX/ ZnO كانت الجزيئات ضمن حدود الاقل من 45.00 nm تصل الى نسبة 10% والتي بحدود الاقل من 85.00 nm سجلت نسبة 50% اما نسبة 90% كانت للحجوم التي ضمن الحدود الاقل من 135.00 nm ، اما ارتفاع الجزيئة النانوية لمركب الـ ZnO الحر وصل الى 1.36 nm اما بعد تحميله بعلاج NAP,MTX كان الارتفاع 5.72 nm ، 3.35 nm على التوالي الاشكال (4-12 ، 14 ، 16).



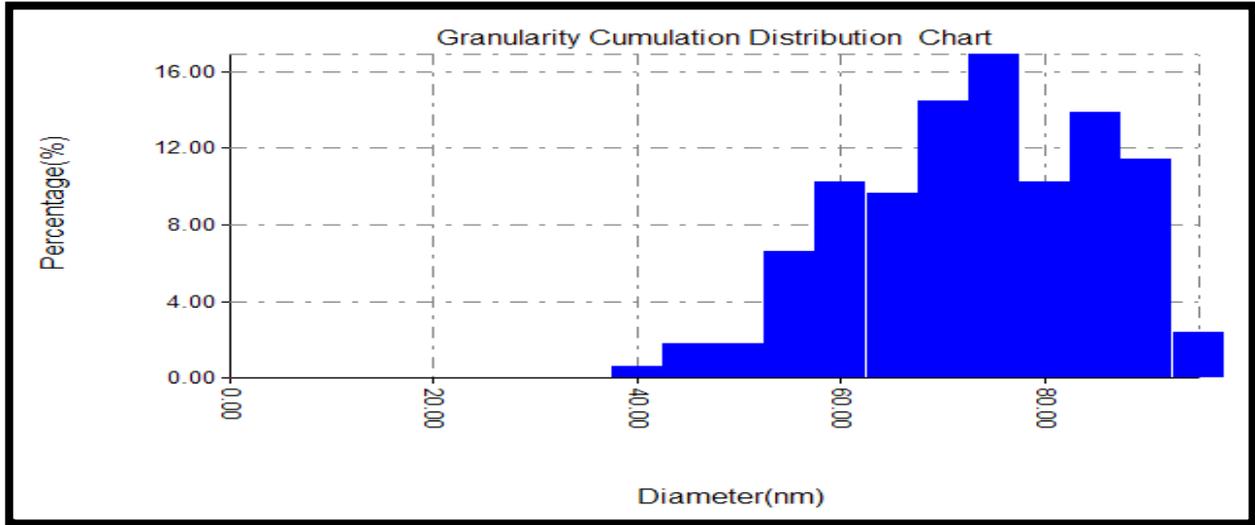


شكل (4-12) صور مجهر القوة الذرية لمركب اوكسيد الزنك الحر a / صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات

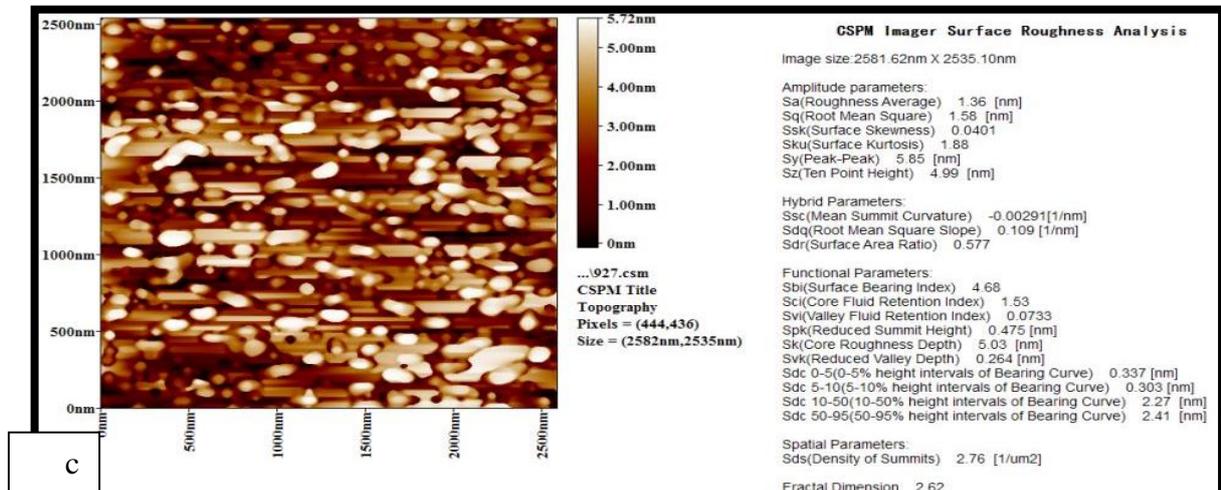
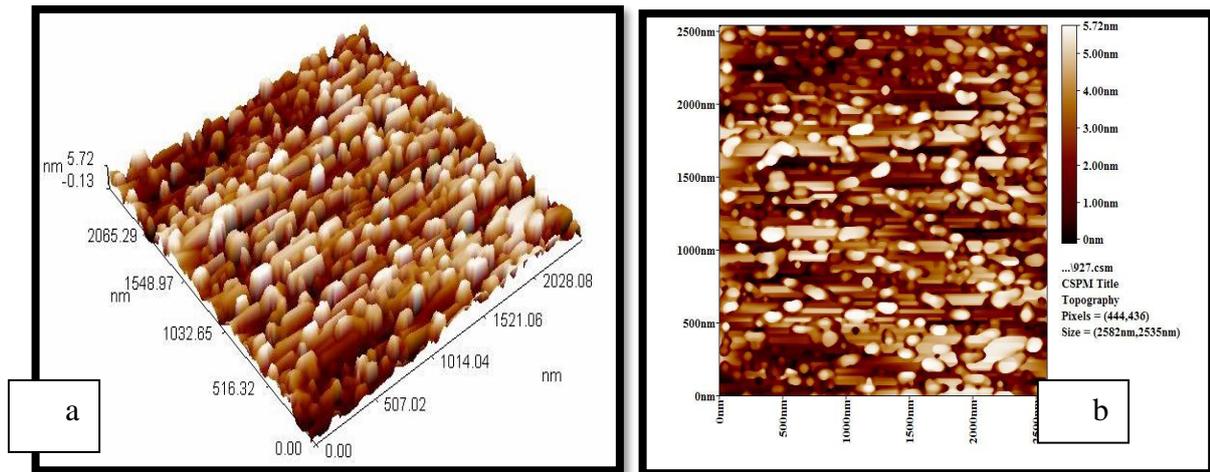
جدول (4-1) يبين المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب ZnO النانوي الحر والنسب المختلفة لتلك الحجوم :

Avg. Diameter:70.76 nm	<=10% Diameter:50.00 nm
<=50% Diameter:70.00 nm	<=90% Diameter:85.00 nm

Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)	Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)	Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)
40.00	0.60	0.60	60.00	10.24	21.08	80.00	10.24	72.29
45.00	1.81	2.41	65.00	9.64	30.72	85.00	13.86	86.14
50.00	1.81	4.22	70.00	14.46	45.18	90.00	11.45	97.59
55.00	6.63	10.84	75.00	16.87	62.05	95.00	2.41	100.00



شكل (4-13) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب الـ ZnO النانوي الحر :

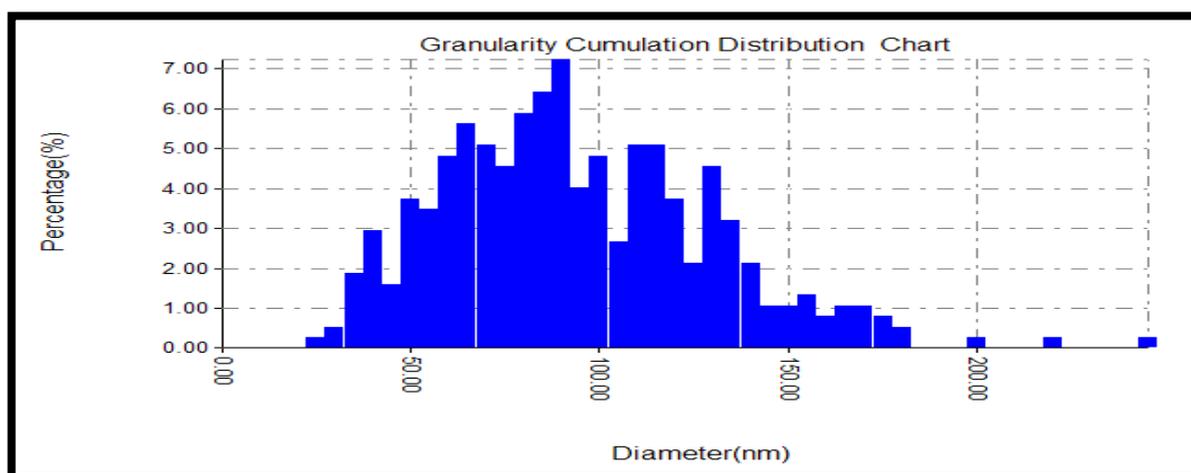


شكل (4-14) صور مجهر القوة الذرية لمركب ZnO/ MTX /a صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات :

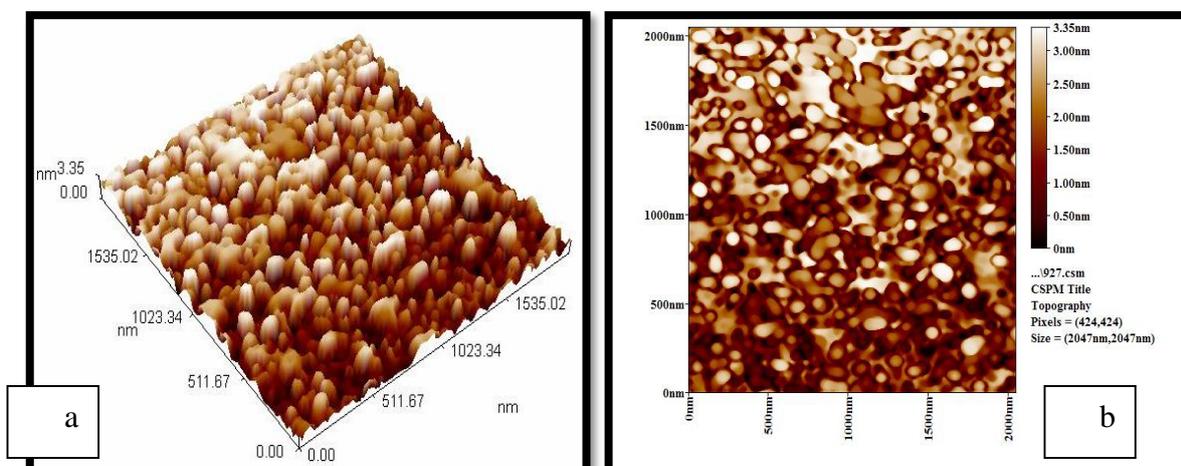
جدول (4-2) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب ZnO/ MTX والنسب المختلفة لتلك الحجوم :

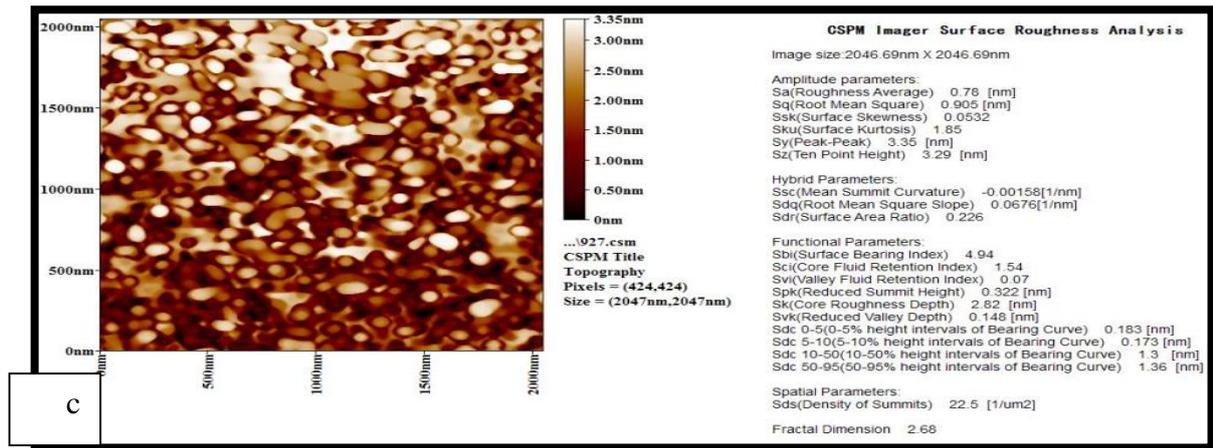
Avg. Diameter:91.75 nm	<=10% Diameter:45.00 nm
<=50% Diameter:85.00 nm	<=90% Diameter:135.00 nm

Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)
25.00	0.27	0.27	85.00	6.42	46.79	145.00	1.07	92.51
30.00	0.53	0.80	90.00	7.22	54.01	150.00	1.07	93.58
35.00	1.87	2.67	95.00	4.01	58.02	155.00	1.34	94.92
40.00	2.94	5.61	100.00	4.81	62.83	160.00	0.80	95.72
45.00	1.60	7.22	105.00	2.67	65.51	165.00	1.07	96.79
50.00	3.74	10.96	110.00	5.08	70.59	170.00	1.07	97.86
55.00	3.48	14.44	115.00	5.08	75.67	175.00	0.80	98.66
60.00	4.81	19.25	120.00	3.74	79.41	180.00	0.53	99.20
65.00	5.61	24.87	125.00	2.14	81.55	200.00	0.27	99.47
70.00	5.08	29.95	130.00	4.55	86.10	220.00	0.27	99.73
75.00	4.55	34.49	135.00	3.21	89.30	245.00	0.27	100.00
80.00	5.88	40.37	140.00	2.14	91.44			



شكل (4-15) يبين توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب الـ ZnO/ MTX:



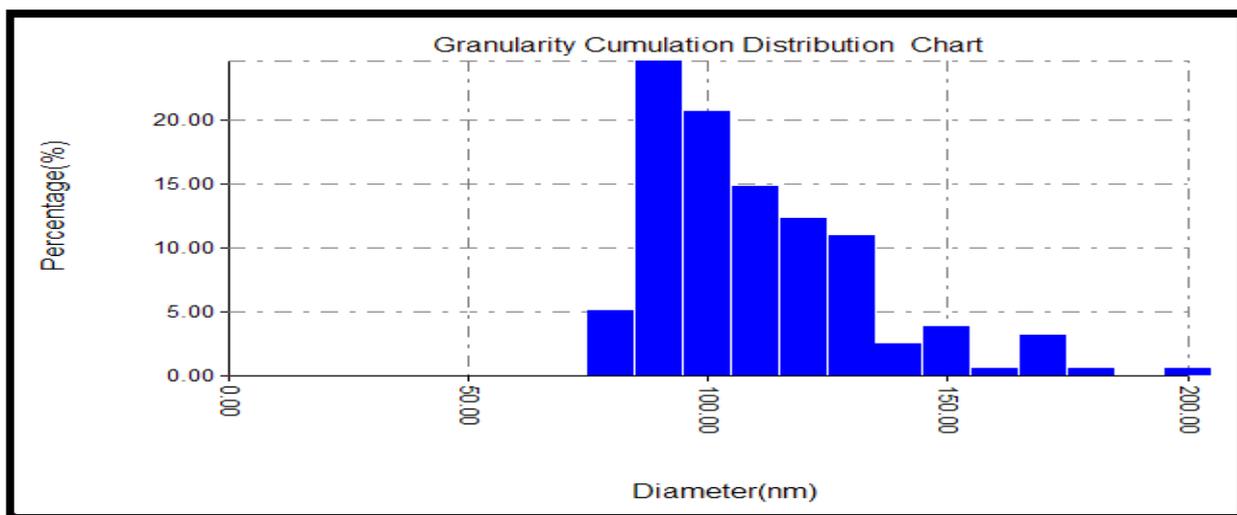


شكل (4-16) صور مجهر القوة الذرية لمركب ZnO/ NAP /a صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات :

جدول (4-3) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب ZnO/ NAP والنسب المختلفة لتلك الحجوم :

Avg. Diameter:105.62 nm	<=10% Diameter:80.00 nm
<=50% Diameter:90.00 nm	<=90% Diameter:130.00 nm

Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)	Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)	Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)
80.00	5.16	5.16	120.00	12.26	77.42	160.00	0.65	95.48
90.00	24.52	29.68	130.00	10.97	88.39	170.00	3.23	98.71
100.00	20.65	50.32	140.00	2.58	90.97	180.00	0.65	99.35
110.00	14.84	65.16	150.00	3.87	94.84	200.00	0.65	100.00



شكل (4-17) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب ZnO/ NAP:

جدول (4-4) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات ومعدل الجذر التربيعي لخشونة السطح لمركب ZnO قبل وبعد تحميل علاج NAP و MTX:

ZnO NP	معدل قطر الجزيئة nm	معدل خشونة السطحnm	معدل الجذر التربيعي nm	البعد بين قمتين متتاليتين nm	معدل ارتفاع عشر قمم nm	معدل عمق القلب nm
ZnO NP/ Free	70.76	0.295	0.347	1.35	0.74	1.06
ZnO NP/ MTX	91.75	1.35	1.58	5.85	4.99	5.03
ZnO NP/ NAP	105.62	0.78	0.905	3.35	3.29	2.82

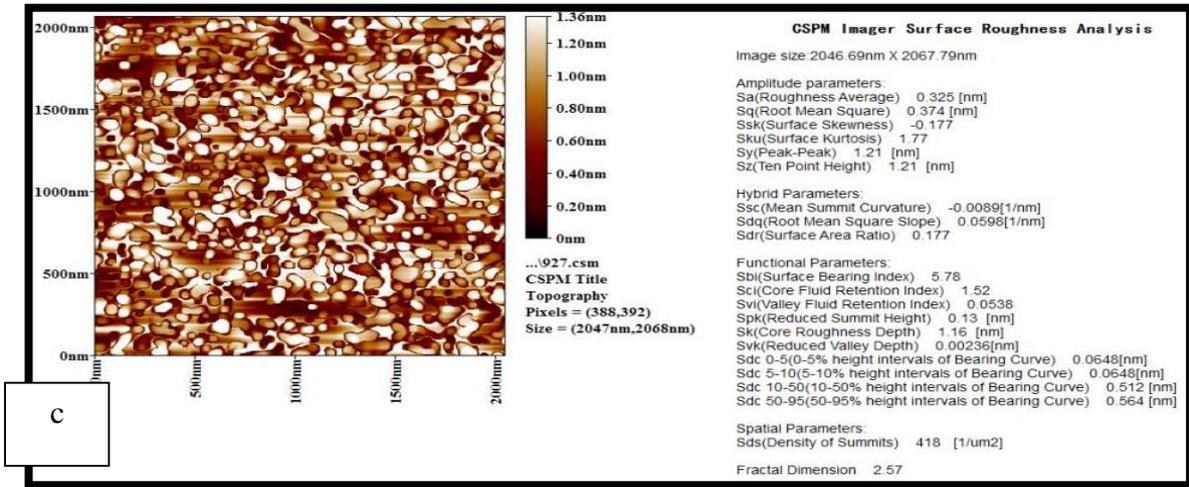
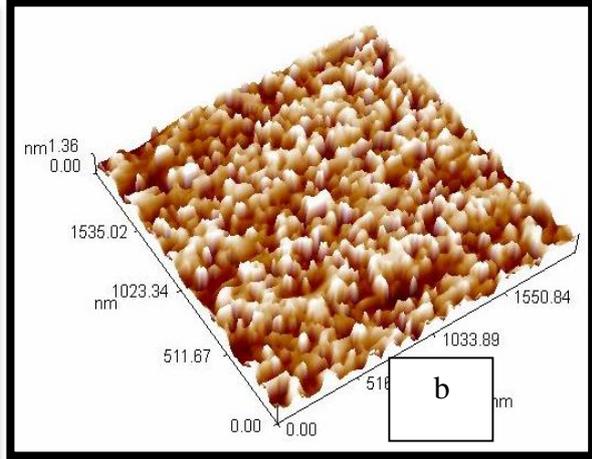
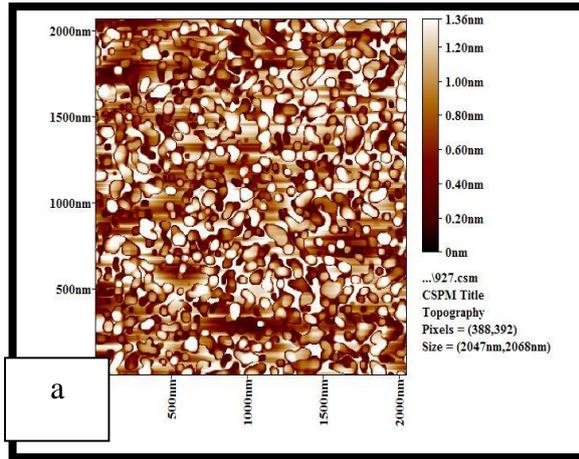
2:1:4:2: صور مجهر القوة الذرية لمركب الفضة النانوي الحر والمحمل بعلاجي

الميثوتركسات والنبروكسين :

تشير نتائج الأشكال (4-18، 20، 22) لصور مجهر القوة الذرية للفضة الحرة والمحملة بالميثوتركسات والنبروكسين على التوالي الى ان معامل خشونة السطح الخارجي لمركب الفضة النانوية الحرة وصل الى 0.325nm والفضة المحملة بالميثوتركسات هو 0.5 nm بحيث يكون الفرق بين الفضة قبل وبعد التحميل بالميثوتركسات 0.075 nm، اما في حالة تحميل الفضة بعلاج النبروكسين يصل معامل الخشونة الى 0.514 nm ليكون الفرق بين الفضة قبل وبعد تحميلها بالنبروكسين يصل الى 0.189 nm ، وهذا دليل واضح على ان خشونة السطح الخارجي قد ازدادت بعد تحميل الـ MTX و NAP على سطح الفضة وهذا يزيد من إنتظام التركيب البلوري وكذلك زيادة التجانس لسطح الجزيئات النانوية ، كما ان معدل الجذر التربيعي للفضة غير المحملة بالعلاج سجل 0.347 nm بينما الفضة المحملة بالـ MTX 0.471 nm بحيث يكون الفرق 0.124 nm ، اما لدى تحميل الفضة بالنبروكسين سجل معدل الجذر التربيعي 0.602 nm بحيث يكون الفرق قبل وبعد تحميل العلاج المذكور مساوي لـ 0.225 nm، مما يشير الى زيادة البلورية وكذلك التجانس البلوري للمركب بعد التحميل عما هو قبله .

ان معدل الحجم الجزيئي للفضة النانوية (Ag nanno) قبل التحميل 45.24 nm اما بعد تحميله فقد كان المعدل الحجم الجزيئي 78.09 nm بعد تحميله بعلاج الـ MTX ، و 65.68 nm لدى تحميله بعلاج الـ NAP. مما يشير على ان العلاج بعد تحميله يعطي حجم اكبر وهذا دليل تحميل العلاج على مركب الفضة النانوي الجدول (4-8) .

كما ان نتائج الجداول (4-5، 6، 7) تشير الى نسب الحجم الجزيئية للفضة النانوية الحرة والمحملة بعلاجي الميثوتركسات والنبروكسين ، إذ سجلت الحجم الاقل من 26.00 nm لجزيئات الفضة النانوية الحرة نسبة 10% والحجم الجزيئية الاقل من 42.00 nm نسبة 50% ، وكانت النسبة العامة 90% للجزيئات النانوية الاقل من 66.00 nm، اما بعد تحميل الفضة النانوية بعلاج الميثوتركسات فكانت النسبة 10% للحجم الجزيئية الاقل من 60.00 nm ونسبة 50% للجزيئات ذات الحجم الاقل من 75.00 nm ، وكانت الحجم بشكل عام اقل 95.00 nm وبنسبة 90% ، اما الحجم الجزيئية بعد تحميل علاج النبروكسين على مركب الفضة النانوية كانت الحجم الاقل من 35.00 nm نسبتها 10% والحجم الاقل من 60.00 nm نسبتها 50% وكانت الحجم بشكل عام اقل من 90.00 nm وبنسبة 90% .

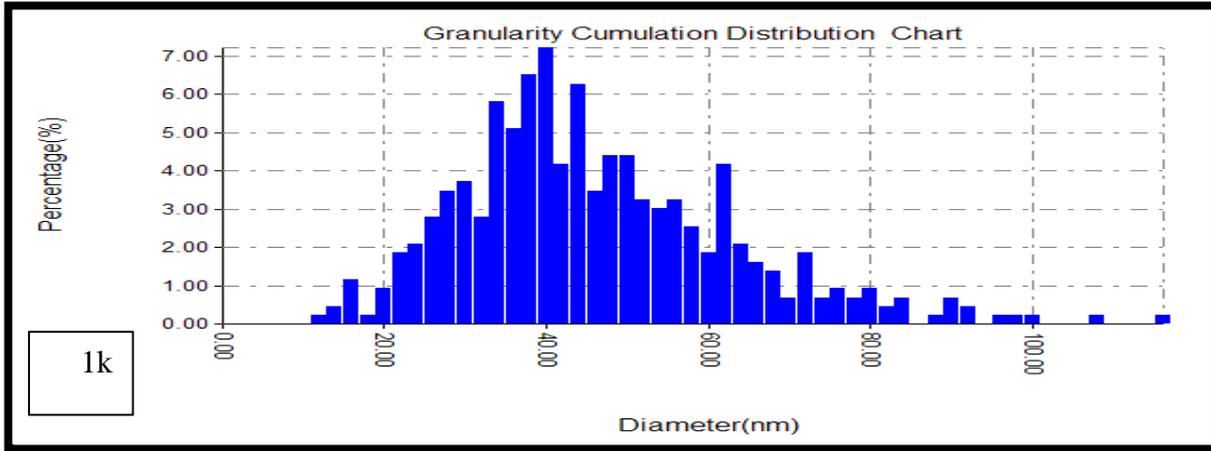


شكل (4-18) صور مجهر القوة الذرية لمركب الفضة النانوي الحر a / صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات:

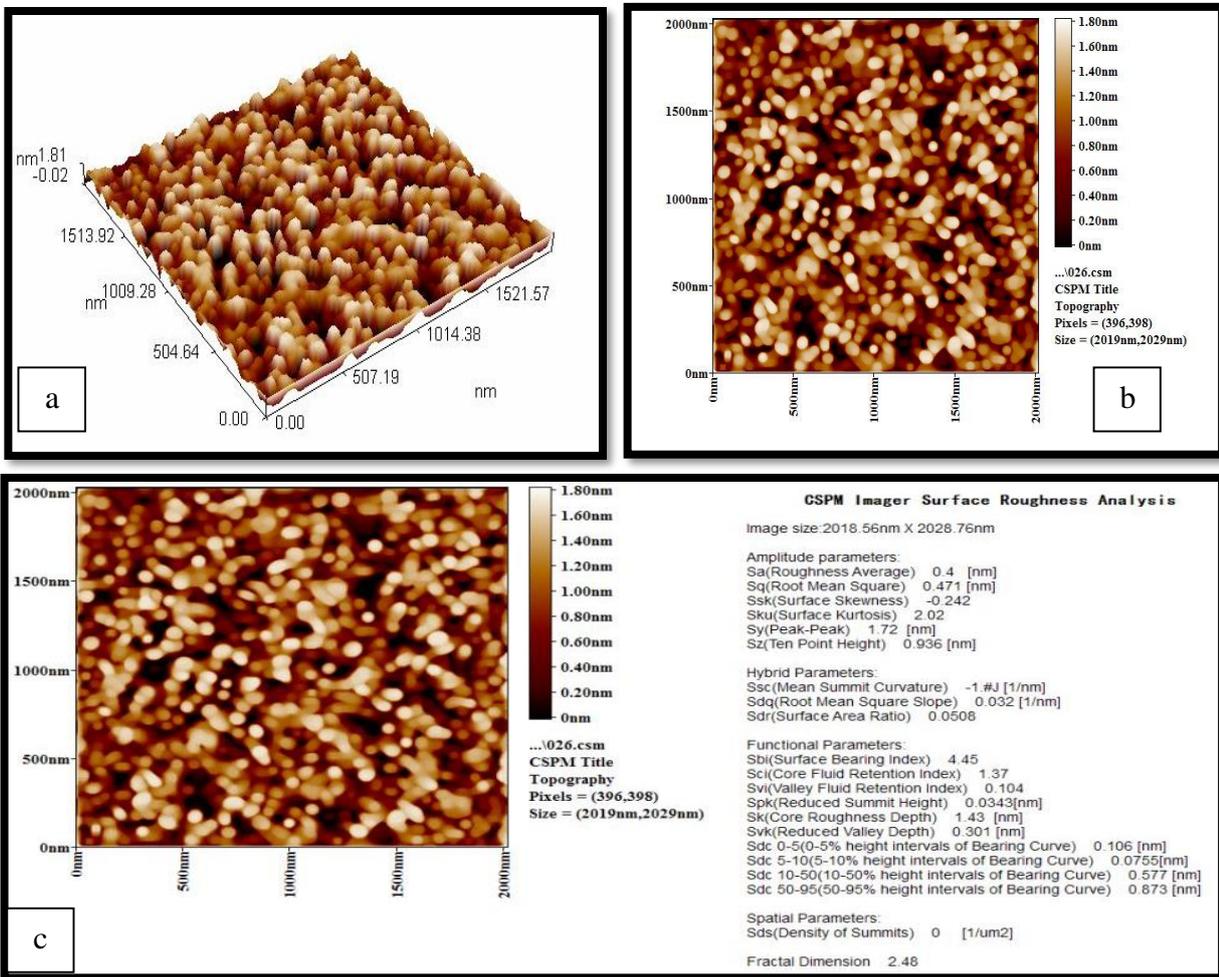
جدول (4-5) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب Ag النانوي الحر والنسب المختلفة لتلك الحجوم:

Avg. Diameter:45.24 nm	<=10% Diameter:26.00 nm
<=50% Diameter:42.00 nm	<=90% Diameter:66.00 nm

Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)
12.00	0.23	0.23	42.00	4.19	48.60	72.00	1.86	93.02
14.00	0.47	0.70	44.00	6.28	54.88	74.00	0.70	93.72
16.00	1.16	1.86	46.00	3.49	58.37	76.00	0.93	94.65
18.00	0.23	2.09	48.00	4.42	62.79	78.00	0.70	95.35
20.00	0.93	3.02	50.00	4.42	67.21	80.00	0.93	96.28
22.00	1.86	4.88	52.00	3.26	70.47	82.00	0.47	96.74
24.00	2.09	6.98	54.00	3.02	73.49	84.00	0.70	97.44
26.00	2.79	9.77	56.00	3.26	76.74	88.00	0.23	97.67
28.00	3.49	13.26	58.00	2.56	79.30	90.00	0.70	98.37
30.00	3.72	16.98	60.00	1.86	81.16	92.00	0.47	98.84
32.00	2.79	19.77	62.00	4.19	85.35	96.00	0.23	99.07
34.00	5.81	25.58	64.00	2.09	87.44	98.00	0.23	99.30
36.00	5.12	30.70	66.00	1.63	89.07	100.00	0.23	99.53
38.00	6.51	37.21	68.00	1.40	90.47	108.00	0.23	99.77
40.00	7.21	44.42	70.00	0.70	91.16	116.00	0.23	100.00



شكل (4-19) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب Ag nano الحر :

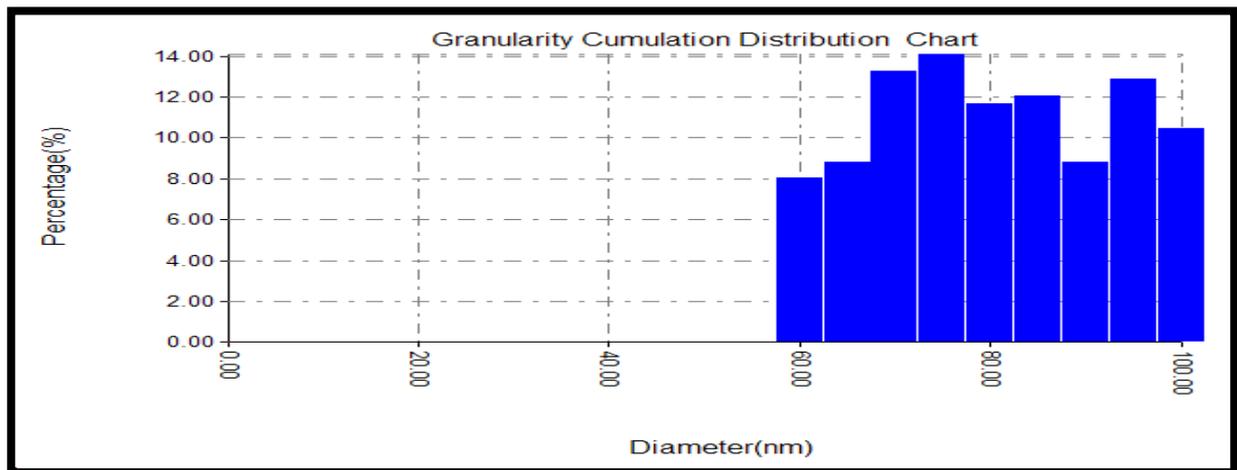


شكل (4-20) صور مجهر القوة الذرية لمركب MTX / Ag nano / a: صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات :

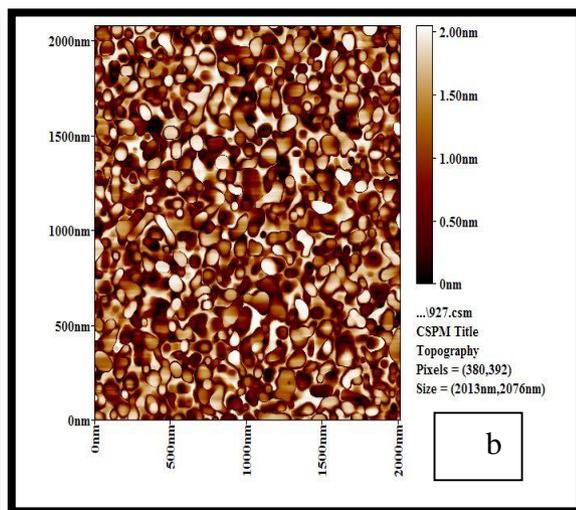
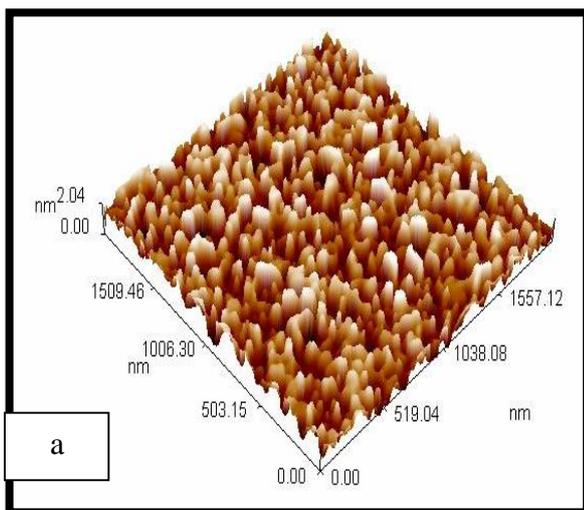
جدول (4-6) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب MTX / Ag nano والنسب المختلفة لتلك الحجوم:

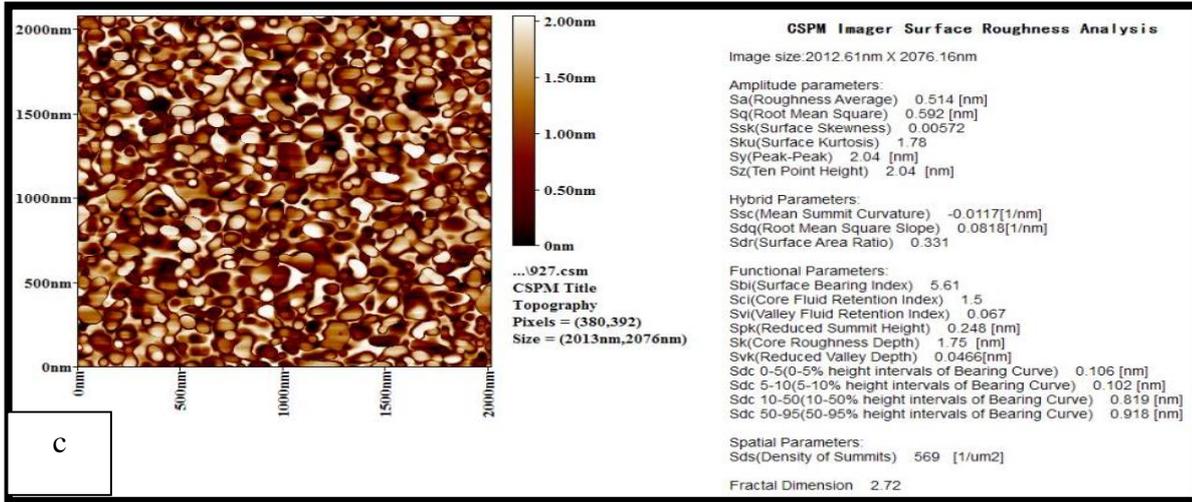
Avg. Diameter: 78.09 nm	<=10% Diameter: 60.00 nm
<=50% Diameter: 75.00 nm	<=90% Diameter: 95.00 nm

Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)	Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)	Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)
60.00	8.03	8.03	75.00	14.06	44.18	90.00	8.84	76.71
65.00	8.84	16.87	80.00	11.65	55.82	95.00	12.85	89.56
70.00	13.25	30.12	85.00	12.05	67.87	100.00	10.44	100.00



شكل (4-21) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب MTX / Ag nano :



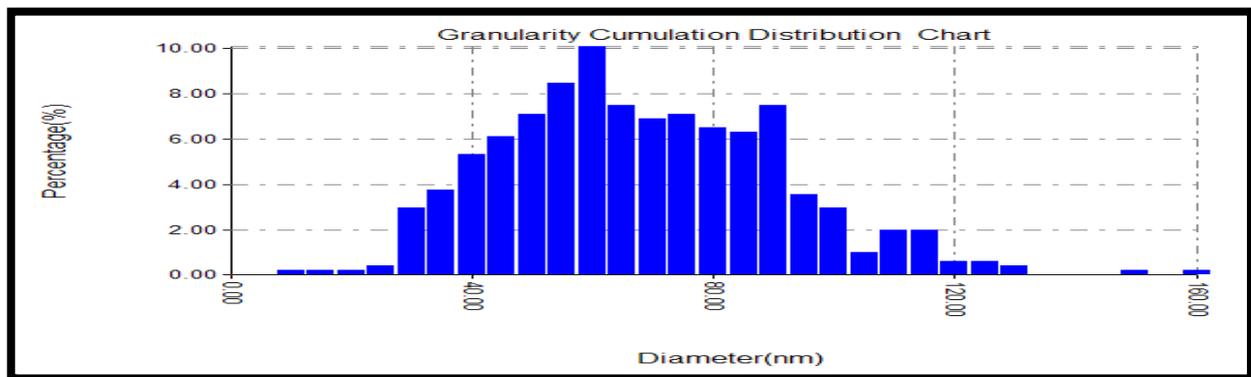


شكل (4-22) صور مجهر القوة الذرية لمركب NAP / Ag nano / a: صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات :

جدول (4-7) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب NAP/ Ag nano والنسب المختلفة لتلك الحجوم

Avg. Diameter:65.68 nm	<=10% Diameter:35.00 nm
<=50% Diameter:60.00 nm	<=90% Diameter:90.00 nm

Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)	Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)	Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)
10.00	0.20	0.20	55.00	8.48	34.71	100.00	2.96	93.10
15.00	0.20	0.39	60.00	10.06	44.77	105.00	0.99	94.08
20.00	0.20	0.59	65.00	7.50	52.27	110.00	1.97	96.06
25.00	0.39	0.99	70.00	6.90	59.17	115.00	1.97	98.03
30.00	2.96	3.94	75.00	7.10	66.27	120.00	0.59	98.62
35.00	3.75	7.69	80.00	6.51	72.78	125.00	0.59	99.21
40.00	5.33	13.02	85.00	6.31	79.09	130.00	0.39	99.61
45.00	6.11	19.13	90.00	7.50	86.59	150.00	0.20	99.80
50.00	7.10	26.23	95.00	3.55	90.14	160.00	0.20	100.00



شكل (23-4) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب Ag nano / NAP :

جدول (8-4) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات ومعدل الجذر التربيعي لخشونة السطح لمركب Agnano قبل وبعد تحميل علاج
NAP وMTX:

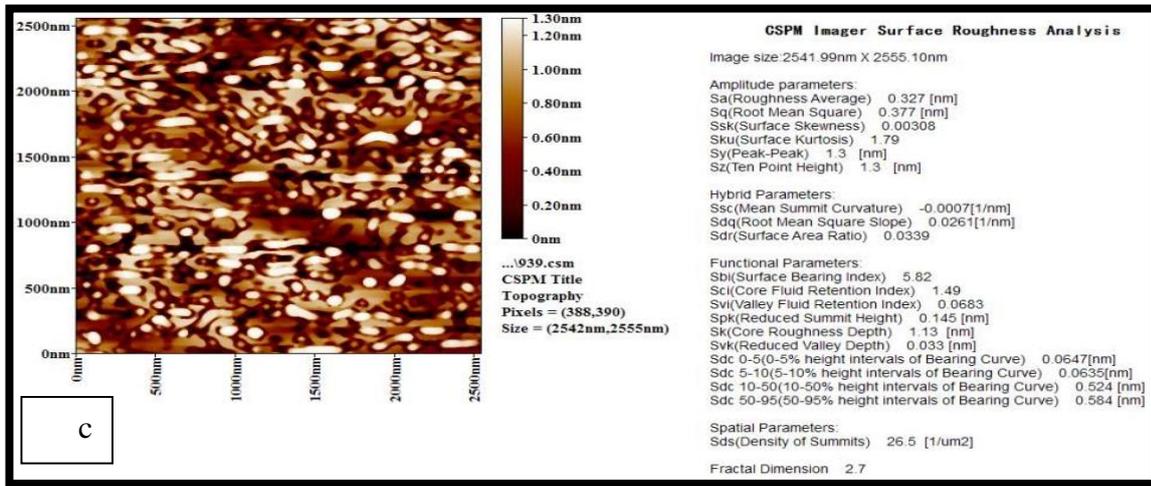
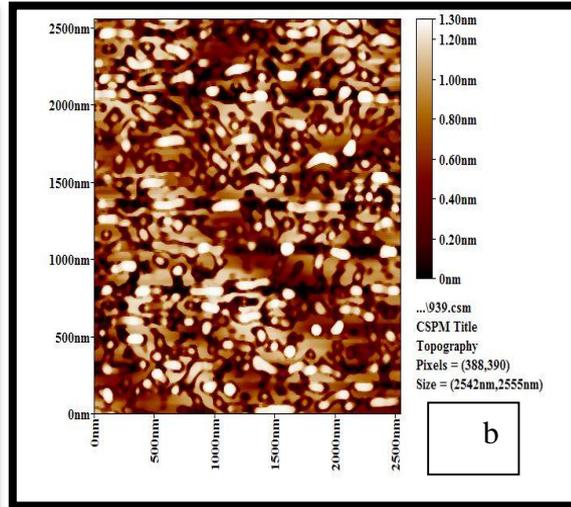
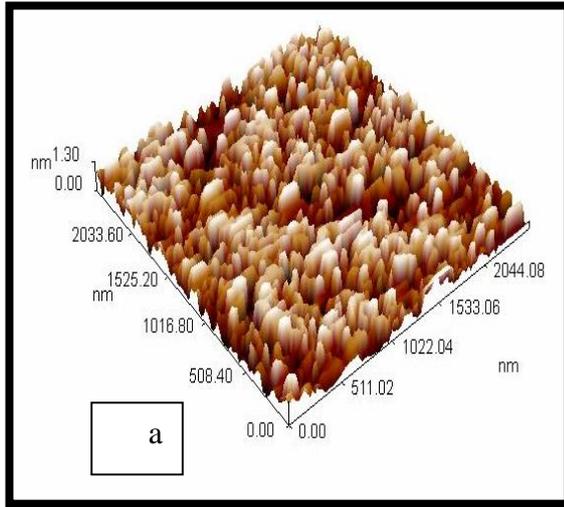
3:2:1:4 : صور مجهر القوة الذرية لمركب الزيروجل Xerogel النانوي الحر والمحمل

Ag NP	معدل قطر الجزيئة nm	معدل خشونة السطحnm	معدل الجذر التربيعي nm	البعد بين قمتين متتاليتين nm	معدل ارتفاع عشر قمم nm	معدل عمق القلب Nm
Ag NP / Free	45.24	0.325	0.374	1.21	1.21	1.16
Ag NP /MTX	78.09	0.4	0.471	1.72	0.036	1.43
Ag NP /NAP	65.68	0.514	0.502	2.04	2.04	1.75

بعلاجي الميثوتركسات والنيبروكسين :

تشير النتائج (4-24، 26، 28) الخاصة بصور مجهر القوة الذرية (AFM) الى ان مركب الـ Xerogel النانوي الحر يمتلك معامل خشونة سطح مقداره 0.327 nm اما في حال تحميل علاج الـ MTX 0.488nm والفرق بين خشونة سطح الـ Xerogel قبل وبعد تحميل علاج الـ MTX يساوي 0.161 nm ، وفي حالة تحميل المركب النانوي بعلاج النيبروكسين يكون مقدار خشونة السطح 5.45 nm ليكون الفرق قبل وبعد تحميل الاخير يساوي 5.213 nm ، و منه نجد ان العامل (R) يتأثر كثيرا عند تحميل علاج الـ MTX و NAP اي ان النظام البلوري اصبح اكثر تجانسا وانتظاما ، اما الجذر التربيعي للـ Xerogel فهو 0.377 nm ، وفي حال تحميله بعلاج الـ MTX فيساوي 0.565 nm ليصبح الفرق 0.188 nm وهذا دليل اخر على الانتظام البلوري للمركب بعد التحميل ونجاح عملية التحميل ، اما في حالة تحميل المركب النانوي بعلاج الـ NAP فيكون الجذر التربيعي 6.49 nm ليصبح الفرق هنا 6.113 nm ومن هذه النتائج نلاحظ ان التجانس والانتظام للتركيب البلوري يكون اعظم عند تحميل علاج النيبروكسين منه عند تحميل علاج الميثوتركسات على سطح المركب Xerogel النانوي .

