جمـــهـوريـــة العــــــراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعـــــــــة ميســــــان
كليـــــة العلـــــــوم
قسم علوم الحياة

التخليق الحيوي لجسيمات الذهب النانوية بواسطة بعض الفطريات النباتية الداخلية وتحديد فعاليتها الحيوية كمضادات للأكسدة والسرطان

الرسالة مقدمة

الى مجلس كلية العلوم/جامعة ميسان

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

ازهار محمد عليوي

بكالوريوس علوم الحياة/ كلية العلوم

جامعة البصرة /2000-2001

بأشراف

الأستاذ المساعد الدكتور رشيد رحيم حتيت

1444هـ **2023م**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

((يُطَافُ عَلَيْهِمْ بِصِحَافٍ مِنْ ذَهَبٍ وَأَكْوَابٍ وَفِيهَا مَا تَشْتَهِيهِ الْأَنْفُسُ وَتَلَذُّ الْأَعْيُنُ وَأَنْتُمْ فِيهَا خَالِدُونَ))

صدق الله العليُ العظيم

الزخرف \ ايه 71

شهادة المشرف

اشهد بأني قرأت الرسالة الموسومة **التخليق الحيوي لجسيمات الذهب النانوية بواسطة بعض الفطريات النباتية الداخلية وتحديد فعاليتها الحيوية كمضادات للأكسدة والسرطان** والمقدمة من قبل الطالبة (ازهار محمد عليوي) وقد تم اعدادها تحت اشرافي في كلية العلوم جامعة ميسان كجزء من متطلبات شهادة الماجستير في علوم الحياة.

التوقيع

أ.م. الدكتور رشيد رحيم حتيت

قسم علوم الحياة

كلية العلوم/ جامعة ميسان

التاريخ / / 2023

توصية رئيس قسم علوم الحياة

في ضوء التوصيات المتاحة ; احيل هذه الرسالة للمناقشة من قبل لجنة الامتحانات

التوقيع

أ.م. الدكتور ميثم عبد الكاظم دراغ

رئيس قسم علوم الحياة

كلية العلوم/ جامعة ميسان

التاريخ: / /2023

الاهداء

الى شمس عالم الملك ومجلي الظلام

الى السماق السابق في اعلاء العلم

اليك هذا الجهد والجد خطوة وضاءة

التمس فيها رضاك ....مولاي حجة الله الأعظم

صاحب الزمان

الشكر والتقدير والعرفان

الحمد لله والشكر له خالق السماوات والأرض ومافيهن بأسمة ابدأ وعليه اتوكل وبه استعين والصلاة والسلام على معلم البشرية محمد وعلى أله الطيبين الطاهرين وصحبه الغر الميامين على ما منحني من عزيمة وصبر وإرادة لإنجاز هذه الرسالة.

انطلاقا من قول الامام زين العابدين عليه السلام: يقول الله تبارك وتعالى لعبد من عبيده يوم القيامة اشكرت فلانا؟ فيقول بل شكرتك يا رب فيقول: لم تشكرني إذ لم تشكره. فأني أتوجه بالشكر والامتنان الى مشرفي الأستاذ المساعد الدكتور رشيد رحيم حتيت لإقتراحه هذا الموضوع وعلى دعمه المهني وتوجيهاته القيمة والودية طوال فترة البحث جزاه الله خير جزاء المحسنين. أتوجه بشكري الى عمادة كليه العلوم والشكر الخاص الى رئيس قسم علوم الحياه الدكتور ميثم عبد الكاظم لتسهيلهم كثير من الأمور في انجاز هذه الرسالة .كما أتوجه بالشكر الى أساتذتي في قسم علوم الحياة الدكتور صالح والأستاذ صادق والدكتورة اسوان والدكتور منذر في قسم الفيزياء والدكتور أسامة في قسم الكيمياء على تقديم المساعدة .كما أتقدم بالشكر الى معاون عميد كلية الزراعة الدكتور ضرغام والدكتور مخلد عبد الكريم الأستاذ في كلية الطب جامعة ميسان والدكتور علي عبد الرحمن والدكتورة امل صالح كلية التربية جامعة البصرة والدكتورة آيات ابراهيم الأستاذة في كلية العلوم جامعة البصرة والدكتور احمد الشرع في كلية الهندسة على ما قدموه لي من معلومات ونصائح اسال الله التوفيق لهم والسداد. كذلك أتقدم بخالص الشكر والعرفان الى زميلي الأستاذ حسن لتقديمه المساعدة والمساندة اللامتناهية طيلة فترة بحثي. أقدم شكري الى صديقاتي الست حوراء عبد الجبار والست هبة في مختبر الاحياء المجهرية والست ثريا والست نورفي إزالة العقبات طيلة مدة البحث والدراسة اسال الله ان يحفظهم ويوفقهم. أقدم شكري وامتناني الى الدكتور ميثاق شمخي مسؤول شعبه تعزيز الصحة في دائرة صحة ميسان ومدير المختبر المركزي الأستاذ سليم حلو وزميلي الأستاذ سلام جاسم الكيمياوي في مختبر مستشفى الصدر العام على دعمهم بتجهيزي لبعض الأدوات والمواد. واخيرا انا ممتنة الى والدي لدعواتهم المتواصلة لي وشكري الى عائلتي واخواتي على صبرهم ودعمهم لي طوال فترة الدراسة.

ازهار محمد عليوي

الخلاصة

في الدراسة الحالية تم جمع عينات من اوراق نبات (الصبار، الاكاسيا، الختمة) للمدة ما بين تشرين الثاني 2021 إلى منتصف كانون الثاني 2022 من مناطق مختلفة في محافظة ميسان (حديقة كلية الصيدلة ،حديقة كلية العلوم ،حديقة المنزل) وتم جلب العينات النباتية الى مختبر التقنية الحيوية في كلية العلوم جامعة ميسان وتم عزل اعداد من الفطريات بطريقة تعقيم السطح Surface sterilization وقد تم تشخيص الفطريات بصورة أولية بالمجهر الضوئي وشخصت أربعة أنواع من فطريات النسيج الداخلي Endophyte fungi جزيئيا بإستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) إذ تم عزل وتشخيص الفطر *Aspergillus fumigatus* isolate AZ-RA123 من أوراق نبات الصبار وعزل وتشخيص الفطر *Penicillium citrinum* isolate MEBPOO16 من أوراق نبات الختمة وعزل الفطر *Aspergillus fumigatus* strain Zbf-R10 والفطر *Aspergillus tubingensis* strain HRb من أوراق نبات الاكاسيا وبعد تشخيص الفطريات تم اختبار إمكانية هذه الفطريات في التصنيع الحيوي لجسيمات الذهب النانوية وذلك بمزج الراشح الفطري مع محلول كلوريد الذهب الرباعي $HauCl_4 .3H_2O$ واظهرت النتائج حدوث تغير لوني كمؤشر ودليل اولي على تكون جسيمات الذهب النانوية وتم تأكيد انتاج جسيمات الذهب النانوية عن طريق فحص مطياف الاشعة المرئية الفوق بنفسجية UV-VIS spectrophotometer إذ أظهرت النتائج امتلاك جسيمات الذهب النانوية قمم طيف الاشعة البنفسجية عند الاطوال الموجية بين (548-610) نانومتر. و تضمن التوصيف الفيزيائي لجسيمات الذهب النانوية المحظرة حيويا حيود الاشعة السينية X Ray diffraction والمجهر الالكتروني النافذ Transmission electron microscope (TEM) والمجهر الالكتروني الماسح للأنبعاث المجالي Field Emission Scanning Electronic Microscope (FE-SEM) وفحص مجهر القوى الذرية Atomic force microscope (AFM) وفحص زيتا Zeta potential إذ أظهرت نتائج فحص حيود الاشعة السينية ان جسيمات الذهب النانوية تمتلك تركيب مكعب متمركز الوجه FCC كما أظهرت نتائج فحص TEM أن احجامها تتراوح من (12-187) نانومتر واشكالا مختلفة .كما اثبتت نتائج فحص مجهر القوى الذرية للصور الثنائية والثلاثية الابعاد لجسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا امتلاكها ابعادا ضمن المقياس النانوي .واظهرت

نتائج فحص زيتا اكتساب جسيمات الذهب النانوية شحنات سطحية سالبة ساعد على عدم تنافرها واستقرارها عند القيم (-8.9 ,-9.1 ,-9.4) ملي فولت.كما تم تقييم الفعالية الحيوية المضادة للأورام ضد خط خلايا سرطان الثدي MCF-7 لمحاليل جسيمات الذهب النانوية وتبين ان جسيمات الذهب النانوية المحضرة من الفطر *Penicillium citrinum* isolate MEBPOO16 هي فقط تمتلك نشاط مضادا للسرطان عند التركيز 1000و500 مايكروغرام /مل بنسبة تثبيط 35% و 30% على التوالي بألية غير معتمدة على تنشيط انزيم الكازبيز 3وأكدت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين التراكيز المثبطة للخلايا السرطانية عند مستوى معنوية 0.05.كما تم تقييم فعالية جسيمات الذهب النانوية المحضرة من راشح الفطر *Aspergillus fumigatus* strain Zbf-R10 كمضادة اكسدة بطريقة الكسح الجذري لمادة 22,-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) حيث أظهرت النتائج ان جسيمات الذهب النانوية تمتلك اعلى فعالية مضادة للأكسدة بنسبة كسح 71%عند التركيز 800 ميكروغرام / مل.

المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
أ	الخلاصة (باللغة العربية)
ج	قائمة المحتويات
و	قائمة الجداول
ز	قائمة الاشكال
ك	قائمة المختصرات

الصفحة	العنوان	التسلسل
	الفصل الأول: المقدمة	
1	المقدمة Introduction	1-1
3	الهدف من الدراسة The aim of the study	2-1
	الفصل الثاني : استعراض المراجع	
4	تقنية النانو Nanotechnology	1-2
6	تاريخ التقنية النانوية	2-2
8	الجسيمات النانوية Nanoparticles	3-2
9	تصنيف الجسيمات النانوية	1-3-2
10	الجسيمات النانوية في النظام البيئي	2-3-2
12	الذهب	4-2
13	التخليق الحيوي لجسيمات الذهب النانوية	5-2
18	الية التخليق الحيوي لجسيمات الذهب النانوية	6-2
20	تطبيقات جسيمات الذهب النانوية	7-2
22	الفطريات النباتية الداخلية Endophyte fungi	8-2

24	الفطريات النباتية الداخلية مصدر للجسيمات النانوية	1-8-2
25	The cancer السرطان	9-2
25	Breast cancer سرطان الثدي	1-9-2
26	Treatment of breast cancer علاج سرطان الثدي	2-9-2
29	علاج سرطان الثدي بتقنية النانو	3-9-2
30	الية تثبيط الجسيمات الذهبية النانوية للخلايا السرطانية	10-2
33	جسيمات الذهب النانوية كمضادات اكسدة	11-2
	الفصل الثالث: المواد وطرق العمل	
35	Equipments and Apparatues الأجهزة والمعدات المختبرية	1-3
36	الأدوات المستخدمة في هذه الدراسة	2-3
37	المواد الكيميائية والاحيائية	3-3
39	الأوساط الزرعية	4-3
40	خطوات طرائق العمل	5-3
41	جمع العينات	1-5-3
41	عزل فطريات النسيج النباتي الداخلي	2-5-3
42	تنقية وتشخيص الأنواع الفطرية قيد الدراسة	3-5-3
42	التشخيص الجزيئي للفطريات المدروسة	4-5-3
42	استخلاص ال DNA من المستعمرات الفطرية	1-4-5-3
44	الترحيل الكهربائي الهلامي لتحليل جودة DNA	2-4-5-3
44	The primers preparation تحضير البوادئ	3-4-5-3
45	تحضير مزيج مكونات تفاعل ال PCR	4-4-5-3
46	تضخيم الدنا بواسطة جهاز التدوير الحراري	5-4-5-3
47	التخليق الحيوي لجزيئات الذهب النانوية من الفطريات المدروسة	5-5-3
47	Preparation of $Haucl_4.3H_2O$ تحضير محلول كلوريد الذهب	1-5-5-3

47	تحضير جسيمات الذهب النانوية حيويا	2-5-5-3
48	التشخيص الفيزيائي لجسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا	6-5-3
48	التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية Ultra violate visible	1-6-5-3
48	حيود الاشعة السينية X Ray diffracton (XRD)	2-6-5-3
49	المجهر الالكتروني النافذ Transmission electron microscope (TEM)	3-6-5-3
49	المجهر الالكتروني الماسح للانبعاث المجالي Field emission electron microscope	4-6-5-3
49	مجهر القوة الذرية Atomic force microscope (AFM)	5ه-6-5-3
49	جهد زيتا Zeta potential	6-6-5-3
49	تحديد الفعالية المضادة للأكسدة لجسيمات الذهب النانوية المخلقة مختبريا	7-5-3
50	دراسة الفعالية المضادة للسرطان لجسيمات الذهب النانوية المخلقة في المختبر	8-5-3
50	إدامة مزارع الخلايا السرطانية	1-8-5-3
50	فحوصات السمية الخلوية Cytotoxicity assays	2-8-5-3
51	الكشف المناعي عن بروتينات الموت الخلوي المبرمج Caspase 3	3-8-5-3
52	التحليل الاحصائي	9-5-3
	الفصل الرابع: النتائج والمناقشة	
53	العزل والتشخيص	1-4
53	عزل فطريات النسيج الداخلي	1-1-4
53	التشخيص الجزيئي للفطريات المعزولة	2-1-4
55	التخليق الحيوي لجسيمات الذهب النانوية	2-4
59	توصيف جسيمات الذهب النانوية	3-4
59	التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية UV-Visible	1-3-4
62	حيود الاشعة السينية XRD	2-3-4
66	المجهر الالكتروني الماسح للانبعاث المجالي (FeSem)وEDX	3-3-4

4-3-4	المجهر الالكتروني النافذ TEM	68
5-3-4	مجهر القوى الذرية AFM	73
6-3-4	جهد زيتا Zeta potential	77
4-4	تأثير جسيمات الذهب النانوية المخلقة كمضادات اكسدة	79
5-4	الفعالية المضادة للسرطان لجسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا ضد خط سرطان الثدي MCF-7	81
6-4	تقنية الكيمياء المناعية النسيجية لاختبار تحفيز Caspase 3	86
	الفصل الخامس: الاستنتاجات والتوصيات	
1	الاستنتاجات Conclusions	88
2	التوصيات Recommendation	89
3	المصادر العربية	90
4	المصادر الاجنبية	91
5	الملاحق	

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1-2	بعض أنواع البكتريا المنتجة للجسيمات النانوية	15
2-2	بعض أنواع الفطريات المنتجة للجسيمات النانوية	16
3-2	بعض أنواع الطحالب المنتجة للجسيمات النانوية	17
1-3	الأجهزة والمعدات المستخدمة	35
2-3	الأدوات المستخدمة في هذه الدراسة	36
3-3	المواد الكيميائية والاحيائية المستخدمة في الدراسة الحالية	37
4-3	الأوساط الزراعية المستخدمة في عزل وتخمر الفطريات	39
5-3	النباتات المستخدمة في الدراسة الحالية	41

6-3	تسلسل البادئ ITS1 وITS4 المستخدمة في هذه الدراسة	45
7-3	مكونات مزيج تفاعل ال PCR	45
8-3	الظروف المثلى لتضخيم الحامض النووي المستخلص من الفطريات المعزولة في دراستنا الحالية	46
1-4	التشخيص الجزيئي للفطريات المعزولة من النسيج الداخلي لأوراق النباتات قيد الدراسة	55
2-4	قيم الامتصاصية وشدة الامتصاصية لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من الرواشح الفطرية قيد الدراسة	59

قائمة الاشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1	اهم تطبيقات التقنية النانوية	5
2	المناهج والطرق المختلفة في توليف الجسيمات النانوية	6
3	تطور التقنية النانوية عبر التاريخ	7
4	الدقائق الرئيسية والتجمعات والتكتلات	8
5	أنواع الجسيمات العضوية	9
6	التركيب النانوي المضاد للانعكاس لجناح الفراشة الزجاجي	11
7	الية التصنيع الحيوي لجسيمات الذهب النانوية	20
8	أنواع العلاجات المناعية لسرطان الثدي	28
9	الية عمل جسيمات الذهب النانوية ضد الخلايا السرطانية	32
10	مخطط يوضح خطة عمل الدراسة البحثية (اعداد الباحثة)	40
11	Aحجم ناتج PCR بعد الترحيل الكهربائي على 1.5% هلام الاكاروز،B طفرة الغرز بإضافة نوكليوتيد C عند الموقع 13 زوج قاعدي pb	54
12	التغير اللوني من الأصفر الى البني الداكن لراشح مزرعة	57

	الفطر *A.fumigatus* strain Zbf-R10	
13	التغير اللوني من الأصفر الى البنفسجي لراشح مزرعة الفطر *A.tubingensis* strain HRb	57
14	التغير اللوني من الأصفر الى البني لراشح مزرعة الفطر *A.fumigatus* isolate AZ-RA123	58
15	التغير اللوني من الأصغر الى البني لراشح مزرعة الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO1	58
16	طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة الفطر *A.fumigatus* strain Zbf-R10	60
17	طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة الفطر *A.tubingensis* strain HRb	61
18	طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة الفطر *A.fumigatus* isolate AZ-RA123	61
19	طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO1	62
20	نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus srtain* Zbf-R10	64
21	نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.tubingensis* strain HRb	64
22	نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus* isolate AZ-AR123	65
23	نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر P.citrinum isolate MEBPOO1	65
24	Aصور المجهر الالكتروني FESEM وB edx لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.tubingensis* strain HRb	67
25	Aصور المجهر الالكتروني FESEM وB edx لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus*	67

	isolate AZ-AR123	
68	Aصور المجهر الالكتروني FESEM وB edx لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *P.cirinum* isolate MEBPOO1	26
69	صور TEM لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.tubingensis* strain HRb	27
70	توزيع الحجم لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.tubingensis* srtain HRb	28
70	صور TEM لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.fumigatus* AZ-AR123	29
71	توزيع الحجم لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.fumigatus* AZ-AR123	30
71	صور TEM لجسيمات الذهب النانوية لراشح القطر *P.citrinum* isolate MEBPOO1	31
72	توزيع الحجم لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO1	32
72	صور TEM لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus srtain* Zbf-R10	33
73	توزيع الحجم لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus srtain* Zbf-R10	34
74	صورة ثلاثية الابعاد لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.tubingensis* srtain HRb	35
74	صورة ثنائية الابعاد لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.tubingensis* srtain HRb	36
75	صورة ثلاثية الابعاد لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus* AZ-AR123	37
75	صورة ثنائية الابعاد لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus* AZ-AR123	38
76	صورة ثلاثية الابعاد لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من	39