تشير النتائج الجداول (9-4 ، 10 ، 11 ، 12) الخاصة بمعدل الحجم الجزيئي لمركب الـ Xerogel النانوي قبل وبعد التحميل الى ان المركب الحر قبل التحميل كان معدل الحجم الجزيئي له 94.14 nm و (100.38 nm ، 127.95 nm) بعد تحميل علاج الـ MTX و NAP على التوالي ، اذ ان الزيادة في معدل الحجم بعد التحميل تدل على نجاح تحميل هذين العلاجين ، اما فيما يخص نسب الاحجام الجزيئية للمركب قبل التحميل تساوي 10% للاحجام الجزيئية الاقل من 50.00 nm ، ونسبة 50% كانت للاحجام الجزيئية الاقل من 90.00 nm اما الاحجام بشكل عام كانت 90% اقل من 130.00 nm ، كما ان نسب الاحجام الجزيئية بعد تحميل علاج الـ MTX فكانت 10% للاقل من 60.00 nm و 50% للاقل من 90.00 nm وكانت الاحجام بنسبة 90% تحت حجم 140.00 nm ، اما ما يخص تحميل المركب النانوي بعلاج الـ NAP كانت نسبة 10% للاحجام ذات الاقطار الاقل من 110.00 nm ونسبة 50% للجزيئات ذات الحجم 120.00 nm اما النسبة 90% كانت تشير الى ان الاحجام اغلبها تحت 150.00 nm .

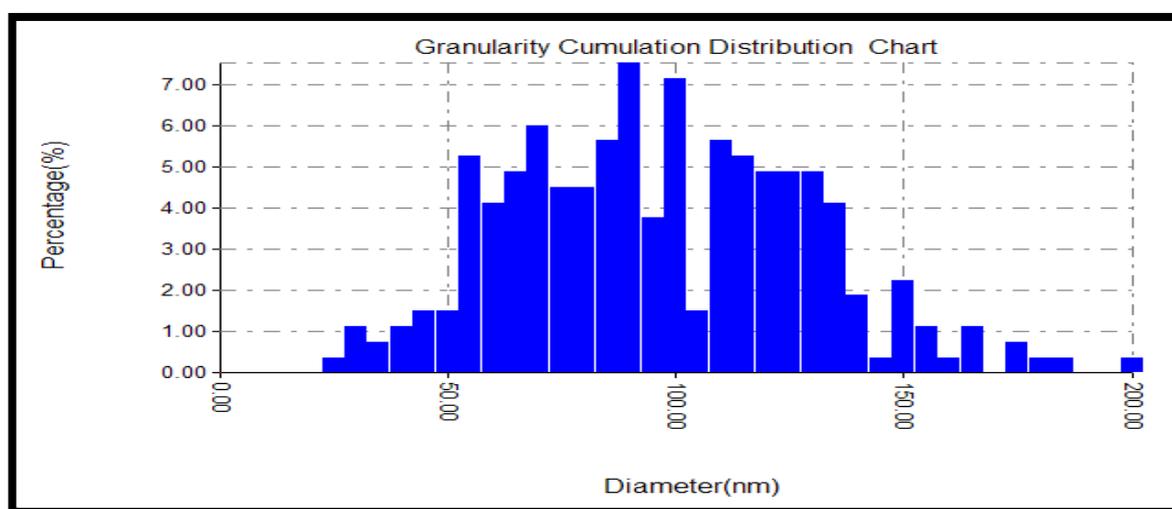


شكل (4-24) صور مجهر القوة الذرية لمركب Xerogel النانوي الحر / a صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات:

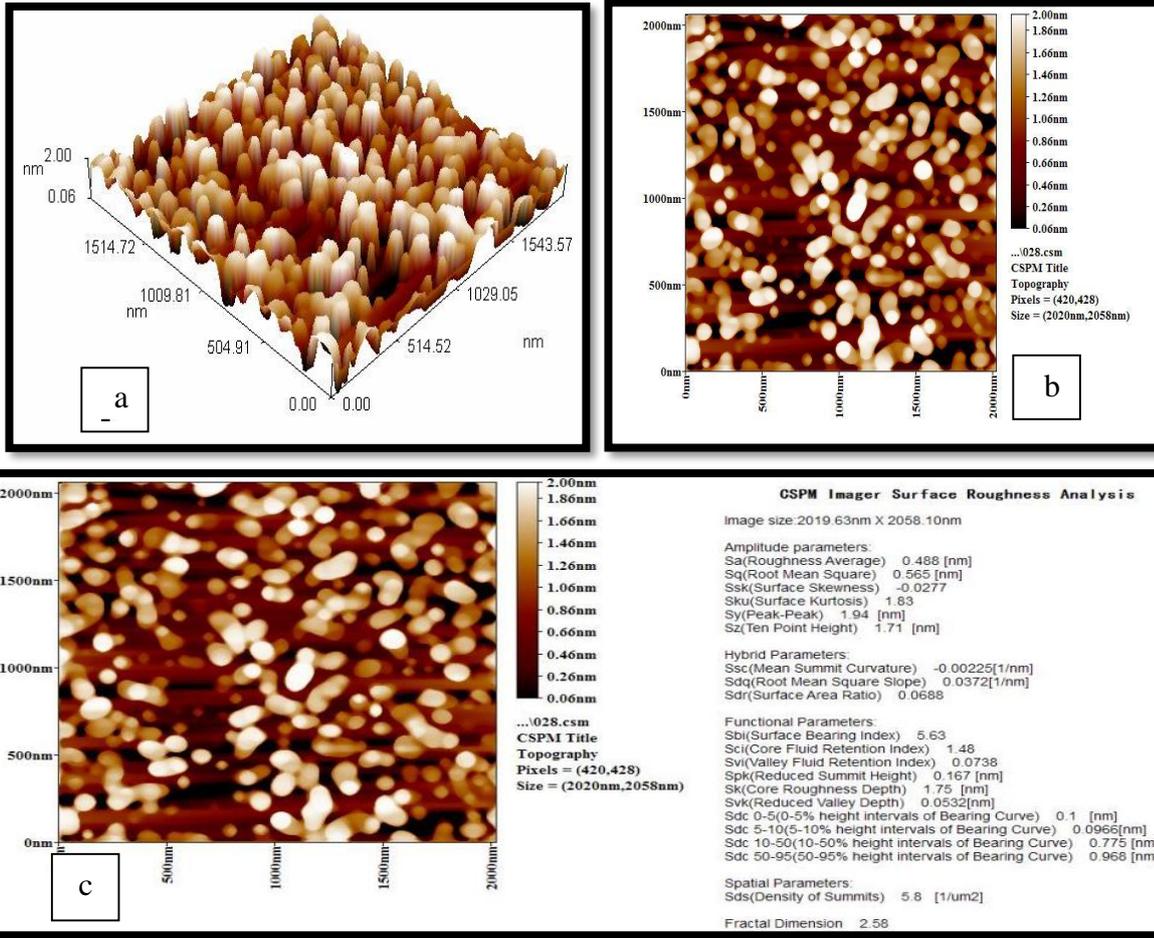
جدول (4-9) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب Xerogel النانوي الحر والنسب المختلفة لتلك الحجوم:

Avg. Diameter:94.14 nm <=10% Diameter:50.00 nm
 <=50% Diameter:90.00 nm <=90% Diameter:130.00 nm

Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)
25.00	0.38	0.38	80.00	4.51	35.71	135.00	4.14	90.98
30.00	1.13	1.50	85.00	5.64	41.35	140.00	1.88	92.86
35.00	0.75	2.26	90.00	7.52	48.87	145.00	0.38	93.23
40.00	1.13	3.38	95.00	3.76	52.63	150.00	2.26	95.49
45.00	1.50	4.89	100.00	7.14	59.77	155.00	1.13	96.62
50.00	1.50	6.39	105.00	1.50	61.28	160.00	0.38	96.99
55.00	5.26	11.65	110.00	5.64	66.92	165.00	1.13	98.12
60.00	4.14	15.79	115.00	5.26	72.18	175.00	0.75	98.87
65.00	4.89	20.68	120.00	4.89	77.07	180.00	0.38	99.25
70.00	6.02	26.69	125.00	4.89	81.95	185.00	0.38	99.62
75.00	4.51	31.20	130.00	4.89	86.84	200.00	0.38	100.00



شكل (4-25) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب Xerogel الحر :

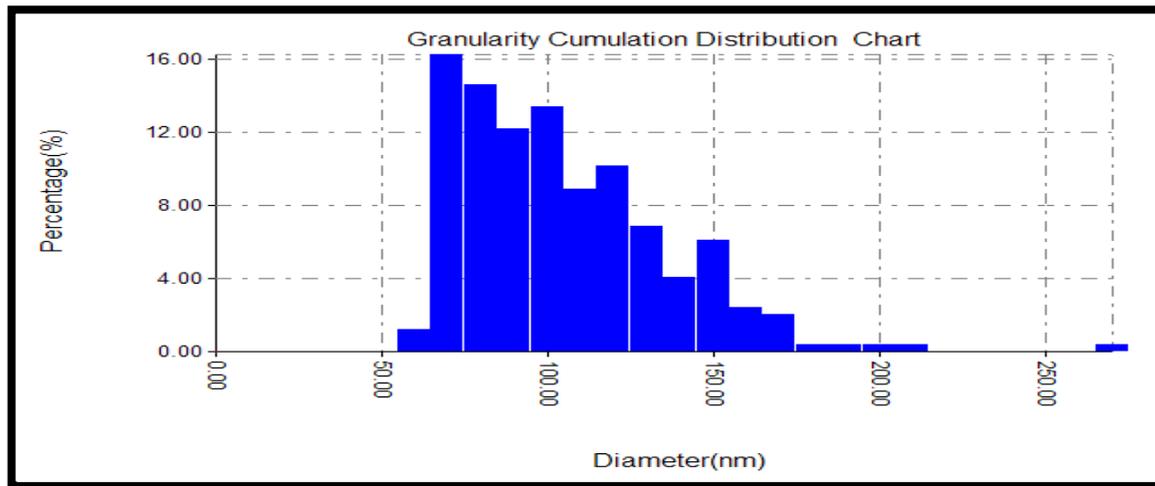


شكل (4-26) صور مجهر القوة الذرية لمركب MTX/ Xerogel النانوي : a / صورة ثلاثية الأبعاد ، b / صورة ثنائية الأبعاد ، c / صورة ثنائية الأبعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات:

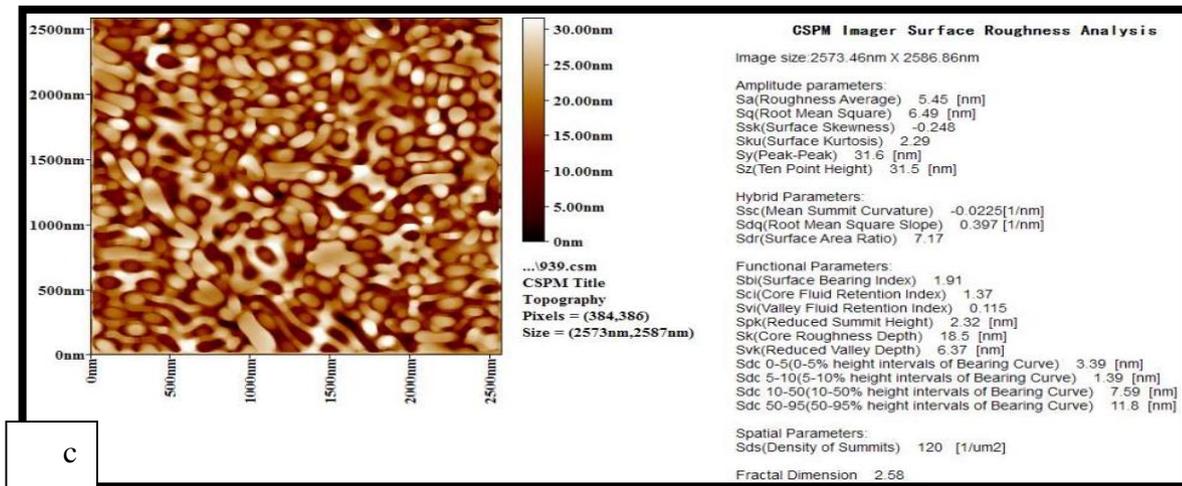
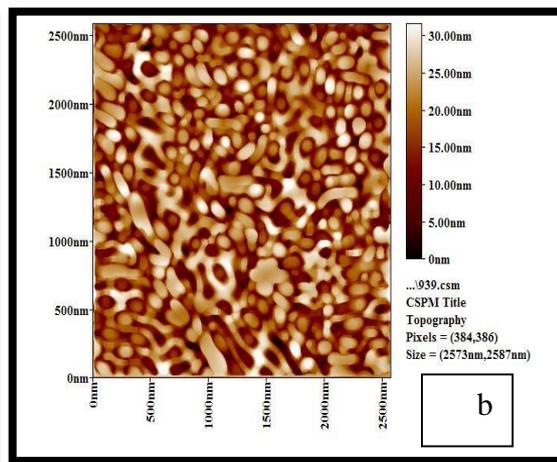
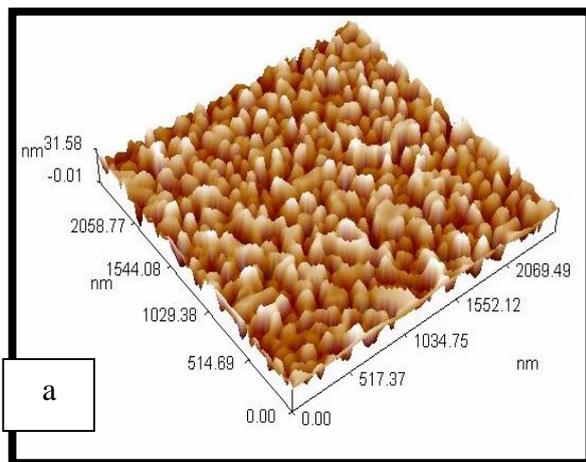
جدول (4-10) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب MTX/Xerogel النانوي الحر والنسب المختلفة لتلك الحجوم:

Avg. Diameter:100.38 nm	<=10% Diameter:60.00 nm
<=50% Diameter:90.00 nm	<=90% Diameter:140.00 nm

Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)	Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)	Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)
60.00	1.21	1.21	120.00	10.12	76.52	180.00	0.40	98.38
70.00	16.19	17.41	130.00	6.88	83.40	190.00	0.40	98.79
80.00	14.57	31.98	140.00	4.05	87.45	200.00	0.40	99.19
90.00	12.15	44.13	150.00	6.07	93.52	210.00	0.40	99.60
100.00	13.36	57.49	160.00	2.43	95.95	270.00	0.40	100.00
110.00	8.91	66.40	170.00	2.02	97.98			



شكل (27-4) يبين توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب MTX / Xerogel :

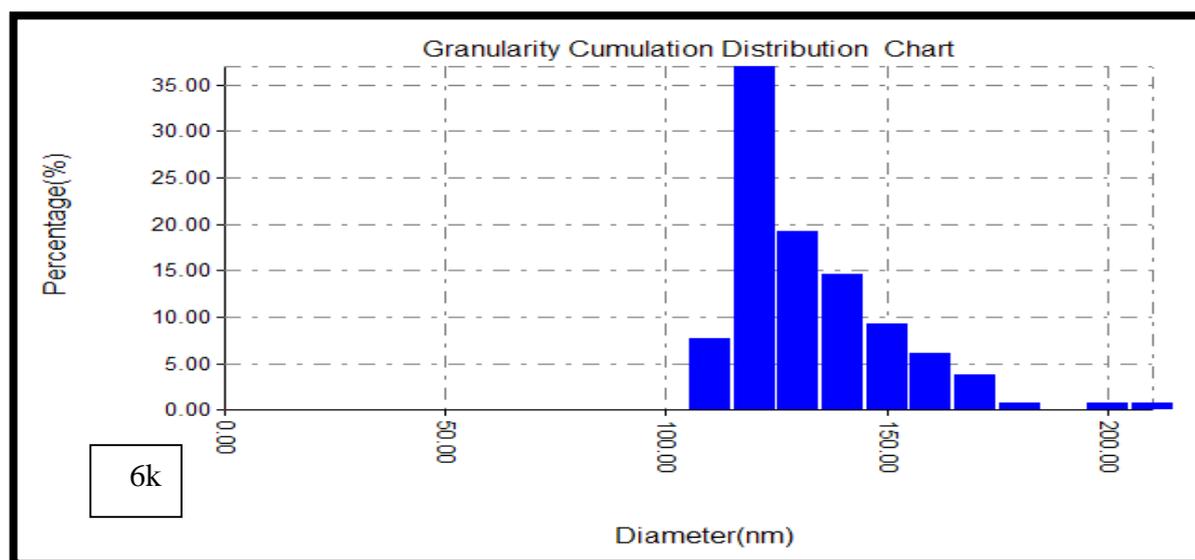


شكل (28-4) صور مجهر القوة الذرية لمركب Xerogel / NAP النانوي : a / صورة ثلاثية الابعاد ، b / صورة ثنائية الابعاد ، c / صورة ثنائية الابعاد تبين جميع التفاصيل للجزيئات:

جدول (4-11) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات لمركب NAP/Xerogel النانوي الحر والنسب المختلفة لتلك الحجوم:

Avg. Diameter:127.95 nm <=10% Diameter:110.00 nm
 <=50% Diameter:120.00 nm <=90% Diameter:150.00 nm

Diameter(nm)<	Volume (%)	Cumulation n(%)	Diameter(nm)<	Volume (%)	Cumulation n(%)	Diameter(nm)<	Volume (%)	Cumulation n(%)
110.00	7.69	7.69	150.00	9.23	87.69	200.00	0.77	99.23
120.00	36.92	44.62	160.00	6.15	93.85	210.00	0.77	100.00
130.00	19.23	63.85	170.00	3.85	97.69			
140.00	14.62	78.46	180.00	0.77	98.46			



شكل (4-29) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات المركب النانوي NAP /Xerogel :

جدول (4-12) المعدل الكلي لحجوم الجزيئات ومعدل الجذر التربيعي لخشونة السطح لمركب

علاج NAP وMTX:

Ag NP	معدل قطر الجزيء nm	معدل خشونة السطح nm	معدل الجذر التربيعي nm	البعد بين قمتين متتاليتين nm	معدل ارتفاع عشر قمم nm	معدل عمق القلب nm
Xerogel NP / Free	94.14	0.327	0.377	1.3	1.3	1.13
Xerogel NP /MTX	100.38	0.488	0.565	1.94	1.71	1.75
Xerogel NP/ NAP	127.95	5.45	6.49	31.6	31.5	18.37

2:4 دراسة حركيات التفاعل Study Of Release Kintics

تمت دراسة حركيات التبادل الايوني بتطبيق معادلات الرتبة الصفرية والرتبة الاولى والثانية الكاذبتين لحركيات كل من المركبات النانوية المدروسة بعد تحميلها بعلاجي MTX وعلاج NAP اذ تم استخراج الرتبة الصفرية بحسب المعادلة الاتية :

$$C_t = k_0 t \dots \dots \dots (\text{zero order})$$

ولاستخراج الرتبة الكاذبة الاولى نطبق المعادلة الاتية :

$$\text{Log}(1 - c_t / c_i) = k_1 t_1 \dots \dots \dots (\text{frist order})$$

ونطبق المعادلة الاتية لاستخراج قيمة الرتبة الثانية الكاذبة

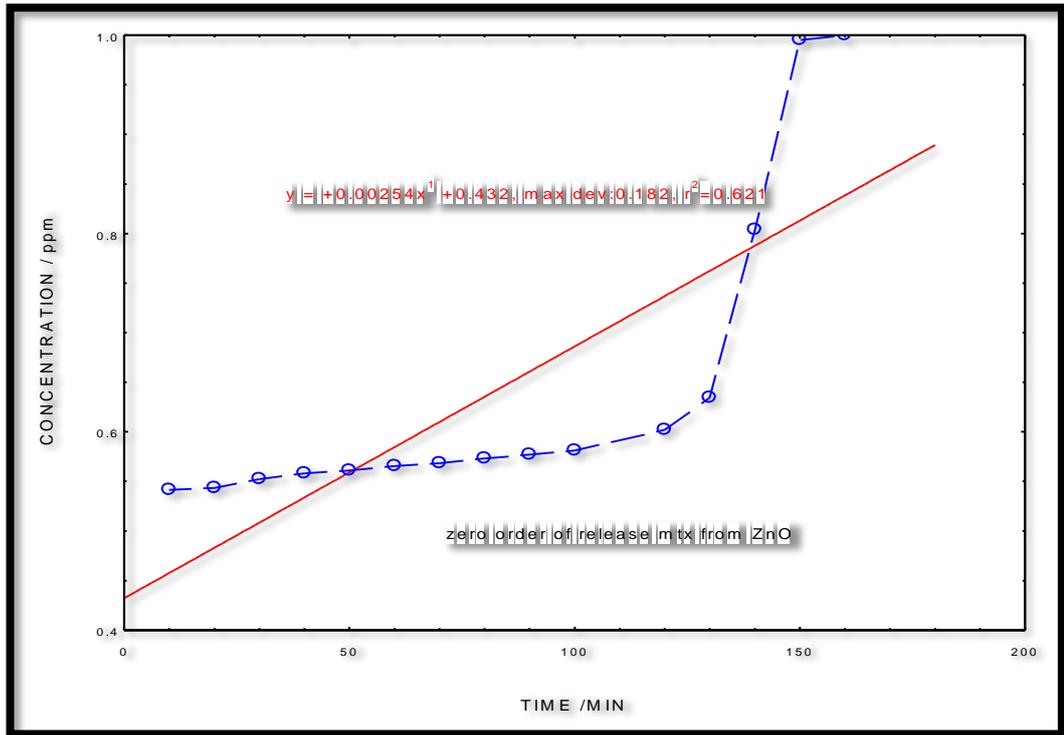
$$t/c_t = k_2 C_i^2 + t/C_i \dots (\text{Second order})$$

بالاعتماد على معادلة Zero Order المشار اليها في اعلاة يتم رسم قيم (Ct) مقابل الزمن وتم معرفة قيم معامل الارتباط من خلال تطبيق معادلة الخط المستقيم .

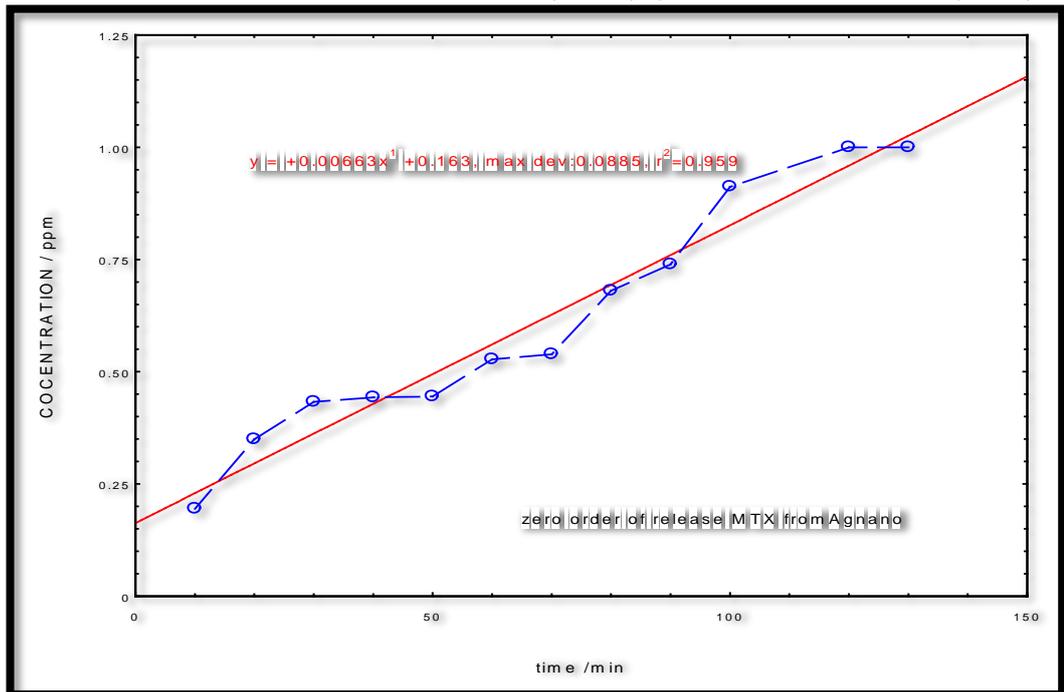
1:2:4: دراسة حركيات علاج MTX المحمل على المركبات النانوية Agnano ZnO و Xerogel :

:1:1:2:4 الرتبة الصفرية (Zero order):

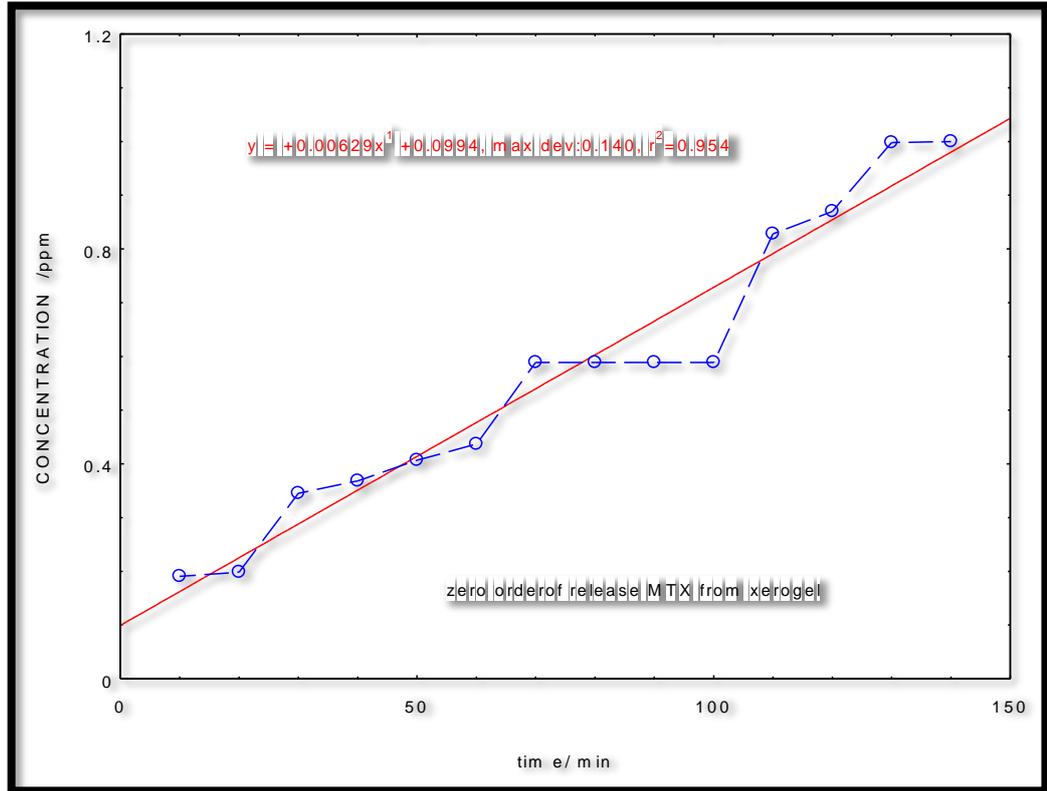
تشير النتائج وفقا لمعادلة الرتبة الصفرية لانتشار العلاج MTX من المركبات النانوية Agnano/ ZnO/ MTX , و Xerogel/ MTX الاشكال (4-30) ، (4-31) ، (4-32) على التوالي الى وجود انحراف لتلك القيم عن الخط المستقيم مما يدل على عدم مطاوعة عمليه التحرر لعلاج (MTX) لموديل الرتبة الصفرية ، إذ يبدأ التحرر التدريجي البطيء حتى الزمن 20 دقيقة ثم يبدأ التسارع الى ان يصل اعلى تحرر عند زمن 130 دقيقة في حالة استخدام مركب ZnO النانوي كحامل لعلاج MTX ، اما في حالة استخدام الـ AgNP كحامل لعلاج MTX يبدأ التحرر الطردي حتى يصل زمن 130 دقيقة ليصل بعد ذلك الى حالة الاستقرار ، اما مايخص تحرر علاج MTX من المركب النانوي Xerogel يبدأ التحرر الطردي عندالزمن 125 دقيقة ليبدأ بالاستقرار عند وصوله الى 150 دقيقة .



شكل (30-4) الرتبة الصفريّة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي ZnO:

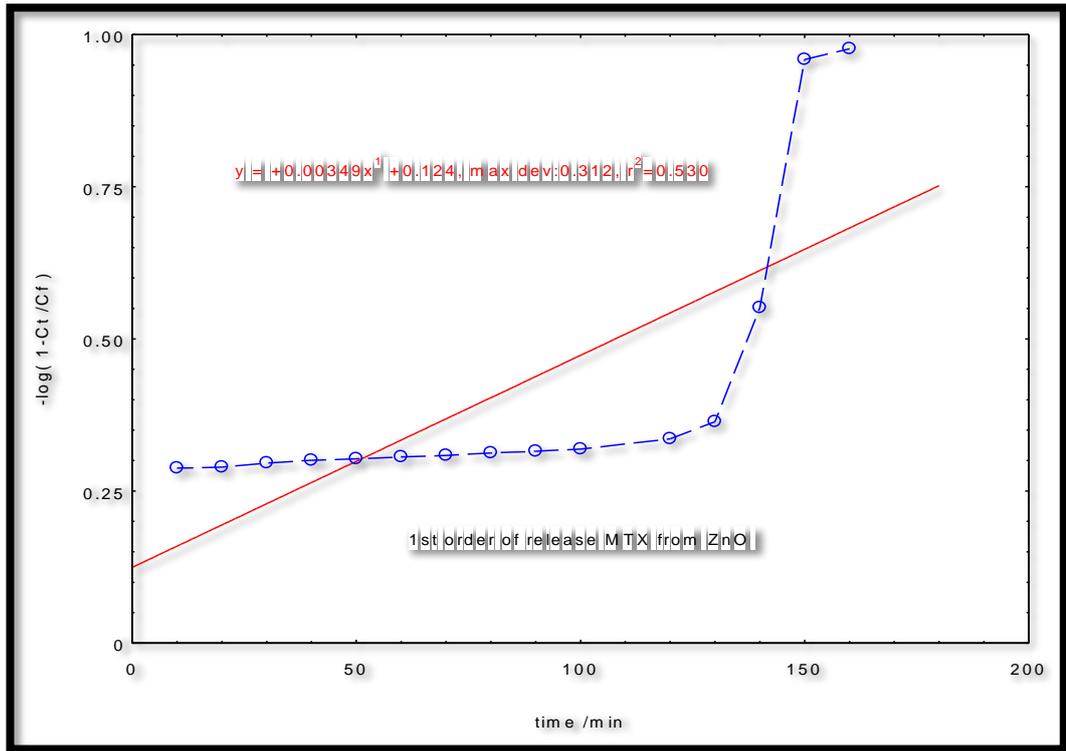


شكل (31-4) الرتبة الصفريّة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي Agnano:

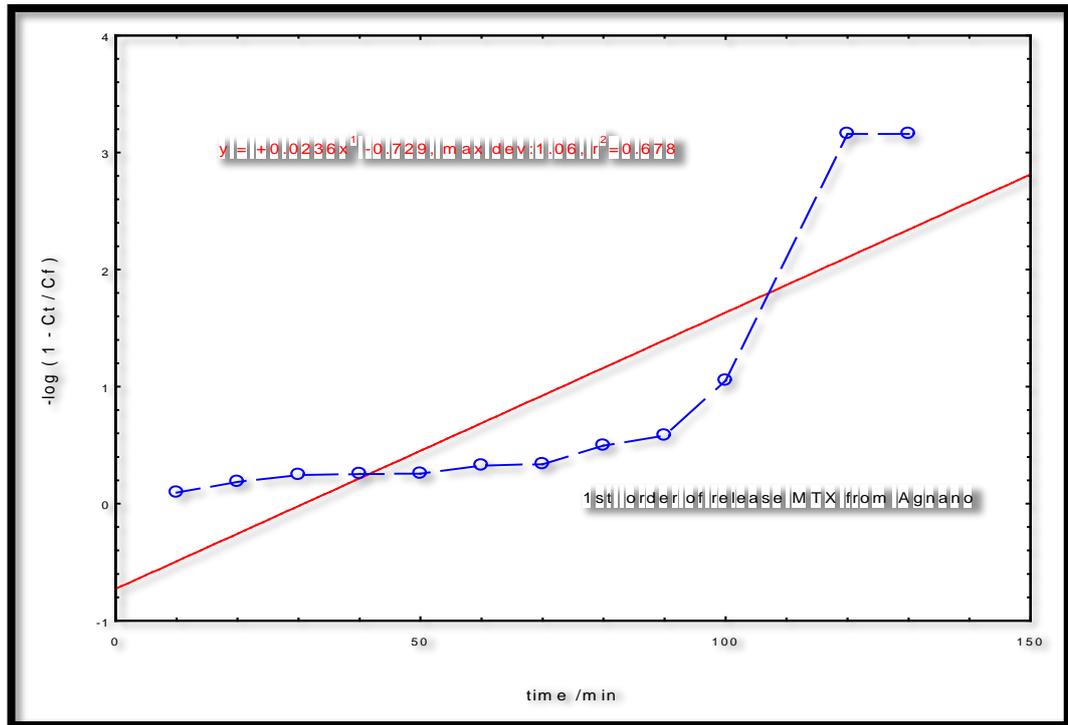


شكل (4-32) الرتبة الصفرية لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي Xerogel :
2:1:2:4: الرتبة الاولى الكاذبة

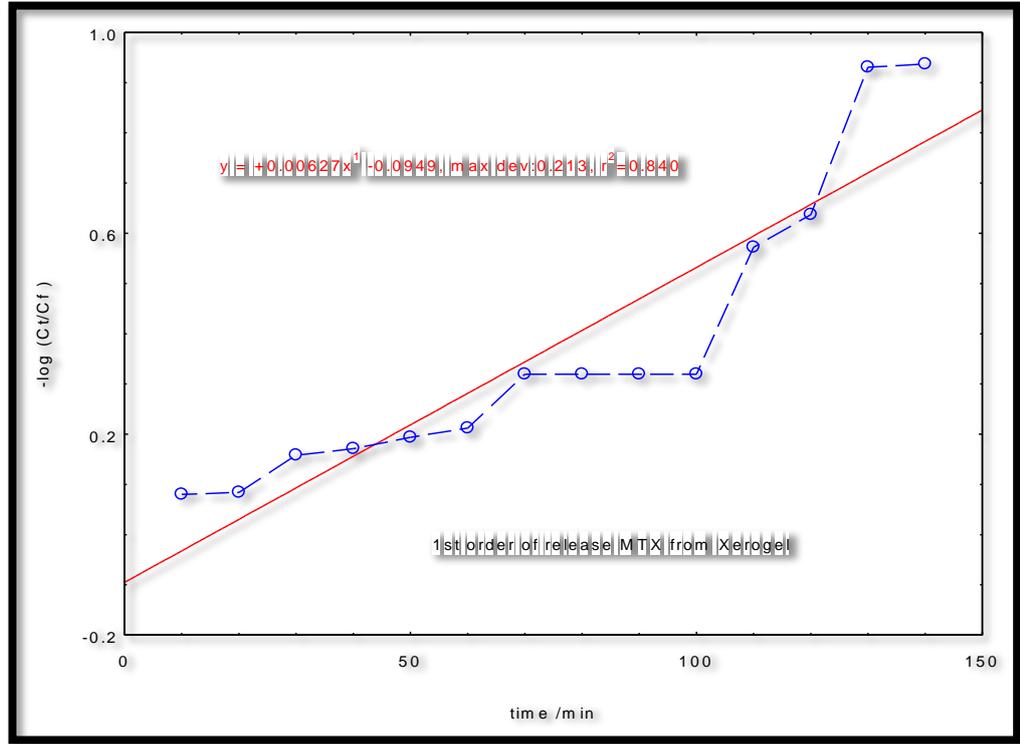
تحرر MTX من المركبات النانوية يلاحظ من خلال النتائج التي تشير اليها الاشكال (4-33)، (4-34)، (4-35) الخاصة بتحرير علاج MTX من مركبات النانوية MTX , ZnO/ Agnano/ MTX و Xerogel/ MTX على التوالي ، ان قيم التحرر هذه غير مطابقة للخط المستقيم مما يدل على عدم مطاوعة عملية التحرر للعلاج MTX لموديل الرتبة الاولى الكاذبة كما حصل عند تطبيق موديل الرتبة الصفرية لذلك يتم تطبيق معادلة الرتبة الثانية الكاذبة ، إذ بدأ تحرر العلاج بزمن يقرب من 20 دقيقة ليصل الى اعلاه عند الزمن 140 دقيقة .



شكل (33-4) الرتبة الاولى الكاذبة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي ZnO/ MTX :



شكل (34-4) الرتبة الاولى الكاذبة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي Agnano/ MTX :



شكل (4-35) الرتبة الاولى الكاذبة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي Xerogel/ MTX :

3:1:2:4: الرتبة الثانية الكاذبة

تشير النتائج عند تطبيق موديل الرتبة الكاذبة الثانية لتحرير علاج MTX من المركبات النانوية ZnO /MTX ، Ag/MTX و Xerogol/MTX ، الاشكال (4-36) ، (4-37) ، (4-38) على التوالي الى ان هذا الموديل يكون اكثر انطباقا لتفسير سلوكية تحرير علاج (MTX) من هذه المركبات النانوية ، إذ نجد ان :

$$r^2 = 0.979 \text{ في حالة تحرير علاج الـ MTX من ZnO}$$

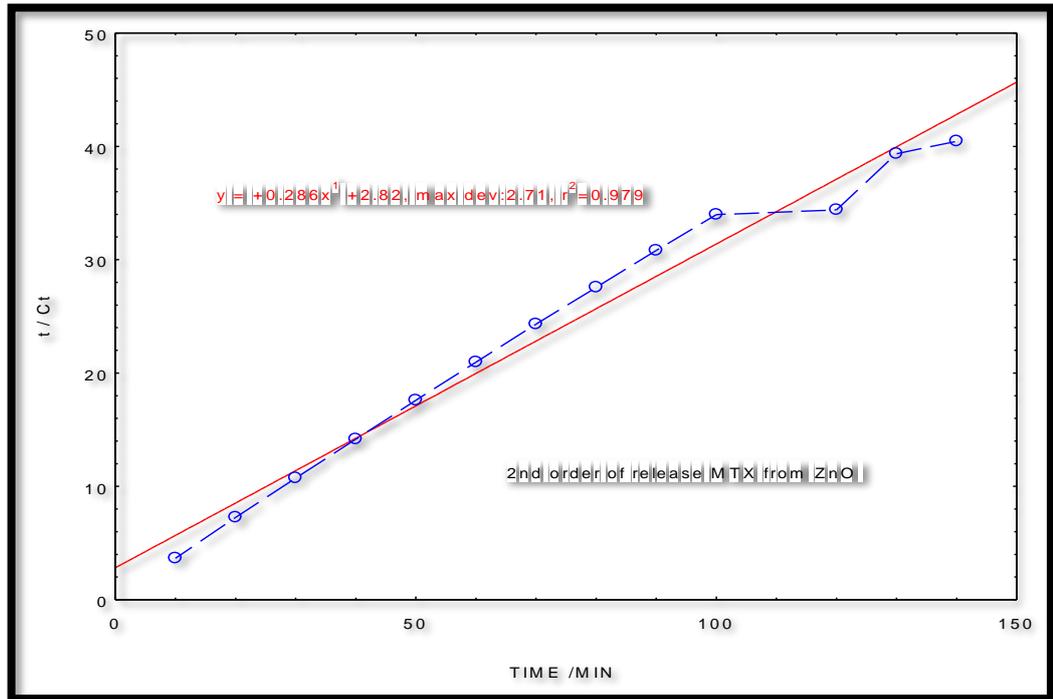
$$\text{وثابت والسرعة } K = 0.286 \text{ min}^{-1}$$

$$r^2 = 0.997 \text{ في حالة تحرير علاج الـ MTX من Ag}$$

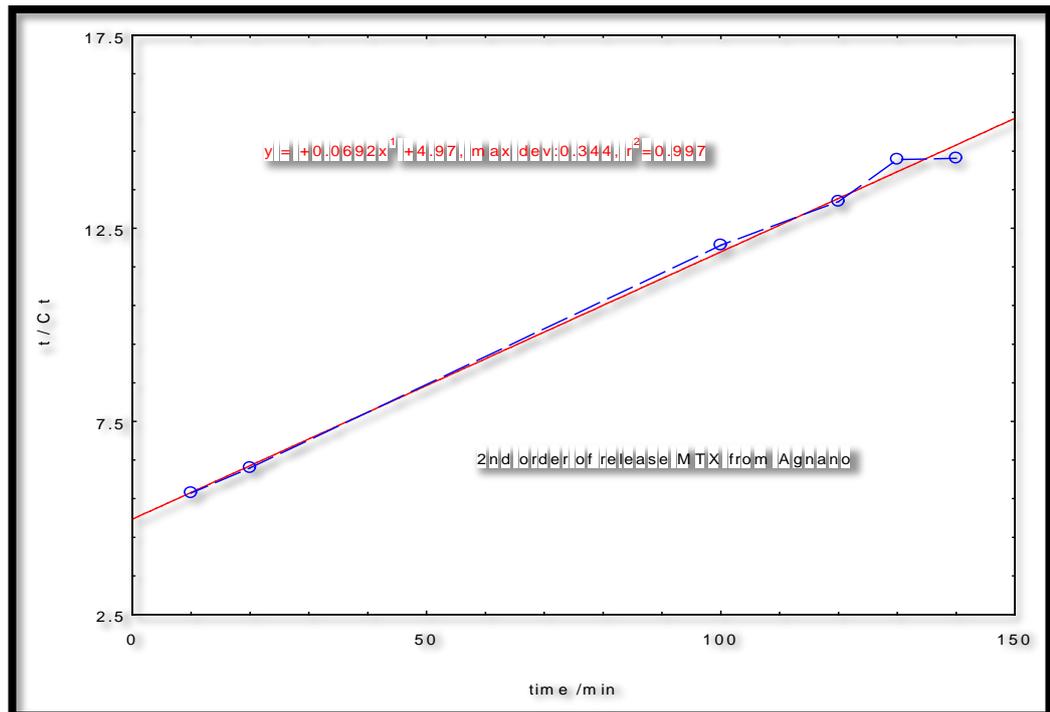
$$\text{وثابت والسرعة } K = 0.0692 \text{ min}^{-1}$$

$$0.996 = \text{Xerogel من MTX في حالة تحرير علاج الـ}$$

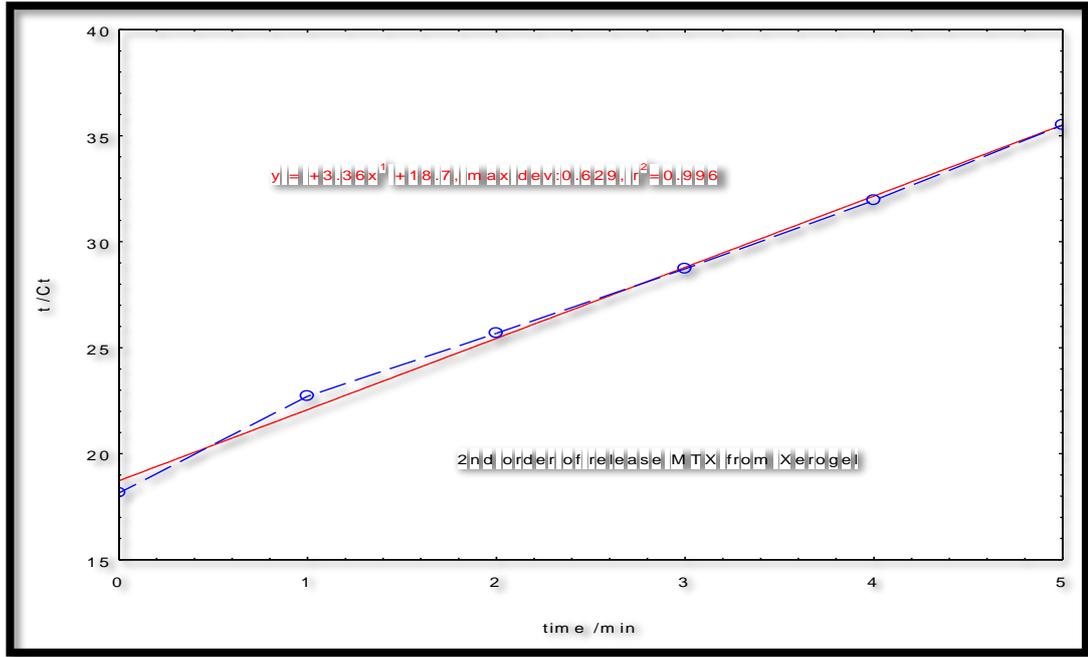
$$\text{وثابت والسرعة } K = 3.36 \text{ min}^{-1}$$



شكل (36-4) الرتبة الثانية الكاذبة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي ZnO/ MTX :



شكل (37-4) الرتبة الثانية الكاذبة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي Agnano/ MTX :



شكل (4-38) الرتبة الثانية الكاذبة لتحرير علاج (MTX) من المركب النانوي Xerogel/ MTX :

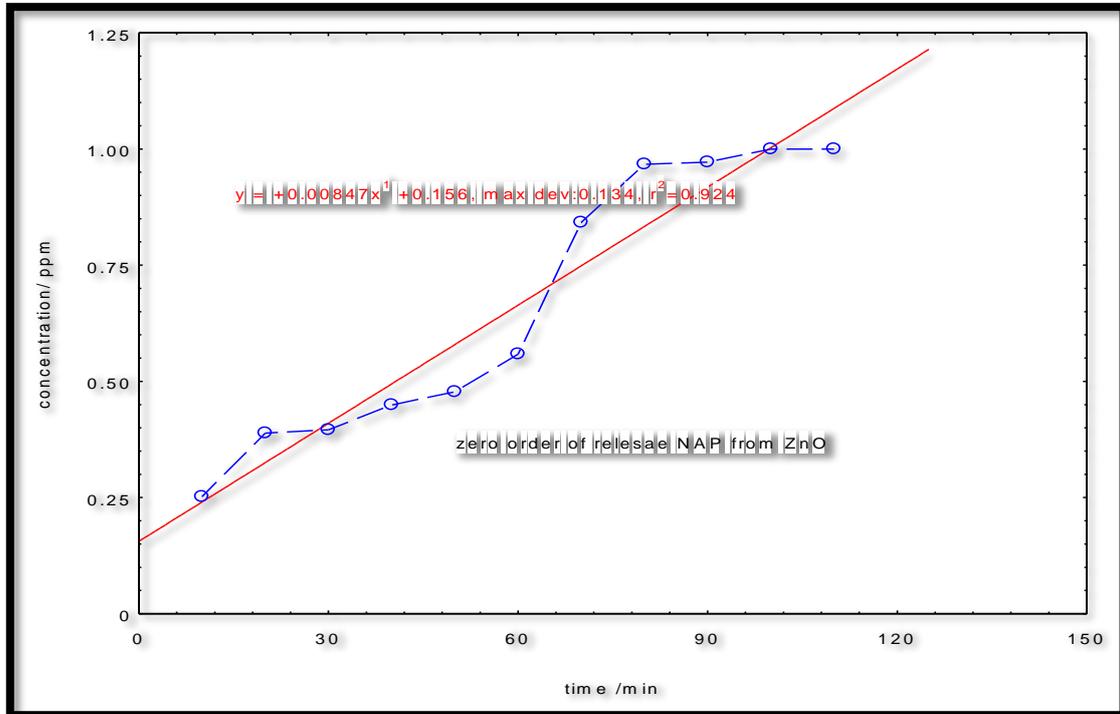
جدول (4-13) معامل الارتباط وثابت السرعة للرتبة الصفرية والاولى والثانية الكاذبتين لتحرر علاج MTX من المركبات النانوية:

معامل الارتباط r^2 وثابت السرعة $K^{-1}\text{-min}$ للرتبة	الرتبة الصفرية Zeroorder		الرتبة الكاذبة الاولى 1 st order		الرتبة الثانية الكاذبة 2 nd order	
	r^2	$K^{-1}\text{-min}$	r^2	$K^{-1}\text{-min}$	r^2	$K^{-1}\text{-min}$
تحرر علاج MTX						
MTX from ZnO	0.621	0.0025	0.530	0.0034	0.979	0.286
MTX from Agnano	0.959	0.0066	0.678	0.0236	0.997	0.0692
MTX from Xerogel	0.954	0.0062	0.840	0.0062	0.996	3.36

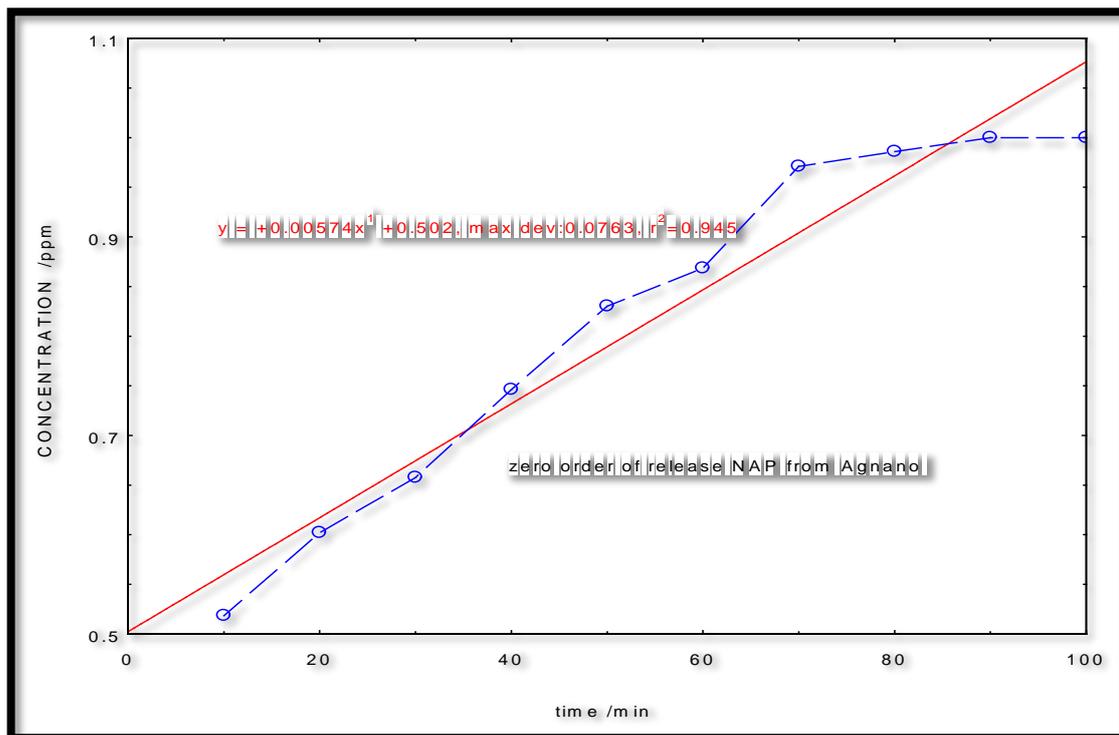
2:2:4: دراسة حركيات المركبات النانوية المحمل عليها علاج NAP 1:2:2:4: الرتبة الصفرية

تشير النتائج الاشكال (4 - 39)، (4 - 40)، (4 - 41) الى ان تحرر علاج NAP من المركبات النانوية ZnO/NAP، Ag/NAP، Xerogel/NAP على التوالي لاتنطبق عليه معادلة موديل الرتبة الصفرية مما يدل الى عدم مطاوعة القيم لهذه المعادلة، وبعد معرفة قيم معامل الارتباط وانحراف الخط المستقيم، إذ اشارت الاشكال ذاتها الى ان تحرر علاج الـ NAP من

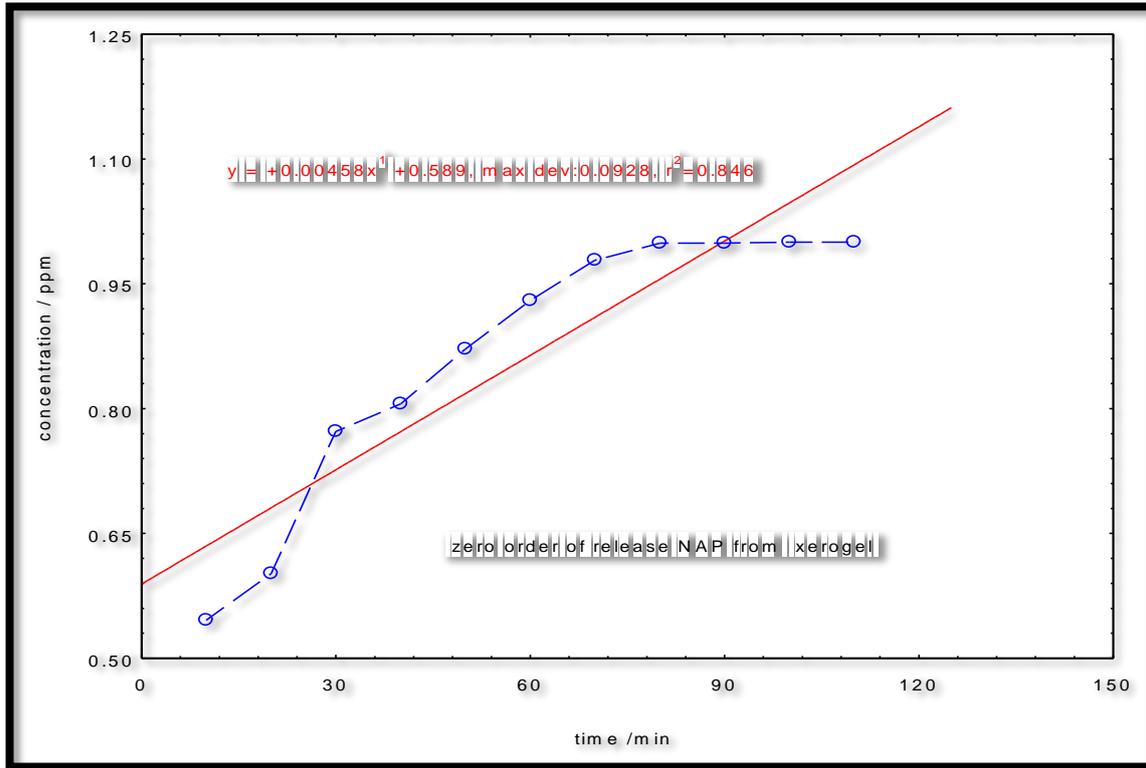
المركب ZNO / NAP يكون بطيء في بداية التفاعل ثم يعود ليتسارع عند الزمن 120 / دقيقة ، وان ثابت السرعة $K = 0.00847 \text{ min}^{-1}$ ، اما في حالة تحرره من المركب Ag/NAP يكون التحرر سريع منذ الدقائق الاولى حتى يصل حالة الاتزان عند الزمن 70 min وثابت السرعة $K = 0.00574 \text{ min}^{-1}$ ، في حين كان التحرر لعلاج الـ NAP من المركب النانوي Xerogel/NAP يسير ببطيء حتى يصل الى حالة الاتزان عند زمن 80 / دقيقة وكان ثابت السرعة 0.00458 min^{-1} .



شكل (4-39) الرتبة الصفرية لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي ZnO/NAP:



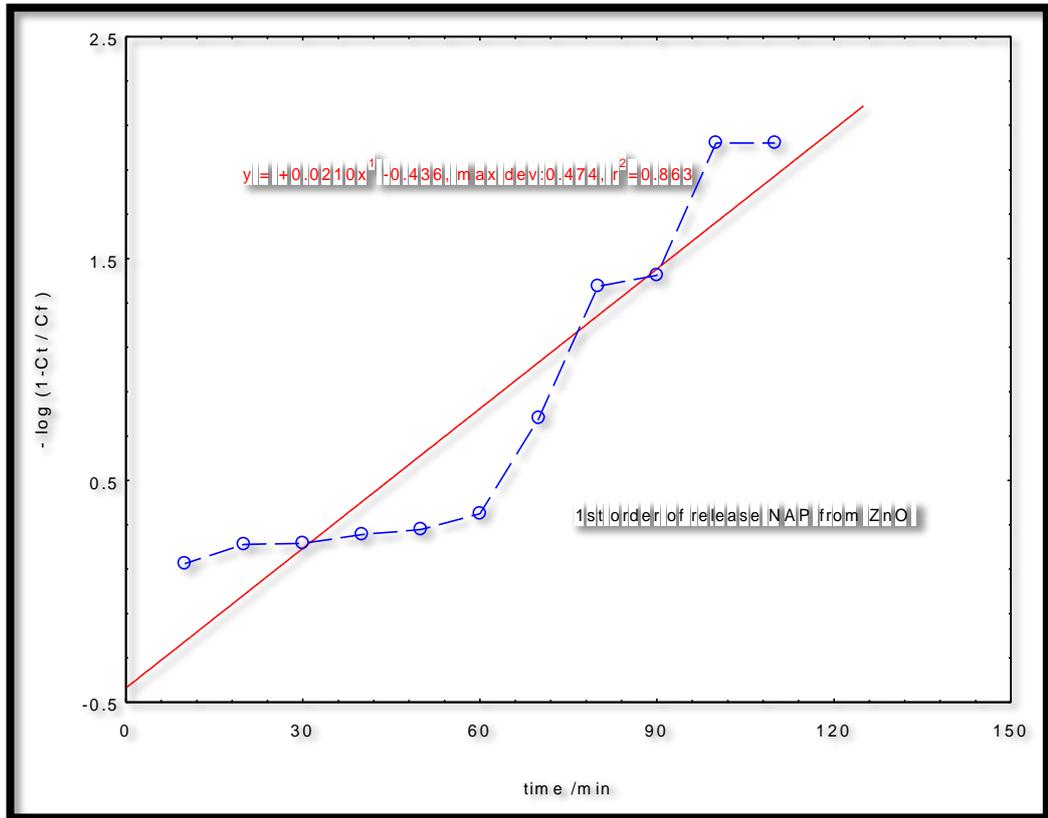
شكل (40-4) الرتبة الصفيرية لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي Agnano/NAP:



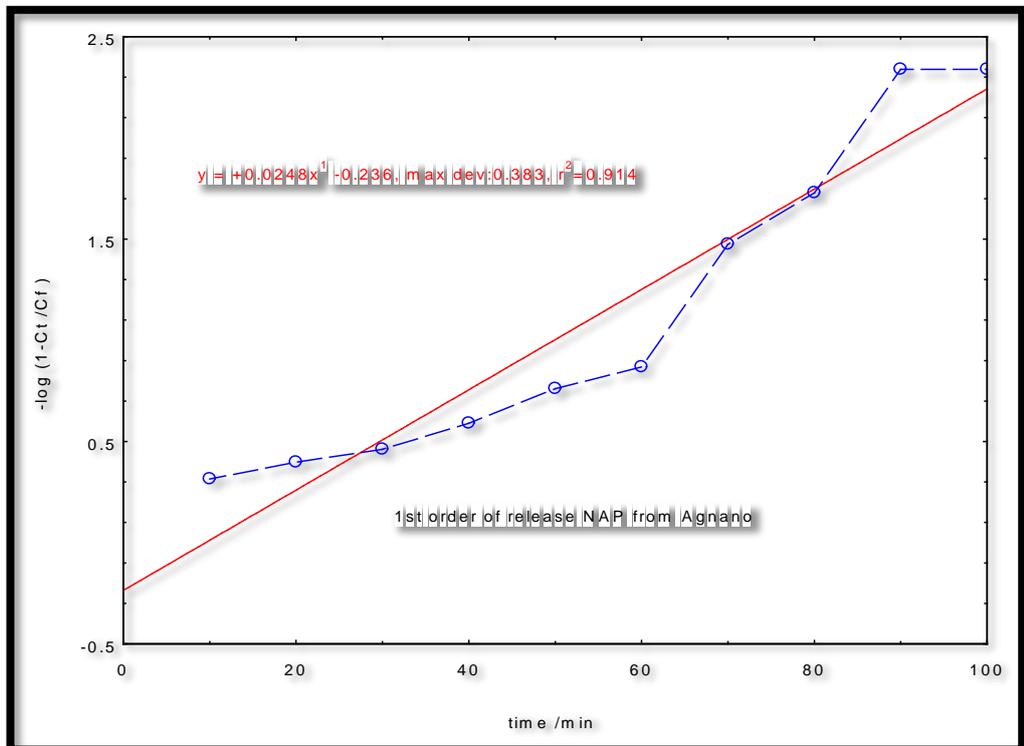
شكل (41-4) الرتبة الصفيرية لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي Xerogel /NAP:

2:2:2:4: الرتبة الاولى الكاذبة

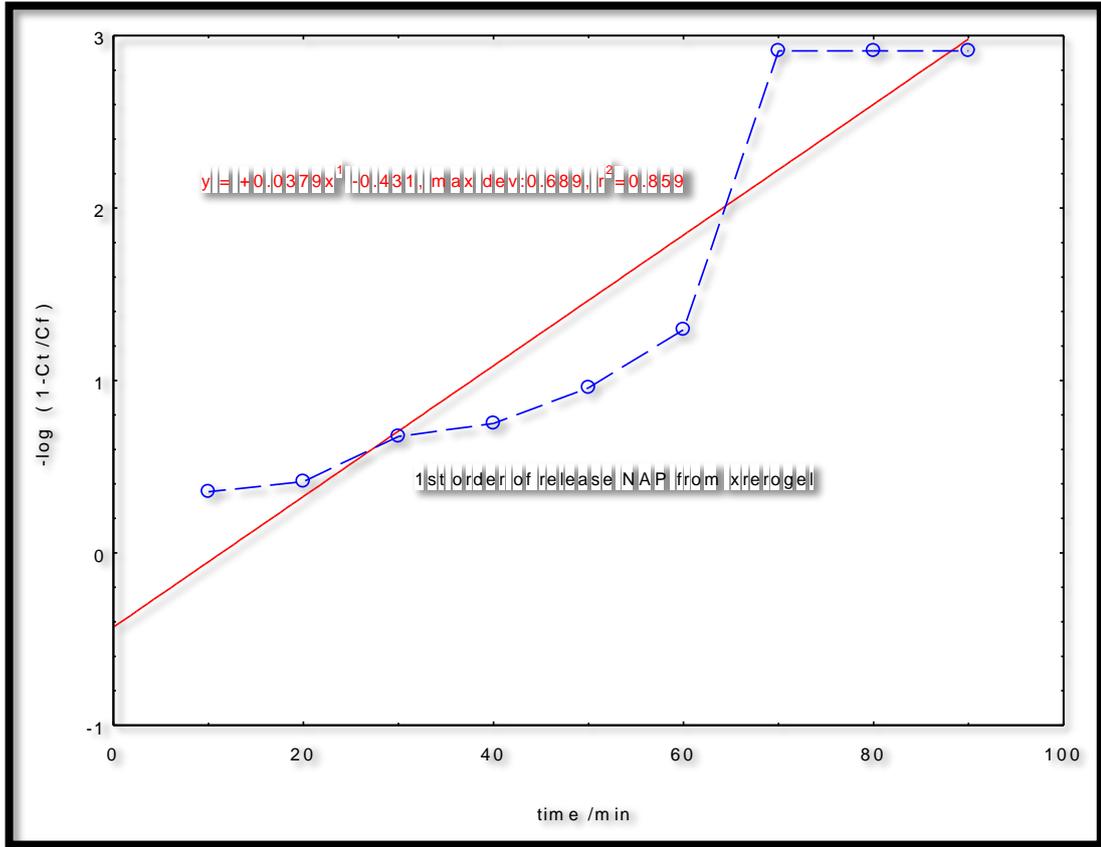
يظهر من خلال الاشكال (42-4)، (43-4)، (44-4) الخاصة بدراسة سلوكية تحرر علاج Nap من المركبات النانوية Xerogel/NAP ، Ag/NAP ، ZnO/NAP على التوالي ايضاً عدم انطباق موديل هذه الرتبة كما في الرتبة الصفيرية من خلال انحراف قيم الرتبين عن الخط المستقيم وعدم مطاوعة هذه القيم لموديل الرتبة الصفيرية والاولى الكاذبة ، لذلك يتم رسم قيم (t/tc) مقابل الزمن ويستخرج معامل الارتباط (r) لتطبيق الموديل الرياضي للرتبة الثانية الكاذبة بعد فشل موديل الرتبة الصفيرية والرتبة الاولى الكاذبة بمطابقة معادلة الخط المستقيم ، اذ كانت نتائج الاشكال آنفة الذكر r^2 في حالة تحرر علاج الـ NAP من الـ ZnO $0.863 = r^2$ وثابت السرعة $0.0210 = K \text{ min}^{-1}$ ، اما في حالة تحرر العلاج من المركب Ag/Nap سجل $0.414 = r^2$ وثابت السرعة $0.0248 = K \text{ min}^{-1}$ ، في حين سجلت نتائج التحرر لعلاج الـ NAP $0.0859 = r^2$ وثابت السرعة $0.0379 = K \text{ min}^{-1}$.



شكل (42-4) الرتبة الاولى الكاذبة لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي ZnO:

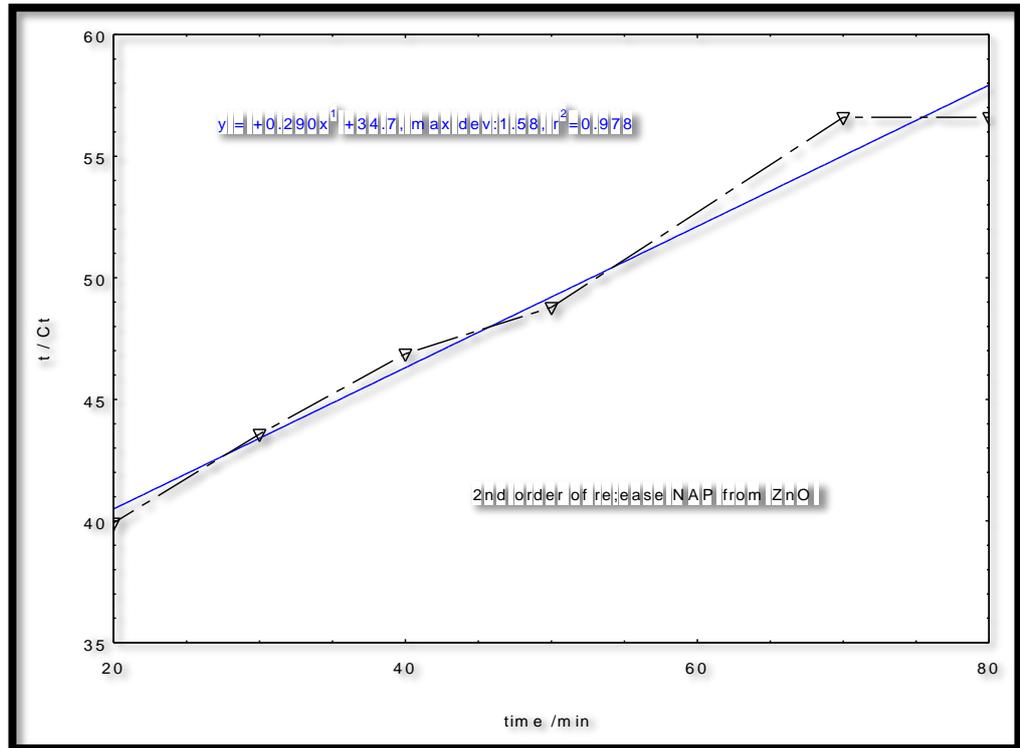


شكل (43-4) الرتبة الاولى الكاذبة لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي Agniano:

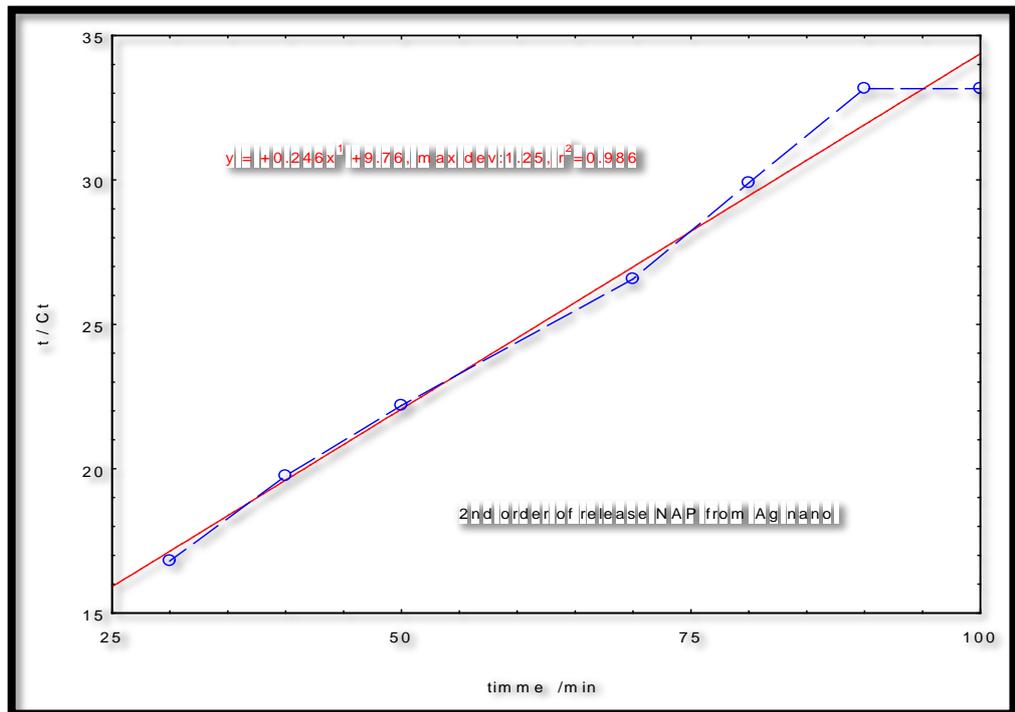


شكل (44-4) الرتبة الاولى الكاذبة لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي Xerogel :
3:2:2:4: الرتبة الثانية الكاذبة

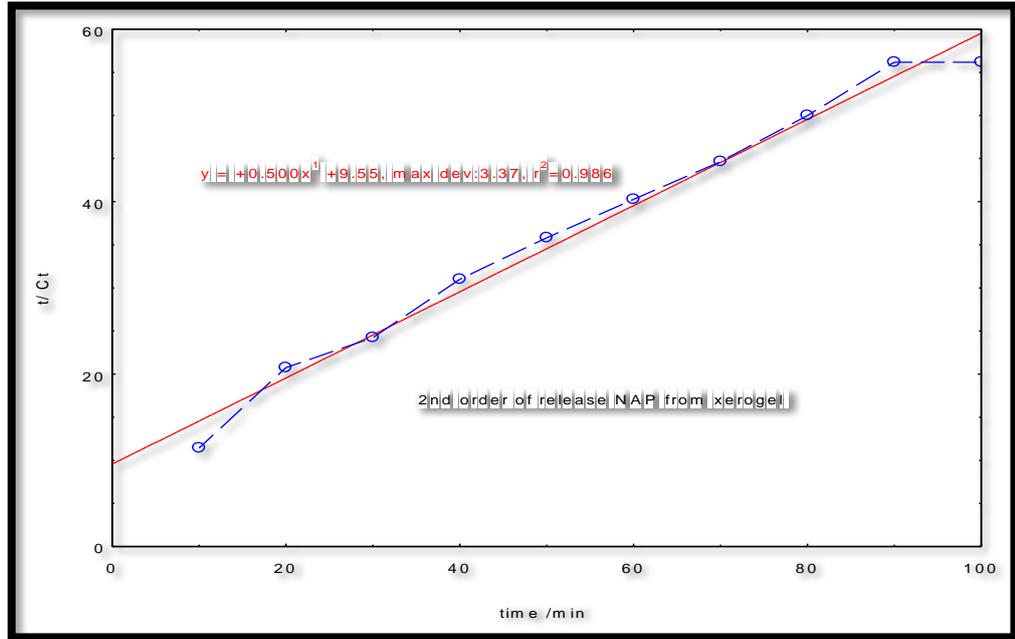
يتضح من الاشكال (45-4)، (46-4)، (47-4) مطاوعة الموديل الرياضي للرتبة الكاذبة الثانية لمعادلة الخط المستقيم التي تميل الى حركة انتشار علاج NAP من المركبات النانوية ZnO/NAP ، Ag/NAP ، Xerogel/NAP مما يدل على انها الاكثر انطباقا لتفسير حركة العلاج خلال الاوساط قيد الدراسة من المركبات النانوية أنفة الذكر ، اذ ان تحرر علاج الـ NAP من المركب ZnO/NAP سجل نتائج بينتها الاشكال المذكورة التي سجلت $r^2 = 0.978$ وثابت السرعة $K = 0.290 \text{ min}^{-1}$ ، اما لدى النظر في نتائج تحرر العلاج من المركب Ag/NAP ان الـ $r^2 = 0.986$ وثابت السرعة 0.246 min^{-1} ، وان نتائج العلاج المذكور لدى تحرره من المركب Xerogel/Nap سجل $r^2 = 0.986$ وثابت سرعة قدره 0.500 min^{-1} .



شكل (45-4) الرتبة الثانية الكاذبة لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي ZnO:



شكل (46-4) الرتبة الثانية الكاذبة لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي Agnano:



شكل (4-4) الرتبة الثانية الكاذبة لتحرير علاج (NAP) من المركب النانوي Xerogel :

جدول (4-14) معامل الارتباط وثابت السرعة للترتبة الصفرية والاولى والثانية الكاذبتين لتحرر علاج NAP من المركبات النانوية:

معامل الارتباط r^2 وثابت السرعة K 1^{-min} للترتبة	الرتبة الصفرية Zeroorder		الرتبة الكاذبة الاولى 1 st order		الرتبة الثانية الكاذبة 2ndorder	
	r^2	K 1^{-min}	r^2	K 1^{-min}	r^2	K 1^{-min}
NAP تحرر علاج						
NAP from ZnO	0.924	0.0084	0.863	0.0210	0.978	0.290
NAP from Agnano	0.945	0.0057	0.914	0.0248	0.986	0.246
NAP from Xerogel	0.846	0.0045	0.859	0.0379	0.986	0.500

3:4: دراسة السيطرة على تحرير العلاجين NAP، MTX من المركبات النانوية المهجنة :

تمت دراسة تحرير العلاج من المركبات النانوية المهجنة داخل الوسط المائي لكاربونات الصوديوم المائية بتركيز (0.5) مولاري و بفترات زمنية تراوحت بين (10-160) دقيقة بحسب المعادله الاتية:

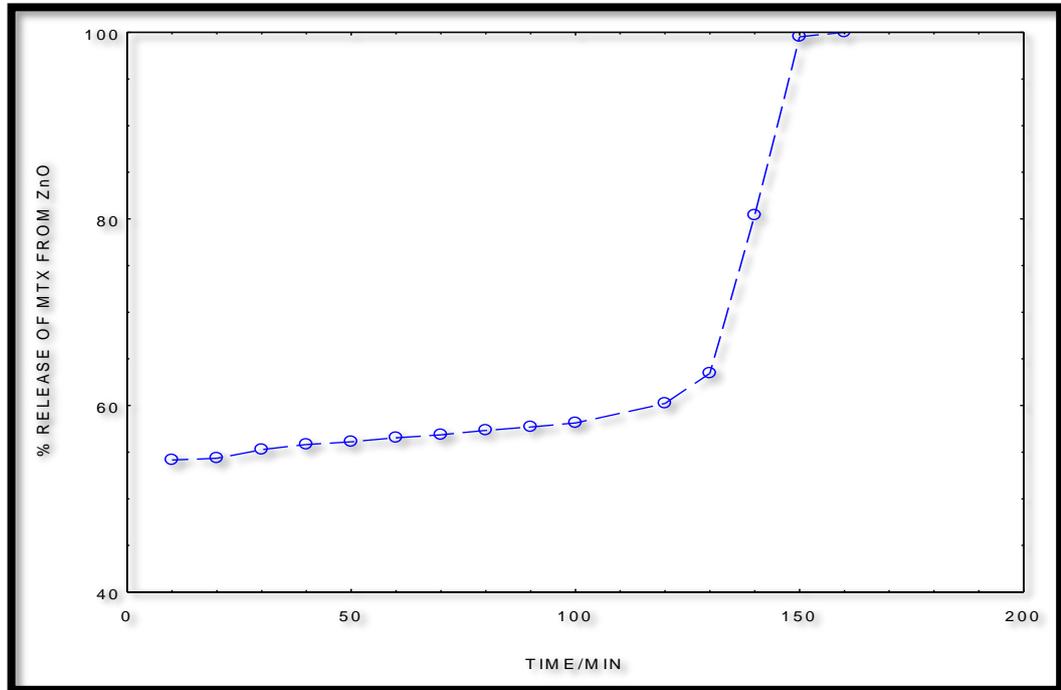
$$\text{Release \%} = \text{Ct}/\text{CT} * 100$$

من خلال رسم قيم $Ct/CT*100$ مقابل الزمن (t) ثم استخراج النسبة المئوية لتحرير العلاج كما موضح بالاشكال الاتيه:
(48-4)، (49-4)، (50-4)، (51-4)، (52-4)، (53-4) وكان بدء التحرر في الزمن (0.25) ساعة.

1:3:4: دراسة النسبة المئوية لتحرر علاجي MTX و NAP من المركبات النانوية المهجنة :

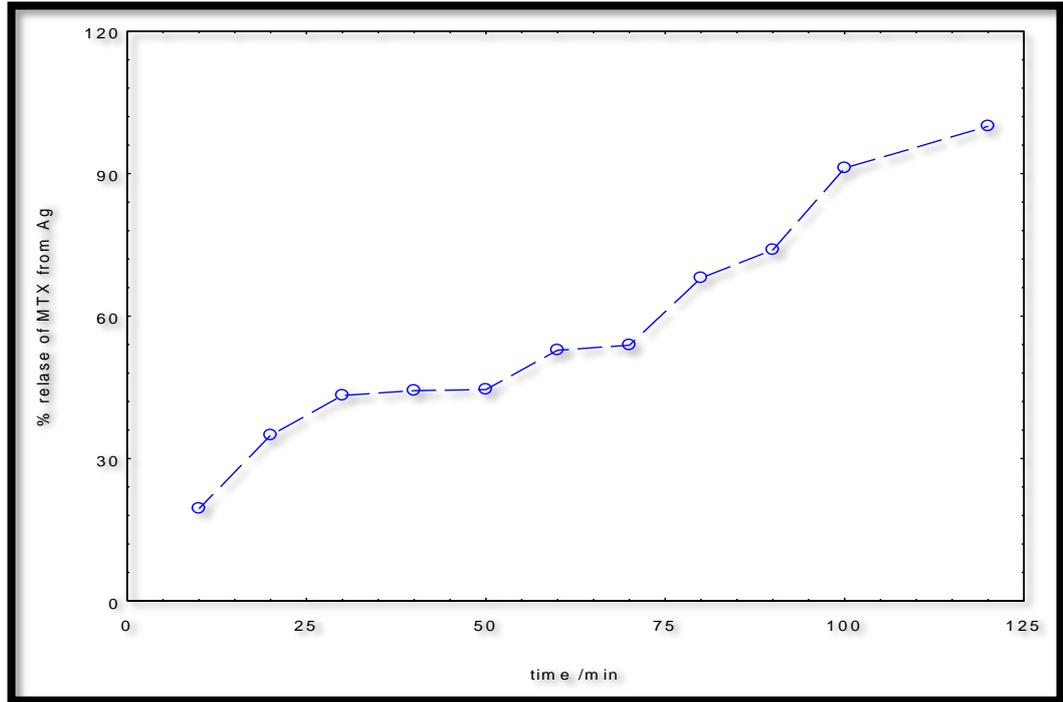
1: 1:3:4: دراسة النسبة المئوية لتحرر علاج MTX من المركبات النانوية المهجنة :

يبين الشكل (48-4) ان شدة التبادل الايوني السطحي بين المركب MTX/ZnO و الانيون $(CO_3)^{2-}$ القادم من الكاربونات تكون كبيره مما يجعل نسبة تحرر علاج MTX تصل الى اكثر 98% في وسط كاربونات الصوديوم بتركيز 0.5 مولاري خلال ساعتين ونصف من زمن بدء التفاعل .