	راشح الفطر *P. citrinum* isolate MEBPOO1	
76	صورة ثنائية الابعاد لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *P. citrinum* isolate MEBPOO1	40
78	جهد زيتا لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.tubingensis* srtain HRb	41
78	جهد زيتا لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.fumigatus* AZ-AR123	42
79	جهد زيتا لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *P. citrinum* isolate MEBPOO1	43
80	النسبة المئوية للكسح الجذري لحامض الاسكوربك ولجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus srtain* Zbf-R10	44
81	فعالية المضادة للاكسدة لحامض الاسكوربك ولجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.fumigatus srtain* Zbf-R10 بطريقة DPPH	45
83	النسبة المئوية لحيوية خلايا خط MCF-7 المعرضة لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.tubingensis* srtain HRb	46
84	النسبة المئوية لحيوية خلايا خط MCF-7 المعرضة لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus* AZ-AR123	47
85	النسبة المئوية لحيوية خلايا MCF-7 المعرضة لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *P. citrinum* isolate MEBPOO1	48
87	خلايا خط MCF-7 المعاملة بجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *P. citrinum* isolate MEBPOO1 والمصبغة بصبغة ADB	49

87	خلايا خط MCF-7 غير المعاملة بجسيمات الذهب النانوية ومصبغة بصبغة ADB	50

قائمة المختصرات

الاختصارات	المفتاح
AFM	Atomic Force Microscope
CNT	Carbon nano Tube
CPT	Camptothecin
DAB	Diaminobenzidine
DMSO	Dimethyl Sulphoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDX	Energy Dispersive X-Ray Analysis
ER	Endrogen Receptor
FCC	Face-Centered Cubic
FE-SEM	Field Emission Scanning Electronic Microscope
GCCG	Glutathion disulfide
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor
MCF-7	Michigan Cancer Foundation
MTT	Dimethylthiazol-2-yl-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
MGYP	Malt Glucose Yeast Peptone
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide phosphate Hydrogen
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Babio Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	Potata Dextrose Agar
PDP	Potata Dextrose Proth

PR	Progestron Receptor
ROS	Reaction Oxygen Species
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Insititute
SPR	Surface Plasmon Resonance
TEM	Transmission Electron Microscope
TFTs	Thin-Film transistors
XRD	X-Ray Diffraction

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

1-المقدمة

يعد سرطان الثدي من المشاكل الصحية الكبرى للنساء في مختلف انحاء العالم فهو اكثر أنواع السرطانات شيوعا التي تم تشخيصها عند النساء وثاني مسببات الوفاة عند النساء بعد سرطان الرئة في الدول المتطورة والسبب الأول للوفيات السرطانية في البلدان النامية عند النساء ويشكل نسبة 29% من جميع السرطانات عند النساء (Siegel *et al.*, 2012) .وحسب احصائيات منظمة الصحة العالمية لسنة 2020 تم تقدير حالات سرطان الثدي بـ 2.2ال مليون حالة مقارنة ببقية أنواع السرطانات حيث قدرت اعداد سرطان الرئة بـ2.21 مليون حالة وسرطان البروستات بـ 1.41 مليون حالة (Ferlay *et al.*, 2021).

يتم علاج سرطان الثدي بعد تشخيصه بعدة طرق تقليدية منها الجراحة والعلاج المناعي والعلاج الكيميائي والاشعاعي (Zeh, 2020) ويعتبر العلاج الكيميائي والجراحي هما الخياران العلاجيان الاوليان لمرضى السرطان (Xie *et al.*, 2020) وبسبب الاضرار والاعراض الجانبية للعلاجات الكيميائية والاشعاع وتأثيراته على الخلايا السليمة وتطوير مقاومة الادوية والقصور في العلاج ظهرت الحاجة الملحة لتطوير طرق وأساليب جديدة ومن مصادر طبيعية تكون لها فعالية مضادة للسرطان بديلا عن العلاجات التقليدية (Wang *et al.*, ,2020; Mansoori *et al.*, 2017).على سبيل المثال تم استخلاص مركبات ثانوية من الفطريات ذات نشاط مضاد للسرطان من هذه المركبات Taxol و Podophyllotoxin و Camptothecime الا ان هذه المواد تواجه عقبات داخل الجسم وظروف يمكن ان تغير هيكلها الطبيعي وتضعف فعاليتها المضادة للسرطان (Kumar *et al.*, 2021; Seca and Pinto, 2018)

تمكن العلماء من ابتكار تقنية جديدة تدعى بالزراعة النسيجية (Tissue culture) التي تعمل على تسهيل معرفة تأثير العلاج التجريبي على أنواع مختلفة من الخلايا السرطانية والطبيعية خارج الجسم in vitro وذلك باستخدام خطوط الخلايا السرطانية وخطوط الخلايا الطبيعية ومعرفة مدى تأثيرها السمي Cytotoxic effect على هذه الخلايا (koch *et al.*, 2021; Taylor, 2014). في الآونة الأخيرة تزايدت أهمية التقنية النانوية وهي التقنية التي تتضمن تصنيع وتطبيقات المواد التي تمتلك ابعاد في حدود 1-100 نانومتر وتكاملت مع العلوم الأخرى وخاصة الصيدلانية مما أدى الى دخولها في مجال التطبيقات

الطبية واهمها علاج السرطان إذ يستخدم فيها الجسيمات النانوية للتشخيص والعلاج وكمضادات اكسدة (Shi, 2021;Madani *et al*., 2020; Senapati *et al*., 2018).

تأخذ الجسيمات النانوية المعدنية Mineral nanoparticles مجالا مهما في علم المواد بسبب خصائصها الفيزيائية والكيميائية الفريدة التي تختلف عن المواد الحرة (Ealia and Saravanakumar, 2017) ومن اهم الصفات التي تمتلكها الجسيمات النانوية هي زيادة مساحتها السطحية بالنسبة الى الحجم الذي اكسبها خواص حرارية وميكانيكية لها تأثير كبير على التطبيقات الحيوية والصحية على وجه الخصوص (Muddapur *et al*., 2022).

اتجه العلماء لتخليق الجسيمات النانوية حيويا بسبب كلفتها القليلة ولكونها صديقة للبيئة حيث تكون هذه الطرق خالية من الملوثات مقارنة بالتخليق الكيميائي والفيزيائي التي غالبا ما تستخدم طاقة عالية ومواد كيميائية سامة وهي نقطة مهمة ومصدر قلق كبير للتطبيقات البايلوجية وخاصة الطبية منها (Muddapur *et al*., 2022; Zadeh *et al*., 2022).استخدمت المستخلصات النباتية والاحياء المجهرية الدقيقة كالبكتريا والفطريات والخمائر والطحالب والبكتريا الخيطية Actinomycetes في تخليق الجسيمات النانوية المعدنية الوظيفية كالذهب (Au) والفضة (Ag) والبلاتين (Pt) إذ تحتوي المستخلصات الحيوية لهذه الكائنات على الانزيمات التي تقوم باختزال ايونات المعادن الذائبة وتحولها الى بلورات نانوية (Dewan, 2022; Ali and Mohammed., 2021; Kitching *et al*., 2015) وتعد الفطريات الداخلية Endophyte fungi التي تعيش داخل الانسجة النباتية من دون ان تسبب لها الاضرار مصدر حيوي حديث ومهم لكثير من الايوض الحيوية الفعالة Bioactive metabolite والتي تعد من عوامل الاختزال لأيونات المعادن والتي تقوم باختزالها الى جسيمات نانوية (Sardul *et al*., 2017).

تعد تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR من التقنيات المهمة والتي يعتمد عليها في استهداف وتضخيم منطقة معينة من جينوم الكائن الحي للكشف عن علاقة الترابط بين الجينات الوراثية الموجودة بين الفطريات (Aslam *et al*., 2017).ان استخدام تقنية تفاعل البوليمر المتسلسل المعروفة PCR في التشخيص الدقيق للفطريات والكائنات الأخرى تشخيصا جزيئيا أدى ألى القضاء على النتائج غير الدقيقة المعتمدة على الصفات المظهرية (Graeser and Saunte, 2020; Wickes and Wiederhold, 2018).استخدمت هذه

التقنية PCR في تشخيص كثير من أنواع الفطريات في كثير من الأبحاث مثل *pileolaria terebinthi* و*Aspergillus SPP* (Alaei *et al*., 2012: ابراهيم، 2021).

تمتلك جسيمات الذهب النانوية تطبيقات في علم الاحياء المجهرية والالكترونات والطب وكناقل للأدوية كونها مضادة للأكسدة وثابتة في الظروف البيئية وسطح بايلوجي يمكن توظيفه ،ومن اهم هذه التطبيقات هي امتلاكها فعالية مضادة للسرطان وكسح للجذور الحرة ،إذ تؤثر جسيمات الذهب النانوية على الخلايا السرطانية وكذلك على الجذور الحرة بتراكيز معينة ،ومن الجدير بالذكر انها تؤثر على الخلايا السرطانية من دون ان تؤثر على الخلايا الطبيعية وتعمل على قتل الخلايا السرطانية باليات كثيرة منها موت الخلية المبرمج (Patil *et al*., 2019).