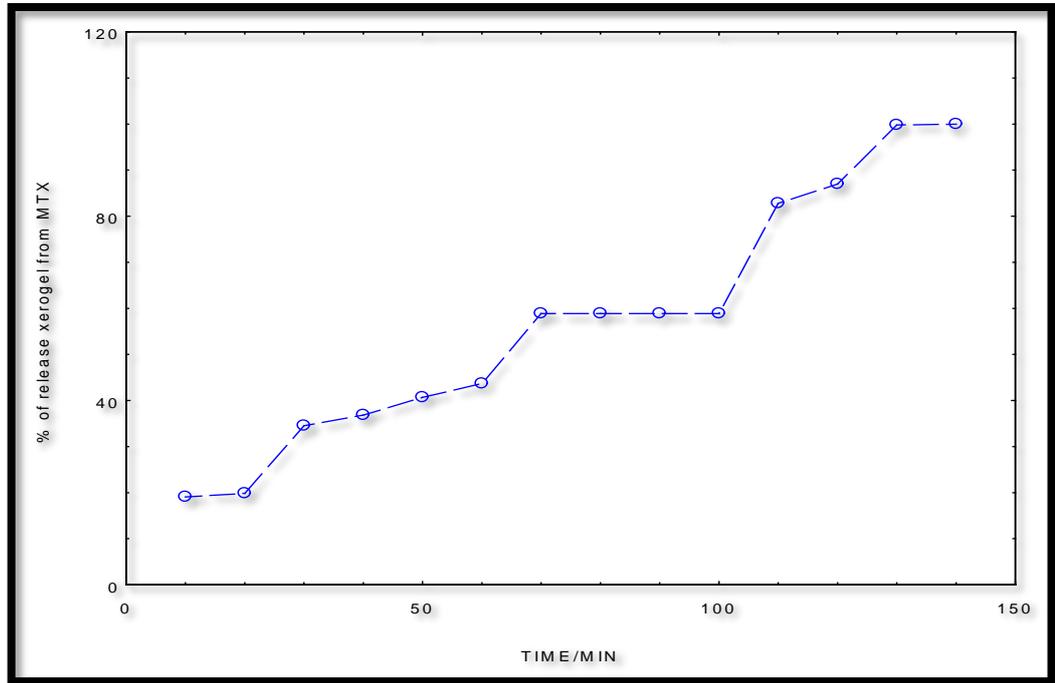
شكل(48-4): النسبة المئوية لتحرر لعلاج الميثوتركسات MTX من المركبت النانوي ZnO:

يبين الشكل (49-4) ان نسبة تحرر علاج MTX الى وسط الكاربونات بتركيز 0.5 مولاري من المركب النانوي (AgNano / MTX) تصل الى 95% خلال فتره تزيد ساعتين من بدءالتفاعل .



شكل (4-4): النسبة المئوية لتحرر علاج MTX من المركب النانوي Ag nano :

كما تصل نسبة تحرر علاج MTX من المركب النانوي Xerogel / MTX الى ما يقارب 99% الى وسط كاربونات الصوديوم بتركيز 0.5 مولاري في زمن قدرة 150 دقيقة شكل (4-50).



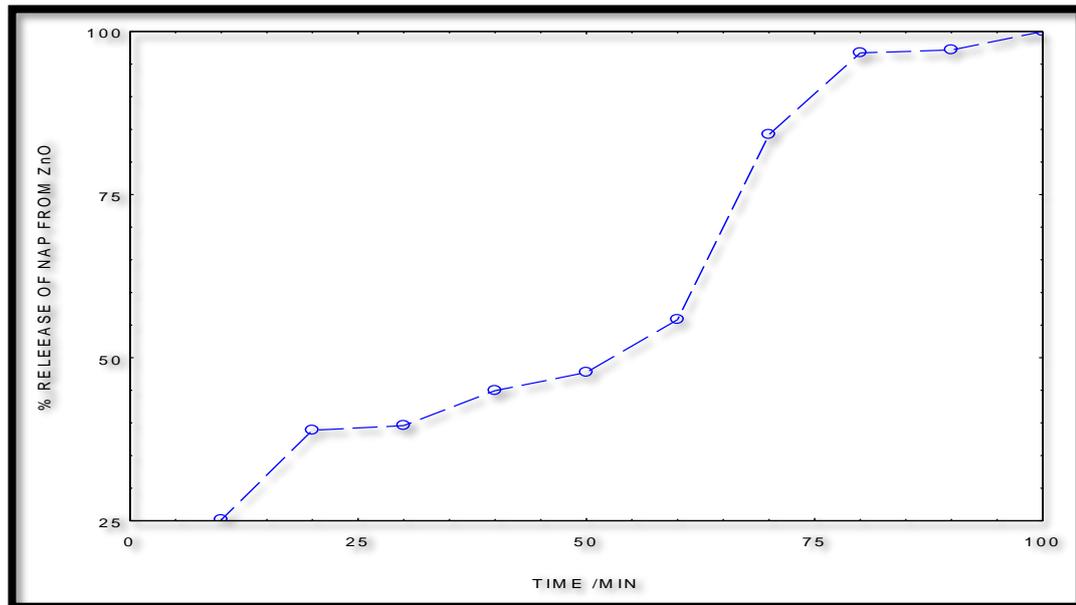
شكل (4-50): النسبة المئوية لتحرر علاج MTX من المركب النانوي Xerogel:

يتضح مما تقدم في الاشكال المذكورة اعلا ان حدوث عملية انطلاق العلاج من المركبات النانوي ZnO الى وسط كاربونات الصوديوم ففي الشكل (4-48) تكون بطيئة في بداية التجربة لتعود هذه العملية بالاسراع وبعد مرور ما يقارب (120) دقيقة من بدء التجربة تكون ثابتة نسبيا . اما فيما يخص نسبة تحرر علاج MTX من المركبين النانويين (Agnano) ،

(xerogel) المبينة في الاشكال (4-49) ، (4-50) على التوالي أنه الذكر فيلاحظ أنها تكون سريعة مقارنة مع نسبة تحرر MTX من المركب اوكسيد الزنك شكل (4-48) فتكون هذه النسبة متدرجة في السرعة الى ان تثبت في نهاية وقت التجربة، وهذا من الممكن ان يعزى الى التركيز العالي لايون الكاربونات $(CO_3)^{2-}$ مما يسبب تحرر كميات متزايدة من العلاج الى الوسط المحيط ، وان تدرج عملية التحرر متصاعد مما يدل على ان عملية التبادل الايوني للكاربونات تكون بشكل تدريجي مما يحافظ على تدرج نسبة التحرر لعلاج MTX وتكوين مركب جديد مع ايون الكاربون المتبادل ليعادل الايون الذي تحرر من العلاج (Chotbi et al. , 2010) ، وبالمقارنة مع نسبة التحرر لعلاج MTX من المركب النانوي اوكسيد الزنك نلاحظ حدوث عملية التحرر ببطء في بداية التجربة لتعود لتكون سريعة بعد مرور (125) دقيقة من زمن التجربة وهنا تدخل عمليات التحلل المائي مما يدل على ان امسالك المركب النانوي (ZnO) بعلاج MTX بشكل قوي الذي يجعل عملية التحرر تكون بطيئة في بداية التفاعل

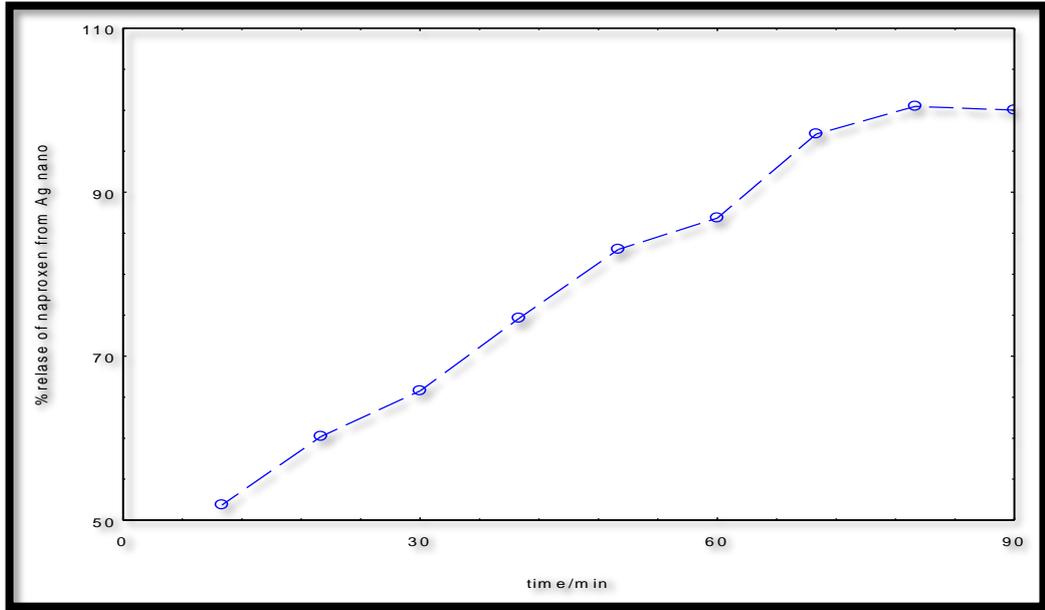
2: 1:3:4: دراسة النسبة المئوية لتحرر علاج NAP من المركبات النانوية المهجنة :

يوضح الشكل (4-51) نسبة التحرر لعلاج النبروكسين من المركب النانوي (ZnO/NAP) الى وسط كاربونات الصوديوم بتركيز (0.5) مولاري والتي بلغت أكثر من (95%) بعد مرور (90) دقيقة من زمن بدء التجربة .



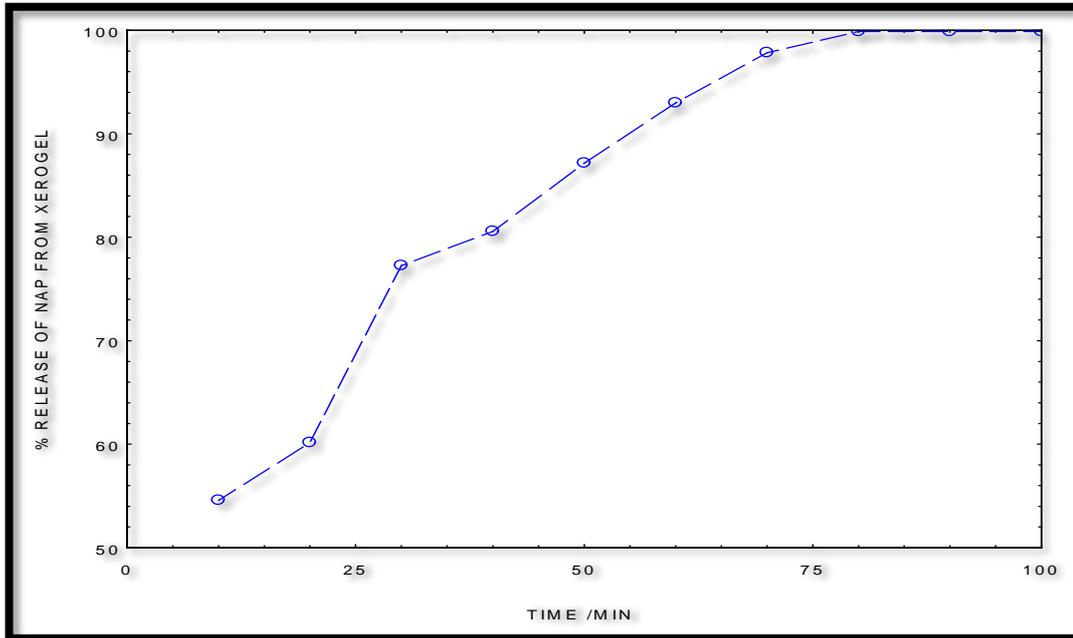
شكل (4-51): نسبة تحرر علاج NAP من المركب النانوي (ZnO/NAP):

اما نسبة التحرر لعلاج الـ NAP من المركب النانوي (Agnano/Nap) الى الوسط وصلت الى (99%) بعد مرور (90) دقيقة من زمن بدء التجربة وبتركييز نسبية اعلى من نسبة تحرر علاج (NAP) من المركب النانوي (ZnO/NAP) (في بداية التجربة الى زمن (60) دقيقة من بدء التجربة لتصل الى اكثر من (85%) الى زمن مابعد (60) دقيقة مقارنة مع نسبة التحرر في المركب النانوي (Agnano/Nap) التي وصلت الى (95%) بعد الدقيقة (60) من زمن بدء التجربة شكل (4-52).



شكل (4-52): نسبة المنوية لتحرر علاج NAP من المركب النانوي (Agnano/Nap):

كما يبين الشكل (4-53) ارتفاع شديد في نسبة تحرر العلاج (NAP) الى وسط الكربونات بتركيز (0.5) من مركب (Xerogol / NAP) النانوي التي وصلت نسبة التحرر الى (100%) قبل الدقيقة 90 من زمن بدء التجربة متخطية بذلك نسبي التحرر للعلاج من المركبين النانويين ZnO/NAP و Ag/NAP .



شكل (53): نسبة تحرر علاج NAP من المركب النانوي (xerogol / NAP):

مما تقدم يتبين في الاشكال المذكورة اعلا ان عملية تحرر العلاج قد تمت بصورة سريعة في بداية عملية التحرر من المركبات النانوية الثلاثة آنفة الذكر وذلك بسبب التواجد الكبير لايونات الكربونات $(CO_3)^{2-}$ التي لها القابلية على الاتحاد من الايون المتحرر من المركب النانوي في الوسط لتكوين مركبات جديدة تؤدي الى التبادل الايوني مع الايونات المتحرر من تلك المركبات النانوية .

فسر العالم Biswick (2012) التححر السريع في تجربة مماثلة للحامض (Caffeic acid) من المركب النانوي لاوكسيد الزنك في بداية التجربة ربما يعود الى سببين هما وجود كميات قليلة من الايون CO_3^{2-} على المركب وان الايونات تكون موجودة على السطح وعلى حافة البلورات للمركب النانوي لذلك يسهل تحرر المواد بسبب قوة المسك الضعيفة . تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه (Kovanda et al., 2011) عند دراسة تراكيز مختلفة من محاليل الكربونات المائية المؤثرة على تحرر المواد من اوكسيد الزنك النانوي اذ وجدت معدل التححر يكون سريعاً في زمن بدء التجربة وبعد ذلك يتم حصول التوازن اذ يكون معدل التححر بطيئاً تدريجياً، كما بين ان كمية المادة المتحررة من المركب النانوي ومعدل التححر تزداد عموماً مع زيادة التركيز الاولي لايونات الكربونات في المحاليل المائية ويلاحظ من النتائج المذكورة في اعلاه ان عملية تحرر العلاج من المركب النانوي تعتمد على كمية الايونات CO_3^{2-} القادمة من الوسط المائي للكربونات وعلى طبيعة المركب النانوي المحضر اذ تعتمد شدة مسك المواد من قبل المركب النانوي على طبيعة توزيع الايونات على سطح المركب وبين بلوراته في ذلك الوسط .

4:4: تأثير المعالجة على المتغيرات المناعية

1:4:4: تأثير المعالجة بـ MTX، NAP الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج

NAP، MTX في مستويات تركيز السيتوكين IL-1β:

تشير نتائج الجدول (4-15) الى ان استحداث التهاب المفاصل الرثياني في ذكور الجرذان بواسطة حقنها بمادة CFA لدى مجموعة السيطرة الموجبة G2 ادى الى ارتفاع معنوي ملحوظ ($P < 0.05$) بمعدل تركيز IL-1β اذ بلغ (86.99 ، 72.28) pg/ml لمدة ستة اسابيع ولمدة ثلاث اسابيع من الاصابة على التوالي بالمقارنة مع معدل تركيزه لدى مجموعة السيطرة السالبة (G1) (6.85 ، 7.97) pg/ml لمدة كاملة (ست اسابيع) ولنصف المدة (ثلاث اسابيع) على التوالي والتي لم يتم حقنها بمادة CFA ، وهذا جاء متفقاً مع ما توصلت له الدراسات (Thiyagarajan et al., 2015 ; Adkar et al., 2014) اذ بينت نتائجها أن استحداث التهاب المفاصل الرثوي بمادة CFA قد سبب ارتفاعاً في عدد خلايا الدم البيض في دم ذكور الجرذان البيض ، وهذا يتفق كذلك مع نتائج الدراسة (Daniel et al., 2007) التي عزت هذه الزيادة إلى ان خلايا الدم البيضاء تعد من المكونات الرئيسية التي تشارك في الاستجابة المناعية الالتهابية إذ تعد كمؤشر لقياس حالة المرض . كما يمكن أن يعزى الارتفاع إلى زيادة إفراز الانترليوكين-1 (IL-1) بواسطة الخلايا البلعمية إذ تعمل هذه المادة على زيادة ترشيح خلايا الدم البيض من مجرى الدم إلى مفاصل العظام وبالنتيجة زيادة تراكمها وأعدادها .

تبين ان المعالجة لمدة كاملة بالمركب النانوي ZnO الحر (G3) ادى الى انخفاض معنوي ($P < 0.05$) بمعدل تركيز IL-1β (50.15) pg/ml مقارنة مع مجموعه السيطرة الموجبة (G2) المصابة وغير المعالجة لمدة كاملة ، في حين كانت المعالجة بالمركب النانوي ZnO (G3) (نصف المدة) تؤدي الى انخفاض ملحوظ بمعدل IL-1β (56.06) pg/ml . جاءت النتائج اعلاه مختلفة مع ما توصلت له الدراسات (Klippstein et al., 2010; Coradeghini et al., 2013) اذ اشارت تلك الدراسات الى الوظيفة الأساسية للجهاز المناعي هو الكشف والتعرف على المواد الغريبة من أجل حماية المضيف ، و الجسيمات النانوية يمكن أن تتداخل مع هذه الوظيفة أو يمكن أن تشخص بنفسها كمستضدات خارجية وبالتالي تستحث الاستجابة المناعية. وقد أظهرت العديد من الدراسات أن جسيمات ZnO من التركيب الكيميائي نفسه ولكن باحجام مختلفة تشكل مخاطر عديدة وتزداد تلك المخاطر بصغر حجم الجسيمات وتكون أكثر ضرراً ، وقد ركزت الدراسات النانوية على السمية الخلوية لجسيمات ZnO والتي تحدث في تراكيز مختلفة اعتماداً على حجم تلك الجزيئات ، اذ

يمكن أن تحدث آثار شبيهة قاتلة وطويلة الأجل على الخلايا إذا كانت بأحجام نانوية منخفضة (Ingle *et al.*, 2014 ; Dworak *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2008).

كما تشير نتائج الدراسة الحالية ان المعالجة بمركب (G4)Agnano ادى الى ارتفاع طفيف في معدل تركيز IL-1 β بالمقارنة بمجموعة السيطره الموجبة (G2) في المدة الكاملة للعلاج ، كما كان هذا الارتفاع معنوي (P<0.05) في نصف الفتره من العلاج اذ بلغ تركيز IL-1 β (131.53,91.27) pg/ml على التوالي ، تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ماتوصلت اليه الدراسات (Seiffert *et al.*, 2014 ; Yen *et al.*, 2009) التي اشارت ان جسيمات الفضة النانوية أكبر من 100 نانومتر تميل إلى التجمع نسبيا بسرعة في المختبر بالمقارنة مع الجسيمات 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 جسيمات الفضة النانوي ذات حجم 5 - 20 نانومتر تسبب السمية الخلوية وتكوين ROS وبشكل اكبر من الجسيمات النانوية فوق 80 نانومتر التي تحفز الاستجابات المناعية الالتهابية بتركيز أقل. وتتسبب تلك الاحجام بانتاج السيتوكينات الالتهابية منها وبشكل رئيس IL-8 ، IL-1 ، IL-6 ، و TNF- α هي كبرى السيتوكينات التي يسببها التعرض للفضة النانوية في المراحل المبكرة. تشير نتائج هذا الجدول كذلك لوجود انخفاض ملحوظ في معدل تركيز IL-1 β لدى مجموعة G5 المعالجة بمركب النانوي Xerogel وبالمدة الكامله للعلاج مقارنة مع مجموعة السيطره الموجبة G2 اذ سجل معدل تركيز Pg/ml 69.34 بينما جاء تركيزه لنصف مدة العلاج مساوي تقريبا لمستوى تركيزه في مجموعة G2 بعد ثلاثة اسابيع من الاصابة اذ بلغت Pg/ml 75.79.

أكد Mohanan و اخرون (2010) ان السيتوكينات المحفزة للالتهاب (pro-inflammatory cytokines) تستعمل كعوامل للتنبؤ بالآثار المناعية لاستخدام المركبات النانوية وإمكانية احدثها للتسمم الخلوي من خلال الالتهاب ، اذ يمكن ان تتغير النتائج العلاجية للمكونات النانوية من خلال معرفة إدارة وكيفية التعامل مع الجسيمات النانوية وتحويلها في المركبات الجلاتينية (Xerogel) فمن الممكن ان يحدث استقطاب للتوازن بين TH1 و TH2 وانتاج السيتوكينات باتجاه مسار معين مفرد على سبيل المثال، المعالجة بالمركب النانوي poly-hydroxylated metallofullerenol يؤدي لاستقطاب التوازن السيتوكيني نحو TH1 السيتوكينات عن طريق خفض إنتاج TH2 وانتاج السيتوكينات (IL-4, IL-5 and IL-6) وزيادة السيتوكينات IFN- γ & TNF- α من خلال إنتاج TH1 في مصف الفئران المعالجة بهذا المركب (Liu *et al.*, 2009) ، ويعزى السبب في زيادة إنتاج كميات كبيرة من السيتوكينات pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL1- β , IL-12 and IFN- γ) الى استنساخ الحمض النووي الخاص بانتاج تلك السيتوكينات في مصف الفئران نتيجة معاملتها بتلك المركبات النانوية المحورة (Tan *et al.*, 1999) .

ان معالجة ذكور الجرذان البيض المستحث بها التهاب المفاصل الرثياني بمادة CFA بعلاجي MTX (G6) NAP, (G7) يؤدي الى انخفاض معنوي واضح (P<0.05) في مستوى تركيز IL-1 β وذلك بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة G2 بالنسبة للمدة الكاملة للعلاج اذ بلغت مستويات تركيزه بعد المعالجة بـ MTX ، NAP (50.13 ، 33.71) Pg/ml على التوالي ، اما بمدة علاج الثلاثة اسابيع (نصف المدة) فكانت نتائج المعالجة بعلاج MTX تؤدي الى انخفاض معنوي بمستوى تركيز IL-1 β والمعالجة بعلاج NAP تؤدي الى انخفاض ملحوظ بمعدل تركيز IL-1 β اذ بلغت (59.85 ، 42.70) Pg/ml على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة G2 لنصف المدة التي بلغت (72.28) Pg/ml ، وهذا موافق لما اشارت اليه الدراسة (Xin *et al.*, 2017) والتي اكدت ان الحقن للجرذان البيض بمادة CFA في اخصص القدم يؤدي الى ارتفاع في مستوى السيتوكينات المحرزة للالتهاب في حيوانات التجربة مثل (IL-1 , IL-6 , IL-8) interleukin وعامل النخر الورمي (TNF - α) وكذلك granulocyte-macrophage

leflunomide, methotrexate (MTX), cyclosporine و colony-stimulating (GM-CSF) وان المعالجة بعلاجات glucocorticoids (CSA), azathioprine (AZA), (LEF) تؤدي الى تخفيف التخريب الحاصل على مستوى المفصل والانسجة المحيطة من خلال تثبيط هذه السيتوكينات المحرصة للتهاب . ان المعالجة بالمركبات النانوية بعد تحميل العلاجات عليها تشير نتائج الجدول (4-15) الى ان العلاج بمركب ZnO / MTX (G8) ادى الى انخفاض معنوي كبير (P<0.05) في مستوى تركيز IL-1 β اذ بلغ (6.94) مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة G2 بالمدة الكاملة للعلاج اذ يصل هذا الانخفاض الى مستوى ينعدم فيه وجود فرق بمستوى التركيز بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (G1) اذ بلغ مستوى تركيزها فيها 6.85 pg/ml . فيما تشير ان لمدة العلاج بهذا المركب اثر كبير اذ تشير نتائج الجدول المذكور ان العلاج بمركب ZnO / MTX (G8) لمدة ثلاث اسابيع (نصف المدة) تؤدي الى انخفاض ملحوظ بمستوى تركيزه 38.93 pg/ml مقارنة مع نصف مدة المعالجة بعلاج MTX الحر وكذلك العلاج بالمركب ZnO النانوي الحر التي بلغت النسب فيها (42.70 ، 56.06) pg/ml على التوالي . كما تشير النتائج ان العلاج بالمركب النانوي ZnO / MTX (G8) لنصف المدة تؤدي الى انخفاض في مستوى تركيز IL-1 β بشكل قريب من تركيزه بالمجموعة المعالجة بعلاج MTX الحر (G6) (33.71) Pg/ml ولمدة علاج كاملة (ست اسابيع) بعد حساب قيمة T الجدولية .

توافق نتائج الدراسة الحالية مع كل من (Liang *et al.*, 2004 ; Liggins *et al.*, 2004) الذي اشارت الى ان علاجات التهاب المفاصل يجب ان تستخدم بحذر شديد بسبب السمية العالية ، اذ غالبا ما تكون الآثار الجانبية واضحة بشدة عند ما لا تدار بشكل منهجي ومع ذلك توجد آثار مفيدة لعلاجات paclitaxel and methotrexate دون سمية واضحة و آثار جانبية في النماذج الحيوانية فتصبح فئات علاجية لتثبيط الخلايا التي تقوم بافراز العوامل المحثة للتهاب ، ويعود السبب في تحسين قابليتها العلاجية الى استخدام نظام توصيل العلاج (drug delivery system DDS) داخل المفصل تتكفل به المركبات النانوية دون اثار جانبية تذكر ، فيما اختلفت النتائج اعلاه مع ماتوصل اليه Janssen واخرون (2014) الذي اقترح انه عند تصنيف الأدوية المرشحة لاستخدامها مع DDSs اي بعد تحميلها على المركب النانوي يجب ابعاد الادوية ذات الطبيعة الكيميائية السامة (MTX) لان من الممكن عند دمجها في DDSs يزداد تعقيد هذا العلاج .

ان لدى معالجة الجرذان المصابة بمادة CFA بمركب Ag nano / MTX (G9) تظهر نتائج جدول (4-15) وجود انخفاض معنوي (P<0.05) في معدل تركيز IL-1 β اذ بلغت 12.20 pg / ml مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة G2 ولنفس المدة وعند مقارنة مجموعة G6 المعالجة بعلاج MTX الحر مع مجموعة G9 نلاحظ وجود انخفاض في مستوى تركيز IL-1 β فيها لمدة علاج كاملة لكل منهما، وكذلك فيما لو قارنا مجموعة G9 مع مجموعة G4 المعالجة بمركب Ag الحر (91.27) pg / ml لمدة كاملة من العلاج فيكون في هذه الحالة الفرق معنوي وبشكل كبير بمستوى (P<0.05) ، اما فيما لو قورنت مجموعة G9 مع نصف مدة العلاج بمركب Ag nano / MTX مع مجموعة G6 المعالجة MTX الحر يلاحظ عدم وجود فروق معنوية اذ بلغت 43.30 Pg/ml بعد حساب قيمة T الجدولية ، جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما اشارت اليه دراستين اجريتا بواسطة Elron-Gross واخرون (2009) بوجود انخفاض في التهاب مفصل الركبة للجرذان المستحث فيها التهاب المفاصل بعد معالجتها بالمركب النانوي Liposomal dexamethasone and diclofenac من مجموعة MTX بالمقارنة مع مجموعة السيطرة التي يقيها التصوير بالرنين المغناطيسي ، وكذلك مع نتائج دراسة Dong *et al.*, (2013) التي اظهرت ان علاج (Celecoxib-hyaluronate- Cxb) المحمل على الجسيمات النانوية الشحمية يكون أكثر فعالية في السيطرة على الألم ووحماية الغضاريف من التآكل من علاج Cxb وحده ، او المركب الشحمي liposome الحر برغم من ان الجسيمات الشحمية هي مستقرة وفعالة ومتوافقة حيويًا لكن وقت بقائها بالجسم يكون قليل نسبيا مقارنة مع مركبات الفضة النانوية المستخدمة ك DDSs . اشارت دراسة (Kopecek ; 2007) ان المركبات الجلوتينية (Hydrogels)

(كالفضة النانوية غير قابلة للذوبان تحبس الماء وتقوم ربطه بسلاسل البوليمر المكونة من هياكل ثلاثية الأبعاد ، إذ يمكن ان يعد (Hyaluronic acid (HA) المحمل على مركبات الهيدروجيل علاجاً للمفصل المصاب استناداً الى وزنها الجزيئي وتكوين الروابط العرضية (Cross-linked) و يعتقد ان الية عملها تعتمد على لزوجتها (viscosity) و التشحيم (Lubricity) من ما يساعد في استعادة فسلجة المفصل الطبيعية الى حد كبير ، افضل من (hyaluronic acid (HA الحر او مركب الفضة الجلانتينية .

اما ما يخص المجموعة G10 المعالجة بمركب xerogel / MTX النانوي التي يبلغ فيها معدل تركيز IL-1 β (14.18) pg/ml مما يشير الى وجود انخفاض معنوي (P<0.05) عند مقارنتها بمجموعة السيطرة الموجبة G2 ولمدة علاج كاملة وكذلك بوجود انخفاض معنوي عند مقارنتها بمجموعة G5 المعالجة بمركب Xerogel الحر (69.34) Pg/ml للمدة ذاتها من العلاج ، وكذلك لدى مقارنتها مع مجموعة G6 يظهر وجود انخفاض ملحوظ في مستوى تركيزه الذي بلغ (33.71) pg/ml ، اما لو قورنت النتائج الخاصة بالمجموعة G10 ولنصف مدة العلاج 38.52 pg/ml مع المجموعة G6 المعالجة بـ MTX الحر لمدة علاج كاملة (33.71) Pg/ml يلاحظ عدم وجود فرق يعتد به فيما بينهما مما يشير الى تساوي كفاءة المعالجة لكلا العلاجين تقريبا بعد حساب قيمة T.

جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع دراسة اقترحت تطوير نظام اوصول العلاج DDS لعلاج MTX الموقعي (Localizes / MTX) المستخدم في معالجة التهاب المفاصل الرثياني (RA) من خلال تكوين كريات صغيرة ذات قياسات نانوية الحجم والعمل على تغيير الخصائص العلاجية في المختبر *in vitro* منها السيطرة على التحرر ودرجة الحموضة والاستقرار وطول مدة التخزين و اظهرت زيادة اختراق العلاج للجلد ثلاثة إلى أربعة أضعاف باستخدام حمض الأوليك (Oleic acid) مع مركبات Ufasomes مقارنة مع العلاج الموقعي الحر السائل او المستخدم معه هلام الكاربوبول carbopol xerogel وفي نهاية التجربة اتضح توفير اكثر 50% من الجرعة المستخدمة عن طريق الجلد (Sharma & Arora, 2012)

اظهرت كذلك نتائج الدراسة الحالية ان علاج الحيوانات المحقونة بمادة CFA بالمركب النانوي ZnO NAP / (G11) تؤدي الى انخفاض معنوي (P<0.05) في مستوى تركيز IL-1 β مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة G2 اذ بلغ مستوى تركيزه (42.95) pg/ml لمدة العلاج الكاملة ، اما بالمقارنة مع مدة العلاج الكاملة بعلاج NAP (G7) و مركب ZnO النانوي الحر (G3) فانخفضت تلك النسبة انخفاض غير معنوي وبشكل ملحوظ اذ بلغت (50.13 ، 50.15) Pg/ml على التوالي . اما العلاج بالمركب النانوي ZnO / NAP فتشير نتائج الجدول (1-4) ان مدة العلاج ثلاثة اسابيع (نصف المدة) قد بلغ تركيزه فيها (50.76) Pg / ml وهي مقارنة كثيرا مقارنة مع نتائج العلاج بـ NAP الحر لمدة كاملة .

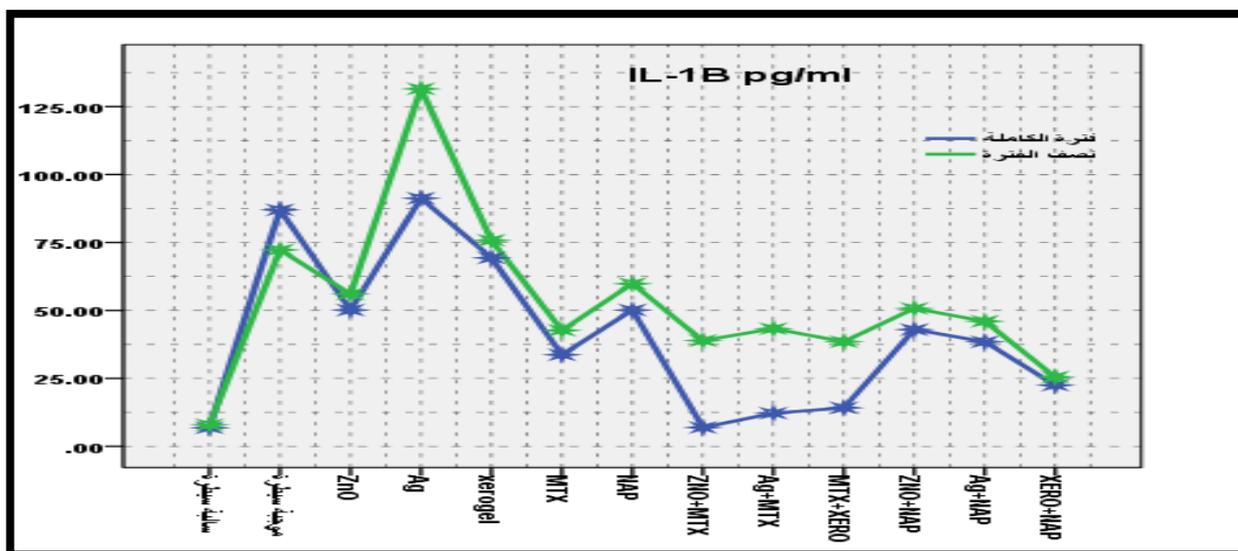
دراسة (Trif et al.2010) اشارت ان جسيمات اوكسيد الزنك النانوية (ZnO nano) التي تستخدم لتوصيل علاجات التهاب المفاصل غير الستيرويدية الى الخلايا المتجمعة بالمفصل تكون افضل من المركبات الشحمية النانوية Liposomes من وتلك التي يدخل في تركيبها البوليمر ، اذ ان الجسيمات الشحمية Liposomes يمكن أن تستخدم لاوصول علاج Lactoferrin لالتهاب المفاصل الناتج من حقن مادة collagen-induced arthritis في الفئران ولكن كفاءتها أقل بكثير بالمقارنة مع المركب المستخدم لاوصول نفس العلاج اذ استخدمت هذه المركبات كـ DDSs الحاوية على اوكسيد الزنك النانوي ، وربما يكون هذا هو سبب تحسين فعالية المعالجة بمركب NAP / ZnO للحيوانات بعد اصابتها بمادة CFA والذي اظهرته نتائج الدراسة الحالية .

كما يبين الجدول (4-15) ان مجموعة G12 للحيوانات المعالجة بمركب Ag nano / NAP اظهرت انخفاض معنوي كبير ($P < 0.05$) في مستوى تركيز IL-1 β اذ بلغ (38.47) Pg / ml مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة G2 و G7 المعالجة بالـ NAP الحر لمدة العلاج الكاملة وكذلك لدى مقارنتها مع مجموعة G4 المعالجة بالفضة النانوية الحرة Ag nano (91.27) pg / ml ولنفس المدة ، اما عند مقارنة مجموعة G12 لنصف مدة العلاج والتي بلغت (46.00) Pg / ml مع مجموعة G7 المعالجة بـ NAP الحر نجد انها انخفضت انخفاضا طفيفا بمقارنة التائية المحسوبة .

اكدت نتائج الدراسات (Butoescu *et al.*, 2009 ; Sinhae & Trehan, 2003) استخدام المركبات النانوية لتوصيل العلاج داخل المفصل فعال جدا ، اذ ان استخدام (poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) باعتباره DDS مع مضادات الالتهاب غير الستيروئيدية (NAP) تظهر تحسن كبير وزيادة فرص معالجة تقدم RA ويعتقد ان تركيب أحجام الجسيمات المختلفة تؤثر في نتائج DDS الحركية DDS kinetics وكذلك على البيئات الاحصائية لتحرر العلاج ، فان الجسيمات الأصغر من 10 ميكرون يمكن أن تتم بلعمتها بسهولة من قبل الخلايا الزليلية Synoviocytes، في حين أن الجسيمات الأكبر من 20 ميكرون يمكن يؤدي التعرض لها الى تحفيز استجابة الخلايا العملاقة Giant cell ، وكل منها لها استجابة مناعية مختلفة ولكن ليس بالضرورة ان تكون استجابة محرزة للالتهاب وهذا ما اتت اليه نتائج الدراسة الحالية اذ تحسن العلاج بعد تحميله على الجزيئات النانوية قيد الدراسة وبشكل كبير ، في حين ارتفعت معدلات IL-1 β لدى معاملة الحيوانات المصابة فقط بمركب Ag nano الحر (91.27) pg / ml . النتائج التي يظهرها الجدول (-15) والخاصه بمجموعة G13 المعالجة بمركب Xerogel / NAP فتشير الى مستوى تركيز IL-1 β قد انخفض معنويا وبشكل كبير اذ بلغ (22.51) pg / ml مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة G2 ومجموعة G7 المعالجة بـ NAP الحر وكذلك مجموعة G5 المعالجه بمركب Xerogel الحر اذ بلغت (69.34) Pg/ml للمدة العلاجية الكاملة لتلك المجموعات اما عند مقارنة مستوى تركيز IL-1 β في المجموعة G13 لنصف المدة من العلاج يلاحظ وجود انخفاضا معنويا واضحا بدلالة T الجدولية المحسوبة اذ بلغ تركيزه فيها 25.49 Pg/ml مقارنة مع مستواه في المجموعة G7 المعالجة بـ NAP الحر لمدة كاملة مما يشير الى تقليل الوقت والجرعة بشكل كبير يصل الى 50% . دراسة (Grund *et al.*, 2011) اكدت ان التطبيق السريري يعد بغاية الاهمية لمعرفة التوافق الحيوي المشترك بين علاج النابروكسين و DDSs اذ ان استخدام المركبات النانوية (Xerogel) في علاج التهاب المفاصل الرثياني على نطاق واسع وتعد متوافقة حيويًا مع DDSs ، ولكن عند تحليلها ترفع الحامضية ويمكن أن يقلل PH في البيئة المحيطة ، لذلك يجب أن يكون نظام إيصال العلاج DDSs قابلا للتحلل الامن تماما اذ أن بقايا الجسيمات النانوية الحاملة من الممكن أن تكون سببا في تقدم التهاب المفصل من خلال تعزيز افراز الوسائط الالتهابية IL-1 β و TNF- α ، وهذا ما اثبتته نتائج الدراسة الحالية اذ اشارت الى ان طريقة التصميم والحجم لـ DDSs تؤثر على خصائص العلاج الذي يصبح عرضة للبيئية الداخلية المحيطة .

جدول (4-15): تراكيز السيتوكين IL-1 β pg/ml قبل وبعد المعالجة بـ MTX، NAP، الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج MTX، NAP.

المعاملة	المدة	المتوسط	الخطأ القياسي	Isd	المعاملة	الفترة	المتوسط	الخطأ القياسي	التائية المحسوبة
سيطرة سالبة (G1)	المدة الكاملة	6.85	2.50	31.91 32.88 22.91	ZNO+MTX (G8)	المدة الكاملة	6.94	2.89	
	نصف المدة	7.97	0.32			نصف المدة	38.93	4.09	-1.12
	Total	7.41	1.67			Total	22.93	8.32	
سيطرة موجبة (G2)	المدة الكاملة	86.99	20.96		Ag+MTX (G9)	المدة الكاملة	12.20	2.08	
	نصف المدة	72.28	19.44			نصف المدة	43.30	4.21	-2.04
	Total	79.64	19.04			Total	27.75	8.04	
ZnO (G3)	المدة الكاملة	50.15	3.96		MTX+XERO (G10)	المدة الكاملة	14.18	5.07	
	نصف المدة	56.06	1.12			نصف المدة	38.52	7.79	-0.90
	Total	53.10	3.04			Total	26.35	8.42	
Ag (G4)	المدة الكاملة	91.27	17.88		ZNO+NAP (G11)	المدة الكاملة	42.95	6.14	
	نصف المدة	131.53	25.98			نصف المدة	50.76	5.54	-0.20
	Total	111.40	22.78			Total	46.86	5.72	
Xerogel (G5)	المدة الكاملة	69.34	0.00		Ag+NAP (G12)	المدة الكاملة	38.47	4.47	
	نصف المدة	75.79	14.76			نصف المدة	46.00	5.03	1.36
	Total	72.57	15.07			Total	42.23	4.76	
MTX (G6)	المدة الكاملة	33.71	11.09		XERO+NAP (G13)	المدة الكاملة	22.51	6.20	
	نصف المدة	42.70	4.90			نصف المدة	25.49	3.99	8.87
	Total	38.21	8.22			Total	24.00	4.88	
NAP (G7)	المدة الكاملة	50.13	5.79		Total	المدة الكاملة	40.44	15.37	
	نصف المدة	59.85	1.00			نصف المدة	53.01	15.87	
	Total	54.99	4.49			Total	46.73	15.80	



شكل (4-54) تأثير المدة الزمنية على المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج على معدل تركيز IL-1 β 2:4:4: تأثير المعالجة بـ MTX، NAP، الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاجي MTX، NAP في مستويات تركيز عامل النخر الورمي TNF- α .

تبين نتائج الدراسة الحالية جدول (4-16) ان استحثاث التهاب المفاصل الريثاني بواسطة مادة CFA يسبب ارتفاعا معنويا كبيرا ($P<0.05$) في معدل تركيز عامل النخر الورمي TNF- α في مصل الدم لذكور الجرذان البيض اذ بلغا مستويا تركيزية (460.17 ، 449.61) Pg/ml في مجموعتي السيطرة الموجبة (G2) للمدة الكاملة ولنصف المدة من العلاج على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة G1 اذ بلغ مستوى تركيزية فيها (72.53 ، 73.39) Pg/ml للمدة الكاملة ولنصف المدة من العلاج على التوالي ، هذا يتفق مع ما توصلت اليه دراسة (Namdeo and Kale, 2014) التي عزت السبب لارتفاع أعداد الصفائح الدموية يرجع إلى تحفيز جهاز المناعة ضد غزو الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض ومن الواضح تسلل الخلايا الوحيدة في مفاصل الفئران المستحث بها التهاب المفاصل سببا في افراز عامل النخر الورمي .

كما يظهر الجدول ذاته ارتفاعا في معدلات تركيز TNF- α لدى المجاميع G3 , G4 , G5 المعالجة بالمركبات النانوية Xerogel , Ag nano, ZnO لمعدلات (Total) المدة الكاملة ولنصف المدة من العلاج التي اذ بلغت هذه المعدلات (572.72 ، 581.01 ، 496.50) Pg/ml مقارنة مع معدل تركيزية في مجموعة السيطرة الموجبة (G2) اذ بلغ (89. 454 pg/ml) .

إنفقت نتائج الدراسة الحالية مع ماتوصل اليه كلا من (Elsabahy & Wooley 2013) اذ اشارا الى ان الجسيمات النانوية التي تدخل في الجسم عن طريق التجريع تتعرض لتفاعلات معقدة من خلايا الدم والبروتينات و فور دخولها تتكاثف بروتينات الدم على أسطحها وامتزاز والبروتينات على اسطح الجسيمات النانوية يكون الاكليل (protein corona) وهذه التفاعلات تحدد التوزيع البيولوجي والفعالية العلاجية للجسيمات النانوية و كما تسهم في نوع الاستجابة المناعية وهنا جاءت بتعزيز افراز عامل النخر الورمي TNF- α وIL-1 β كذلك كما مر في معالجة الجرذان بمركب الفضة لنانوية Ag nano جدول (4-15) .

دراسة مماثلة اشارت (Aggarwal et al.,2009) الى ان الاستساغة (Opsonization) تعد أحد أهم العوامل المحددة لوصول وتوزيع الجسيمات النانوية في جسم الكائن الحي وان تحفيز المكونات البروتينية الأكثر شيوعا الى الاحاطة بالجسيمات النانوية وتكوين الهالة البروتينية هي بروتينات المتمم ، الألبومين، والبروتينات الشحمية، والفيبرينوجين اذ ان اسطح الجسيمات النانوية تحمل علامات مستضدية تجعلها عرضة للهجوم من قبل Mononuclear phagocytic system (MPS) اذ ان خلايا الدم تتعرض لبعض الجسيمات النانوية قد تنتج السيتوكينات ، ولكن آليات الدقيقة لانتاج السيتوكين غير معروفة لحد الان. على عكس المستضدات التقليدية lipoproteins polysaccharides, DNA, RNA والتي تحفز السيتوكينات بعد استثارة TLRs، فمن غير المعروف ما إذا كان التعرف على الجسيمات النانوية من قبل الخلايا المناعية عن طريق TLRs محددة، أو بواسطة مستقبلات أخرى.

كما تشير نتائج الدراسة الحالية في الجدول (4-16) ان الحيوانات المستحث بها التهاب المفاصل الريثاني و المعالجة بعلاج MTX (G6) NAP (G7) سوف تتخفض بها معدلات تركيزي TNF- α انخفاض معنوي كبير ($P<0.05$) لمعدل العلاج ولكلا المجموعتين (G6 , G7) اذ بلغ معدل هذين التركيزين (344.23 ، 398.15) pg/ml مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G2) التي بلغ معدل تركيز TNF- α فيها (454.89) Pg/ml لمعدل فترتي العلاج ايضا وهذا ما يتفق مع الدراسة (Denarie et al.,2017) التي اشارت ان استخدام علاجات الميثوتركسات لها دور كبير في تثبيط انتاج عامل النخر الورمي TNF- α من خلال تأثيره على انزيمات الاكسدة الحلقية (COX-1, COX-2) وكنتيجة لذلك تثبيط إنتاج TNF- α الذي يتم تصنيعه بشكل رئيسي الخلايا البلعمية خلال نشاط COX-1 الذي يسبب تجميع هذه الخلايا

وانتاج كميات من هذا المركب وكذلك يعمل على خفض الانتاج لعامل النخر الورمي من خلال الفعل التآزري مع باقي العلاجات مثل (IFX) Infliximab من خلال تقليل تكوين انتاج الاجسام المضادة لهذا العلاج (ATI) antibody towards IFX .

تبين نتائج الجدول (4-16) الى وجود انخفاض معنوي واضح ($P<0.05$) في مستوى تركيز TNF- α لدى افراد المجموعة G8 المعالجة بالمركب النانوي ZnO / MTX اذ بلغ هذا التركيز (136.19) Pg/ml مقارنة مع مجاميع السيطرة الموجبة (G2) و المعالجة بالمركب ZnO الحر (G3) والمجموعة المعالج افرادها بعلاج MTX الحر (G6) لفترات العلاج الكاملة في هذه المجاميع اذ بلغت هذه التراكيز (460.17 ، 520.78 ، 324.91) Pg/ml على التوالي .

إن العلاج بنفس المركب (ZnO / MTX) لمدة ثلاثة اسابيع (نصف الفتره العلاجية) يظهر الجدول(4-14) انخفاضا معنويا ($P<0.05$) بتركيز TNF- α (283.62) Pg/ml مقارنة مع مجموعة (G6) المعالجة بـ MTX الحر التي بلغ مستوى التركيز فيها (324.91) Pg/ml لمدة علاج كاملة بعد حساب قيمة T ، مما يزيد كفاءة العلاج من خلال اختصار الوقت والتركيز . أظهرت نتائج الدراسة اتفاقا مع الدراسة اجراها Laxmi (2007) التي اشارت الى ان تحضير مركب نانوي من chitosan gel و المركب غير الايوني (niosomal) الحامل لعلاج MTX (MTX / niosomal) واختبار فعاليته على المتطوعين الأصحاء في علاج الصدفية الموضعية (localized psoriasis) اظهرت انخفاض مستوى عامل النخر الورمي TNF وعدم وجود تحسس (sensitization) او تهيج (irritation) مقارنة باستعمال مركب (niosomal) وحده ا وعلاج MTX الحر.

وعند المعالجة بالمركبين النانويين (G9) Ag nano / MTX ، (G10) Xerogel / MTX لمدة علاج كاملة نلاحظ وجود انخفاضا معنويا ($P<0.05$) في تركيز TNF- α لدى افراد هاتان المجموعتان اذ بلغ تركيزه فيها (229.82 ، 255.32) Pg/ml على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G2) ومجموعة G4 (المعالجة بمركب النانوي Ag nano الحر) ومجموعة G5 المعالجة بمركب Xerogel الحر النانوي ومجموعة (G6) المعالجة بـ MTX الحر اذ بلغ معدل تركيزه في هذه المجاميع (460.17 ، 526.30 ، 481.77 ، 324.91) Pg/ml على التوالي ولمدة علاجه كاملة ، اما لدى مقارنة نتائج نفس المجموعتين (G9 ، G10) لكن لنصف مدة العلاج نلاحظ ان مستوى تركيز TNF- α انخفض بشكل واضح اذ بلغ تركيزه 310.00 Pg/ml ، بينما انخفض في مجموعة (G10) معنويا اذ بلغ 267.54 Pg/ml مقارنة مع مجموعة G6 (المعالجة بـ MTX الحر) الذي كان تركيز TNF- α فيها يبلغ (324.91) Pg/ml وبمدة علاج كاملة .

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه Roy و اخرون (2016) والذي اشار الى ان تحميل علاج MTX على المركب النانوي Theranostic gold (Au) half-shell NPs او Polysialic acid (PSA)-trimethyl chitosan (Xerogel) (TMC) NPs يحفز تكوين اجسام مضادة اتجاه مستقبلات محددة للخلايا البلعمية CD46 ، وان تحميل علاج MTX يكون اكثر فعالية بكثير من العلاج الحر في تثبيط انتاج عامل النخر الورمي TNF- α والقضاء على تقدم التهاب المفاصل بشكل كبير في حيوانات التجربة .

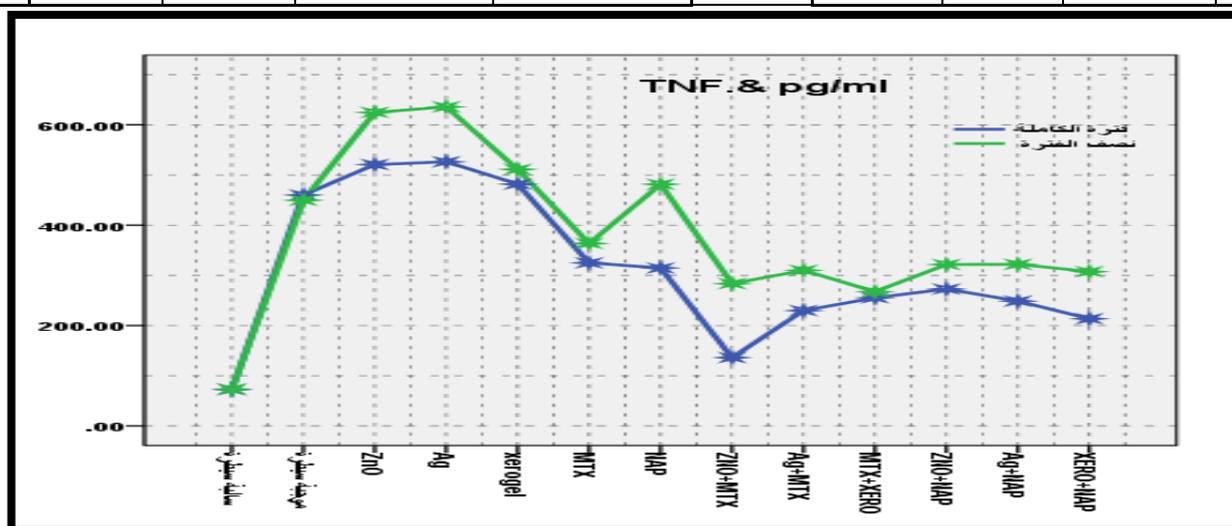
تظهر نتائج الجدول (4-16) للمجاميع G11 ، G12 ، G13 المعالجة بالمركبات النانوية ZnO / NAP ، Ag nano/ NAP ، xerogel / NAP على التوالي انخفاض معنوي ($P<0.05$) في مستوى تركيز TNF- α اذ بلغ مستوى التركيز في المدة العلاجية الكاملة لهذه المجاميع (272.79 ، 248.71 ، 213.61) Pg/ml على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة G2 (460.17) Pg / ml والمجاميع المعالجة بـ ZnO الحر (G3) ، Ag nano الحر (G4) و Xerogel الحر (G5) وعلاج NAP الحر (G7) اذ بلغ مستوى تركيزه في كل منها وعلى التوالي لمدة العلاج الكاملة (78 ، 520 ، 526.30 ، 481.77 ، 314.69) Pg/ml ، وعند مقارنة انخفاض مستوى تركيز TNF- α في المجاميع آنفة الذكر المعالجة بالمركبات النانوية قيد الدراسة والمحمل عليها علاج NAP لنصف مدة العلاج يلاحظ ان مستوى تركيزه قد انخفض

الى مستويات متساوية تقريبا مقارنة مع المجموعة (G7) المعالجة بـ NAP الحر ولمدة علاج كاملة اذ بلغ تركيزه في هذه المجاميع (321.63 ، 321.99 ، 307.93) على التوالي ، مما يشير الى تقليل مدة الشفاء من خلال انخفاض وقت العلاج والجرعة المعطاة الى 50% .

توافقت نتائج الدراسة الحالية مع ماتوصل اليه Wani وآخرون (2014) الذي اكد ان فعالية مركبات Hydrogel النانوية واعتبارها حوامل علاجية ذكية للنابروكسين الى المواقع البيولوجية المستهدفة وذلك لسعة استيعابها وسيطرتها العالية على تحرير العلاج في مناطق الالتهاب مما يحمي المفصل من فعل العوامل الالتهابية وعامل النخر الورمي $TNF-\alpha$ ويعود السبب في ذلك الى عدة عوامل منها ، التوافق العالي بسبب احتوائها على كميات كبيرة من الماء تساعد على تقبلها من الانسجة الطبيعية وهذا يخف الاستجابة المناعية اتجاهها ، سهولة تكسيرها من قبل الجسم مما يجعلها عرضة للاجهزة الاخراجية وبذلك تقليل سميتها ، وكذلك قدرتها على حمل العلاجات والمحافظة عليها لحين وصولها الى الانسجة الهدف ، وايضا استطاعتها الافلات من الجهاز الشبكي البطاني ووصولها الى الانسجة الهدف وتنظيم تحرير العلاج فيها .

جدول (4-16): تراكيز السيتوكين TNF.& pg/ml قبل وبعد المعالجة بـ MTX، NAP، الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج MTX، NAP.

المعاملة	المدة	المتوسط	الخطأ القياسي	التائية المحسوبة
سيطرة سالبة (G1)	المدة الكاملة	136.19	17.69	
	نصف المدة	283.62	30.49	3.35
	Total	209.90	42.13	
سيطرة موجبة (G2)	المدة الكاملة	229.82	39.08	
	نصف المدة	310.00	23.42	1.55
	Total	269.91	35.46	
ZnO (G3)	المدة الكاملة	255.32	40.43	
	نصف المدة	267.54	29.48	4.80
	Total	261.43	32.89	
Ag (G4)	المدة الكاملة	272.79	33.02	
	نصف المدة	321.63	5.07	-1.56
	Total	297.21	24.79	
Xerogel (G5)	المدة الكاملة	248.71	35.27	
	نصف المدة	321.99	9.93	-1.31
	Total	285.35	29.70	
MTX (G6)	المدة الكاملة	213.61	39.69	
	نصف المدة	307.39	13.71	1.09
	Total	260.50	35.47	
NAP (G7)	المدة الكاملة	312.12	77.34	
	نصف المدة	380.92	85.53	
	Total	346.52	82.60	
ZNO+MTX (G8)	المدة الكاملة	158.41	4.23	
	نصف المدة	186.00	4.30	
	Total	122.16	3.95	
Ag+MTX (G9)	المدة الكاملة	76.53	460.17	
	نصف المدة	67.71	449.61	
	Total	66.94	454.89	
MTX+XERO (G10)	المدة الكاملة	102.40	520.78	
	نصف المدة	89.58	624.67	
	Total	92.47	572.72	
ZNO+NAP (G11)	المدة الكاملة	66.48	526.30	
	نصف المدة	96.47	635.71	
	Total	81.04	581.01	
Ag+NAP (G12)	المدة الكاملة	75.20	481.77	
	نصف المدة	97.87	511.22	
	Total	81.11	496.50	
XERO+NAP (G13)	المدة الكاملة	6.69	324.91	
	نصف المدة	70.75	363.55	
	Total	47.43	344.23	
Total	المدة الكاملة	10.03	314.69	
	نصف المدة	87.45	481.62	
	Total	70.09	398.15	



شكل (4-55) علاقة المدة الزمنية على المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج على معدل تركيز TNF-α 3:3:4: تأثير المعالجة بـ MTX، NAP، الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها

علاجي MTX، NAP في مستويات تركيز لانترلوكين 1L-6:

ان استحداث التهاب المفاصل في ذكور الجرذان البيض في مجموعة السيطرة الموجبة (G2) يؤدي الى الارتفاع المعنوي (P<0.05) في مستوى تركيز الانترلوكين 1L-6 الذي بلغ تركيزه 442.25 pg/ml بعد ثمانية اسابيع من الاصابة

مقارنة مع الحيوانات غير المستحث بها التهاب المفاصل وهي مجموعة السيطرة السالبة (G1) اذ بلغ مستواه فيها 34.36 Pg/ml بعد ثمانية اسابيع من بدء التجربة جدول (4-17) ، وتشير نتائج هذا الجدول ان معالجة الحيوانات المستحث بها المرض بالمركبات النانوية قيد الدراسة يؤدي الى انخفاض مستوى تركيزه في تلك المجموع اذ ان مستواه في المجموع G3 (معالجة ZnO) ، G4 (معالجة Ag nano) ، G5 (معالجة Xerogel) بلغ وعلى التوالي (440.13 ، 407.22 ، 385.18 pg/ml) ولمدة ست اسابيع بعد الاصابة مقارنة مع مجموعة السيطرة (G2) ولمدة علاج كاملة ، وهذا ما توصلت اليه دراسة Heng وآخرون (2011) لمقارنة تأثير شكل الجسيمات النانوية لأكسيد الزنك (الكروية مقابل الورقية) ذات مساحة سطحية متماثلة تقريبا وجد ان الجسيمات الكروية على الرغم من كونها ذات فعالية لم تكن هناك تأثيرات في تحفيز إفراز IL-6 وكان ارتفاع طفيف لإفراز TNF- α ناتج بسبب ارتفاع معدل الخلايا البلعمية للفئران المعاملة بجسيمات أكسيد الزنك الكروية ، بالمقارنة مع الفئران التي تمت معاملتها بجزيئات أكسيد الزنك الورقية اذ لوحظ ان الخلايا الاولية Dendritic cells هي التي سببت انتاج السيتوكين TNF- α بكميات اعلى من الجسيمات الكروية ، وبالتالي فإن استهداف انواع محددة من الخلايا هو عامل مهم في تحديد الاستجابة المناعية للجسيمات النانوية .

دراسة (Elsabahy & Wooley, 2013) بينت الية الاستجابة المناعية اتجاه الجسيمات النانوية اشارت الى امتلاك الجسيمات النانوية محددات مستضدية مختلفة ترتبط مع مستقبلات خلوية محددة بعدها تتم عملية الادخال الخلوي Endocytosis الذي يحدد الاستجابة المناعية ، وهناك أربعة طرق رئيسية للبلعمة بواسطة مستقبلات بواسطة نظام المانوز mannose receptor (MRs) ، Fc γ receptor (Fc γ Rs) ، complement receptor (CRs) و كذلك مستقبلات scavenger receptor (SRs) وتتوسط الاستجابة المناعية وتحدد طبيعة هذه الاستجابة سواء بالمانوز او بروتينات المتمم او البروتينات المناعية (Immunoglobulins) بعد ان تتم استساغة الاجسام الغريبة الهدف (NP) بواسطة المستقبلات MR, CR and Fc γ R على التوالي اما مستقبلات SRs فيعتقد انها تتفاعل مع السطوح سالبة الشحنة. كما يمكن للخلايا البلعمية القضاء على تلك المواد الغريبة بواسطة طرق اخرى .

كما ان التعرض للجسيمات النانوية يؤدي إلى زيادة في التعبير الجيني لمستقبلات المانوز على سطح الخلايا البلعمية للحويصلات الرئوية وان الزيادة في التهاب الجسيمات النانوية من خلال تلك الخلايا وبوساطة ارتباط MR-mediated phagocytosis يرافقه الزيادة في تلك المستقبلات والتي تنتهي في نهاية المطاف مع إنتاج (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) ، من خلال تفعيل الاستجابة المناعية ، اما ماتوصلت اليه نتائج الدراسة اعلاه فهو تقليل السيتوكينات الالتهابية بشكل ملحوظ ومسيطر عليه بصورة موجهة.

وتشير نتائج الجدول (4-17) الى انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في مستوى تركيز IL-6 في مجموعة G6 المعالجة بـ MTX الحر اذ بلغ مستوى تركيزه Pg/ml 233.01 مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G2) 442.25 Pg/ml . اما لدى المجموع التي تمت معالجتها بالمركبات النانوية قيد الدراسة والمحمل عليها علاج MTX تشير النتائج جدول (4-17) الى وجود انخفاض معنوي كبير ($P < 0.05$) في مستويات تركيز IL-6 فان مستوى هذا التركيز في المجموع ZnO (G8) / MTX ، (G9)Ag nano / MTX ، (G10) Xerogel / MTX يبلغ مستواه (112.78 ، 119.43 ، 65 ، 120 Pg/ml) على التوالي وبالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G2) ولمدة علاجية كاملة استغرقت ست اسابيع بعد الاصابة . كذلك تمت المقارنة بين المجموع (G8 ، G9 ، G10) أنفة الذكر لنصف مدة العلاج اوجدت النتائج انخفاضاً واضحاً في مستوى تركيز IL-6 اذ كانت التراكيز في هذه المجموعات (216.61 ، 199.71 ، 92 ، 210 Pg / ml) يصل الى مستوى معنوي ($P < 0.05$) في مجموعة (G9 ، G10) بعد حساب قيمة T مقارنة مع تركيزه لدى افراد المجموعة المعالجة بـ MTX الحر (G6) الذي سجلت معدل تركيز قدرة Pg/ml 230.58 لمدة معالجة مدتها ثلاث

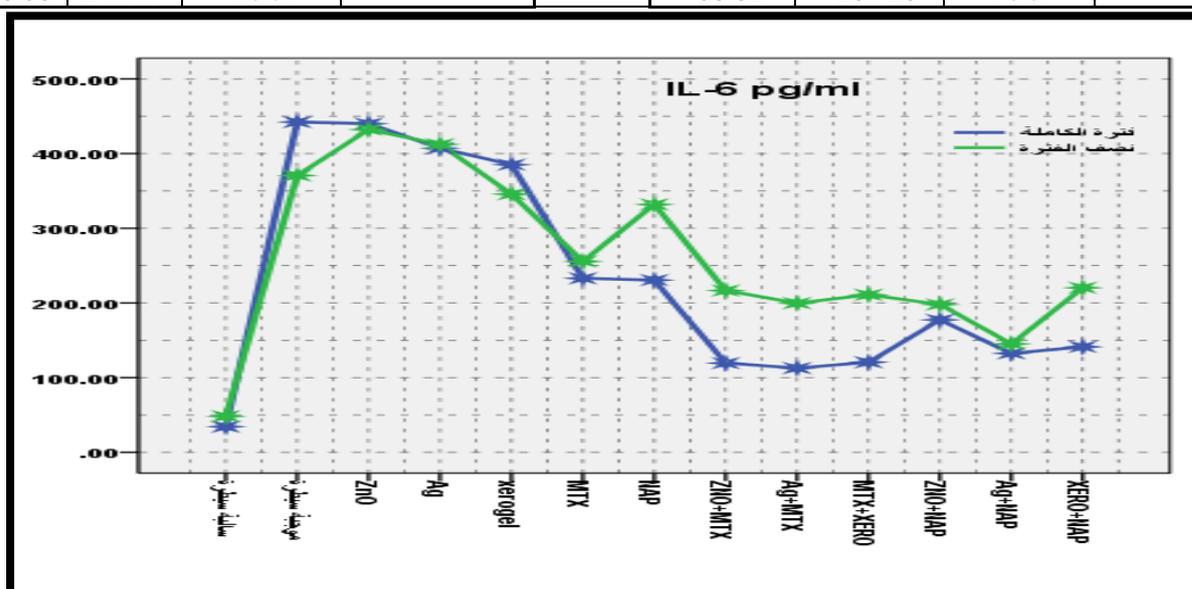
اسابيع من بدء الإصابة. اتفقت النتائج مع ما اشارت اليه دراسة Kranti وآخرون (2014) بان الجسيمات النانوية واحدة من البدائل الفعالة للعلاج الكيميائي لامراض المناعة الذاتية ، اذ استخدمت اعادة صياغة وتطوير علاج MTX من خلال تحميله مع الجزيئات النانوية - القابلة للتحلل poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLG) ادى هذا التحميل الى تحسين للخصائص الفيزيائية والكيميائية للعلاج مثل حجم الجسيمات، الجهد الكهربائي ، والسيطرة على تحرر العلاج ، كما اشارت النتائج المختبرية *in vitro* الى ارتفاع التأثير للخلايا السامة cytotoxic ضد الخلايا التي تعبر عن جين U-343 MGa بواسطة الخلايا العصبية الأرومية البشرية وان الحجم الامثل للجسيمات >200 نانومتر التي ادت انخفاضاً كبيراً في نشاط الخلية السرطانية وارتفاع نشاط الخلايا السامة بواسطة علاج MTX المحمل على الجسيمات النانوية مقارنة مع MTX الحر . كما اشارت دراسة (Mohamed Ali *et al.*,2008) الى ان تحضير مركب نانوي (MTX / liposomes (LMTX من Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphocholine (DPPC) ومنتج الصويا (soy PC) ومنتج مح البيض yolk PC، والكوليسترول cholesterol على شكل Xerogel اذ تم تطبيقه على المرضى يوميا ، تليها التشعيع مقدارها 80 جول من الليزر 650 نانومتر 3 مرات أسبوعياً لمدة 12 أسبوعاً ادت الى تحسين السيطرة على التحرر العلاج ومع زيادة طاقة الليزر ≤ 80 جول ادى وبشكل ملحوظ اطلاق كميات اكثر من العلاج . أظهرت المركبات الجلوتينية النانوية انطباق موديل الرتبة الصفريه لحركات تحرر العلاج ومكافحة النشاط المرضي لالتهاب المفاصل خلال 8 أشهر من المتابعة، نسبة تصل إلى 60% من المرضى الذين عولجوا بالمركب LMTX لم تتكرر لديهم عودة ارتفاع المعايير الالتهابية و كان هذا الاختلاف ذو دلالة معنوية. اذ استنتج أن تطبيق لليزر بقوة J-80 ادى إلى تحسين علاج المرض الى 25% تقريبا مقارنة مع الهيدروجيل (ZnO , Ag nano) ولم تطرأ اي سمية جهازية.

تبين نتائج الدراسة الحالية جدول(4-17) انخفاضاً معنوياً ($P < 0.05$) في مستوى تركيز IL-6 اذ بلغ تركيزه (230.58) Pg/ml في المجموعة المعالجة بـ NAP الحر (G7) لمدة معالجة كاملة مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة G2 ، كما يبين الجدول ذاته وجود انخفاضاً معنوياً كبيراً ($P < 0.05$) في المجاميع المعالج افرادها بـ ZnO/NAP (G11)، Agnano/NAP (G12)، Xerogel/NAP (G13) اذ يبلغ معدل تركيزه فيها (177.35 ، 132.52 ، 141.23) Pg/ml لمدة علاج كاملة على التوالي ، وفي حالة نصف مدة العلاج سجلت النتائج انخفاضاً بمستوى تركيز IL-6 وصل الى اقل من مستواه في المجموعة G7 المعالجة بـ NAP الحر اذ وصلت مستوياته في المجموعات (G11 ، G12 ، G13) الى (95 . 197 ، 145 . 11 ، 220.32) Pg / ml ، على التوالي كان الانخفاض ذو دلالة معنوية ($P < 0.05$) في مجموعة (G12) .

تتماشى نتائج الدراسة الحالية مع دراسة اعدت من قبل Chen وآخرون (2012) اشارت الى رفع مستوى Control release ، عن طريق تحميل العلاج غير الستيرويدي على كريات نانوية Microsphere من الشيتوزان Chitosan بعد تحويله الى مركب جلاتيني اطالة بقائه في الجسم دون تحلل ، كما يظهر ان التحلل الحيوي للمركبات النانوية الحاوية على النيتروجين يترافق مع سيطرة أفضل لتحرر العلاج وتحسين خصائص المركبات من غيرها والسبب بذلك يعود للأحماض الأمينية والأحماض الكربوكسيلية تعد من بين الفئة من البوليمرات التي توفر أكبر قدر من التنوع من حيث التصميم على المستوى الجزيئي لتحسين خصائص control release و اشارت كذلك ان هناك ميزة هامة لتلك المركبات تعزى الى التصميم فإن تحللها في الغالب يعتمد الآلية الأنزيمية ، والتي تتجمع و تعمل على التآكل السطحي للمركبات وتحرير العلاج اذ لوحظ ان حركتها تقترب من الرتبة الصفريه zero-order kinetics مما شجع على استعمالها في DDSs لعلاجات القلب والشرابين والتهاب المفاصل (RA) .

جدول (4-17): تراكيز السيتوكين IL-6 قبل وبعد المعالجة بـ MTX، NAP الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج NAP، MTX .

المعاملة	الفترة	المتوسط	الخطأ القياسي	التائية المحسوبة	المعاملة	الفترة	المتوسط	الخطأ القياسي	Isd
سيطرة سالبة (G1)	المدة الكاملة	34.36	1.37	30.43	ZNO+MTX (G8)	المدة الكاملة	86.82	1.37	86.82
	نصف المدة	48.20	7.26	23.20		نصف المدة	82.41	7.26	82.41
	Total	41.28	5.86	34.16		Total	59.85	5.86	59.85
سيطرة موجبة (G2)	المدة الكاملة	442.25	52.04	15.36	Ag+MTX (G9)	المدة الكاملة	442.25	52.04	442.25
	نصف المدة	370.69	40.56	32.10		نصف المدة	370.69	40.56	370.69
	Total	406.47	46.46	31.22		Total	406.47	46.46	406.47
ZnO (G3)	المدة الكاملة	440.13	13.98	17.68	MTX+XERO (G10)	المدة الكاملة	440.13	13.98	440.13
	نصف المدة	432.24	23.86	1.35		نصف المدة	432.24	23.86	432.24
	Total	436.18	18.20	24.50		Total	436.18	18.20	436.18
Ag (G4)	المدة الكاملة	407.22	45.99	44.99	ZNO+NAP (G11)	المدة الكاملة	407.22	45.99	407.22
	نصف المدة	412.32	32.20	34.45		نصف المدة	412.32	32.20	412.32
	Total	409.77	36.78	37.42		Total	409.77	36.78	409.77
Xerogel (G5)	المدة الكاملة	385.18	20.56	3.08	Ag+NAP (G12)	المدة الكاملة	385.18	20.56	385.18
	نصف المدة	345.78	37.31	20.72		نصف المدة	345.78	37.31	345.78
	Total	365.48	29.43	14.04		Total	365.48	29.43	365.48
MTX (G6)	المدة الكاملة	233.01	5.84	6.60	XERO+NAP (G13)	المدة الكاملة	233.01	5.84	233.01
	نصف المدة	255.61	16.11	8.76		نصف المدة	255.61	16.11	255.61
	Total	244.31	12.45	20.22		Total	244.31	12.45	244.31
NAP (G7)	المدة الكاملة	230.58	34.27	66.19	Total	المدة الكاملة	230.58	34.27	230.58
	نصف المدة	331.87	31.20	53.66		نصف المدة	331.87	31.20	331.87
	Total	281.23	38.82	60.38		Total	281.23	38.82	281.23



شكل (4-56) علاقة المدة الزمنية على المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج على معدل تركيز IL-6 4:4:4: تأثير المعالجة بـ NAP، MTX الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها

علاج NAP ، MTX على مستوى تركيز الكلوبيولين المناعي IgG :

تظهر نتائج الجدول (4-18) ان الحيوانات المستحث بها التهاب المفاصل بواسطة مادة CFA (G2) ارتفع لديها البروتين المناعي IgG في المصل ارتفاعاً معنوياً ($P < 0.05$) بعد الإصابة بمدة ستة اسابيع اذ سجل معدل تركيزه 3238.00 mg/dl مقارنة مع مجموعة حيوانات السيطرة السالبة (G1) التي سجل معدل تركيز IgG فيها (651.75) ml/dl . في حين اظهرت نتائج هذه الدراسة جدول(4-18) ان المعالجة بالمركبات النانوية الحرة موضوع الدراسة ادت الى انخفاض معنوي كبير ($P < 0.05$) في مستوى تركيز IgG في المصل اذ بلغ مستوى تركيزه في المجموعات (G3 معالجة ZnO) ، (G4 معالجة Ag nano) ، (G5 معالجة Xerogel) للمدة الكاملة من العلاج (2554.00) ، (2504.00) ، (2256.50) ml/dl على التوالي ، وكان الانخفاض معنوي ($P < 0.05$) كذلك في المجموعتين المعالجات بـ MTX الحر (G6) ، و المعالجة بـ NAP الحر (G7) والتي سجلنا مستوى تركيز (1935.50 ، 2122.00) mg/dl على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G2) والتي تم علاجها لمدة ست اسابيع من العلاج .

اتفقت النتائج اعلاه مع دراسة Morishige وآخرون (2012) التي اشارت ان التعديل الجزئي (15%) للغلاف الموجب الشحنة للجسيمات النانوية crosslinked knedel-like بارتباطه مع الهستامين (بدلاً من مجموعة الأيونات الأولية) يحد بشكل كبير السمية المناعية لتلك الجسيمات النانوية وربما يرجع ذلك إلى تقليل الشحنة (بسبب تقليل المحتوى الاميني) الذي اظهره انخفاض جهد زينا نسبياً (12-15%). كما أظهرت دراسة Heng وآخرون (2011) عن طريق قياس مستويات 23 بروتين مناعي ان المعالجة للفئران بالجسيمات النانوية الحاملة للهستامين لمدة 24 ساعة تؤدي الى إفراز كميات اقل من السيتوكينات الالتهابية والاجسام المضادة بالمقارنة بالمعالجة بواسطة الجسيمات النانوية فقط وأن الاختلافات بين مستويات افراز السيتوكينات كانت معنوية لـ 12 سيتوكين، IL-3, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, Eotaxin, RANTES, monocyte chemotactic، IL-12 سيتوكين، protein (MCP)-1, MIP-1 β , KC TNF- α .

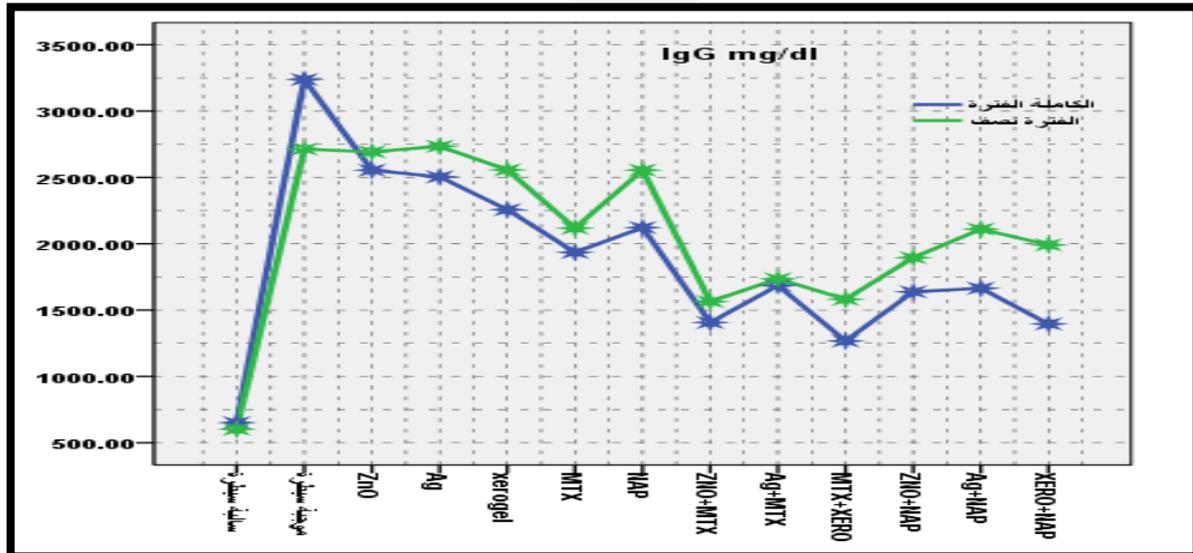
كما اختلفت نتائج اعلاه مع ماتوصل الية Minigo وآخرون (2007) اذ عزى زيادة الالتهاب بزيادة ROS اذ اشار الى ان الجسيمات النانوية تنتج كميات كبيرة من أنواع الأوكسجين الفعال (Reactive oxygen species (ROS) التي يمكن أن تؤدي تحرير البروتينات الالتهابية من خلال تفعيل NF- κ B ، وإن إنتاج ROS يكون أعلى للجسيمات النانوية (النانومترية) من الجسيمات الدقيقة (الميكرومترية) وذلك بسبب زيادة مساحة السطحية المتفاعلة، كما اختلفت مع النتائج التي توصل اليها Val وآخرون (2009) التي اكد فيها ان جزيئات الكربون الأسود Carbon black و ثاني أكسيد التيتانيوم TiO₂ تسبب تحرير السيتوكينات الالتهابية بواسطة الخلايا الظهارية للشعب الهوائية بسبب الإجهاد التأكسدي و اشار الى امكانية تثبيط تأثير الالتهابات وتحرير السيتوكينات بواسطة تحرر انزيم الكاتالاز Catalase الذي يعمل كمضاد للإجهاد التأكسدي عن طريق تحفيز تحلل بيروكسيد الهيدروجين إلى الأوكسجين والماء. الجزيئات النانوية للسيليكا البلورية Crystalline silica nanoparticles تنتج ROS التي تثير مستقبلات TNF وكذلك تنشيط عامل النسخ الخلوي NF- κ Bcellular NF- κ B transcription factor مما يؤدي الغلوبولينات المناعية (Immunoglobulins) ورفع الحالة الالتهابية. وتظهر نتائج الجدول (4-18) انخفاض معنوي واضح لدى المجاميع التي تمت معالجتها بالمركبات النانوية المدروسة بعد تحميل علاج MTX عليها فوجد ان تركيز IgG بلغ (1406.50) mg/dl بالمجموعة المعالجة بالمركب النانوي ZnO/MTX (G8) وبلغ مستوى تركيزه في المجموعة المعالجة بـ Ag nano / MTX (G9) 1685.00 mg/dl كما كان تركيزه في المجموعة المعالجة بـ xerogel / MTX (G9) يبلغ (1267.50) mg/dl مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة التي سجلت تركيز (3238.00) mg/dl وكذلك عند المقارنة مع العلاج بـ MTX الحر (G6) 1935.50 mg/dl انخفض تركيزه معنوياً في مجموعة G8 ، G10 ، فيما كان الانخفاض ملحوظ بالمجموعة G9 لفترات العلاج الكاملة .

وفيما كان الانخفاض معنوي بدلالة T المحسوبة لدى مقارنة هذه المجموع المعالجة بالمركبات النانوية المذكورة لنصف مدة العلاج مقارنة مع ما سجله مستوى التركيز للبروتين المناعي IgG في المجموعة المعالجة بعلاج MTX الحر لمدة كاملة ، اذ بلغ مستوى تركيزه في مجموعة G8 ، G9 ، G10 ، (1581.50 ، 1736.00 ، 1564.50) mg/dl على التوالي . نجحت المركبات قيد الدراسة في المحافظة على المفصل المستحث فيه المرض واثبات فعاليتها في خفض العوامل الالتهابية من خلال تحميل العلاج عليها ، وهذا ماجاء به الباحث Wang وآخرون (2013) الذي توصل الى اهمية ان يكون المركب النانوي الحامل متوافق حيويًا لتجنب تفاقم التهاب المفصل المصاب ، وتوجد مجموعة واسعة من الجسيمات النانوية الناقلة مكونة من جزيئات البوليمر القابلة للتحلل بصورة طبيعية او بالطرق الاصطناعية او مجتمعة اذ ان الجسيمات النانوية لديها ميزة كبيرة وهي امكانية تغييرها لتناسب مع البيئة المحيطة.

تظهر المجموع المصابة بالتهاب المفاصل جدول (4-18) والمعالجة بالمركبات النانوية المحمل عليها علاج الـ NAP انخفاض معنوي في مستوى تركيز IgG اذ بلغ في المجموعة المعالجة بالمركب ZnO / NAP (G11) 1638.00 mg/dl والمجموعة المعالجة بـ Ag nano / NAP (G12) 1664.50 mg/dl والمجموعة المعالجة بـ Xerogel / NAP (G13) مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G2) 3238.00 mg/dl وكان هذا الانخفاض معنوي مقارنة مع المجموع المعالجة بالمركبات النانوية الحرة والـ NAP الحر كذلك للمدة العلاجية الكاملة في كل هذه المجموع اذ بلغ في مجموعة G3 (2554.00) mg/dl ، و G4 (2504.00) mg/dl ، و G5 (2556.50) mg/dl وفي مجموعة G7 (2122.00) mg/dl لمدة علاج كاملة وعند مقارنة هذه المجموع المعالجة بالمركبات النانوية ولنصف مدة علاج تظهر النتائج الجدول ادناه ان مستويات IgG فيها وانخفضت بشكل ملحوظ اذ بلغت (1895.00 ، 2110.50 ، 1991.50) mg/dl على التوالي في المجموع G11 ، G12 ، G13 اذ وصل ذا الانخفاض دون مستوى مجموعة المقارنة G7 (المعالجة بـ NAP) لمدة العلاج الكاملة بعد حساب قيمة T. اكد Saravanan وآخرون (2011) ان علاج ديكلوفيناك الصوديوم (الفولتارين) المحمل بمركبات الألومين النانوية اظهر انخفاضًا كبيرًا في التهاب المفاصل بعد 30 يوما من المعالجة في الركبة المصابة بمادة CFA بالارانب ، وان المركبات النانوية الجيلاتينية قادرة على حمل علاجات مضادات الالتهاب غير الستيروئيدية أو البروتينات ، وجد ان المركبات الجيلاتينية تكون أكثر استقرارًا من الألومين ، ولكن أوقات بقائها لا تزال قصيرة نسبيًا مما يسبب في وقت لاحق مشاكل في السيطرة على العلاج والتسبب في التهاب الأنسجة المحيطة بالمفصل ، في حين اثبتت المركبات النانوية قيد الدراسة استقرار عالي وسيطرة كبيرة على تحرير العلاج ، كما اوضحت اغلب النتائج اختصار مدة العلاج والجرعة المعطاة بشكل كبير مما يزيد من فرص المحافظة على المفصل وعدم تطور فسلجة المرض .