1-2- أهداف الدراسة Aims of the study

1- عزل فطريات النسيج النباتي الداخلي Endophyte fungi وتشخيصها بالطرق الجزيئية.
2- اختبار قدرة الفطريات المعزولة على تخليق جسيمات الذهب النانوية.
3- تحديد خصائص جسيمات الذهب النانوية بإستعمال تقنيات التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية (UV) وحيود الاشعة السينية (XRD) والمجهر الالكتروني النافذ (TEM) والمجهر الالكتروني الماسح للأنبعاث المجالي (FESEM) و مجهر القوى الذرية (AFM) و جهد زيتا Zeta Potentail .
4- استخدام جسيمات الذهب النانوية المحضرة بواسطة فطريات النسيج النباتي الداخلي كمضادات للسرطان تجاه خط سرطان الثدي MCF-7 وكمضادات للأكسدة.
5- اختبار فعالية جسيمات الذهب النانوية المحضرة مختبريا في تحفيز انزيم Caspase 3 .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

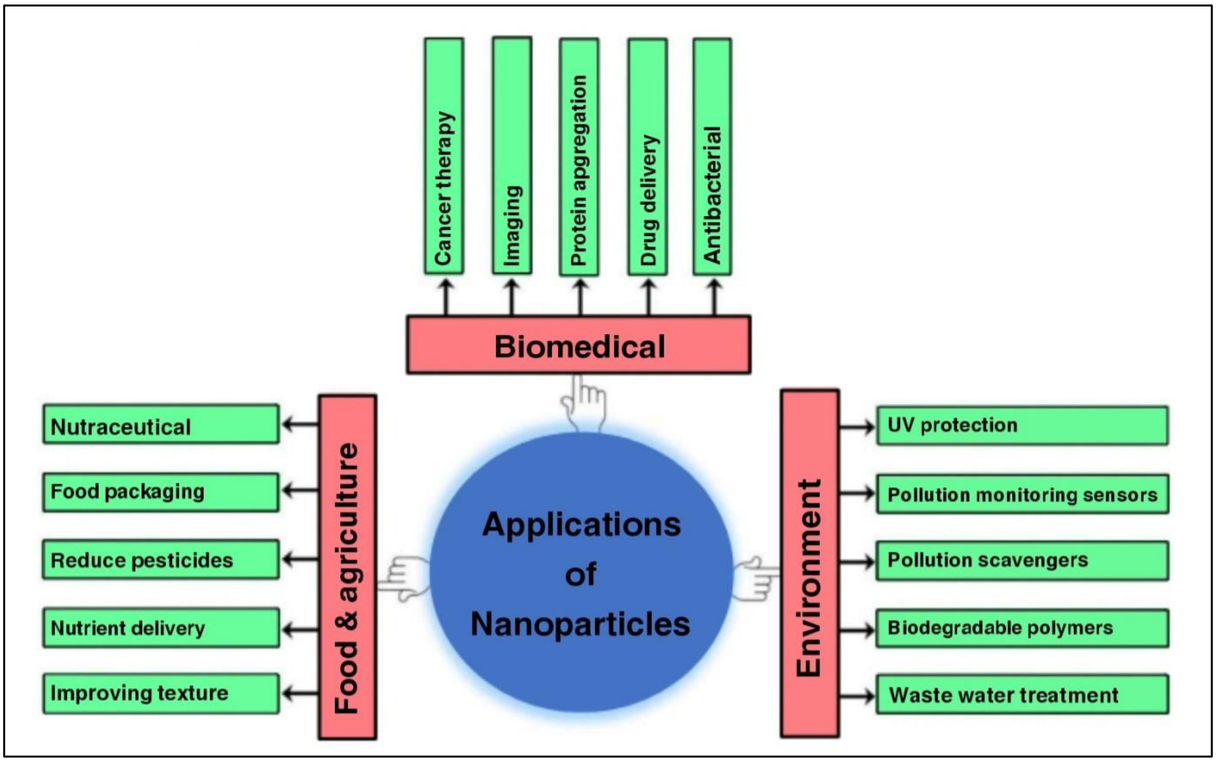
2- استعراض المراجع

2-1- تقنية النانو Nanotechnology

تقنية النانو هي العلوم المتعددة التخصصات والتعقيد بما في ذلك علم الفيزياء النانوية والكيمياء النانوية والمواد النانوية والالكترونات النانوية وعلم القياس النانوي وعلم الايونات النانوية وغيرها وتعتبر تقنية النانو مزيجا جديدا من العلوم ومجموعة واسعة من التطبيقات التي تتراوح من انتاج الطاقة الى الإنتاج الصناعي والتطبيقات الطبية والحيوية (Madkour, 2019) شكل (1).والنانو كلمة تعني في اللغة اليونانية نانوس وتعني بعالم الاقزام الخرافي المتناهي في الصغر dwarf أو الشيء الصغير جدا وهي وحدة قياس يرمز لها بالرمز(nm) وتساوي جزء واحد من المليار من المتر 10^{-9} وهذا المقياس اصغر من طول موجة الضوء المرئي واقل بـ 100 الف مرة من سمك شعرة الانسان (Tripathi, 2019) ، ويصف توماس كيني من جامعة ستانفورد حجم الجزيئة النانوية بعدة امثلة منها معدل نمو ظفر الأنسان في ثانية واحدة أو إرتفاع قطرة ماء بعد بسطها على مساحة متر مربع واحد (Parsa, 2011).

تستند تقنية النانو على خاصية وهي كلما صغر حجم الجسيمات النانوية زادت نسبة مساحة السطح الى الحجم وهذه الخاصية تمنحها سرعة في التفاعلات الكيميائية وخصائص فيزيائية متعلقة بقوانين الكم (Rafique *et al*., 2020). كما أوضح AL Dabbagh (2022)، إن التغييرات التي تحصل في خصائص المواد عند تحولها للمقياس النانوي هي مثل قلة الوزن وزيادة المقاومة الكهربائية وزيادة صلابة المعادن وتحول المواد المعتمة الى شفافة وتحول المواد من الحالة الصلبة الى السائلة في درجات الحرارة الاعتيادية. استغل العلماء هذه الخصائص في انتاج مواد وأجهزة وأدوات تخدم البشرية لاسيما في حقلي الطب الحياتي والصيدلة وتشير التوقعات ان التقنية النانوية في مجال الصيدلة والطب سوف تقوم بأحداث ثورة في مجال إيصال الدواء والتشخيص والتصوير والمجسات الحيوية (Matteucci *et al*., 2018).وبسبب الاتساع والشمولية والتطور السريع الحاصل في هذا المجال عدت التقنيات النانوية اليوم من اكثر التقنيات المهمة بين العلوم الحديثة مما دفع الدول والمؤسسات البحثية للتنافس واستثمار المال والجهد في أبحاث تطوير التقنية النانوية

مما يسهم في حل كثير من المشاكل الخطيرة التي يعاني منها البشر مثل انتاج مواد جديدة وعلاج الامراض المستعصية وكفاءة الطاقة (Abad-Segura *et al*., 2020).



شكل (1) اهم تطبيقات التقنية النانوية (Koul *et al*., 2021)

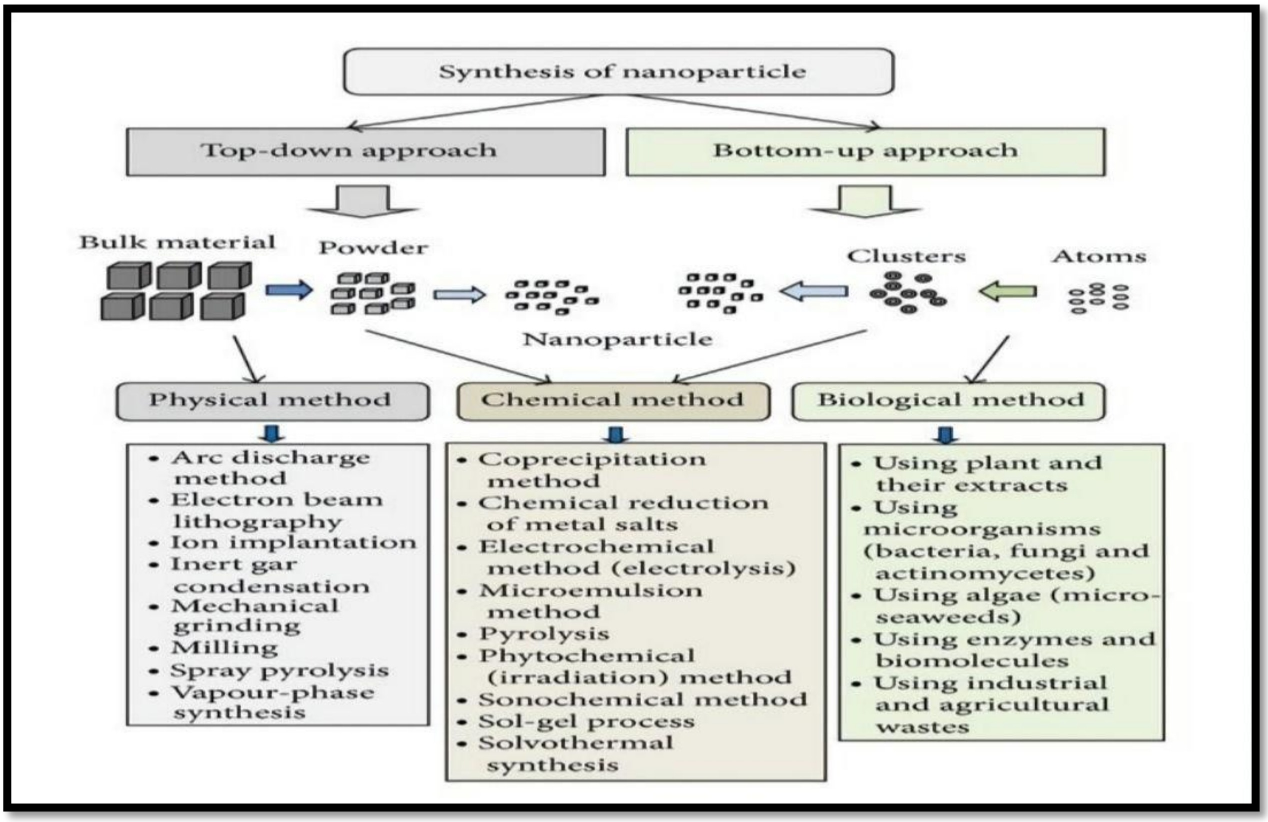
إن أحد الأهداف الرئيسة لتقنية النانو هو انتاج الجسيمات النانوية بإستعمال أساليب ومناهج بديلة مستدامة وصديقة للبيئة مقارنة بالمناهج المستخدمة سابقا والتي تتميز بشكل عام بالكلفة العالية وتنطوي على استعمال مواد كيميائية خطرة (Shah *et al*., 2015). هناك مفهومان يستخدمه العلماء لتخليق الجسيمات النانوية موضحان في شكل (2)