جدول (4-18): تراكيز الكلوبولين المناعي IgG قبل وبعد المعالجة بـ MTX، NAP،
 الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج MTX، NAP.

المعاملة	المدة	المتوسط	الخطأ القياسي	التائية المحسوبة	المعاملة	Isd	الخطأ القياسي	المتوسط	المدة	المعاملة	
سيطرة سالبة (G1)	المدة الكاملة	1406.50	88.56		ZNO+MTX X (G8)	384.58	120.33	651.75	المدة الكاملة	Ag+MTX (G9)	
	نصف المدة	1564.50	70.72	11.50					نصف المدة		Ag+MTX (G9)
	Total	1485.50	83.25						Total		
سيطرة موجبة (G2)	المدة الكاملة	1685.00	131.75		MTX+XERO (G10)				المدة الكاملة	ZNO+NA P (G11)	
	نصف المدة	1736.00	137.75	3.51					نصف المدة		ZNO+NA P (G11)
	Total	1710.50	125.38						Total		
ZnO (G3)	المدة الكاملة	1267.50	73.98		Ag+NAP (G12)				المدة الكاملة	XERO+NAP (G13)	
	نصف المدة	1581.50	84.63	9.53					نصف المدة		XERO+NAP (G13)
	Total	1424.50	105.11						Total		
Ag (G4)	المدة الكاملة	1638.00	154.32		Total				المدة الكاملة	NAP (G7)	
	نصف المدة	1895.00	285.03	1.78					نصف المدة		NAP (G7)
	Total	1766.50	220.91						Total		
Xerogel (G5)	المدة الكاملة	1664.50	94.12		Total				المدة الكاملة	Total	
	نصف المدة	2110.50	206.87	0.11					نصف المدة		Total
	Total	1887.50	183.04						Total		
MTX (G6)	المدة الكاملة	1396.00	136.61		Total				المدة الكاملة	Total	
	نصف المدة	1991.50	97.50	1.84					نصف المدة		Total
	Total	1693.75	179.82						Total		
NAP (G7)	المدة الكاملة	1870.71	309.99		Total				المدة الكاملة	Total	
	نصف المدة	2065.44	293.26						نصف المدة		Total
	Total	1968.08	303.44						Total		



شكل (4-57) علاقة المدة الزمنية على المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج على معدل تركيز IgG
 5:4:4 : تأثير المعالجة بـ MTX، NAP، الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج

NAP،MTX في مستويات تركيز الكلوبولين المناعي IgM

تظهر نتائج الدراسة جدول (4-19) ان استحثاث التهاب المفاصل الرثياني في ذكور الجرذان البيض يؤدي الى الارتفاع المعنوي ($P < 0.05$) في مستوى تركيز IgM في المصل بعد ستة اسابيع من الاصابة اذ بلغ معدل تركيزه 330.00 mg/dl في مجموعة السيطرة الموجبة (G2) مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (G1) اذ يبلغ فيها 91.93 mg/dl . كما يبين الجدول المذكور في افراد المجموعات المستحث بها بالتهاب المفاصل الرثياني والمعالجة بالمركبات النانوية الحرة انخفاض مستوى تركيز IgM بشكل ملحوظ لديها اذ بلغ معدل تركيزه في المجاميع G3 (معالجة ZnO) ، G4 (معالجة Ag nano) ، G5 (معالجة Xerogel) (297.50 ، 294.00 ، 279.50) mg / dl على التوالي مقارنة مع مجموعة G2 ولمدة علاج كاملة .

أكد Elsabahy وآخرون (2013) اعتمادا على خصائصها الفيزيائية يمكن أن تحفز الجسيمات النانوية الاستجابة المناعية الفطرية والتكيفية ، ومع ذلك فإنه لا يزال من غير الواضح كيف تؤثر الجسيمات النانوية في تحفيز الاستجابة المناعية بشكل واضح ، إذ ان الجسيمات النانوية يمكن أن تتفاعل مع بروتينات المصل بما في ذلك الأجسام المضادة ، وغالبا ما يكون استهداف الجسيمات النانوية إلى خلايا وأنسجة محددة ، وان فهم كيفية استخدام السيتوكينات كمؤشرات حيوية من إمنونوسيمولاتيون غير المرغوب فيها و المرتبطة بالمواد النانوية المهندسة يعد في غاية الأهمية كونها عنصرا أساسيا في اختبار سلامة تلك الجسيمات النانوية تقييم 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 الجسيمات النانوية . وعادة ما ترتبط مستويات عالية من السيتوكينات عند العلاج بالجسيمات النانوية ووجود سمية عالية ، وكذلك ردود فعل سلبية وفعالية علاجية منخفضة ، فالسيتوكينات يمكن استخدامها للتنبؤ جزئيا بفعالية الجسيمات النانوية من عدمها في توجيه الاستجابة المناعية .

كما يشير هذا الجدول ان المعالجة بـ MTX الحر (G6) ، NAP الحر (G7) تؤدي الى خفض مستوى IgM انخفاضا معنويا اذ سجلت في كل المجاميع G6 ، G7 مستويات تركيز (248.50 ، 269.50) mg/dl على التوالي بعد مدة علاج دامت ستة اسابيع (مدة كاملة)، فيما تشير نتائج الدراسة الحالية جدول(4-19) الى وجود انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في مستوى تركيز IgM في المجموعات المستحث بها التهاب المفاصل الرثياني بعد معالجتها بالمركبات النانوية الثلاثة المحمل عليها العلاج MTX (G8 ، G9 ، G10) لمدة كاملة اذ بلغ معدل التركيز في المجموعات (179.00 ، 50 ، 189.00) mg/dl على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G2) التي سجلت تركيز قدره 330.00 mg/dl وكذلك المجاميع المعالجة بالمركبات النانوية الحرة (G3 ، G4 ، G5) ومقارنة مع G6 المعالجة بـ MTX الحر كان الانخفاض بشكل ملحوظ لمدة علاج كاملة اذ بلغ 248.50 mg/dl ، وعند مقارنة نفس المجاميع (G8 ، G9 ، G10) لمدة علاج ثلاث اسابيع نلاحظ انخفاض واضحا في مستوى تركيز IgM اذ بلغت معدلاته فيها (179.00 ، 238.25 ، 238.25) mg/dl على التوالي مقارنة مع المجموعة المعالجة بـ MTX الحر والمعالجة مدة كاملة وبتركيز كامل وكان الانخفاض في المجموعة (G8) ذودلالة احصائية بعد حساب قيمة T.

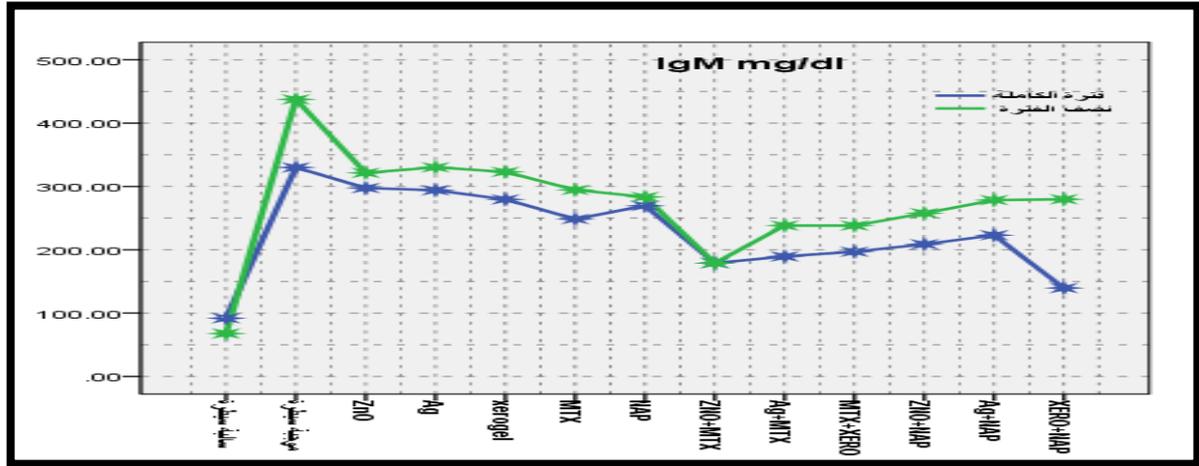
و وجد الجدول ذاته ان مجموعات الجرذان التي استحث المرض في افرادها انخفضت لديها معدل تركيز IgM ايضاً انخفاضا معنويا ($P < 0.05$) اذ بلغت معدلاته في هذه المجاميع (208.75 ، 223.00 ، 139.55) mg/dl بعد معالجتها بالمركبات النانوية (G11) ZnO / NAP ، (G12) Ag / NAP ، (G13) Xerogel / NAP على التوالي لمدة علاج كاملة مقارنة مع مجموعة السيطرة G2 (330.00) mg/dl وعند مقارنة هذه المجاميع مع مجموعة المعالجة بالـ NAP الحر كانت هنالك فروقات واضحة في مستوى تركيز IgM اذ بلغ فيها (269.50) mg/dl كما تظهر النتائج (جدول 19-4) انخفاض في مستوى تركيز IgM لدى نفس المجموعات المعالجة بالمركبات النانوية محملاً عليها NAP وهذه الحرة لنصف

مدة العلاج اذ بلغ تركيزه في المجاميع G11 ، G12 ، G13 ، الى مستوى يقارب تركيزه في مجموعة العلاج بـ NAP الحر (G7) المعالجة مدة كاملة وبتركيز كامل اذ سجلت مستوياته فيها (257.75 ، 278.50 ، 279.50) mg/dl .

اتفقت النتائج مع الدراسات (Bedouet *et al.*, 2013 ; Bedouet *et al.*, 2014) التي سعت إلى تطوير السيطرة على التحرر Control release لنظام التوصيل العلاجي DDSs داخل المفصل من خلال تطوير مركب نانوي جلاتيني مشتق ميثاكريلات methacrylate مع ايبوبروفين ibuprofen مع hydrophilic PEG-hydrogel ، الذي اظهر تحرر مضاد للالتهاب غير ستيرويدي (لايبو بروفين) ببطئ وبشكل يؤمن حاجة المفصل من العلاج من دون اثار جانبية متأتية من كميات العلاج لزيادة والتي هي عرضة للبيئة الداخلية .

جدول(4-19): تراكيز الكلوبولين المناعي IgM mg/dl قبل وبعد المعالجة بـ MTX ، NAP الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج MTX ، NAP .

المعاملة	الفترة	المتوسط	الخطأ القياسي	Isd	المعاملة	الفترة	المتوسط	الخطأ القياسي	التانية المحسوبة
سيطرة سالبة (G1)	المدة الكاملة	91.93	10.88	68.70	ZNO+MTX (G8)	المدة الكاملة	179.00	16.92	
	نصف المدة	67.78	13.20	67.05		نصف المدة	179.00	16.92	9.31
	Total	79.85	12.60	48.00		Total	179.00	15.66	
سيطرة موجبة (G2)	المدة الكاملة	330.00	9.66	Ag+MTX (G9)	المدة الكاملة	189.50	21.59		
	نصف المدة	437.50	10.84		نصف المدة	238.25	19.98	1.20	
	Total	383.75	27.40		Total	213.88	22.51		
ZnO (G3)	المدة الكاملة	297.50	41.84	MTX+XERO (G10)	المدة الكاملة	197.00	15.28		
	نصف المدة	321.50	28.24		نصف المدة	238.25	18.26	1.29	
	Total	309.50	33.54		Total	217.63	18.44		
Ag (G4)	المدة الكاملة	294.00	22.24	ZNO+NAP (G11)	المدة الكاملة	208.75	24.15		
	نصف المدة	330.25	14.33		نصف المدة	257.75	11.80	1.80	
	Total	312.13	19.37		Total	233.25	21.14		
Xerogel (G5)	المدة الكاملة	279.50	36.99	Ag+NAP (G12)	المدة الكاملة	223.00	19.90		
	نصف المدة	323.00	19.02		نصف المدة	278.50	43.17	-0.51	
	Total	301.25	29.15		Total	250.75	33.83		
MTX (G6)	المدة الكاملة	248.50	8.38	XERO+NAP (G13)	المدة الكاملة	139.55	19.87		
	نصف المدة	294.50	26.96		نصف المدة	279.75	23.30	-1.00	
	Total	271.50	21.50		Total	209.65	39.05		
NAP (G7)	المدة الكاملة	269.50	11.50	Total	المدة الكاملة	226.75	35.40		
	نصف المدة	283.50	11.72		نصف المدة	271.50	41.96		
	Total	276.50	11.26		Total	249.13	39.92		



شكل (4-58) علاقة المدة الزمنية على المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج على معدل تركيز IgM :

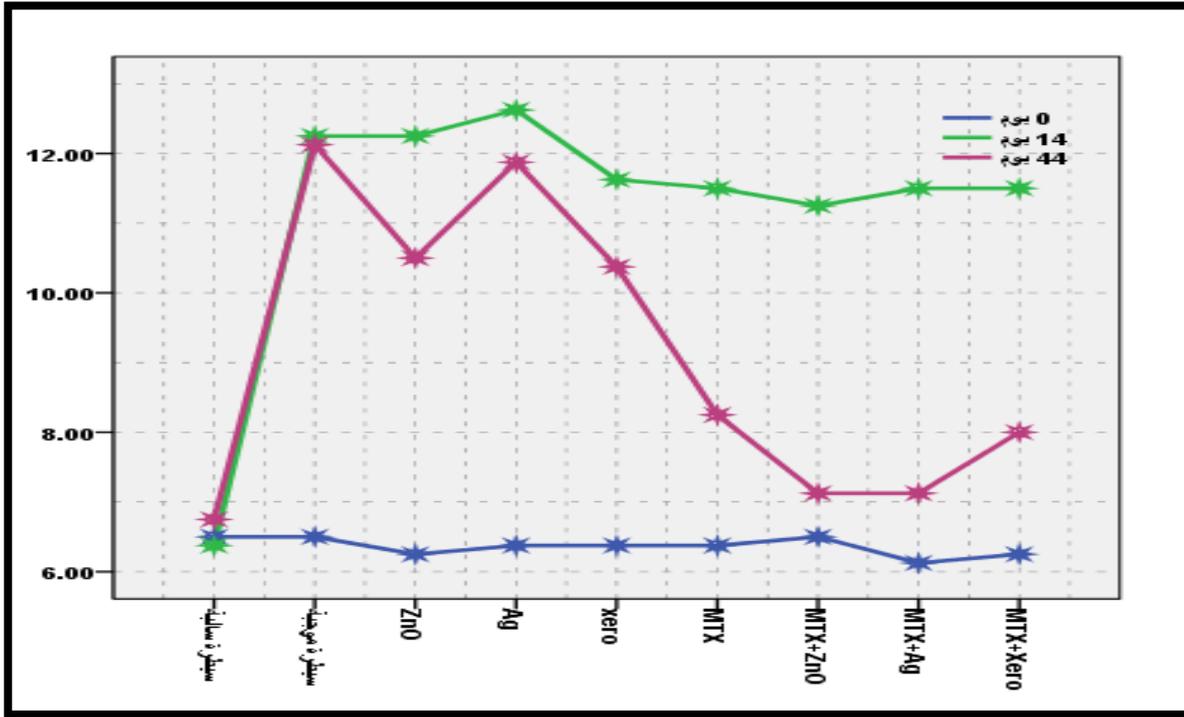
5:4:4: تأثير المعالجة بـ MTX الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج MTX في سمك القدم الأيمن لذكور الجرذان البيض المستحث بها التهاب المفاصل :

تظهر نتائج الجدول (20-4) انفتاحا وزيادة سمك القدم في ذكور الجرذان البيض بعد حقنها بـ (0.1 مل) من CFA يكون مصحوبا باحمرار بالقدم المصابة وصعوبة الحركة وانعزال الحيوان بعد 14 يوم من الاصابة وكانت تلك الزيادة بمستوى معنوي ($P < 0.05$) لدى مجموعة السيطرة الموجبة G2 وكذلك لدى المجموع G3, G4, G5, G6, G8, G9, G10 مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة G1 قبل المعالجة (0-14) يوما من الاصابة ، كما يظهر الجدول ذاته ان المعاملة بعد اليوم 14 في المجموع انفة الذكر بالمركبات النانوية الحرة وكذلك علاج MTX الحر وايضا بعد تحميله على المركبات النانوية قيد الدراسة حسب الترتيب انخفاض في معدلات سمك القدم اليمنى المصابة كان معنويا في جميع المجموع ($P < 0.05$) عدا المجموعة المعاملة بالمركب النانوي Ag nano (G4) مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة G2 . كما يبين نفس الجدول نسب الاصابة العالية التي تشير الى حدوث اصابة مؤثرة وكذلك بين نسب الشفاء التي وصلت لمعدلات جيدة ناهزت الـ 50% .

الدراسات (Pasi et al., 2015; Mariaselvam et al., 2014) اتفقت مع نتائج الدراسة الحالية والتي أشارت الى ان استحثاث التهاب المفصل يعمل على رفع مستويات العوامل الالتهابية المحرصة للالتهاب كـ IL-1 β , IL-6, IL-17A, IFN- γ , and TNF- α بعد 14 يوم من الاستحثاث ، وتعد المشكلة الرئيسية لمرضى التهاب المفاصل الروماتويدي ارتفاع معدلات هذه العوامل في حين ردود الفعل الالتهابية ليست الميزات الوحيدة اذ تعد التورم والاحمرار وتلف انسجة الغضروف والعظم من المظاهر المصاحبة له ، لذلك السيطرة على ردود الفعل الالتهابية هي انعكاس لنجاح العلاج المستخدم في السيطرة على المرض. وكذلك اتت النتائج اعلاه متماشية مع ما أظهرته نتائج الدراسة (Xue et al., 2012) أن المعاملة اليومية مع المركب النانوي الحامل لعلاج Tripterygium Tripterygium-loaded solid lipid nanoparticles خفض معدل الاستجابات الالتهابية أثناء تطور التهاب المفاصل الروماتويدي ، بما في ذلك التخفيف من تورم القدم المستحث الالتهاب فيها وكذلك انخفاض مؤشرات تحرير التهاب المفاصل الاخرى مثل IL-1 β , IL-6 and TNF- α في مصف الفئران المستحث بها المرض .

جدول (4-20) معدل سمك القدم الأيمن (ملم) لذكور الجرذان البيض المستحث بها التهاب المفاصل الرثياني المعالجة بـ MTX والمركبات النانوية الحرة و بـ MTX المحمل على المركبات النانوية .

النسبة المئوية للعلاج	النسبة المئوية للإصابة	سمك القدم الأيمن (ملم) المعدل ± الخطأ القياسي			المعاملات
		اليوم (44) ملم	اليوم (14) ملم	اليوم (صفر) ملم	
		Lsd للأيام = 0.38			
		0.29 ± 6.75	0.48 ± 6.38	0.41 ± 6.50	G1 السيطرة السالبة غير مستحدث بها التهاب المفاصل
88.5%		0.48 ± 12.13	0.65 ± 12.25	0.58 ± 6.50	G2 السيطرة الموجبة مستحدث بها التهاب المفاصل
16.6 %	96 %	0.41 ± 10.50	0.65 ± 12.25	0.29 ± 6.25	G3 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة ZnO
6 %	98 %	0.48 ± 11.88	0.48 ± 12.63	0.48 ± 6.38	G4 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة Ag
9.5 %	82.3 %	0.48 ± 10.38	0.75 ± 11.63	0.48 ± 6.38	G5 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة Xerogel
28.27 %	77.23 %	0.29 ± 8.25	0.71 ± 11.50	0.48 ± 6.38	G6 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة MTX
57.8 %	73.1 %	0.25 ± 7.13	0.29 ± 11.25	0.41 ± 6.50	G8 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة ZnO+MTX
61.3 %	87.60 %	0.63 ± 7.13	0.41 ± 11.50	0.25 ± 6.13	G9 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة Ag+MTX
44 %	84 %	0.41 ± 8.00	0.41 ± 11.50	0.50 ± 6.25	G10 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة Xerogel +MTX



شكل (4-59) علاقة المدة الزمنية على معدل التثبيط الورمي للقدم اليمنى في الجرذان المستحث بها التهاب المفاصل الرثياني المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج MTX.

6:4:4: تأثير المعالجة بـ NAP الحر والمركبات النانوية الحرة والمحمل عليها علاج NAP في سمك القدم الأيمن لذكور الجرذان البيض المستحث بها التهاب المفاصل :

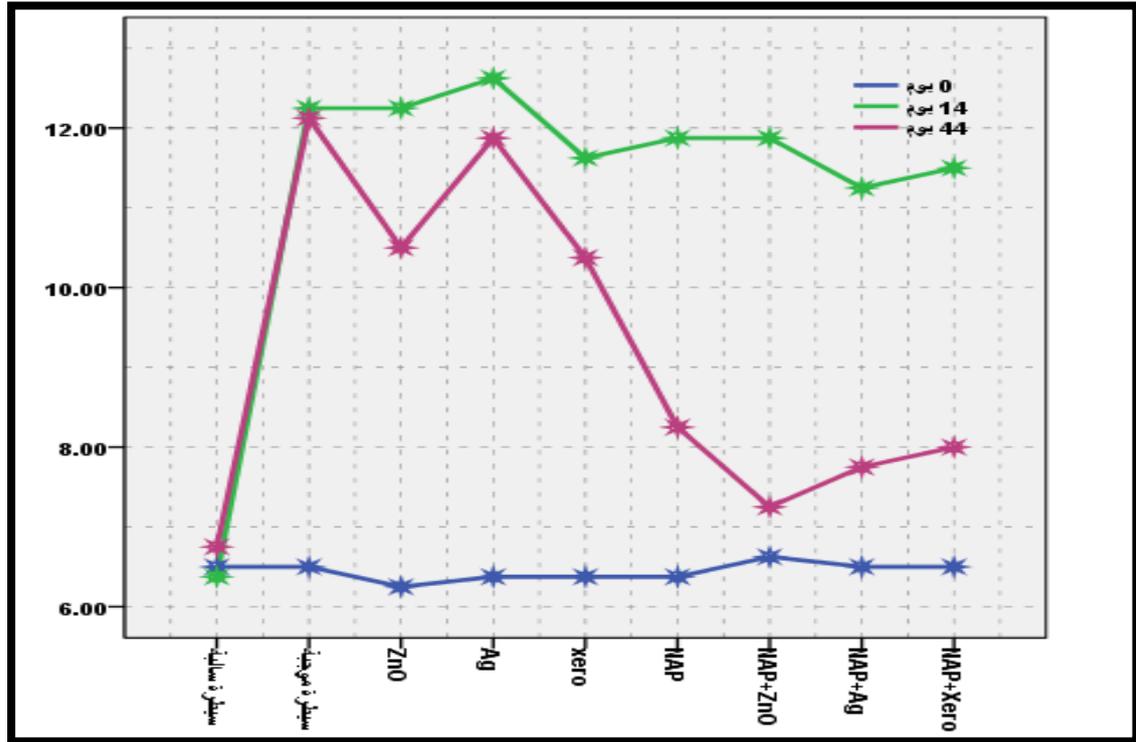
سجلت نتائج الجدول (4-21) زيادة في سمك القدم اليمنى بعد حقنها بمادة CFA (0.1) مل في المجموعات التي قيد الدراسة (G13,G12,G11,G7,G5,G4,G3,G2) وقبل معاملتها بالمركبات النانوية الحرة والعلاج الحر (NAP) وكذلك بعد تحميله على المركبات التي هي قيد الدراسة وحسب الترتيب (0-14) يوما من الإصابة مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة G1 التي لم يتم حقنها بمادة CFA، وهذا توافق مع دراسة (Xin et al.,2017) التي اشارت الى انه يمكن استحثات التهاب المفاصل في البداية عن طريق الحقن تحت الجلد في منطقة جذر الذيل للجرذان بوزن (250 مل / 200 جرام) بـ 0.1 مل من مادة CFA، والطريقة الثانية عن طريق الحقن تحت الجلد في اخمص القدم وبعد تقريبا أسبوعين، أظهرت تلك الحيوانات المحقونة أعراضا واضحة لالتهاب المفاصل منها الالتهاب inflammation والتورم swelling والاحمرار erythema في حين يظهر الجدول ذاته ان معاملة افراد المجاميع (G13,G12,G11,G7,G5,G4,G3) بالمركبات ZnO، Xerogel، Agnano وعلاج الـ NAP الحر والمركبات النانوية Xerogel/NAP، Agnano/NAP، ZnO/NAP على التوالي انخفاض في معدلات سمك القدم اليمنى وكان هذا الانخفاض معنوي ($P < 0.05$) في كل المجاميع الدروسة عدا المجموعة (G4) كان الانخفاض ملحوظا، كما يظهر هذا الجدول نسب شفاء جيدة وصلت في بعض المجاميع الى 50% تقريبا مقارنة بنسب الإصابة العالية التي وصلت الى اكثر من 80%.

اشارت دراسة Xue واخرون 2012 الى ان استخدام Tripterygium wilfordii Hook f. (TWHF) لها تأثيرات مضادة للالتهابات واثار مثبطة للمناعة، ولكن استخدامه السريري يكون محدود إلى حد ما بسبب بعض الآثار السامة على الجهاز الهضمي و الجهاز البولي وجهاز الدوران، وخاصة الجهاز التناسلي لذكور الجرذان. وأكدت الدراسة أن الجسيمات النانوية TWHF-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) لها آثار وقائية على الاجهزة التناسلية للذكور في الفئران وتقليل التأثير السام على الكبد، وقد ركزت هذه الدراسة على التأثير المضاد للالتهابات TWHF لـ

على التهاب المفاصل الناجم عن FCA في الجرذان وان معاملة الحيوانات بالمركب TWHF-loaded solid lipid nanoparticles -SLN له اثر في نظام توصيل العلاج مما يؤثر على خفض سمية الكبد الناجم عن TWHF الحر. وكذلك اثر بشكل كبير على خفض حجم الكف المحقون بمادة CFA وكذلك معدل بروتينات المصل في ذكور الجرذان .

جدول(4-21) : معدل سمك القدم الأيمن (ملم) لذكور الجرذان البيض المستحث بها التهاب المفاصل الرثياني المعالجة بـ NAP والمركبات النانوية الحرة و بـ NAP المحمل على المركبات النانوية .

النسبة المئوية للمعالجة	النسبة المئوية للإصابة	سمك القدم الأيمن (ملم) المعدل ± الخطأ القياسي			المعاملات
		اليوم (44) ملم	اليوم (14) ملم	اليوم (صفر) ملم	
		Lsd للملايام = 0.38			
		0.29 ± 6.75	0.48 ± 6.38	0.41 ± 6.50	G1 السيطرة السالبة غير مستحث بها التهاب المفاصل
	88.5 %	0.48 ± 12.13	0.65 ± 12.25	0.58 ± 6.50	G2 السيطرة الموجبة مستحث بها التهاب المفاصل
16.6 %	96 %	0.41 ± 10.50	12.25 ± 0.65	0.29 ± 6.25	G3 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة ZnO
6 %	98 %	0.48 ± 11.88	0.48 ± 12.63	0.48 ± 6.38	G4 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة Ag
9.5 %	82.3 %	0.48 ± 10.38	0.75 ± 11.63	0.48 ± 6.38	G5 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة Xerogel
44 %	86.2 %	0.29 ± 8.25	0.48 ± 11.88	0.48 ± 6.38	G7 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة NAP
63.9 %	78.2 %	0.29 ± 7.25	0.48 ± 11.88	0.48 ± 6.63	G11 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة ZnO+ NAP
48.6 %	77 %	0.29 ± 7.57	0.50 ± 11.25	0.41 ± 6.50	G12 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة Ag+ NAP
44 %	77 %	0.41 ± 8.00	0.41 ± 11.50	0.58 ± 6.50	G13 ستحدث بها التهاب المفاصل ومعالجة Xerogel +NAP



شكل (60-4) علاقة المدة الزمنية على معدل التثبيط الورمي للقدم اليمنى في الجرذان المستحث بها التهاب المفاصل الرثياني المعالجة بالمركبات النانوية المحملة بالعلاج NAP.

5:4: التأثير التثبيطي لمركبي ZnO , Ag قبل وبعد تحميل المضامين الحيويين Gentamicin ، Erythromycin على بكتريا *S. aureus* و *E. coli* :

تمت دراسة الفعالية التثبيطية للمركبين النانويين ZnO و Ag بشكلهما الحراتجاه بكتريا *E. coli* السالبة لصبغة كرام (G^{-ve}) ، وكذلك بكتريا *S. aureus* (G^{+ve}) ومقارنة النتائج مع المضاد الحيوي Gentamicin (GN) و (ER) Erythromycin بحالتهم الحرة وبعد تحميلهما على المركبين النانويين ودراسة الفرق في التأثير التثبيطي بالشكل الحر والشكل التآزري بين المركب والمضاد الحيوي ، بعد اخذ قيمة MIC لكل من المركبين النانويين والمضادين الحيويين قيد الدراسة جدول (4-22) .

تشير نتائج الجدول (4-23) ان هناك تباين واضح في تأثير المركبين النانويين والمضادات الحيوية قبل وبعد التحميل على نوعي البكتريا المدروسة اذ اشار الجدول المذكور ان تحميل المضاد الحيوي GN 64 µg/ml على مركب ZnO 320 µg/ml (T5) يظهر فرق معنوي كبير في مساحة التثبيط (15.25) ملم مقارنة مع مساحة التثبيط لكل من المركب الحر ZnO والمضاد الحيوي الذين سجلا مساحة تثبيط (7.25 ، 6.75) ملم T3 و T1 على التوالي في الاوساط الزرعية الخاصة بعزلات بكتريا القولون *E. coli*

اشار الباحث Kalishwaralal (2010) ان المركبات الـ (Au) gold ، (Ag) silver ، و (ZnO) zinc oxide تمتلك تأثير تثبيطي مثبت تم استعمال مركبات الذهب والفضة النانوية بصورة اقل لتكلفتها العالية لذلك تم التركيز على مركب الزنك النانوي الذي يمتلك خصائص عديدة مهمة اذ يعد (Immunomodulatory agent) فضلا عن الى خاصية اباده الجراثيم ، ان المركبات النانوية لديها القدرة على منع البكتريا من تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm formation) الذي يساهم في زيادة مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية والعلاجات ، كما يعزو الباحث Hanley (2009) هذا التأثير الى قدرة مركب ZnO النانوي

بتعطيل جينات مقاومة الاجهاد التاكسدي وكذلك زيادة الـ ROS ممايساهم في اباده البكتريا من خلال تحفيز الخلايا البلعمية و انتاج السيتوكينات التي تساهم في توجيه الفعل المناعي وتجعله اكثر تنظيما .

كما بين الجدول ذاته ان تحميل المضاد الحيوي (GN) على مركب الفضة النانوي Ag nano بتركيز $g \mu 650$ (T7) يظهر فرقا معنويا كبير اذ وصل معدل التثبيط (16.50) ملم مقارنة مع مساحته مساحة التثبيط لمركب الفضة النانوي الحر (T2) التي بلغت 9.00 ملم و مضاد الـ GN الحر (T3) وكذلك T1 على التوالي ، كما كان الفرق معنويا كذلك بالمقارنة مع T5 (15.25) ملم ، والسبب يعود في ذلك ربما لنفس الاسباب التي اشارت اليها دراسة اجراها (Rizwan et al.,2010 ; Nagarajan and Rajagopalan,2008) والتي اثبتت ان الفضة النانوية Ag nano تعد من المركبات الامنة اذ تتعلق سميتها بحجم هذه المركبات اي كلما كانت الجزيئات المؤلفه للمركب ذات احجام تحت 40 nm تمتلك سمية اكبر من الاحجام الكبيرة (Bulk size) بسبب زيادة المساحة السطحية المعرضة للبيئة الخارجية اي ان زيادة المساحة السطحية ترتبط بقابليتها على احداث السمية الخلوية وهذا ما يضمن زيادة معدل التداخل المحتمل مع العضيات الحية الموجودة على اسطح الخلايا المعرضة لتلك المواد .

ان نتائج التأثير التثبيطي للمضاد الحيوي ER بتركيز $\mu 32g$ (MIC) قبل وبعد التحميل على المركبين النانويين قيد الدراسة سجلت تباينا كبيرا ، إذ بينت نتائج (جدول 4-22) ان معدل التثبيط لنمو *E. coli* في مجموعتي (T6) و (T8) المعاملتين بـ ZnO/ER و Ag/ER سجلت مساحة تثبيط (17.00، 19.25) ملم على التوالي مما يشير الى فرق معنوي بمستوى ($P < 0.05$) بين المعاملتين نفسيهما وكذلك مقارنة مع المعاملات في المجاميع (T1، T2) و T4 التي سجلت 12.75 ملم والخاصة بالمضاد ER بشكله الحر ، اشارت الدراسة (Jena et al., 2012) ان الفضة Ag المحضرة بالنشأ والمركدة بواسطة الـ (Chitosan) لها قابلية تثبيطية عالية ضد الـ Pathogen من خلال العمل على التأثير في قابلية البكتريا على مقاومة المضادات دون احداث سمية خلوية او سمية جينية للخلايا البلعمية وهذا سبب محتمل لزيادة الفعالية التثبيطية لتلك لمركبات كما اشارت الى ان منظمة الغذاء والدواء الامريكية U.S. Food and Drug administration (21CFR182.8991) ادرجت مركب ZnO النانوي كاحد المواد المستخدمة في العديد من التطبيقات البيولوجية كايصال العلاج وفحوصات التصوير الحيوي وكذلك المعالجة اذ اظهرت جزيئات هذا المركب فعالية تثبيطية اعلى عندما تكون ضمن الحدود النانوية من جزيئات المركب ذات الاحجام الكبيرة ، وكانت هذه الفعالية عالية في اغلب العزلات البكتيرية السالبة والموجبة وبكتريا السل للسلاطات المقاومة لتاثير المضاد في الفئران المصابة والمعاملة بهذا المركب .

اظهرت نتائج الجدول (23-4) والخاصة ببكتريا *S. aureus* ان تحميل المضاد الحيوي (GN) بتركيز MIC ($\mu g/ml 64$) على المركب النانوي ZnO بتركيز ($\mu g/ml 160$) ZnO/ GN (T5) والتي سجلت مساحة تثبيط مقدارها 14 ملم يظهر فروق معنوية بمستوى ($P < 0.05$) مقارنة مع (T1 و T3) التي سجلت مساحتي تثبيط متقاربة (7.75، 10.75) ملم على التوالي ، ان التأثير التازري لاستخدام الـ ZnO النانوي مع العلاجات المضادة لبكتريا *S.aureus* المقاومة للمضادات ومنعها من التحلل الدموي بواسطة السموم المحللة للدم ناتج من خلال منعها من تكوين الـ Biofilm (Pati et al.,2014) ، و يعد التأثير التثبيطي للبكتريا لبعض المعادن اللاعضوية كالـ ZnO ، MgO ، SiO_2 و TiO_2 ذات تاثير سمي انتقائي للنظم البيولوجية مما يقود للتفكير باستخدامها كمواد علاجية وتشخيصية مستقبلية وفي الاجهزة والعمليات الجراحية استنادا الى تاثيرها التثبيطي للخلايا البكتيرية الغازية (Sobha et al.,2010) ، وكما اظهرت دراسة (Pati et al.,2014) ان النشاط التثبيطي لمركب ZnO النانوي يكون عالي اتجاه بكتريا *S.aureus* ويكون استخدام هذا المركب لكبح نمو بكتريا *Mycobacterium bovis* اقل تاثيرا لكن سرعان مايزداد هذا التأثير عند تحميل

العلاج rifampicin المضاد للسلسل (antituberculous-drug) كما بينت الدراسة ذاتها ان ميكانيكية تأثير مركب الزنك النانوي تعتمد على احداث اضرار بالغشاء البلازمي الخاص بالبكتيريا من خلال احداث الفجوات والاختلال بازموزية الجدار مما يؤدي الى موت الخلية ، الدراسات (Alok and Vyom, 2010 ; Zhongbing et al.,2008) بينتا ان استخدام استخدام نفس التراكيز على بكتريا *S.aureus* اذ اشارت النتائج ان البكتريا G^- تكون اكثر حساسية من البكتريا G^{+ve} وهذا يعود الى اختلاف التركيب الكيميائي للجدار البكتيري وفسلجة الخلية وايضا وكذلك الى طبيعة التفاعل بين المركب والخلايا المعاملة به ، اذ ان من خلال فحص المجهر الالكتروني اشارت الصور ان مركب الـ ZnO النانوي يعمل على احداث خلل في جدار الخلية البكتيرية سواء كانت موجبة ام سالبة من خلال التأثير على ازموزية الجدار الخلوي لذلك يتبين ان الخلايا المعاملة بهذا المركب تظهر مجمدة وغير منتظمة الشكل.

في حين تحميل المضاد ذاته على مركب الفضة النانوي بتركيز MIC مقدار 64 ($\mu\text{g/ml}$) (T7) Ag/ GN 13.25 ملم يظهر فروق معنوية في مستوى ($P < 0.05$) مقارنة مع مساحتي التثبيط في (T2) التي استعمل فيها مركب الفضة الحر 10. 50 ملم و T3 على التوالي في عزلات بكتريا *S.aureus*، اذ ان الدراسات (Dakal et al.,2016 ;Hwang et al., 2007; Yuan et al.,2012) اشارت الى انه عند وصول ايونات الـ AgNP الى الخلايا الهدف تعمل على التبادل الايوني مع تلك الخلايا وهذا مايسهل عملية ايصال العلاج وزيادة كفاءته وينتج من ذلك توليد ROS والتي من المحتمل انتاجها من خلال تثبيط انزيمات التنفس بواسطة ايونات الفضة التي تهاجم الخلية نفسها بعد تحريرها للايون المتبادل .

كما ان الفضة تسلك سلوك حامض ضعيف وتتفاعل مع القواعد كما تقوم بالارتباط مع الفسفور والتيروسين وتغيير صورته (modulate the phosphor tyrosine profile) الببتيدي للبكتريا مما يؤثر على الاشارات البكتيرية وهذا بدوره يؤدي الى تثبيط نمو البكتريا وبالتالي موتها كما تمت الاشارة الى ان الفضة النانوية لها تأثير تثبيطي تفاعلي ضد البكتريا المرضية *S.aureus* و *E.coli*. ان العزلات البكتيرية لبكتريا *E.coli* التي اظهرت تأثرا عاليا لدى استخدام المضاد الحيوي Nitrofurantoin المحمل على جزيئات الفضة (AgNP) التي سجلت 18 mm في حين كانت نتائج التثبيط للمضاد الحر تشير الى انخفاض هذا التأثير الذي بلغ 12 mm قبل التحميل وذلك يعود الى الاستهداف المباشر بعد توصيل هذا العلاج لتخليق البروتين وتكوين الاحماض النووية الذي تساهم في تكوين الغشاء البلازمي للبكتريا الموجبة لصبغة كرام بسبب اتحاد الفضة بالغشاء البلازمي وتبادل الايونات مما يعطل وظيفة الغشاء وموت الخلية بسبب اختلال الضغط الازموزي .

يمكن استخدام جزيئات الفضة النانوية لكبح نمو طيف واسع من الانواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام بما في ذلك المقاومة للمضادات الحيوية ففي تجربة اجريت على اختبار معدل التثبيط للمضادات الحيوية (penicillin G ، Cefipime و Gentamicin) اذ سجلت هذه المضادات مساحات تثبيط (6، 9، 8) mm على التوالي بشكلها الحر ضد بكتريا *S.aureus* لكن في حالة التآزر مع مركب الـ AgNP كانت النتائج اكثر فعالية اذ سجلت (12، 14، 15) mm على التوالي ، كما كانت النتائج الخاصة بالبكتريا الموجبة لكرام (*P.aeruginosa* ، *P.mirabilis* و *E.coli*) لمضاد Gentamicin ومركب الـ AgNP ذات تأثير تثبيطي جيد اذ ازدادت مساحة التثبيط للمضاد الحيوي من 10 - 18 mm لبكتريا *E.coli* ، اما مساحة التثبيط لبكتريا *P.aeruginosa* سجلت زيادة من 9-16 mm و من 11-17 mm اتجاه بكتريا *P.mirabilis* بعد تحميل المضاد GN على مركب الفضة النانوي ، كما سجلت اغلب المضادات مساحات تثبيط ذات فرق كبير بعد تحميلها على مركب الفضة في عزلات البكتريا السالبة والموجبة (Raja& Singh,2012).

اظهرت دراسة Eby (2009) ان ميكانيكية التأثير لجزيئات الفضة تجري بثلاث طرق رئيسة تحدث على انفراد او بالتزامن مع بعضها بنفس الوقت ، الاولى تحدث اثناء التداخل والجدب الالكترونيستاتيكي بسبب الشحنة السالبة لجزيئات الفضة النانوية والشحنة الموجبة لبروتينات الغشاء التكاملية (Intgral protein) على سطح البكتريا ، والطريقة الاخرى تعتمد على

تغيير سيولة الغشاء البلازمي للبكتيريا من خلال احداث التغيير الكيميائي الوظيفي (Physiochemical change) في الجدار الخلوي للبكتيريا مما يؤدي الى عدم السيطرة على المواد الداخلة والخارجة من والى الخلية البكتيرية وهذا مايسبب موت الخلية بنهاية المطاف ، اما الطريقة الاكثر شيوعا هي السيطرة على نشاط الـDNA وحجب تكوين الدفاعات لمقاومة البكتيريا من خلال التأثير على تكوين الانزيمات والبروتينات الضرورية لبقاء البكتيريا وادامة نشاطها .

بينت صور المجهر الالكتروني TEM لبكتريا *S. aureus* المعاملة لجزيئات الفضة النانوية ظهور تدهور الجدار الخلوي للبكتيريا وربما يعود السبب في ذلك الى خروج محتويات الساييتو بلازم الى خارج الخلية وهذا مايبين سبب موت الخلية البكتيرية بعد تعرضها الى AgNP ، اذ ان جزيئات الفضة تخترق جدران الخلية البكتيرية والوصول الى الغشاء البلازمي ومن بعد ذلك استبطان هذا الغشاء بسهولة وهذا الاستبطان سوف يؤدي الى تكوين الحفر (Pits-holes) مما يؤدي الى تمزيق الجدار الخلوي البكتيري ، كما ان هذا الاستبطان يعطي دليلا على تأثير جزيئات الفضة النانوية التثبيطي يكون من خلال التسبب في تعطيل استنساخ الـDNA او من خلال منع التنفس الخلوي Sharma et al.,2009 ; Ruparelia (et al.,2008) .

اشارت دراسة (Agnihotri et al.,2014) الى ان مركبات الفضة النانوية تقوم باننتاج ROS مسببة بذلك موت الخلية البكتيرية فضلا عن ذلك تقترح تلك الدراسة وجود عوامل عديدة ممكن ان تتأزر في توليد الفعل التثبيطي للمواد المضادة للبكتيريا بسرعة اكبر بواسطة التحميل على المركب النانوي لما يمتلكه من خصائص كهربائية تساعد في الاتصال بالبكتيريا مما يسهل وصول المضاد الحيوي المحمل على هذه الجزيئات ، كما ان فعل الايونات التي ماتلبث ان تنطلق لدى وصولها الى الخلية البكتيرية الغازية لايمكن تجاهله في اباداة البكتيريا .

ان التأثير التثبيطي للمضاد ER الحر الذي بلغ اقل مستوياته (5.25) ملم (T4) سجل مستويات مرتفعة معنويا لدى تحميله على المركبين النانويين ZnO و Ag بلغت 16.50 ، 18.0 ملم (T6 ، T8) على التوالي مقارنة مع T1 ، T2 و T4 ، مما يدل على الفعالية المميزة لاستخدام تلك المركبات وتغيير خصائصها بعد تحميلها على المركب النانوي اذ اشارت الدراسات (Zachariah et al.,2010 ; Rizwan et al.,2010) الى ان استخدام مركب الـ ZnO يعد آمن وذو فائدة كبيرة ، فبالاضافة لفعاليتيه التثبيطية الكبيرة اتجاه سلالات البكتيريا المقاومة للعلاج والمسببات المرضية فهو ذو سمية لا تكاد تذكر على أنشطة خلايا الجسم ، اذ تمتلك تلك الجزيئات مدى مقاومة واسع للحرارة والبيئة الداخلية وقابلية توفير عناصر معدنية اساسية للخلايا الحيوانية حتى في الكميات الصغيرة تعطي نشاط ايجابي كبير ، وان معدل القابلية التثبيطية يعتمد على الزيادة بالتركيز وكذلك حجم الجزيئات النانوية المستخدمة في الاقراص المضادة للبكتيريا ، وتختلف مساحة التثبيط تبعا لنوع البكتيريا المعاملة بمركب الـ ZnO النانوي

واشار الجدول (23-4) الى ان تحميل المضاد ER على المركب النانوي Ag (T8) سجلت اعلى المستويات التثبيطية في عزلات البكتيريا *S.aureus* و *E.coli* (18.00 ، 19.25) ملم على التوالي ، و يشير كذلك الى زيادة التأثير التثبيطي التآزري للمضادات مع مركب الفضة النانوي مقارنة مع الاشكال الحرة للمركب ذاته والمضادين الحيويين كما هو الحال في تحميل المضادات قيد الدراسة على مركب الزنك النانوي .

اقترح الباحث Gurunathan وآخرون (2014) ان جزيئات الفضة النانوية تعمل على منع نمو البكتيريا من خلال تأثيرها المباشر تخليق البروتين من خلال ارتباط ذرات الفضة مع الـ Thiol group (SH) الخاصة بالانزيمات التابعة للبكتيريا وبذلك تعطل عمل هذه الانزيمات ، كما ان الـ AgNP يعمل على تغيير عمل المركبات المكونة للغشاء البلازمي والمهمة في توليد الطاقة والنقل الايوني عبر هذا الغشاء من خلال تكوين أصرة S-Ag مع مجموعة الـ Thiol group .

يعمل المركب النانوي على تكوين الاواصر الكبريتية الثنائية في تفاعل ذرات الاوكسجين والهيدروجين بالخلية بمجموعات الـ (R-S-S-R) Thiol group في انواع *S.aureus* , *P.aeruginosa* , *E.coli*, *Bacillus subtilis* , *Helicobacterbiylori* و *Shigella flexnri* .

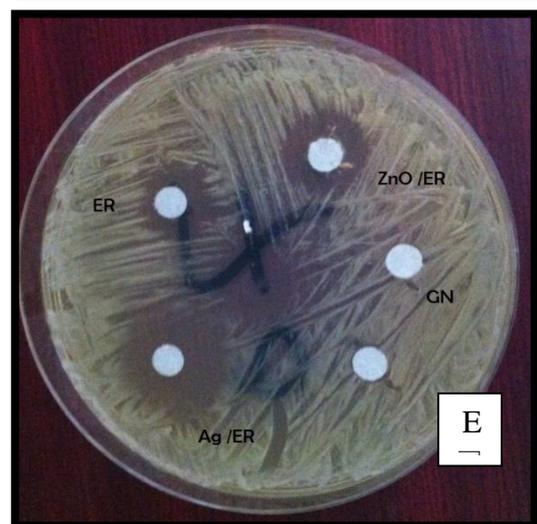
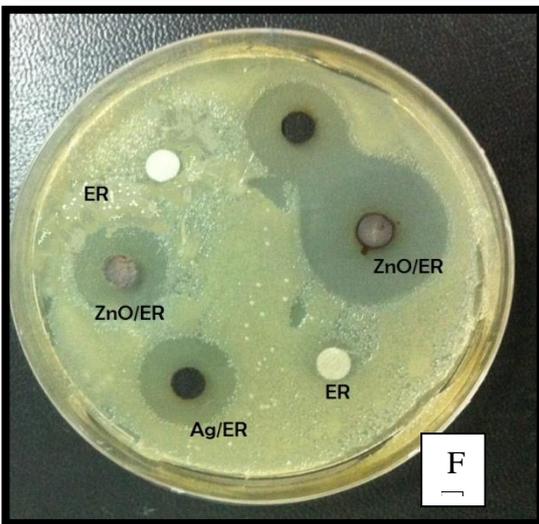
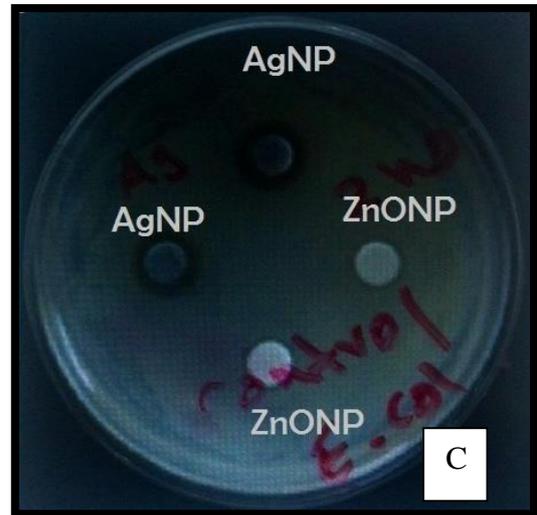
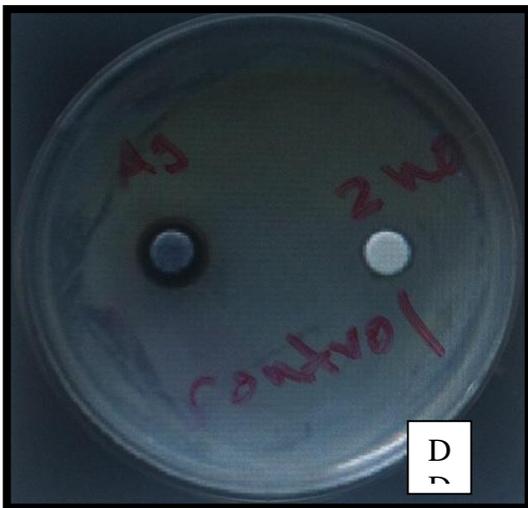
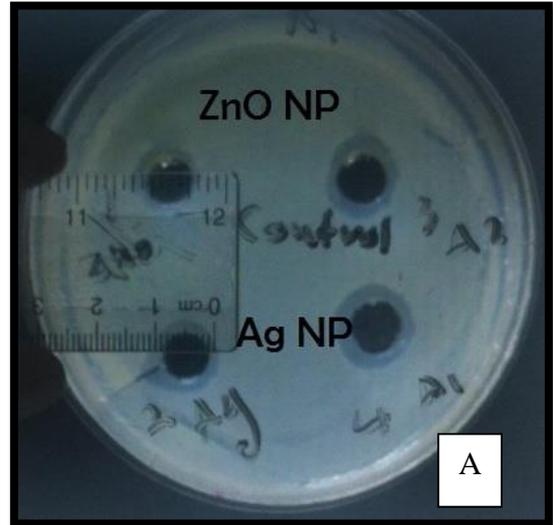
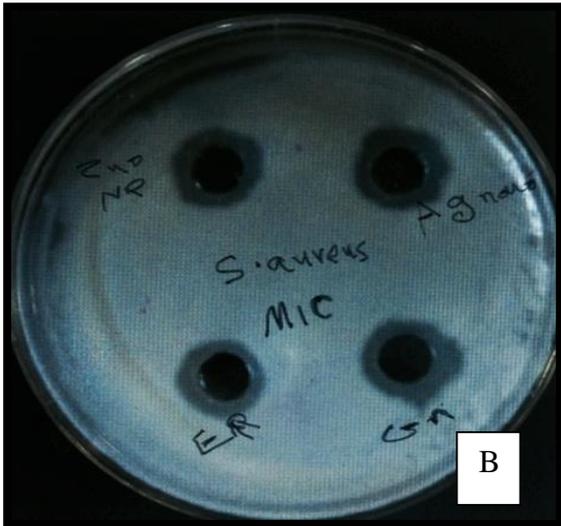
اشار كل من الباحثين Sotiriou and Pratsinis (2010) الى ان استخدام الـ AgNP تزيد نسبة التأثير التثبيطي لبكتريا *E.coli* and *P.mirabilis* لدى تحميل المضاد الحيوي Nalidixic acid على المركب النانوي اذ بلغ في كل منهما قبل التحميل 10، 15 mm على التوالي فيما سجل معدل التثبيط بعد التحميل 17,18 mm على التوالي وتعزى فعالية هذه المركبات الى دخول ايونات الفضة (Ag^+ Ion) الى داخل الخلية وتداخله بين قواعد البورين والبرمدين (purine and pyrimidine base) في جزيئات الـ DNA اذ بينت هذه الدراسة ان جزيئات الـ AgNP لا يقتصر فعلها ضمن الغشاء البلازمي وانما تخترق الخلية وتقوم بتعطيل استنساخ الـ DNA الخاص بالخلية البكتيرية مما يؤدي الى هلاكها .

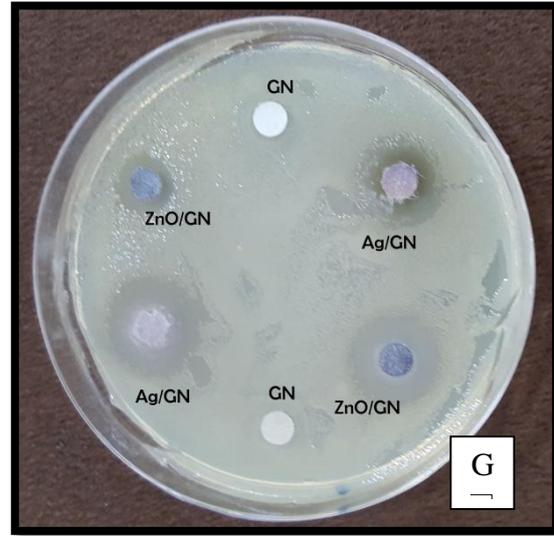
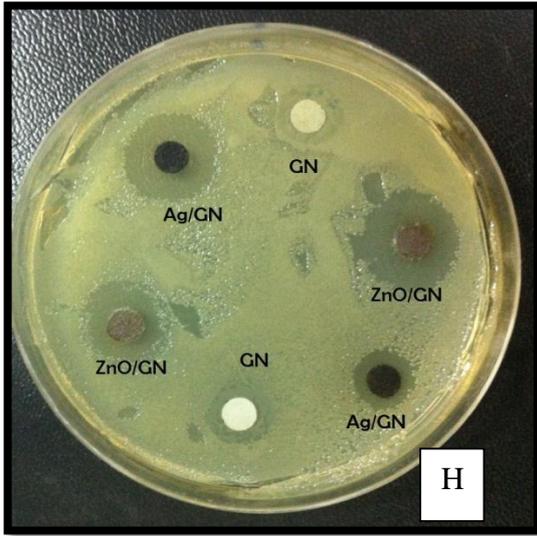
جدول (4-22): التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC) لمركبي ZnO , Ag النانويين و المضادين الحيويين Erythromicin ، Gentamicin على بكتريا *Escheirchia coli* و *Staphylococcus aureus*:

ER	GN	Ag	ZnO	تركيز المركبات (µg/ml)	
				البكتريا ونوع التركيز	
32	64	650	320	MIC	<i>E. coli</i>
256	512	2560	1280	MBC	
128	64	160	160	MIC	<i>S. aureus</i>
512	128	640	640	MBC	

جدول(4-23) قطر حلقة التثبيط عند المعاملة بالمركبين النانويين ZnO , Ag قبل وبعد تحميل المضادين الحيويين (ER)Erythromicin , (GN) Gentamycin على بكتريا *E. coli* و *S. aureus*:

منطقة التثبيط (مم) المعدل ± الخطأ القياسي		المعاملات
<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	
7.75 ±0.25	7.25±0.48	T1 (ZnO)
10.50 ±0.50	9.00 ±0.41	T2 (Ag)
10.75 ±0.25	6.75 ±0.25	T3 (GN)
5.25 ± 1.80	12.75 ±0.63	T4 (ER)
14 ±0.75	15.25 ±0.75	T5 (GN /ZnO)
16.50 ±0.65	17.00 ±0.58	T6 (ER /ZnO)
13.25 ±0.38	16.50 ±0.29	T7 (GN / Ag)
18.00 ±0.82	19.25±0.25	T8 (ER / Ag)
2.00	1.24	LSD /0.05





شكل (4-61) يظهر التأثير التثبيطي للمركبات النانوية ZnO ، Ag ، والمضادين الحيويين GN ، ER بأشكالها الحرة والتآزرية قبل وبعد التحميل .

A - مركب Ag NP و ZnONP (MIC) بالماكرو غم لكل ملتر لبكتريا *E. coli* - B مركب Ag NP و ZnONP (MIC) بالماكرو غم / ملتر لبكتريا *S. aureus* - C المركب النانوي Ag NP و ZnONP بالماكرو غم / قرص / المضاد ER الحر والمحمل على *E. coli* - D المركب النانوي Ag NP و ZnONP بالماكرو غم / قرص / المضاد ER الحر والمحمل على *S. aureus* - E المركب النانوي Ag NP و ZnONP بالماكرو غم / قرص / المضاد GN الحر والمحمل على *E. coli* - F المركب النانوي Ag NP و ZnONP بالماكرو غم / قرص / المضاد GN الحر والمحمل على *S. aureus* - G المركب النانوي Ag NP و ZnONP بالماكرو غم / قرص / المضاد GN الحر والمحمل على *E. coli* - H المركب النانوي Ag NP و ZnONP بالماكرو غم / قرص لبكتريا *S. aureus* .

الاستنتاجات Conclusions

من خلال نتائج هذه الدراسة تم استنتاج ما يأتي :

- 1- نجاح عمليات التحميل للعلاجين MTX و NAP وكذلك المضادين GN و ER وتم الحصول على مركبات جديدة من خلال ظهور المستويات الحيوية الجديدة للمركبات النانوية الهجينة .
- 2- حدوث عملية تحرر متدرجة ضمن الاوساط المختلفة مما يشير الى انطلاق العلاج بكميات جيدة من المركبات النانوية Agnano و Xerogel بنسب تحرر عالية ومنتظمة بفترات زمنية اقل وهذا ما اثبتته معادلات حركيات التفاعل وانطبق موديل الرتبة الثانية الكاذبة والنسبة المئوية للتحرر مقارنة مع المركب الهجين ZnO اذ كان التحرر ابطاً .
- 3- ارتفاع مستويات السيتوكينات IL-6 , TNF- α , IL-1 β وكذلك البروتينات المناعية IgG , IgM عند ذكور الجرذان البيض المستحث بها التهاب المفاصل .
- 4- انخفاض مستويات السيتوكينات والبروتينات المناعية عند معاملة الجرذان المصابة بالمركبات النانوية والعلاج باشكالها الحرة والهجينة .
- 5- حصول نسب شفاء 50% عند اختزال الجرع والزمن الى النصف عند المعاملة بالمركبات الهجينة لنصف مدة علاج بلغت نفس المستويات التي وصلتها نسب الشفاء عند المعالجة بالعلاج الحر مدة علاجية كاملة .
- 6- ادى استحداث التهاب المفاصل في ذكور الجرذ الابيضالى زيادة في سمك القدم اليمنى وقد انخفضت هذه الزيادة وكانت مستويات نسبة الشفاء تقدر ب50% بعد المعاملة بالعلاجات قبل وبعد التحميل على المركبات النانوية .
- 7- ان للمركبات النانوية الحرة تأثير تثبيطي على بكتريا *E.coli* و *S.aureus* ادى هذا التأثير الى تحسين كفاءة المضادين GN و ER بشكل كبير بعد اخذ ادنى تركيز مثبط لكلا من المركبات النانوية والمضادين مما يشير الى نجح الفعل التازري باقل كمية من المضاد والمركب النانوي .

التوصيات Recommendations :

1. دراسة تأثير المركبات النانوية المحضرة من المستخلصات المائية والكحولية للنبات في خفض المعايير المناعية الالتهابية عند ذكور الحيوانات المختبرية المستحث بها التهاب المفاصل الرثوي .
2. دراسة تأثير المركبات النانوية على الجانب النسيجي والوظيفي في الحيوانات المختبرية لمعرفة تأثيرها السمي على تلك الانسجة واماكن تراكمها بعد انتهاء المركب من اوصول العلاج والية التخلص من تلك المركبات .
- 3- اجراء دراسة تهدف للاستفادة من خاصية التجمع لتلك المركبات في اماكن الخلل في الجسم من خلال تحضير مركبات نانوية امنة لتحديد الخلل بواسطة التصوير الشعاعي .
- 4- دراسة تأثير المركبات النانوية من خلال استحثاث امراض غير التهاب المفاصل لاختبار امكانية معالجتها بالمركبات النانوية .
- 5- دراسة امكانية تحويل بعض العلاجات المناعية الى اشكال نانوية لمعرفة اختلاف تأثير تلك العلاجات .
- 6- اختبار الفعل التثبيطي للمركبات النانوية على بكتريا ذات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية .
- 7- دراسة امكانية استخدام المركبات النانوية كعلاج وقائي قبل حدوث المرض كاستخدامه لقاح او مع المواد الحافظة في الاغذية لعدم انتشار الكائنات الدقيقة .

المصادر العربية

الساهوكي،مدحت . ووهيب ،كريمة محمد . (1990) . تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب، جامعة بغداد .

References

-A-

- Adeneye, A. A. ; Oreagba A. I. ; Ishola, I. O. & Kalejaiye, H. A. (2014).** Evaluation of the anti-arthritic activity of the hydroethanolic leaf extract of alchornea cordifolia in rats. *Afr J. Tradit Com. Alte. Med* ; 11(2):402-410.
- Adkar, P. P. ; Dongare,A.; Ambavade S. D, & Bhaskar, V. H. (2014).** Effect of *Trapa bispinosa* on HDAC Level in Animal Tissues for its Anti-arthritic Activity. *Res. J. of Pha., Bio. and Chem.Sci.* ; 5 (4) : 1409 - 1412.
- Aggarwal, D. & Abraham, S. (2016).** Rheumatoid Arthritis Treatments: A Historical Perspective. *JSM Arthritis* ; 1(2): 1011-1120.
- Aggarwal, P. ; Hall, J. B. ; McLeland, C. B. ; Dobrovolskaia, M. A.& McNeil, S.E. (2009)** .Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*; 61:428-437.
- Agnihotri ,S. ; Mukherjiabc, S. & Mukherji, S. (2014) .** Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy .*RSC Adv.*; 4: 3974-3983.
- Alamanos, Y. & Drosos, A. ; (2005) .** Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* ; 4 : 130 - 136 .
- Albrecht, M. A. ; Evan, C. W. & Raston, C. L. (2006).** Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chem.* ; 8 : 417-443.
- Aletaha, D. ; Neogi, T. ; Silman, A. J. ; Funovits, J.; Felson, D. T. ; Bingham III, C. O.& Hawker, G. (2010).** rheumatoid arthritis classification criteria. *Arthritis and Rheumatism*; 62(9), 2569-2581.
- Allegra, C. J. ; Drake, J. C. ; Jolivet, J. & Chabner, B. A. (1985).** Inhibition of phosphoribosyl amino imidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. *Proc. Natll. Acad. Sci. U S A* ; 82 : 4881 -4885.
- Alok, D. Vyom, S, (2010).** Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Anal. Bioanal. Chem.*; 398(2): 589-605.
- Amy, M. & Wasserman, M.(2011) .** Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis, *Am. Fam. Physician.*; 84 (11) : 1245 - 1252

-
-
- Anderson, D.** (2004) . TNF inhibitors: a new age in rheumatoid arthritis treatment. *Am J Nurs.* ; 104 (2) : 60 - 68.
- Anderson, J.** ; Caplan, L. ; Yazdany, J. ; Robbins, M. L. ; Neogi, T. & Michaud, K.(2012). Rheumatoid arthritis disease activity measures: American College of Rheumatology recommendations for use in clinical practice. *Arthritis Care Res.* ; 64 : 640- 647.
- Angiolilli, D. J. & Weisman, S. M.**(2017) . Clinical Pharmacology and Cardiovascular Safety of Naproxen. [*Am. J. Cardiovasc Drugs.*](#) 2017; 17(2): 97–107.
- Angiolilli , C.** ; Grabiec, A. M. & Ferguson, B. S. (2016). Inflammatory cytokines epigenetically regulate rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte activation by suppressing HDAC5 expression. *Annals of the Rheum. Dise.* ; 75:430-438.
- Antony, A. C.**(1996). Folate receptors. *Annu. Rev. Nutr.*; 16: 501-521.
- Atiyeh, B. S.** ; Ioannovich. J. ; Al-Amm, C. A. & El-Musa, K. A. (2002). Management of acute and chronic open wounds: the importance of moist environment in optimal wound healing. *Curr Pharm Biotechnol*; 3:1389 - 2010.
- Atlas, R.M. (1995)** :Principle of Microbiology. 1st.ed. Mosby-Year book company. USA.

-B-

- Barrera, P.** ; Boerbooms, A. M. ; Demacker, P. N. ; Van de Putte, L. B. ; Gallati, H. & Van der Meer, J. W. (1994) . Circulating concentrations and production of cytokines and soluble receptors in rheumatoid arthritis patients:: effects of a single dose methotrexate. *Br.J.Rheumatol.*;33:1017-24.
- Barry, M.** ; Bleackley, R. C. (2002) . Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev. Immunol. Jun.* ; 2 (6) : 401-409 .
- Beatrix, B. & Gary, S.** (2010). Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* ; 233(1): 233-255.
- Beck, A.** ; Salem, K. ; Krischak. G. ; Kinzl, L. ; Bischoff, M. & Schmelz, A. (2005). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the perioperative phase in traumatology and orthopedics effects on bone healing. *Oper Orthop Traumatol.* ; 17(6) : 569 - 578.
- Bedouet , L.** ; Moine , L. ; Pascale , F. ; Nguyen , V. N. ; Labarre , D. ; Laurent , A . (2014). Synthesis of hydrophilic intra-articular microspheres conjugated to ibuprofen and evaluation of antiinflammatory activity on articular explants. *Int. J. Pharm.* ; 459: 51-61.
- Bedouet , L.** ; Pascale , F. ; Moine , L. ; Wassef , M . ; Ghegediban , S. H. ; Nguyen , V. N.; Bonneau , M . ; Labarre , D. ; Laurent , A . (2013) . Intra-articular fate of degradable

-
-
- poly(ethyleneglycol)-hydrogel microspheres as carriers for sustained drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 456 : 536-544.
- Bello**, A. E. ; Perkins, E. L. ; Jay, R. & Efthimiou, P. (2017). Recommendations for optimizing methotrexate treatment for patients with rheumatoid arthritis. *Open Access Rheumatology : Rese. and Rev.* ; 9: 67-79.
- Bernardi**, A. ; Zilberstein, A. C. ; Ager, E. ; Campos, M. M. ; Morrone, F. B. ; Calixto J. B. ; Pohlmann, A. R. ; Guterres, S. S. & Battastini, A. M. (2009). Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. *Bri. J. of Pharmacol.*; 158: 1104-1111.
- Bertino**, J. R. (1993). Kamofsky memorial lecture. Ode to methotrexate. *J.Clin.Oncol.* ; 11:5-14.
- Bijlsma**, J.W.; Welsing, P.M.& Woodworth, T.G. (2016). Early rheumatoid arthritis treated with tocilizumab, methotrexate, or their combination (U-Act-Early): a multicentre, randomised, double-blind, double-dummy, strategy trial. *Lancet* ; 388:343–355.
- Bingham**, C. O. (2002). The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J. Rheumatol. Suppl.* ; 65 : 3-9 .
- Bingham**, C. O. ; Looney, R. J. ; Deodhar, A. ; Halsey, N. ; Greenwald, M. & Coddling, C. (2010). Immunization responses in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab: results from a controlled clinical trial. *Arthritis Rheum.*; 62 : 64-74.
- Biswick** , T. ; Park, D. and Choy , J. (2012). Enhancing the UV A1 screening ability of Caffeic acid by encapsulation in layered basic zinc hydroxide matrix. *Journal of physics and chemistry of solids* ,73:1510-1513.
- Boissier** , M. C . ; Assier, E. ; Falgarone, G. & Bessis, N. (2008). Shifting the imbalance from Th1 / Th2 to Th 17 / treg : the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint, bone, spine . revue du rhumatisme* ; 75 : 373 - 375 .
- Bonta**, I. L. ; Pranham, M. J. & VanVliet, L. (1978). Combination of theohylline and prostaglandin EB as inhibitors of the adjuvant-induced arthritis syndrome of rats. *Ann. of the Rheum. Dis.*;37: 212-217.
- Borm**, P. J. ; Robbins, D. ; Haubold, S. ; Kuhlbusch, T. ; Fissan, H. ; Donaldson, K. ; Schins, R. ; Stone, V. ; Kreyling, W. ; Lademann, J. ; Krutmann, J. ; Warheit, D. & Oberdorster, E. (2006). The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC, Part. *Fibre Toxicol.*; 3: 11- 46.
- Brennan** , P. ; & Silman, A. (1994). Breast-feeding and the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheum.*; 37, 808 - 813.

-
- Bresnihan, B.** (1999). Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 26, 717 - 9 .
- Brigger, I. ; Dubernet, C. & Couvreur, P.** (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug. Deliv. Rev;* 54: 631 - 653.
- Brooks, G.F.; K.C. Carroll; J.S. Butel; and S.A. Morse. 2007. Jawetz, Melnick and Adelbergs Medical Microbiology. 24th.ed. The McGrawHill Companies, Inc., New York.P.224-232.
- Brooks, P. M.** (1998). The heberden oration 1997 treatment of rheumatoid arthritis: from symptomatic relief to potential cure. *Br. J. Rheumatol;* . 37, 1265-1271.
- Brun, P. ; Castagliuolo, I. ; Pinzani, M. Palù, G. ; Martines, D.** (2005). Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*; 289:G571 - 578.
- Buch, M. ; Emery, P.** (2002).The aetiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Hosp Pharmacist ;* 9: 5 - 9.
- Buer, J. K.** (2015). A history of the term “DMARD”. *Inflammopharmacology;* 23: 163-171.
- Butoescu , N. ; Jordan , O. & Doelker , E.** (2009). Intra-articular drug delivery systems for the treatment of rheumatic diseases: A review of the factors influencing their performance. *Eur J. Pharm. Biopharm;* 73: 205-218.

-C-

- Carson, D. A. ; Chen , P. P. & Kipps, T. J.** (1991). New roles for rheumatoid factor. *J. Clin. Invest ;* 87(2), 379 - 383.
- Ceccarelli , S. ; Panera, N. ; Mina, M. ; Gnani, D. ; De Stefanis, C. ; Crudele, A. & Rychlicki, C.** (2015). LPS - induced TNF- α factor mediates pro-inflammatory and pro-fibrogenic pattern in non-alcoholic fatty liver disease. *Oncotarget;* 6(39): 41434-41452 .
- Cerceo, E.; Deitelzweig, S. B.; Sherman, B. M. and Amin, A. N.** (2016). Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospital Setting: Overview, Implications for Clinical Practice, and Emerging Treatment Options. *Microb. Drug Resist. (Larchmont, N.Y.)*, 22 (5): 412–431.
- Chaiamnuay, S. & Bridges, L. S.** (2005). The role of B cells and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology ;* 12, 203 - 216.
- Chen, B. ; Zhang, Du, N. ; Dongsheng, L. ; Xiangyang, M & Deren, Y.(2009).Hybrid nanorods: layer-by-layer ,assembly and tunble blue-shiflband gap emission *.J.Material Reserch Bulletin ;*44:889-892.

-
- Chen, J.; Ouyang, J.; Kong, J.; Zhong, W. and Xing, M.M.(2013).** Photo-cross-linked and pH-sensitive biodegradable micelles for doxorubicin delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*, 5(8):3108–3117.
- Chen, Z. P.; Liu, W.; Liu, D.; Xiao, Y. Y.; Chen, H. X.; Chen, J.; Li, W.; Cai, H.; Cai, B. C.; Pan, J.(2012)** . Development of brucine-loaded microsphere/thermally responsive hydrogel combination system for intra-articular administration. *J. Control. Release*, 162, 628–635.
- Choy, E. & Panayi, G. (2001).** Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl. J. Med.*; 344 (12):907 - 916.
- Chun-Hao, T. & Chuh-Yung, C. (2007).** Growth of Ag nanoparticles using plasma-modified multi-walled carbon nanotubes. *Nanotechnology* ; 19: (3)477 - 486.
- Coelho, M. G. ; Reis, P. A. & Gava, V. B. (2004).** Anti-arthritis effect Subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. *Toxicol Lett* ; 154:69 - 80.
- Combe, B ; Landewe, R. & Daien, C.I. (2016)** update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *Ann Rheum Dis*; 10:1136-1143.
- Combe, B. & Dougados, M. (2001).** La polyarthrite rhumatoïde est morte, vive la polyarthrite chronique évolutive. *La lettre du rhumatologue* ; 277, 3 - 4.
- Coradeghini, R. ; Gioria, S. ; Garcia, C.P. ; Nativo, P.; Franchini, F. ; Gilliland, D. ; Ponti, J.& Rossi, F.(2013)** .Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. *Toxicol Lett.* ; 217 : 205-216.
- Costache, M. C. ; Qu, H. ; Ducheyne, P. & Devore, D. (2010).** Polymer - Xerogel Composites for Controlled Release Wound Dressings. *Biomat.*; 31: (24), 6336-6343.

-D-

- Dakal, T. C.; Kumar, A.; Majumdar R. S. and Yadav V. (2016)** . Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Front. Microbiol.*; 7(1831):1-17.
- Daniel, C.; McGillicuddy, K. H. Shah; Ryan P.; Larry A. and Jonathan A.(2007)** How sensitive is the synovial fluid white blood cell count in diagnosing septic arthritis? *The Am. J. of Emer, Med.*; 25(7): 749-752.
- De Waal, M. R. ; Moore, K. W .(1998)** . interleukin-10. In: *The Cytokine Handbook*. 3rd edition. *Acad. Press. Limit.* ; 78 : 333 - 364 .
- Degen, A. & Kosec, M. (2000)** . Effect of pH and impurities on the surface charge of zinc oxide in aqueous solution. *J. Eur. Cer. Soc.* ; 20: 667-73.

-
- Denarie, D.;** Rinaudo-Gaujous, M .; T Thomas, h.; Paul, S and Marotte H.(2017) . Methotrexate Reduced TNF Bioactivity in Rheumatoid Arthritis Patients Treated with Infliximab . *Mediat. of Inflamm.*; 8 :1-8.
- Dobkin, P. L. ;** Filipski, M. ; Looper, K. ; Schieir, O. & Baron, M. (2008). Identifying target areas of treatment for depressed early inflammatory arthritis patients. *Psychother. and psychosomat.*, 77, 298 - 305.
- Dolhain, R. J. ;** Tak, P. P. ; Dijkmans, B. A. ; De Kuiper, P. ; Breedveld, F.C. & Miltenburg, A. M. (1998). Methotrexate reduces inflammatory cell numbers, expression of monokines and of adhesion molecules in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*; 37:502 - 508.
- Dong , J. ;** Jiang, D. ; Wang , Z. ; Wu , G. ; Miao, L.& Huang , L.(2013) .Intra-articular delivery of liposomal celecoxib-hyaluronate combination for the treatment of osteoarthritis in rabbit model. *Int. J. Pharm.*, 441; 285–290.
- Dworak, N. ;** Wnuk, M. ; Zebrowsk., J. ; Bartosz, G. Lewinska, A.(2014) .Genotoxic and mutagenic activity of diamond nanoparticles in human peripheral lymphocytes *in vitro*. *Carbon* ; 68 : 763-776 .

-E-

- Eby, D. M.;** Luckarift, H. R. & Johnson, G. R. (2009) . Hybrid antimicrobial enzyme and silver nanoparticle coatings for medical instruments. *ACS Appl. Mater. Interfaces*; 1: 1553-1560.
- Eftekhari, F. ;** Rastegar, M.; Golalipour, M.and Mansour ,S. N.(2012). Detection of extended spectrum beta-lactamases in urinary isolates of *Klebsiella pneumonia* in relation to Bla SHV, Bla TEM, Bla CTX-M gene carriage. *Iran J. Public Health.*, 41:127–32.
- Egorov, N.S.** (1985) : Antibiotics Scientific approach . mirpublishers .
- Elron-Gross , I. ;** Glucksam , Y. & Margalit , R. A. (2009) . Liposomal dexamethasone-diclofenac combinations for local osteoarthritis treatment. *Int. J. Pharm.*; 376: 84-91.
- Elron-Gross , I. ;** Glucksam , Y. ; Biton , I. E. & Margalit , R. A. (2009) . novel Diclofenac-carrier for local treatment of osteoarthritis applying live-animal MRI. *J. Control. Release*; 135: 65-70.
- Elsabahy, M.& Wooley, K. L.** (2013). Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity . *Chem. Soc. Rev.*; 42(12): 5552-5576.
- Elsaman, T. & Musab, M. A.** (2016) . Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) Derivatives with Anti-Cancer Activity. *Am. J. of Res. Com.*; 4(4): 2325-4076 .

Emery, P. & Seto, Y. (2003). Role of biologics in early arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* ; 21: 5191 - 5194.

Ernest, H. ; Choy, M. D. , & Gabriel, S. ; Panayi, M. D.(2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.*; 344(12), 907 - 916.

-F -

Fairbanks, L.D. ; Ruckemann, K.; Qiu, Y. Hawrylowicz, C.M. ; Richards, D.F. and Swaminathan, R. (1999) . Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T lymphocytes: a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis? *Biochem J.* ; 342 (1) :143-52.

Feldman, M. & Maini, R.N. (2001). Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned?? *Annu.Rev.Immunol.* 19:163-196.

Feldman, M. ; Brennan, F. M. & Maini, R. N. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Cell* ; 85: 307 - 310.

Ferrara, N. ; Houck, K.A. ; Jakeman, L.B. ; Winer, J. & Leung, D.W. (1991). The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem.* **47**, 211-218

Floyd, J. L.; Smith, K. P.; Kumar, S. H.; Floyd, J. T. and Varela, M. F. (2010). LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54:5406–5412 .

Forbes, B.; Sahm, D. and Weissfeld, A. (2014). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 13th edn. St. Louis, MO: Mosby, Inc., 201–229.

Fulisa, A. ; Popoiu, C. ; Vlase, G. ; Vlasb, T. ; Onetiu, D. ; Saviu, G. ; Simu, G. ; Patrutescu, C. (2014) Thermoanalytical and Spectroscopic Study on Methotrexate- Active Substance and Tablet. *Digest Journal of Nanomat. and Biostructu.* ; 9(1) 93- 98.

-G-

Galdiero, S. ; Falanga, A. ; Vitiello, M. ; Cantisani, M. ; Marra, V. & Galdiero, M. (2011). Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents, *Molecules*; 16: 8894-8918 .

Gertrude, Y.G. ; Kuskovsky, I. (2007) . in Springer Handbook of Electronic and Photonic Materials: Doping Aspects of Zn-Based Wide-Band-Gap Semiconductors, ed. by P.C. Safa Kasap, *Springer*; 843-854.

Gibbon, C .J.(2003). South African medicines formulary. 6th ed. Pinelands: South African Medical Association. *Heal. and Medi. Pub. Group*; 569 -570.

-
-
- Glavinas, H.;** Mehn, D. ; Jani, M.; Oosterhuis, B.; Heredi-Szabo , K. & Krajcsi, P. (2008). Utilization of membrane vesicle preparations to study drug-ABC transporter interactions. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*; 4 (6): 721–732.
- Gloria , L. & David , B.** (2011) . Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Elsev. . 22* : 189-195.
- Goeb, V. ; Dieude, P. ; Vittecoq, O.** (2005). *Association* between the TNFR_{II} 196R allele and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7(5): 1056-1062.
- Golbach, R. & Lipsky, P. E.** (2003) . New concepts in the treatment of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Med . ; 54:* 197-216.
- Gorman, J. Lum, R. ; Chen, J. ; Suarez-Almazor, M.; Thomson, G. & Criswell, L.**(2004). Impact of shared epitope genotype and ethnicity on erosive disease: a meta-analysis of 3,240 rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum. ; 50(2) :* 400-412.
- Grund , S. ; Bauer , M. & Fischer , D.** (2011).Polymers in Drug Delivery-State of the Art and Future Trends. *Adv. Eng. Mater.*, 13: 61-87.
- Gunalana, S. ; Sivaraja, R . & Rajendranb, V.**(2012) Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens , *Materials International*; 22(6):693-700.
- Guo, D.;** Wu, C. ; Jiang, H.; Li, Q.; Wang, X. & Chen, B. (2008). Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation. *J. Photochem. Photobiol .;* 119 - 126.
- Gurunathan, S. ; Han, J.W. ; Kwon, D. ; and Kim, J.** (2014).Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria .*J Nanoscale Res Lett. ; 9 (1) :*373-384 .
- Halldorsdottir, H.;** Jonsson, T.; Thorsteinsson, J. & Valdimarsson, H. (2000) . A prospective study on the incidence of rheumatoid arthritis among people with persistent increase of rheumatoid factor. *Ann Rheum Dis.;* 59(2):149-151
- Hanley, C.;** Thurber, A.; Hanna, C.; Punnoose, A.; Zhang, J.; Wingett, D.G.(2009).The Influences of Cell Type and ZnO Nanoparticle Size on Immune Cell Cytotoxicity and Cytokine Induction. *Nanoscale Res Lett*;4: 1409-20.
- Hardman, J.G. & Limbird, L.E.**(2001). Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill. 10: 2148-1250.
- Haroon, N. ; Aggarwal, A.; Lawrence, A.; Agarwal, V. ; Misra, R.** (2007). Impact of rheumatoid arthritis on quality of life. *Mod Rheumatol.;*17:290-5.
- Hassan, A.;** Usman. J.; Kalee,. F.; Omair, M. ; Khalid, A. & Iqbal, M. (2011). Detection and antibiotic susceptibility pattern of biofilm producing Gram positive and Gram negative

bacteria isolated from a tertiary care hospital of akistan. *Mala. J. of Microbiol.*; 7 (1): 57-60.

Haverkamp, R. G. ; Marshall, A.T. (2009). The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: limits on accumulation. *J. Nanopart. Res.* ;11: 1453 - 1463.

Hendrik , S.K. & Lipsky, P.E. (2004). T Cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis *Int. J. Radiat. Biol.*; 76 (8) : 1143 - 1153 .

Heng, B.C.; Zhao, X. ;Tan, E.C. Khamis, N. ; Assodani ,A. ; Xiong, S. ; Ruedl, C. & Loo, J.S. (2011)Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles. *Arch. Toxicol.* ; 85:1517-1528.

Hinks, A. ; Worthington, J. & Thomson, W.(2006) . The association of PTPN22 with rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*; 45(4):365-8.

Hitchon, A.C. & El-Gabalawy , H .S . (2004). Oxidation in rheumatoid arthritis . *Arthritis Research and Therapy* ; 6: 265-278 .

Hussain, T.(2015). Pakistan at the verge of potential epidemics by multi-drug resistant pathogenic bacteria . *Adv. Life Sci.*, 2(2):46-47.

Hwang ,I.S.; Hwang, J.H. ;Choi, H. ; Kim, K. and Lee,D.G. (2012). Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved .*J. Med. Microbiol.* ; 61: 1719-1726 .

Hypothesis: Rubens--one of the first victims of an epidemic of rheumatoid arthritis that started in the 16th-17th century? . *Rheumatology (Oxford)* ; 44 : 681- 683.

-I-

Ibrahim, S. and Ibrahim, H.(2013) .reparation and study properties of xerogel silica using sol-gel metho, *Int. J. of Appl. or Inn. in Eng. & Man.* (IJAIEM), 2(9) : 2319 - 4847.

Inagaki, Y. & Okazaki, I. (2007) . Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* ; 56:284-292.

Ingle, A.P. ; Duran, N. & Rai, M.(2014) .Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* ; 98:1001-1009.