المفهوم الأول: من اعلى الى أسفل Top-Down

في هذا النوع من التخليق الجسيمات النانوية يتم انتاجها عن طريق العمليات الفيزيائية كالإشعاع والليزر والطحن والقطع إذ تتحول المادة من الحجم الكبير الى حجم أصغر وصولا للحجم النانوي (Purohit *et al*., 2019).

المفهوم الثاني من الأسفل الى الأعلى Bottom-Up

يشمل هذا المفهوم انتاج الجسيمات النانوية عن طريق العمليات الكيميائية والبايلوجية عبر ضم الذرات والجزيئات الأصغر وبناء هياكل نانوية ثم يتم تجميعها لإنتاج الجسم النهائي (Subramani *et al.*, 2019).

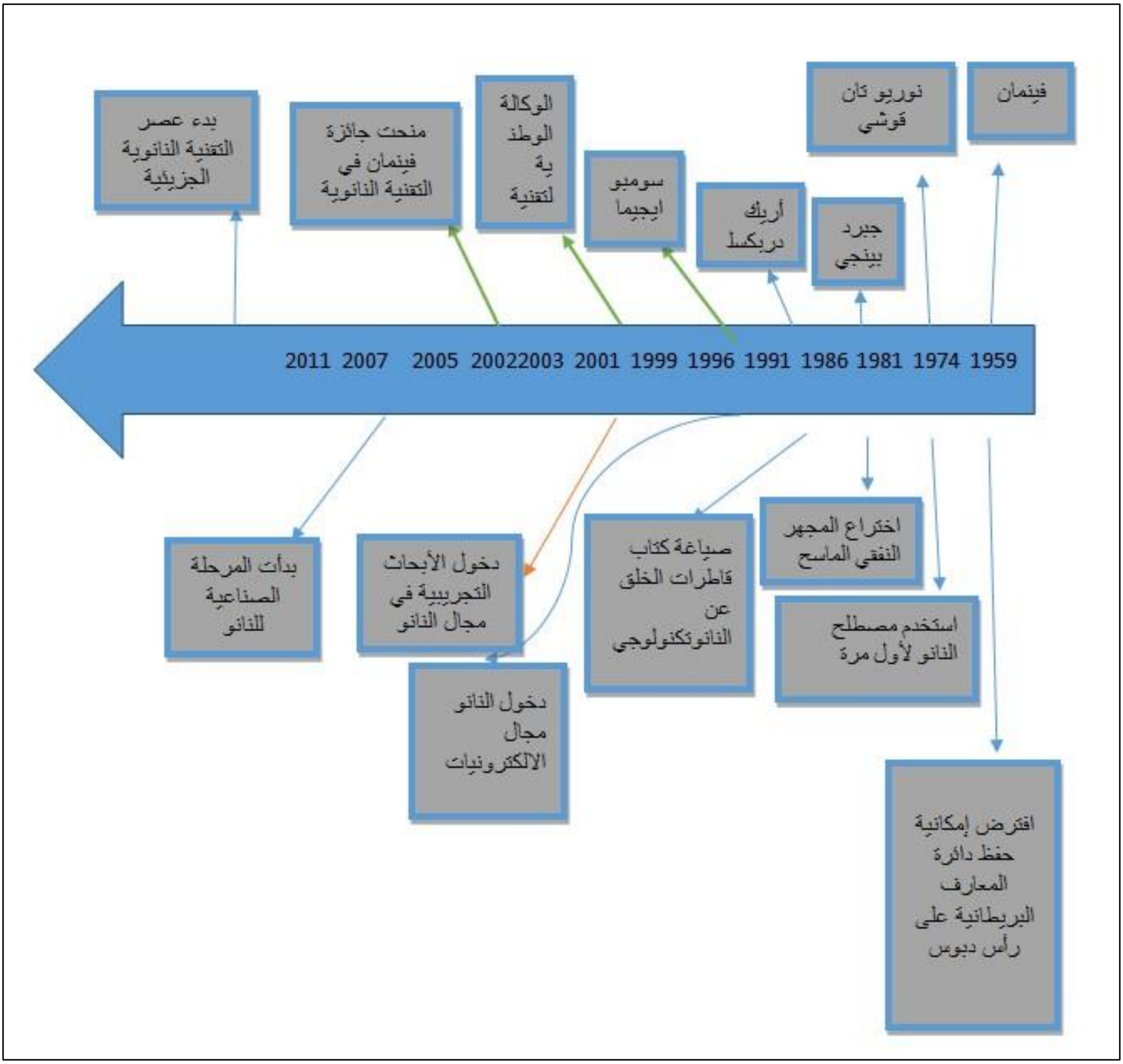


شكل (2) مناهج وطرق تصنيع الجسيمات النانوية (Parveen *et al.*, 2022)

2-2- تاريخ التقنية النانوية

أستعمل البشر تقنية النانو منذ الاف السنين من غيران يدرك حقيقة هذه التقنية وخصائصها وتحضيرها فأستخدموا الاحجام الذرية للمواد النانوية في كثير من الصناعات مثل المطاط والزجاج وغيرها (Joy, 2020) كما استخدمت المواد النانوية المعدنية منذ القرن العاشر الميلادي وهذا ما عثر عليه في الاواني الزجاجية المصبوغة والخزفية المطلية

بنانو الذهب والفضة (Patkar *et al.*, 2019). وللوقوف على اهم الاحداث التاريخية التي توالت في تطور علم النانو ندرج شكل (3) والذي يمثل المراحل التي مرت بها تقنية النانو.



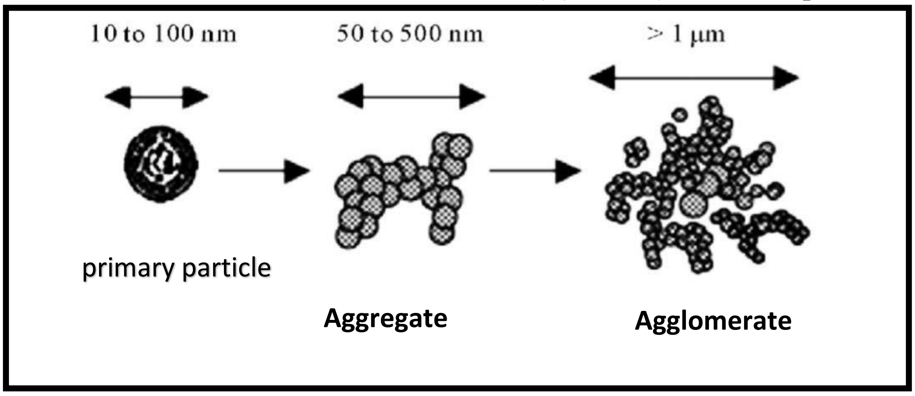
شكل (3) تطور التقنية النانوية عبر التاريخ (Horikoshi and Serpone, 2013)

2-3- الجسيمات النانوية Nanoparticles

الجسيمات النانوية مجموعة من الجزيئات او الذرات مرتبطة ببعضها البعض في حجم (قطر) في حدود 1-100 نانومتر في اتجاه واحد على الأقل بتعبير ادق يطلق على الجسيم المعدني metal particle الذي يبلغ قطره 2 نانومتر يسمى الكتلة النانوية nanocluster ويطلق مصطلح بلورة نانوية nanocrystal بالنسبة لقطر أكبر من 2 نانومتر، تتغير خصائص الجسيمات النانوية Nanoparticles البصرية والكهربائية والالكترونية كلما كان الحجم أصغر (Ganguly *et al.*, 2013)

واثبت Rao واخرون ، (2002) الى احتواء سطح الجسيمات النانوية على الكترونات محصورة ضمن مجال بسبب صغر حجمها مما يؤدي الى تغير في خصائصها الفيزيائية والكيميائية الشاملة. وأشار Kushwaha واخرون ،(2015) ان الجسيمات النانوية هي اللبنة الأساسية لتقنية النانو وعرفها على انها جسيمات لها ابعاد بقياس 100 نانومتر او اقل ولها خصائص تختلف عن المادة ذات الحجم الكبير على نطاق واسع. وذكر Qu واخرون ،(2018) ان الجسيمات النانوية تسلك سلوك مختلفا تماما عن المواد الحرة bulk materials بسبب كبر مساحتها السطحية نسبة الى الحجم مما يضعف ترابطها ويزيد فعاليتها.