Iwamoto, T. ; **Ikari**, K. **Nakamura**, T.(2006) Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*, 45(7):804-807.

- J -

-
-
- Janssen, M.** ; Mihov, G. ; Welting, T. ; Thies, J. & Emans, P. (2014) . Drugs and Polymers for Delivery Systems in OA Joints: Clinical Needs and Opportunities . *Polymers* ; 6: 799-819.
- Jaracz, S.;** Chen, J. ; Kuznetsova, L. V. & Ojima, I. . (2005). Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorg. Med. Chem* ; 13, 5043 - 5054.
- Jawaheer , D.** ; Lum, R. ; Amos, C. ; Gregersen, P. & Criswell, L. (2004) . Clustering of Disease Features Within 512 Multicase Rheumatoid Arthritis Families. *Arthritis Rheum*, 50 (3):736 - 741.
- Jayaraman, A.** Wood, T.K. (2008).Bacterial quorum sensing]signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu Rev. Biomed. Eng.*, 10:145–167.
- Jena, P.;** Mohanty, S.; Mallick, R. ; Jacob, B.; Sonawane, A. (2012) .Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells. *Int J Nanomedicine*;7:1805-18.
- Jin, E.** ; Zhang, B. ; Sun, X. R. ; Zhou, Z. X. ; Ma, X. P. ; Sun, Q. H. ; Tang, J. B. ; Shen, Y.Q. ; Van Kirk, E. ; Murdoch, W. J. & Radosz, M. (2013). Acid-active cell-penetrating peptides for in vivo tumor-targeted drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* ; 135:933- 942.
- Jin, J.**(2015) Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *JAMA.* ; 314(10):1084 - 1091.
- Jung, H. J. and Lee, D. G.** (2008). Synergistic antibacterial effect between silybin and N,N9-dicyclohexylcarbodiimide in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J. Microbiol.*; 46: 462–467.

- K -

- Kalishwaralal, K.;** BarathManiKanth , S ; Pandian, S. R.; Deepak, V.; Gurunathan, S. (2010).Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces*;79:340-344.
- Kameda, H.** ; Ueki, Y. ; Saito, K.; Nagaoka, S. ; Hidaka, T. & Atsumi, T. (2010). Etanercept (ETN) with methotrexate (MTX) is better than ETN monotherapy in patients with active rheumatoid arthritis despite MTX therapy: a randomized trial. *Mod Rheumatol*; 20 : 531 - 538.
- Kaneko, Y.** ; Atsumi, T.; Tanaka, Y. (2016).Comparison of adding tocilizumab to methotrexate with switching to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis with inadequate response to methotrexate: 52-week results from a prospective, randomised, controlled study (SURPRISE study). *Ann Rheum Dis*;75: 1917–23.

-
-
- Kary, S.** ; Fritz, J. ; Scherer, H. & Burmester, G.; (2004) - Do we still miss the chance of effectively treating early rheumatoid arthritis? New answers from a new study. *Rheumatology* ; . 43 : 819 - 820.
- Ke, C. J.** ; Su, T.Y. ; Chen, H. L. ; Liu, H. L. ; Chiang, W. L. ; Chu, P. C. ; Xia, Y.N.; Sung, H.W. (2011). Smart multifunctional hollow microspheres for the quick release of drugs in intracellular lysosomal compartments. *Angew. Chem. Int. Ed.*; .50: 8086 - 889.
- Khameneh, B.** Diab, R. Ghazvini, K. Fazly Bazzaz, B.S. (2016). Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb Pathog.*; 95:32-42.
- Kinne, R.W.**; Brauer , R. ; Stuhlmuller , B. ; Palombo-Kinne, E. & Burmester, G.R. (2000). Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arth. Res*; . 2, 189 - 202.
- Kirwan, J.R.** (1995). The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group. *New Eng. J. of Med.*; . 333(3): 142 - 146.
- Klareskog , L.**; Stolt, P. ; Lundberg, K. ; Kallberg, H. Bengtsson, C. & Grunewald, J.(2006). A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR(shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arth. and Rheuma.*;54(1):38-46.
- Klippstein, R.** ; Fernandez-Montesinos, R. ; Castillo, P.M.; Zaderenko, A.P.& Pozo, D. (2010). Silver nanoparticles interactions with the immune system: implications for health and disease. *nanoparticles.*; 1: 309-24.
- Kora, A. J.**; Manjusha, R. and Arunachalam, J. (2104).Superior bactericidal activity of SDS capped silver nanoparticles: synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering* ; 29(7) :2009- 2019 .
- Kovanda, F.**; Maryskova, Z. & Kovar, P. (2011). Intercalation of paracetamol into the hydrocalcite-like host. *Journal of solid state chemistry*;184: 3329-3335.
- Kranti, P. M.** ; Praful, B. D.; Prashant, B. M. & Udupa , N. (2014).Methotrexate-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, characterization and evaluation of its cytotoxic potential against U-343 MGa human neuronal glioblastoma cells. *Bull. Mater. Sci.*; 37(4) : 945-951.
- Kremer, J.** ; Genovese, M. & Cannon, G.W. (2004). et al. Combination leflunomide and methotrexate (MTX) therapy for patients with active rheumatoid arthritis failing MTX monotherapy: open-label extension of a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Journal of Rheumatology.*; 31(8):1521-1531.

Kvein, T.K. (2004). Epidemiology and burden of illness of rheumatoid arthritis. *Pharmacoeconomics*; 22(2 Suppl): 1-12.

- L -

Landewe, R.B. ; Boers, M. ; Verhoeven, A.C. ; Westhovens, R. ; van de Laar M.A. & Markusse H.M. (2002)COBRAA combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: long-term structural benefits off a brief intervention. *Arthritis Rheum*;46:347 - 56.

Laste, G.; Cristina, I. ; Souza, C. ; Santos, V. S. ; Caumo, W. & Torres, I. L.S. (2014). Histopathological Changes in Three Variations of Wistar Rat Adjuvant-Induced Arthritis Model (*IJPRS*) 3: I - 12 .

Lefton, C. and Sigmud , W.(2005) . Mechanisms controlling crystal habits of gold and silver colloids. *Adv. Funct. Mater.*; 15: 1197-1208.

Leipe, J.; Skapenko, A. ; Lipsky, P.E. & Schulze-Koops, H. (2005). Regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*;7:93-101.

Li, G.; Qian, H. D. Y.; Guan, B.; Gao, S.; Cui ,Y.; Yokoyama ,K. and Wang ,L.(2012) Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*. *Int. J. Mol .Sci.* ,13:466–476.

Li, P.; Wei, Y.; Liu, H. and Wang, X. K. (2005) .Growth of well-defined ZnO microparticles with additives from aqueous solution . *J. Solid State Chem.* ; 178: 855-860.

Liang , L. S. ; Jackson , J. ; Min , W. ; Risovic , V.; Wasan , K. M. & Burt, H.M. (2004) . Methotrexate loaded poly(L-lactic acid) microspheres for intra-articular delivery of methotrexate to the joint. *J. Pharm. Sci.* 93: 943–956.

Liew, F.Y. & McInnes, I.B. (2002). Role of interleukin 15 and interleukin 18 in inflammatory response. *Ann Rheum Dis. Suppl.*; 100 : 100- 102.

Liggins , R. T. ; Cruz , T. ; Min , W. ; Liang , L. ; Hunter , W. L. & Burt, H. M. (2004). Intra-articular treatment of arthritis with microsphere formulations of paclitaxel: biocompatibility and efficacy determinations in rabbits. *Inflamm. Res.*; 53: 363–372.

Lindqvist, E. ; Eberhardt, K.; Bendtzen, K. ; Heinegard, D. & Saxne, T. (2005). Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* ; 460: 196-201.

Linnert, T. ; Mulvaney, P. ; Henglein, A. & WeUer, H. (2009). Long-Lived Nonmetallic Silver Clusters in Aqueous Solution: Preparation and Photolysis, *J. Am. Chem. Soc* ; . 112:4657 - 4664.

-
-
- Linn-Rasker, S.;** van der Helm-van Mil, A. ; van Gaalen F. (2006) Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann Rheum Dis*, 65(3):366 - 71.
- Liu , Y.;** Jiao, F.; Qiu, Y.; Li, W.; Lao, F.; Zhou, G. ; Sun, B.; Xing, G. ; Dong, J. ;Zhao, Y.; Chai, Z.& Chen, C. (2009) .The effect of Gd@C82(OH)22 nanoparticles on the release of Th1/Th2 cytokines and induction of TNF-alpha mediated cellular immunity. *Biomaterials*; 30 : 3934 - 3945 .
- Liu , J. B .;** Dong , W. ; Zhan , P. ; Wang , S. Z. ; Zhang , J. H. & Wang, Z. L.(2005) . Synthesis of Bimetallic Nanoshells by an Improved Electroless Plating Method. *Langmuir*; 21: (5) 1683 - 1686.
- Liu, M. ;** Mao, W. ; Guan H. ; Li, L. ; Wei, B. & Li, P. (2011). Effects of taurochenodeoxycholic acid on adjuvant arthritis in rats. *International Immunopharmacology* ; 11, 2150 - 2158.
- Lundy, S. K. ;** Sarkar, S. ; Tesmer, L. A. & Fox, D. A. (2007). Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther*; **9**: 202 -210.

-M-

- MacFaddin, J.F. (2000).**Biochemical tests for identification of medical bacteria, 3rd ed. the Williamsand Wilkins. London.
- Maekay, A. H. &** Jishnu, N. (2014). Structural Charecterization and Controlled Release Analysis of 5-Fluorocytosine-ZnO-LH Nanocomposite Against Candida Albicans. *International Journal of Scientific Engineering and Technology Research*; 3:(17) 3671 - 3679.
- Majithia, V. &** Geraci, S.A. (2007). Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. *American Journal of Medicine*; 120 (11), 936-939.
- Mannheimer, J.S. ;** Whalen, E.C. (1985). The efficacy of transcutaneous electrical nerve stimulation in dysmenorrhea. *Clin J Pain*; 1(2):75 - 83.
- Mariaselvam, C.M. ;** Aoki, M. ; Salah, S. ; Boukouaci, W. & Moins-Teisserenc, H. (2014) Cytokine expression and cytokine-based T cell profiling in South Indian rheumatoid arthritis. *Immunobiology* ; 219: 772-777.
- Matthew, I.R. ;** Browne, R.M. ; Frame, J.W. & Millar, B.G. (1995) .Subperiosteal behaviour of alginate and cellulose wound dressing materials. *Biomaterials*; 16:275-278.
- Maxwell, S.R.J. &** Webb, D.J. (2005). COX-2 selective inhibitors – important lessons learned. *Lancet*; 365(9458): 449–451.

-
-
- Mease**, P.J. ; Revicki, D.A.; Szechinski, J. ; Greenwald, M. ; Kivitz, A. & Barile-Fabris, L. (2008). Improved health-related quality of life for patients with active rheumatoid arthritis receiving rituximab:results of the Dose-Ranging Assessment: International Clinical Evaluation of Rituximab in rheumatoid arthritis(DANCER) trial. *J Rheumatol* ; 35 : 20 - 30.
- Merrill**, J.C. ; You, J. ; Constable, C. ; Leeman, S.E. & Amar, S. (2011). Whole-body deletion of LPS-induced TNF- α factor (LITAF) markedly improves experimental endotoxic shock and inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 108:21247- 21252.
- Minigo**, G. ; Scholzen, A. ; Tang, C. K. ; Hanley, J. C. ; Kalkanidis, M. ; Pietersz, G . A. ; Apostolopoulos. V. & Plebanski, M. (2007) .Poly-L-lysine-coated nanoparticles: a potent delivery system to enhance DNA vaccine efficacy. *Vaccine.*; 25:1316–1327.
- Miyazaki**, K. & Islam, N. (2007). Nanotechnology systems of innovation – An analysis of industry and academia research activities. *Technovation* ; 27: 661-671 .
- Mohamed Ali**, M.F.; Salah, M.; Rafea, M. & Saleh N.(2008). Liposomal Methotrexate hydrogel for treatment of localized psoriasis: Preparation, characterization and laser targeting. *Med Sci Monit.*; 14(12): 66-74 .
- Mohammad**, J. H. ; Katharina, M. F. ; Ali Akbar, A. ; Dorleta, J. ; Idoia, R. L.; Teofilo, R. ; Vahid, S.; Wolfgang, J. P. & Morteza, M.(2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology* ; 30 : 499 - 511.
- Mohanan**, D. ; Slutter, B.; Henriksen-Lacey, M. ; Jiskoot, W. ; Bouwstra, J.A. ; Perrie, Y.; Kundig, T.M.; Gander, B. & Johansen, P. (2010).Administration routes affect the quality of immune responses: A crosssectional evaluation of particulate antigen-delivery systems. *J Control Release.*; 147 : 342 - 349 .
- Mohsen**, I. H. & AL Dujaily, A. N.(2011). Effect of arthritis on som blood biochemical criteria in women in Najaf governorate. *Magazine of Al-Kufa University for Biology* ; 3 (2) : 200-212.
- Moreland**, L.W. ; Schiff, M.H. ; Baumgartner, S.W. ; Tindall, E.A. ; Fleischmann, R.M. & Bulpitt, K.J. (1999). Etanerceptt therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann.Intern.Med*; 130:478 - 486 .
- Muthuraman**, P. ; Muthuviveganandavel, V. & Kim, D.H. (2015). Cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles on antioxidant enzyme activities and mRNA expression in the cocultured C2C12 and 3T3-L1 cells Appl. *Biochem. Biotechnol.*; 175: 1270-1280.
- Nagarajan**, P.; Rajagopalan, V. (2008). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles an antimicrobialstudy. *J. Sci. Technol. Adv. Mater.*; 9 (3) : 350 -362.

-
-
- Nair**, A. B., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. of Basic and Clin. Pharm.*, 7(2), 27–31.
- Nair**, S. ; S asidharan, A. ; Divya Rani, V.V. ; Menon, D. ; Manzoor, K. & Raina, S. (2009). Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *J Mater Sci Mater Med.*; 20: 235 - 41.
- Nalawade**, P. ; Aware, B. ; Kadam, V.J. & Hirlekar, R.S.(2009).Layered double hydroxides: A review. *J. Sci. Ind. Res.*; 68, 267 - 272.
- Namdeo**, A.G. and Kale, V.M. (2014). Antiarthritic effect of ganlangin isolated from rhizomes of alpinia officinarum in complete freund’s adjuvant-induced arthritis in rats. *Intl. J. of Pharm. and Pharmaceut. Sci.*. 6(4):502-504.
- Neeck**, G. (2002) Fifty years of experience with cortisone therapy in the study and treatment of rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci*; 966:28-38.
- Neumann**, V.C. ; Taggart, A.J. ; Le Gallez, P. ; Astbury, C. ; Hill, J. & Bird, H.A.A. (1986). study to determine the active moiety of sulphasalazine in rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*; 13: 285 - 287.
- Ning**, S. ; Xinghua, L. ; Manhong, L. ; Hailian, X. ; Yingjing, J. ; Jun, Z. & William, W. (2014). Noble Metal Nanoparticles Synthesized by Chemical Reduction: *Undergraduate Experiments for Nanomaterials Journal of Laboratory Chemical Education* , 2(2): 28-32(224).

- O -

- Ollier**, W.E ; Harrison, B. & Symmons, D. (2001) What is the natural history of rheumatoid arthritis?. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 15(1):27 - 48.
- Olsen**, N.J. & Stein, M. (2004). New drugs for rheumatoid arthritis. *New Eng.J. of Med.*; 350: 2567 - 2579.

- P -

- Palosuo**, T. ; Tilvis, R. ; Strandberg, T. & Aho, K. (2003). Filaggrin related antibodies among the aged. *Ann Rheum Dis*; 62(3):261-273.
- Pasi**, S. ; Kant, R. ; Gupta, S.& Surolia, A. (2015) Novel multimeric IL-1 receptor antagonist for the treatment of rheumatoid arthritis. *Biomaterials* ; 42: 121-133.
- Pati** , R. ; Mehta, R. K. ; Mohanty, S. ; Padhi, A. ; Techa , M. & Sengupta, M. (2014). Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane

disintegration in macrophages, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* ; 10 : 1195-1208.

Pierer, M. ; Kaltenhauser, S. ; Arnold, S. ; Wahle, M. ; Baerwald, C. ; Hantzel, H. & Wagner, U. (2006) Association of PTPN22 1858 single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis in a German cohort: higher frequency of the risk allele in male compared to female patients. *Arthritis Res Ther*; 8(3): 75- 82.

Pouya, E. ; David, A. ; Philip, J. C. & Kevin, C. C. (2011). Historical Perspective on the Etiology of Rheumatoid Arthritis . *Hand Clin.* ; 27(1): 1–10 .

Puent , X. S. ; Sanchez , L. M. ; Overall, C . M . & Lopez - Otin , C. (2003) . Human and mouse proteases: A comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* ; 4 (7) , 544 - 558 .

- R -

Raissouni, N. ; Gossec, L. ; Ayrat, X. & Dougados, M.(2005). Quelles nouveautés dans le diagnostic traitement d'une PR récente. *Rev Rhum* ; 72, 195-200 .

Raja, R.B. and Singh, P. (2012). Synergistic effect of silver nanoparticles with the cephalexin antibiotic against the test strains .*BioResearch Bulletin* ; 2(4): 171-179.

Ranganathan, P. & McLeod, H. L. (2006). Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; **54**, 1366-1377 .

Rasmussen, J.W. ; Martinez, E. ; Louka, P. & Wingett, D.G.(2010). Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin. Drug Deliv* ; 7: 1063-1072.

Reville, J. (2006) The genetic basis of autoantibody production. *Autoimmun Rev*, 5(6):389-98.

Rindfleisch, J. & Muller, D. (2005) . Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. *Am Fam Physician.* 72 : 1037 -1047.

Rizwan ,W.; Young-Soon, K.; Amrita, M.;Soon, Y. ; Hyung-Shik, S.h. (2010). Formation of ZnO micro-flowers prepared via solution process and their antibacterial activity. *J. Nanoscale Res. Lett.*, 5(10): 1675-1681.

Robert, S. ; Gicquel, T. ; Bodin, A. ; Lagente, V. & Boichot, E. (2016). Characterization of the MMP/TIMP Imbalance and Collagen Production Induced by IL-1 β or TNF- α Release from Human Hepatic Stellate Cells. *PLoS ONE* ; 11(4):1-14.

-
-
- Roy** , K. ; Kanwar, R. K. & Kanwar, J. R. (2015). Molecular targets in arthritis and recent trends in nanotherapy. *International Journal of Nanomedicine* ;10 :5407-5420.
- Rudwaleit**, M. ; Yin, Z. ; Siegert, S. ; Grolms, M. ; Radbruch, A. & Braun, J. (2000) . et al: Response to methotrexate in early rheumatoid arthritis is associated with a decrease of T cell derived tumour necrosis factor alpha,, increase of interleukin 10, and predicted by the initial concentration of interleukin 4. *Ann Rheum Dis*;59:311-324
- Ruparelia**, J. P. Chatterjee, A. K. Duttagupta, S. P. and Mukherji, S.(2008) . Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater.*; 4 : 707 - 716.

- S -

- Saag**, K.G. ; Teng, G.G. & Patkar, N.M. (2008). American College of Rheumatology (2008) recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*; 59(6): 762-784.
- Sabry**, E.Y.(2010). The prevalence of aspirin-induced asthma in Saudian asthmatic patients. *Allergol Immunopathol (Madr)*.; 38(4): 181-186 .
- Sadeghi**, B.; Rostami, A. and Momei, S.S. (2015) . Facile Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Seed Aqueous Extract of *Pistacia atlantica* and Its Antibacterial Activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134: 326-332.
- Samberg**, M. E.; Orndorff, P. E . and Monteiro-Riviere, N. A.(2011) . Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods. *Nanotoxicology*; 5: 244-253.
- Samia**, F.; Enas, A . ; Rabab ., & Mohamad, G. (2016). Serum matrix metalloproteinase-3 in rheumatoid arthritis patients: Correlation with disease activity and joint destruction. *The Egyptian Rheumatologist* ; 38, 153-159 .
- Saravanan** , M. ; Bhaskar , K. ; Maharajan , G. ; Pillai , K.S. (2011).Development of gelatin microspheres loaded with diclofenac sodium for intra-articular administration. *J. Drug Target.*, 19: 96–103.
- Satvekar**, R. K.; Phadatare, M. R. ; Karande, V. A. ; Patil, R. N.; Tiwale, B.M and Pawar, S. H. (2012). Influence of Silane Content on the Optical Properties of Sol Gel Derived Spin Coated Silica Thin Films. *International Journal of Basic and Applied Sciences*; 1 (4) :468-476.

-
- Schiavon, G.** (2000). *Sol-Gel Derived Nanocomposites synthesis Spectroscopy, Atomic Force Microscopy*", Ph.D. Thesis Technische München University, *Chemie*,..
- Scott, D. L. ; Smith, C. & Kingsley, G.** (2005). What are the consequences of early rheumatoid arthritis for the individual?. *Best practice & research*;19(1):117-36.
- Scott, D. L. ; Wolfe, F. ; Huizinga, T. W.** (2010) . Rheumatoid arthritis. *Lancet.*; 376(9746): 1094 - 1108
- Seiffert J, Hussain F, Guo C, Chang Y, Zhang J, Smith R, Tetley T, Chung F.** (2014). Inhaled silver nanoparticles induce pulmonary oxidative injury and inflammation: Differential effects between rat strains. *Eur Respir J.*;44(58): 3939-3947.
- Seitz, M. ; Zwicker, M. & Loetscher, P.** (1998). Effects of methotrexate on differentiation of monocytes and production of cytokine inhibitors by monocytes. *Arthritis Rheum*; 41:2032- 2038.
- Sharif, S. ; Eghbal, S. & Gharibdoost, F.** (2007). Comparative study of anti-CCP and RF for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *APLAR J Rheumatol*; 10 (2): 121-124.
- Sharma, V. K., Yngard, R. A. & Lin, Y.** (2009). Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Colloid Interface Sci.*; 145: 83-96.
- Short C. L.** (1974). The Antiquity of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* . ;17(3):193–205.
- Silman, A. J. & Pearson, J. E.** (2002). Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4 (3): 265-272.
- Sinha , V. R. & Trehan , A.** (2003). Biodegradable microspheres for protein delivery. *J. Control. Release*; 90: 261-280.
- Sintubin, . L; Windt, W. Dick, de J.**(2009). Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Appl. Microbiol. and Biotech.*; 84(4) 741-749.
- Skogh, T.** (2005). Does a positive anti-CCP test identify a distinct arthritis entity?. *Arthritis Res Ther*; 7(6):230-232.
- Smolen, J. ; Aletaha, D. & Bijlsma, J.** (2010). Treating rheumatoid arthritis to target recommendations of an international task force. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69: (4) ,631-637.
- Smolen, J. S. ; Nash, P. ; Durez, P. ; Hall, S. ; Ilivanova, E. & Irazoque-Palazuelos, F.** (2013). Maintenance, reduction, or withdrawal of etanercept after treatment with etanercept and

methotrexate in patients with moderate rheumatoid arthritis (PRESERVE): a randomised controlled trial. *Lancet*; 381:918-29.

Smolen, J.S.; Landewe; Bijlsma, R. & Bijlsma, J. (2017). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis*.;0:1–18.

Sobha, K.; Surendranath, K.; Meena, V.; Jwala, K.T.; Swetha, N.; Latha, K.S.M.(2010). Emerging trends in nanobiotechnology. *J. Biotech. Mol. Bio. Rev.*; 5(1): 001-012.

Sotiriou, G.A. and Pratsinis, S.E. (2010) Antibacterial activity of nanosilver particles and particles. *Environ. Sci. Technol.*, 44: 5649–5654.

Steinman, L. A. (2007). Brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* ; 13: 139-145 .

Steven, E. ; Nissen, M. D. ; Neville, D. ; Yeomans, M. D. & Daniel, H. (2016). Cardiovascular Safety of Celecoxib, Naproxen, or Ibuprofen for Arthritis. *n engl j med* . ; 2520-2533.

Storey, G. D. ; (2009). Alfred Baring Garrod (1819-1907). *Rheumatology (Oxford)*; 40:1189-1191.

Suzuki, K. ; Sawada, T. & Murakami, A. (2003). High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* ; 32(4):197-204.

Sweetman, S. C. (2002). Martindale: the complete drug reference. 33rd ed. London: *The Pharmaceutical Press*. 2483

- T -

Takeuchi, O. & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*; 140(6):805 -820.

Tan, Y. ; Li, S. ; Pitt, B. R.& Huang, L. (1999) .The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo. *Hum. Gene Ther.*; 10: 2153-2161.

Tanaka, T. ; Ogata, A. & Narazaki, M. (2010). Tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis, *Expert Review of Clin. Immunol.*; 6 : 843-854.

Tanaka. T. ; Ogata, A. & Kishimoto, T. (2013) . Targeting of interleukin-6 for the treatment of rheumatoid arthritis: a review and update. *Rheumatology: Current Research*, 3: 184: 200-221.

-
-
- Tang, X.** ; Metzger, D. ; Leeman, S. & Amar, S. (2006). LPS-induced TNF-alpha factor (LITAF)-deficient mice express reduced LPS-induced cytokine: Evidence for LITAF-dependent LPS signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 103:13777-13782.
- Tao, S.** & Karl, S. (1994). silver clusters and chemistry in zeolites. *Amarecan chemical society* ; 94(4)857-869.
- Tassi, S.** ; Carta, S. ; Delfino, L. ; Caorsi, R. ; Martini, A. & Gattorno, M. (2010). Altered redox state of monocytes from cryopyrin-associated periodic syndromes causes accelerated IL-1beta secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 107(21): 9789-94.
- Tesija – Kuna, A.** (2006). Laboratory standards in diagnosis and therapy monitoring of rheumatoid arthritis. *eJIFCC*;17(3): 8 -18.
- Thirunavukkarasu, C.** ; Watkins, S.C. ; Gandhi, C.R. (2006). Mechanisms of endotoxin-induced nitric oxide, interleukin-6 and tumor necrosis factor-a production in activated rat hepatic stellate cells: role of p38MAPK. *Hepatology.*; 44:389-398.
- Thiyagarajan, V.;** P. Muthusamy, N.;Jayshree, R. & Vijaya, B.(2015). Evaluation of Anti-arthritic potential of Adansonia digitata seed extract. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development*; 2(4): 548-554.
- Tjong, S. C.** & Chen, H. (2004). Nanocrystalline materials and coatings, *Mater. Sci. Eng., R*, 45: 1- 88.
- Treharne, G. J.** ; Lyons, A. C. ; Booth, D. A. & Kitas, G. D. (2007). Psychological well-being across 1 year with rheumatoid arthritis: Coping resources as buffers of perceived stress. *British Journal of Health Psychology* ; 12 (3) : 323-345.
- Trif , M.** ; Guillen , C. ; Vaughan , D. M. ; Telfer , J. M. ; Brewer , J. M. ; Roseanu , A. & Brock , J. H. (2010) . Liposomes as possible carriers for lactoferrin in the local treatment of inflammatory diseases. *Exp. Biol. Med.*; 226: 559-564.
- Tsavaris, N.** ; Mavragani, C. & Pikazis, D. (2007). Rheumatoid arthritis: correlation between rheumatoid factor levels and CA-125 tumour marker elevation. *Ann Rheum Dis*; 66(7):980-991.
- Tuncer, M.** & Seker, E. (2011). Single step sol-gel made silver chloride on Titania xerogels to inhibit *E. coli* bacteria growth: Effect of preparation and chloride ion on bactericidal activity. *J. of Sol-Gel Sci. and Technol.* ; 59: 304-310.
- Turesson, C.** ; Schaid, D. & Weyand, C. (2005). The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*; 7(6):R1386-93.

- V -

- Van den Berg, W. B.** (1998) . Joint inflammation and cartilage destruction may occur uncoupled. *Springer Semin.Immunopathol*; 20 : 149-164 .
- Van den Borne, B. E. & Dijkmans, B. A. ; de Rooij, H.H. Ie Cessie, S. & Verweij, C. L.** (1997). Chloroquine and hydroxychloroquine equally affect tumor necrosis factor-alpha, interleukin 6, and interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells. *J.Rheumatol* ; 24:55 - 60 .
- Van Nieuwenhuijze, A. E.M.; Van de Loo, F.A. Walgreen B, (2015).** Complementary action of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-17A induces interleukin-23, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, and matrix metalloproteinases and drives bone and cartilage pathology in experimental arthritis: rationale for combination therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*.; 17(1):163-187.
- Vasishta, A. ; (2002)** Diagnosing early-onset rheumatoid arthritis : The role of anti-CCP antibodies. *Am Clin Lab*; 21(7):34-6.
- Verstappen, S. M. ; Jacobs, J. W. ; Bijlsma, J. W. ; Heurkens, A. H. van Booma-Frankfort, C. ; Borg, E. J. (2003).** Five-year followup of rheumatoid arthritis patients after early treatment with disease-modifying antirheumatic drugs versus treatment according to the pyramid approach in the first year. *Arthritis Rheum..* ; 48:1797-807.
- Vijayakumar, S. ; Vinoj, G. ; Alaikozhundan, M . B. ; Shanthi, S. & Vaseeharan, B. (2015).** Plectranthus amboinicus leaf extract mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles and its control of methicillin resistant Staphylococcus aureus biofilm and blood sucking mosquito larva. *Spectrochim. Acta Part AMol. Biomol. Spectrosc* ; 137: 886-891.
- Vingsbo, C. (1996).** Pristane-induced arthritis in rats a new model for rheumatoid arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex and non-major histocompatibility complex genes. *Am. J. Pathol.*; 149, 1675-1683 .,

- W -

- Wang , L . ; Liu , Y. ; Zhang , W. ; Chen , X . ; Yang , T. ; Ma , G.(2013).** Microspheres and microcapsules for protein delivery: strategies of drug activity retention. *Curr. Pharm. Des.*, 19 : 6340-6352.
- Wang, Z. L.(2000)** Transmission electron microscopy of shape-controlled nanocrystals and their assemblies. *J. Phys. Chem. B*; 104 :1153-1175.

-
-
- Wani, U. ; Rashid , M. ; Kumar, M. ; Chaudhary, S. ; Kumar, P.& Mishra, N.**(2014).Trgeting Aspects Of Nanogel. *International Journal Of Pharmaceutical And Nanotechnology ;* 7(4) : 2612-2631.
- Weberr, S. M. & Levitz, S. M.** (2000). Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF-alpha genee expression by a nonlysosomotropic mechanism. *J.Immunol.;* 165:1534 - 40.
- Wendling, D. ; Racadot, E. & Wijdenes, J.** (1993). Treatment of severe rheumatoid arthritis by anti interleukin 6 monoclonal antibody . *J. R. heumatol.;* 20 :259 -262.
- Weng, K. C. ; Noble, C. O. ; Papahadjopoulos-Sternberg, B. ; Chen, F. F. ; Drummond, D. C. ; Kirpotin, D. B. ; Wang, D. ; Hom, Y. K. ; Hann, B. & Park, J. W.** (2008). Targeted tumor cell internalization and imaging of multifunctional quantum dot-conjugated immunoliposomes *in vitro* and *in vivo*. *Nano Lett.;* 8:2851-2857.
- Wesam, S. B. ; Leitnera, D. R. ; Zingla, F. G. ; Schratte, G. , Prasslc, R. ; Goesslerd, W. ; Reidla, J. & Schilda, S.** (2015). Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against Vibrio cholerae and enterotoxic Escherichia coliWesam , *Intl. J.of Med. Microbiol.;* 305 :85-95 .
- Weyand,C. M.** (2000). New Insights into the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology;* **39** (1): 8-17 .
- Wherry, E. J. & Ahmed, R.** (2004) . Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J. Virol. Jun;* 78(11):5535 - 45.
- Wiley: B.; Sun, Y.; Mayers, B.; Xia, Y.** (2005) .Shape controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. *Chem. Eur. J.;* 11: 454-463.
- Williams, D.** (2008). The relationship between biomaterials and nanotechnology. *Biomater J.;* 1: 3 -23.
- Winter, G. D.** (1962). Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature;* 193:293 - 294.
- Wong, P. & Pamer, E.G.** (2003) . CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol;* 21: 29 - 70 .

- X -

- Xia, T.; Kovoichich, M. Liong, M. ; Madler, L. ; Gilbert.; B. ; Shi, H. ; Yeh, J.I. ; Zink, J.I.& Nel, A.E.** (2008) .Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano;* 2 : 2121 - 2134.

-
-
- Xin, F.;** Zhi, X.; Jun, L.; Qiang, M.; Ke-Feng, R. & Shuang, L.(2017). The Anti-Rheumatoid Arthritis Effects of Rhododendron Molle Roots on Collagen-Induced Arthritis in Rats. *J. Complement Med. Alt. Healthcare J .* ; 3(1):1-5 .
- Xu, X. H. N. ;** Brownlow, W. J.; Kyriacou, S. V. Wan, Q. and. Viola, J .J. (2004). Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochemistry* ; 43: 10400-10413.
- Xue, M.;** Jiang, Z.Z. Wu, T. Li, J.; Zhang, L. . (2012) Anti-inflammatory effects and hepatotoxicity of Tripterygium-loaded solid lipid nanoparticles on adjuvant-induced arthritis in rats. *Phytomedicine*; 19 (11) : 998-1006.
- Yen, H. J.;** Hsu, S.H.& Tsai, C.L.(2009) .Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* ; 5 : 1553-1561.
- Yoshii, F. ;** Zhanshan, Y. ; Isobe, K. ; Shinozaki, K. & Makuuchi, K. (1999) . Electron beam crosslinked PEO and PEO/PVA hydrogels for wound dressing. *Radiat Phys Chem .* ; 55:133-138.
- Yuan ,Y.G. ;** Peng ,Q .L.; and Gurunathan,S. (2007).Effects of Silver Nanoparticles on Multiple Drug-Resistant Strains of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa from Mastitis-Infected Goats: An Alternative Approach for Antimicrobial Therapy. *Int. J. Mol. Sci.*; 18: 569-581 .
- Yuan, Q. ;** Hein, S. & Misra, R. D. K. (2010). [New generation of chitosan-encapsulated ZnO quantum dots loaded with drug: Synthesis, characterization and *in vitro* drug delivery response](#) .*Acta Biomater*;6: 2732-2739.
- Yuan, Q. ;** Venkatasubramanian, R. ; Hein, S. & Misra, R. D. K. (2008). A stimulus-responsive magnetic nanoparticle drug carrier: Magnetite encapsulated by chitosan-grafted-copolymer .*Acta Biomater.*; 4: 1024-1037.
- Yuji, Y. &** Toshio, T. (2014). Interleukin 6 and Rheumatoid Arthritis. *BioMed Research International*; 40: 768 - 780.
- Zaheer, K. ;** Shael, A. & Abdullah, Y. O. (2010). Preparation and characterization of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Elsevier*. 82 : 513-517.
- Zahradnik, H. P. ;** Hanjalic-Beck, A. Groth, K. (2010). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hormonal contraceptives for pain relief from dysmenorrhea: a review. *Contraception; Br J Obstet Gynaecol*; 81:185 -192.
- Zawidlak, B. ;** Kawalec, M. ; Bosek, I. ; Juzwa, M. & Adamus, G. (2010). Synthesis and antiproliferative properties of ibuprofen–oligo(3-hydroxybutyrate) conjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry* ; 45, 1833-1842.

-
-
- Zhang, J. & Misra, R. D. K.** (2007). Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: Core-shell nanoparticle carrier and drug release response. *Acta Biomater.*; 3: 838-850.
- Zhang, W. Y. ; Li, W,& Po, A.** (1998). Efficacy of minor analgesics in primary dysmenorrhoea: a systematic review. *Br J Obstet Gynaecol*; 105:780-9.
- Zhang, Z. Y. ; Xu, Y. D. ; Ma, Y. Y. ; Qiu, L. L. ; Wang, Y. ; Kong, J. L. & Xiong, H. M.** (2013). Biodegradable ZnO@polymer core-shell nanocarriers: pH-triggered release of doxorubicin in vitro. *Angew. Chem. Int. Ed.*; 52: 4127-4133.
- Zhongbing, H.; Xu Zh, Danhong, Y.; Guangfu, Y.; Xiaoming, L.; Yunqing, K.; Huang, Baoqing, H.** (2008). Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir* ; 24 (8): 4140-4144.
- Zhoua, H. ; Yana, H. ; Senpanb, A. ; Wicklineb, S. A. ; Panb, D. G. ; Lanzab, M. ; Phama, C. T. N. ; Lanza, G. M. & Pham, C. T. N.** (2012). Suppression of inflammation in a mouse model of rheumatoid arthritis using targeted lipase-labile *fumagillin prodrug nanoparticles* ; 33(33): 8632 - 8640.
- Zhu, J. Kan, C. ; Wang, J. G. & Wang, M.H.** (2011). High yield of uniform synthesis Ag nano wire High Aspect Ratio by introducing the long. Chain pvp in an Improved polyol process. *J. of Nanomat.*; 7 :122- 133.

Summary

The present study aims at identifying the effect of some nanoparticles to reduce rheumatoid arthritis (RA) induced with Complete Freund's Adjuvant (CFA). Through the preparation and diagnosis of hybrid nanoparticles from ZnO, Agnano and Xerogel, and to study some of their biological efficacy (eg control release and percentage of free treatment in different environments) before and after the Methotrexate (MTX) and (NAP) treatments are loaded.

The study also identified the synergistic inhibitory effect of two compounds ZnO and Agnano after loading the antibiotic Gentamycin (GN) and Erythromycin (ER) after taking the Minimal-Inhibition Concentration (MIC) each. It was diagnosed, [Fourier Transform Infrared Spectroscopy \(FTIR\)](#) showed new diffraction levels of hybrid nanoparticles, which clearly showed the success of the loading process. The Atomic Force Microscope (AFM) has also demonstrated the appearance of changes in the surface of hybrid nanoparticles loaded with treatments, all of which are within nanoscale dimensions and dimensions and are compatible with the results of the FT-IR spectrum.

The process of releasing the treatment from the surfaces of the hybrid nanoparticles after the loading referred to above was studied in the acid and base medium. It was noted that the process of releasing the therapeutic material occurs rapidly at the beginning of the liberation and then gradually slows down over time. The results indicate that the model of the equation of the second pseudo order in the study of the dynamics of interaction accordance more than the model first pseudo order and zero order.

The results showed an increase in the percentage of releasing by increasing the concentration of the medium as well as increasing the percentage in the acid medium compared to the basal rate, sometimes reaching more than 99% of the total content. The results showed an increase in the percentage of emancipation by increasing the concentration of the medium as well as increasing the percentage in the acid compared to the basal rate, sometimes reaching more than 99% of the total content.

The results showed that the induction of rheumatoid arthritis (RF) in the male white rat G2 resulted in a significant increase ($P < 0.05$) in the cytokines of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and both IgG and IgM antibodies compared with Positive control group (G1).

There was also a significant decrease ($P < 0.05$) of the IL-1 β concentration level in the groups after treatment with nanoparticles and free and hygienic treatment (ie before and after loading) of the treatment regimens, while the levels of cytokine TNF- α significantly decreased ($P < 0.05$) MTX and NAP for treatment regimens compared to G2, and IL-6 levels significantly decreased ($P < 0.05$) of G6 --- G13 for full treatment, And the IgM antibody levels decreased in groups (G3 ---- G13). This decrease was significant ($P < 0.05$) in totals (G6 ---- G13) for the whole treatment period. The results of the study showed a significant decrease ($P < 0.05$) in the level of immunological parameters studied in treatment of the above treatments after loading them to the nanoparticles under study for half the duration of treatment after calculating the value of T when compared with treatment of MTX and NAP treatments in their free form for the whole treatment period And the amount of treatment to almost half and this indicates improving the efficiency of treatment and reduce waste by 50%.

In addition, the study showed that the induction of arthritis in the male white rat resulted in a significant increase ($P < 0.05$) in the thickness of the right foot in the positive control group G2 compared to the negative control group. This increase was decreased after treatment with MTX and NAP treatments in their free form G6 and G7, This decrease was significant ($P < 0.05$) after loading the two treatments above on the prepared nanoparticles, and the cure rate and tumor reduction in the infected foot was up to 50% after loading the treatments on these compounds.

The inhibitory effect of the growth of *Escheirchia coli* and *Staphylococcus aureus* was studied by ZnO and Agnano in their free form (T1 and T2) and the results were compared with the inhibitory susceptibility of the negative antigen (ER) (T3 and T4) with the synergistic effect ($P < 0.05$) in T5 and T7 groups treated with antagonists (GN / ZnO and Agnano GN) compared to treatments and compounds in *E. coli* isolates ($P < 0.05$). There was also significant increase in the diameter of the inhibition ring ($P < 0.05$) when the isolates of *E. coli* were treated with the two compounds Nanoyen of them loaded the antibiotic in the ER totals T6 and 8 T (ER / ZnO and Agnano/ ER) compared with T1, T2 and T4 respectively. The results showed that the treatment of *S. aureus* isolates with GN / ZnO and Agnano GN (T5 and T7) significantly increased the area of the inhibition ring ($P < 0.05$) compared to the T2, T1 and T3 inhibition rings respectively. While the diameter of the inhibitory ring for the growth of *S. aureus* bacteria after treatment with the two nanoparticles loaded with ER (ER ZnO, Agnano / ER) T6 and T8 significantly ($P < 0.05$) compared to the recorded inhibition of T1, T2 and T4, respectively treatment With a lower concentration of MIC inhibitor for nanoparticles (ZnO, Agnano) and antibiotic (ER).

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Karbala
College of Education for Pure Sciences
Department of Biology



**Immunological Study Of Some Nanoparticles Compounds
In infected Rats With Arthritis And Determining Their
Antibacterial *Role***

By
Kaiser Abdul Sajjad Alslman
B. Sc. / 2002 M.Sc.2012

A Thesis submitted to the College of Education Pure Science of
Karbala University as a partial fulfillment of the requirements
for Doctor of Philosophy in Biology-Zoology

Supervised By
Assist Professor Dr.
Hiyam Abdul Ridha AlAwad

Professor Dr.
Abas Matrood Bashi

1439 A . H.

2018.A.D.