هناك عاملان لهما تأثير على الخواص المختلفة للجسيمات النانوية وهما عاملا التكتلات aggregates وعامل التجمعات agglomerates إذ يؤثر كلا العاملين على المقاومة الميكانيكية والكثافة والخواص الكهربائية والحرارية والفعالية الكيميائية (Al-Gebory and Menquc, 2018) شكل (4).



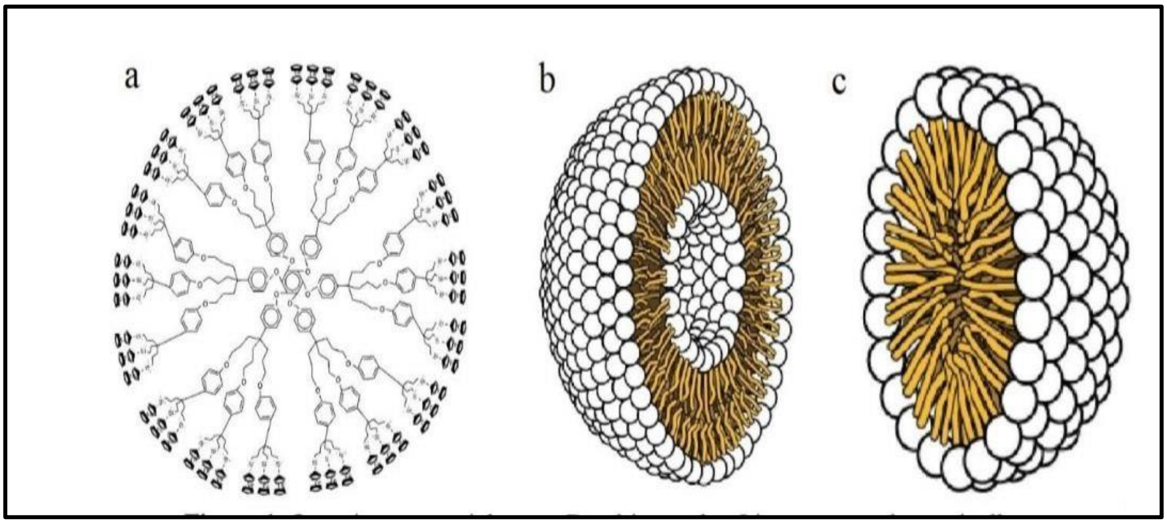
شكل (4) الدقائق الرئيسية والتجمعات والتكتلات (الساعدي، 2021)

2-3-1- تصنيف الجسيمات النانوية

تصنف الجسيمات النانوية التي يتم تصنيعها بطرق مختلفة الفيزيائية والكيميائية والحيوية والمستخدمة في المجالات البحثية والتجارية بصورة عامة الى عضوية وغير العضوية والكاربون (Ealia and Saravanakumar, 2017) على النحو الاتي:

1- الجسيمات النانوية العضوية Organic nanoparticles

يعتبر هذا النوع من أكثر أنواع الجسيمات النانوية شيوعا وتشمل الشجيرات dendrimers والمذيلات micelles والجسيمات الشحمية شكل (4) وتتميز بقابليتها على التحلل وعدم سميتها وحساسيتها للضوء والحرارة ونتيجة لهذه الخصائص الفريدة اصبحت ذات استعمال واسع في المجال الطبي الحيوي إذ استعملت كعامل توصيل للأدوية كما يمكن حقنها في أي جزء من الجسم كعامل استهداف (Abdellatif *et al.*, 2021).



شكل (5) أنواع الجسيمات العضوية حيث a الشجيرات وb المذيلات وc الجسيمات الشحمية (Ealia and Saravanakumar, 2017).

2- الجسيمات النانوية غير العضوية Inorganic nanoparticles

هي الجسيمات النانوية التي لا تحتوي على الكاربون وتشمل المعادن واكاسيد المعادن، فالمعادن المستخدمة بشكل شائع لتخليق الجسيمات النانوية هي الالمنيوم (Al) والكادميوم (Cd) والذهب (Au) والفضة (Ag) والنحاس (Cu) والكوبلت (Co) والحديد (Fe) والرصاص (Pb)، تتميز الجسيمات النانوية الغير عضوية بخصائص مميزة أهمها

مساحة السطح العالية نسبة الى الحجم وشحنة السطح والهياكل البلورية والاشكال المختلفة مثل الكروية والاسطوانية (Peller *et al*., 2018). تفضل الجسيمات النانوية الغير عضوية على الجسيمات النانوية العضوية كمنصة يمكن استعمالها في التصوير والعلاج كونها سهلة التعديل وقدرتها العالية في توصيل الادوية واستقرارها (Paul and Sharma, 2020). اما اكاسيد المعادن تشمل اكاسيد الفلز التي يتم تصنيعها لتعديل خصائص الجسيمات النانوية ذات الأساس المعدني مثل أوكسيد الحديد (Fe_2O_3) واوكسيد الالمنيوم (Al_2O_3) واوكسيد الزنك (ZnO) (Mohammed and Wazir, 2022).

3- الكاربون الأساس Carbon based

وتتضمن الجسيمات النانوية المصنوعة بالكامل من الكاربون ويمكن تصنيفها الى الفوليرين Fullerene (C_{60}) والجرافين وانابيب الكاربون النانوية (CNT) والياف الكاربون النانوية واسود الكاربون carbon black والكاربون المنشط carbon activated (Ijaz *et al*., 2020).

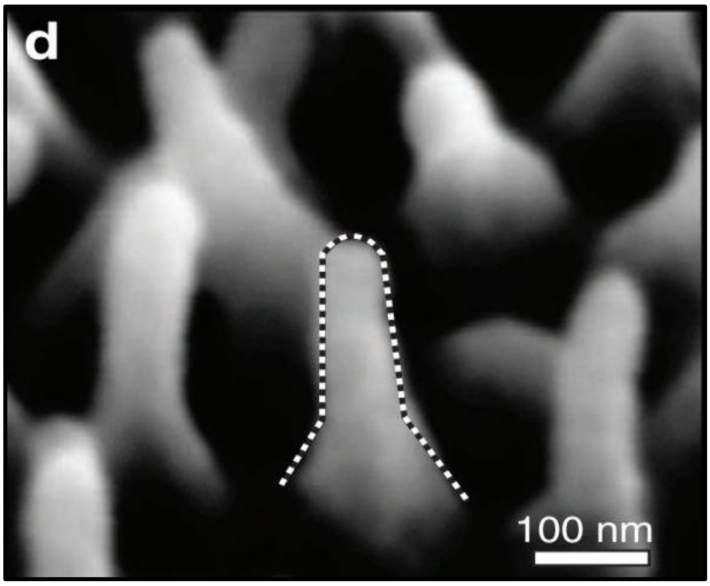
2-3-2- الجسيمات النانوية في النظام البيئي

توجد الجسيمات النانوية في جميع انحاء الغلاف الجوي فهي توجد في الهواء والمياه والتربة وفي تركيب اجسام الكائنات الحية على المستوى الجزيئي والكلي .تتشكل الجسيمات النانوية في الطبيعة بفعل تأثير العمليات الفيزيائية والكيميائية والحيوية التي تحدث بشكل طبيعي مثل التعرية والتجوية والثورات البركانية وحرائق الغابات التي تنتج كميات هائلة من الجسيمات النانوية في الغلاف الجوي وتحملها الى الاف الاميال وتعتبر من ملوثات الهواء،من هذه المواد الاكاسيد Oxides والهيدروكسيدات مثل هيدروكسيدات الحديد والالمنيوم والمعادن الطينية مثل سيلكات البوتاسيوم والمغنسيوم والسيليكا (Neyaz *et al*., 2014; Bessa *et al*., 2020).

ثبت ان الأنشطة الحيوية وبإستعمال عمليات من اسفل الى اعلى تجمع مجموعة من ذرات الكاربون لتكون مواد في النظم الحية ذات محتوى نانوي مثل جزيئات البناء ودقائق الهيومك Humic substances والانزيمات والتي تلعب دور مهم في العمليات الكيميائية الحيوية المختلفة كعمليات الشفاء واستقلاب النمو growth metabolism (Barry and Sadler, 2013; Xu *et al* 2021)، كذلك تعتبر مكونات الدم هي ضمن المقياس النانوي فالحديد والبروتينات مثل الهيموغلوبين الذي يحمل الاوكسجين عبرمجرى الدم يبلغ قطره تقريبا 5نانومتر او خمسة أجزاء من البليون من المتر (Mulvihill *et al*., 2020).

اما في عالم الحيوان تحتوي بعض أجزاء الحيوانات على بنية نانوية مثال على ذلك الاجنحة الشفافة لفراشة الجناح الزجاجي *Greta oto* حيث تمتلك هذا النوع من الفراشات جناح شفاف ذات سلوك مضاد للانعكاس بكل الاتجاهات مما يعطي تمويه بالشفافية وهو ناتج عن عوارض نانوية صغيرة تسمى بالحلمات النانوية nanopilli تغطي هذه الحلمات المناطق الشفافة من الاجنحة تم الكشف عنها بإستعمال المجهر الالكتروني النافذ (TEM) شكل (6) حيث تكون هذه الاعمدة مرتبة بشكل عشوائي مما يقلل الانعكاس حتى لزوايا الرؤية العالية تجعل من الصعب على الطيور المفترسة اقتناصها (Siddique *et al.,* 2015) .مثال اخر هو الصدفة في الرخويات والذي يمثل مركب نانوي حيوي حيث تتكون الصدفة من تناوب صفائح معدنية من كاربونات الكالسيوم مفصولة بطبقات رقيقة من الجزيئات الحيوية فعلى الرغم من ان الصدفة تتكون من مواد ضعيفة الا ان هذا التصميم النانوي الفريد يعطيها قوة ومتانة ومقاومة للصدمات (Yadav *et al*., 2021) .

وهناك امثلة أخرى كثيرة مثل شبكة العنكبوت والعث هذه الأمثلة ليست فقط لفهم الخصائص المذهلة للنظم الحيوية تعطي الهاما للعلماء في التصميم والهندسة ومن مواد جديدة ذات خصائص متقدمة وأيضا في تصميم الات النانو الجزيئية (Krajina *et a*l., 2018).



شكل (6) التركيب النانوي المضاد للانعكاس لجناح الفراشة الزجاجي (Siddique *et al.,* 2015).

2-4- الذهب

الذهب عنصر كيميائي برمز Au وهو من العناصر الموجودة بصورة طبيعية رغم العدد الذري المرتفع له الذي يبلغ 79 ،ويعد فلز نبيل لا يتأثر بأغلب الاحماض ماعدا الماء الملكي والتي تبدي مقاومة عالية للأكسدة والتآكل حتى في درجات الحرارة العالية وهذه المميزات تجعله معدن ثمين ذو خصائص فيزيائية وكيميائية مميزة تختلف عن معظم المعادن الأخرى (Louis and Pluchery, 2017; Aldrich *et al*., 2015; Keefe and Rome, 2007).

استخدم الذهب للأغراض العلاجية والجمالية في تشكيل المجوهرات منذ العصور القديمة لكونه غير متفاعل ولا يتحول في الغلاف الجوي ويحافظ على لونه الجذاب (Yang *et al*., 2015) حيث استخدم الرومان الذهب في العصور الوسطى وكان كأس Lycurgus مثال على ذلك حيث استخدم سبائك الذهب والفضة النانوية في طلي الزجاج مما يظهر لونا مختلفا عند سقوط الضوء عليه، لم يكن يعرف سبب هذا التأثير والاختلاف في الألوان الى ان اثبت مايكل فارادي ولأول مرة ان اللون كان بسبب حجم دقائق جزيئات الذهب والفضة (Mulvaney, 2015).

واستعمل الذهب الغروي colloidal gold من قبل الفنانين لعدة قرون بسبب الألوان النابضة بالحياة نتيجة لتفاعلها مع الضوء المرئي وتم البحث عن هذه الخصائص الفريدة واستخدامها في تطبيقات التكنولوجيا العالية مثل المجسات الحسية والخلايا الضوئية والعوامل العلاجية وفي الموصلات الالكترونية (Aldrich, 2015).

يوفر الذهب كمعدن حر فرص قليلة للانتفاع به في الابحاث بسبب خموله الكيميائي ونتيجة للنمو السريع لتقنية النانو في أواخر القرن العشرين أدى الى استخدام الذهب بالمقياس النانوي بسبب خصائصه الفيزيائية والكيميائية والبصرية المثيرة للاهتمام منها الأستقرار الكيميائي والسمية المنخفضة والبساطة في التخليق مما جعل جسيمات الذهب النانوية واحدة من أكثر المواضيع التي تم دراستها ودخولها في جميع التخصصات العلمية والتطبيقات الطبية والحيوية (Kurapov and Bakhtenko, 2018).

واثبت Azad واخرون ،(2020) ان جسيمات الذهب النانوية ساهمت في حل الكثير من المشاكل الأساسية وخاصة في مجال الطب والصيدلة حيث أصبحت منصة لتوصيل

الدواء الموجه وفي العلاج الاشعاعي المعزز بنانو الذهب وكذلك مضاد للفطريات والالتهابات والاكسدة ومضاد للسرطان.

2-5- التخليق الحيوي لجسيمات الذهب النانوية

اكتسب تصنيع الجسيمات النانوية اهتماما كبيرا بين الباحثين حيث تمكن العلماء من استخدامها في مختلف المجالات بسبب عدة عوامل بما في ذلك الشكل والحجم ورنين البلازمون السطحي(SPR) (Nagnare and Patil, 2020) واشار Safaepour واخرون ، (2009) الى استخدام الجسيمات النانوية في مجال علاج السرطان والعقاقير والاقمشة والكيمياء ومعالجة المياه والتحفيز الضوئي، ولأهمية واتساع تطبيقات الجسيمات النانوية المعدنية قد تصل المبيعات العالمية لهذه المواد الى 50 مليار دولار بحلول عام 2026 (Ovais *et al*., 2018).

استخدمت الطرق الفيزيائية والكيميائية التقليدية في تصنيع الجسيمات النانوية وعلى الرغم من ان هذه الطرق تستغرق وقت قياسي علاوة على ذلك ان الجسيمات المصنعة بهذه الطرق تمتاز بنقاوتها وتكون موحدة بالشكل والحجم (Speed *et al*., 2015) الا ان هذه الطرق تكون مكلفة وصعبة ومعقدة نوعا ما وتستخدم فيها حرارة وطاقة عالية إضافة الى استخدام كواشف وعوامل تثبيت ومواد كيميائية سامة كالامينات الاروماتية Aromatic amines والثالويات thioles الملوثة للبيئة والمسرطنة مما يقيد استخدامها في التطبيقات الطبية والحيوية (Lee *et al*., 2020; Okamoto *et al*., 2019).

احتلت جسيمات الذهب النانوية أهمية كبيرة في مجال الطب والصيدلة واستعملت لأغراض التشخيص والعلاج لكن استخدام الطرق الكيميائية والفيزيائية التي تتضمن استخدام مواد كيميائية سامة والتي تلتصق بذرات الذهب كجزيئات تغليف تجعلها غير مرغوبة في مجال التطبيقات الصيدلانية مما دعا الى اكتشاف طرق جديدة موثوقة لتطبيقها في تلك المجالات المهمة (Castillo-Henriquez *et al*., 2020;Singh *et al*., 2018b;).فكان التخليق الحيوي لجسيمات الذهب النانوية أهمية كبير وبديلا واعدا بأعتباره عملية خضراء وصديقة للبيئة وفعالة وقليلة التكلفة وينطوي على استخدام الجزيئات الحيوية كعوامل اختزال وتغليف التي تلعب دورا في خصائص جسيمات الذهب النانوية من حيث

الشكل والحجم ولكونها مواد طبيعية غير سامة للخلايا البشرية يمكن استخدام جسيمات الذهب النانوية للأغراض الطبية والعلاجية (Bahrulolum *et al*., 2021; Hammami and Alabdallah , 2021).

تحولت عملية تصنيع الجسيمات النانوية من العمليات الفيزيائية والكيميائية الى العمليات الحيوية وذلك بإستعمال المستخلصات النباتية والكائنات الحية الدقيقة microorganism كالبكتريا والبكتريا الخيطية كما في جدول (2-1) والخمائر والفطريات كما في جدول (2-2) والطحالب كما في جدول (2-3) حيث تقوم هذه الكائنات الدقيقة في معالجة المواد السامة مثل النترات والكلوريدات من خلال اختزالها تحت ظروف الاجهاد stress condition وذلك من خلال افرازها مركبات حيوية تقوم بعملية الاختزال والتي تشكل أساس التخليق الحيوي للجسيمات النانوية (Moraga *et al*., 2017).في هذه العملية يتم استخدام المستخلص الخلوي للكائنات الحية مثل البكتريا والطحالب والفطريات والفطريات الشعاعية كوسط للتفاعل إضافة على احتواءه على عوامل التغليف وبذلك أصبحت المستخلصات المائية مناسبة لتخليق الجسيمات النانوية بسبب طبيعتها الغير السامة وغير المتطايرة فالمستخلص الحيوي هو عبارة عن خليط من أنواع مختلفة من الجزيئات الحيوية مثل البروتينات والكاربوهيدرات والفيتامينات والبوليمرات والمواد الخافضة للتوتر السطحي التي توفر للجسيمات النانوية المصنعة استقرارا عاليا وتشتيتا موحدا (Qureshi *et al*., 2021;Srinath *et al*., 2018).

جدول (2-1) بعض أنواع البكتريا المنتجة للجسيمات النانوية

البكتريا المستخدمة	النوع	شكل الجسيمات	حجم الجسيمات (nm)	المصدر
Escherichia coli	CdTe	Round	3-2	Bao *et al*., 2010
Rhodopseudomonas sps	Ag	Spherical	10-6	Manisha *et al*., 2014
Deinococuus radiodurans	Au	Spherical,irregular,triangular	43.75	Li *et al*., 2016
Pseudomonas putida	Au	Spherical	50-10	Hosseini *et al*., 2016
Actinobacter	Au	Spherical	13.2	Golinska *et al*., 2016
Klebsiella pneumonia	Au	Spherical	15-10	Prema *et al*., 2016
Bacillus cereus	Au	Hexagonal, spherical	50-40	Pourali *et al*., 2017
Rhodobacter sphaeoides	Au	Spherical	10-3	Italiano *et al*., 2018
Bacillus endophyticus	Ag	Spherical	5.1	Gan *et al*., 2018
Shewanella loihica	Cu	Spherical	16-10	Lv *et al*., 2018
Streptomyces spp	Ag	Spherical	50-20	AL Dhabi *et al*., 2018
Bacillus brevis	Ag	Spherical	68-41	Saravanan *et al*., 2018
Streptomyces spp	CuO	Spherical	80-78	Hassan *et al*., 2019
Bacillus marisflav	Au	Different	30-12	Nadaf and Kanase, 2019
Bacillus siamensis	Ag	Spherical	50-25	Ibrahim *et al*., 2019
Enterococcus facalis	Zno	Spherical	96-16	Kelmani, 2020
Escherichia coli	Ag	Spherical	19-14	Hashim, 2020
Staphylococcus lentus	Ag	Spherical	93-20	Hateet and Ibrahim,

				2021
Lactobacillus gasseri	Ag	Spherical	58.5	Jabbar, Hussein, 2021
Rothia endophytica	Ag	spherical	50-20	Elbahnasawy *et al.*, 2021
Microbacterium spp	Ag	spherical	44-41	Dewan and Hateet, 2022

جدول (2-2) بعض أنواع الفطريات المنتجة للجسيمات النانوية

المصدر الفطر المستخدم	**النوع**	**شكل الجسيمات**	**حجم الجسيمات (nm)**	
Pencillium verrucosum	Ag	Spherical	24-3	kamalakannan *et al.*, 2014
Pencillium notatum	Ag	Spherical	40-30	Desai &Datta, 2015
Magnusiomyces ingens	Au	Spherical,triangular and hexagonal	80-10	Zhang *et al.*, 2016
Aspergillus spp	Au	Spherical	29-4	Shen *et al.*, 2017
Pleurotus ostreatus	Au	Spherical	30-10	El Domany *et al.*, 2018
Chaetomium globosum	Au, Ag	Spherical	40-6	Singh *et al.*, 2018a
Trichoderma harzianum	Au	Sperical	44-32	Tripathi *et al.*, 2018
Thermoascus thermophilus	Au	Different	10	Molnar *et al.*, 2018
Fusarium oxysporum	Au	Spherical	25-10	Pourali *et al.*, 2018
Trichoderma hamatum	Au	Spherical,pentagonal and hexagonal	30-5	Abdel-kareem and Zohri,2018
Fusarium oxysporum	Ag	Oval,spherical	37-21	Ahmed *et al.*, 2018
Aspergillus niger	Zno	Spherical	69-53	Kalpana *et al.*, 2018

Trametes trogii	Ag	Ellipsoida	65-5	Kobashigawa *et al*., 2019
Pencillium italicum	Ag	Cubic	100-32	Taha *et al*., 2019
Fusarium solani	Au	Needle,flower like	45-40	Clarance *et al*., 2020
Aspergillus flavus	Au	Triangular,polygona l	30	Iranmanesh *et al*., 2020
Penicillium chrysogenum	Ag	Spherical	48.2	Barabadi *et al*., 2022

جدول (2-3) بعض أنواع الطحالب المنتجة للجسيمات النانوية

مصدر الجسيمات	نوع الجسيمات	شكل الجسيمات	حجم الجسيمات (nm)	المصادر
Stoechospermum marginatum	Au	Spherical,hexagonal and triangle	93-18	Rajathi *et al*., 2012
Chiorococcum humicola	Ag	Spherical	16	Jena *et al*., 2013
Prasiola crispa	Au	Spherical	25-5	Sharma *et al*., 2014
Ulva fasciata	Au	Spherical	10	Kumara *et al*., 2014
Galaxaura elonata	Au	Triangles,hexagons,rod	77-4	Abdel-Raouf *et al*., 2017
Egregia spp	Au	Spherical	5	Colin *et al*., 2018

Halymenia dilatata	Au	Triangular,spherical	16	Vinosha *et al*., 2019
Dictyosphaerium spp	Au	Spherical	7.9-2.4	Amina *et al*., 2021
Nanofrustulum shiloi	Au	Spherical,triangular	55-5	Roychoudhury *et al*., 2021
Caulerpa setularioides	Ag	Spherical	48-4	Anjali *et al*., 2022
Sargassum horneri	Au	Spherical	21-2.74	Song *et al*., 2022

2-6- الية التخليق الحيوي لجسيمات الذهب النانوية

هناك الكثير من الدراسات التي تناولت الية التخليق الحيوي لجسيمات الذهب النانوية بإستعمال المستخلصات المائية الحيوية للكائنات الحية المختلفة كالطحالب والبكتريا والنباتات والفطريات لكن الية عملية التخليق الحيوي ليست مفهومة بشكل كامل (Sunderam *et al*., 2019).بصورة عامة يتم تخليق جسيمات الذهب النانوية أولا بأختزال ايونات الذهب Au^{+3} الى ذرات الذهب (Au°) والذي يرتفع تركيزها بسرعة الى مستوى التشبع مما يؤدي الى تصادمها وهي بداية خطوة التنوي nucleation أي تكوين النوى nuclei بعد ذلك تندمج وترتبط تلك النوى nuclei مما يؤدي الى تكوين الجسيمات النانوية شكل (6).(Sunderam *et al*., 2019; Nur, 2013).

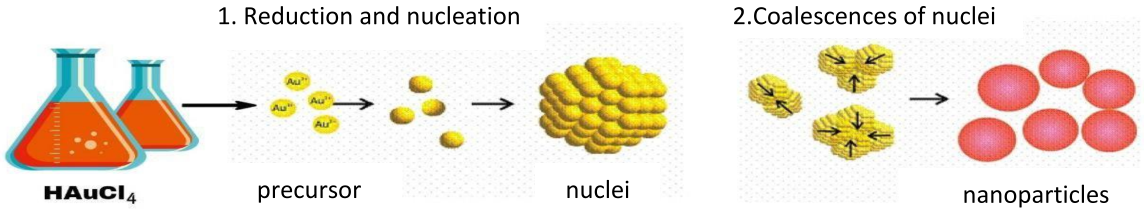
تفضل الفطريات اكثر من غيرها من الاحياء المجهرية في تخليق الجسيمات النانوية الذهبية لأنها تتحمل تراكيز معدنية عالية وقدرتها على ربط المعادن وامتصاصها وسهولة زراعتها ونموها السريع وكذلك افراز كميات كبيرة من الانزيمات خارج الخلية (Mughal *et al*., 2021)..يتم تخليق الجسيمات النانوية بطريقين اما داخل الخلايا intracellular او خارج الخلايا extracellular وتعد الطريقة خارج الخلايا اكثر استعمالا في الدراسات والبحوث لان الفطريات تفرز بروتينات الاكسدة والاختزال redox بوفرة خارج الخلايا التي تكون هي المسؤولة عن تحويل ايونات الذهب الذائبة الى الشكل النانوي البلوري غير الذائب

كون هذه الايونات تعتبر سامة للكائنات المجهرية فتعالجها الى مادة اقل سمية وهي الشكل غير الذائب البلوري النانوي (Qin *et al.*, 2020; Castro *et al.*, 2014) .

كما اشار Molnar واخرون (2018) بأن تخليق الجسيمات النانوية خارج الخلايا بواسطة الفطريات هو أكثر تفضيلا لأنها تتطلب طرق معالجة بسيطة downstream على العكس من التخليق داخل الخلايا التي تتطلب خطوات إضافية لفصل والحصول على الجسيمات النانوية المصنعة داخل الخلايا منها معالجة بالموجات فوق الصوتية او استعمال المنظفات detergent لتفكيك بروتينات الغشاء الخلوي والكاربوهيدرات السطحية في المحلول المائي بينما في التخليق خارج الخلايا يتم فصل الافرازات الفطرية ومن ثم استخدامها.

تتكون جزيئات الذهب النانوية خارج الخلايا بتفاعل الكتروستاتيكي بين الانزيمات الموجودة في جدران الخلايا والأيونات الموجبة لمحلول ملح الذهب $HAuCl_4.3H_2O$ (Vaseghi *et al.*, 2018;Castro *et al.*, 2014)،على سبيل المثال أوضح Niranjan واخرون، (2015) ان الية تخليق جسيمات الذهب النانوية بواسطة الفطر *Aspergillus alternaria* هي ان انزيم الكلوتاثيون Glutathion reductase المسؤول عن عملية الاختزال بوجود NADPH كعامل مساعد للانزيم ففي وجود الكلوتاثيون تبدء ايونات الذهب بتكوين الفايتوكيلانين Phytochelatin ثم يختزل ايونات الذهب Au^{+3} الى AuNPs .

وأشارت دراسات أخرى منها Ovais واخرون ،(2018) و Javed واخرون ،(2020) على قدرة الخلايا الفطرية على انتاج مجموعة من البروتينات الحاوية على التربتوفان Treptophan والتايروسين Tyrosin لها القدرة في تثبيت جسيمات الذهب النانوية حيث يمكن لAuNPs ان تتفاعل مع البروتينات عبر مجموعة الأمين الحرة (NH_3)او مجموعة الكاربوكسيل (COO^-) السالبة وتشكل غلاف على الجسيمات النانوية لمنعها من التكتل وتساهم في استقرارها شكل (7).



شكل (7) الية التصنيع الحيوي لجسيمات الذهب النانوية (Sunderam *et al*., 2019;Nur, 2013)

2-7- تطبيقات جسيمات الذهب النانوية

تتميز جسيمات الذهب النانوية بخصائص بصرية وكهربائية مميزة والقدرة على تكوين معقدات قوية مع الجزيئات الحيوية وهذ ما ساعد في سرعة نمو تطبيقاتها وفي مجالات كثيرة مهمة (Combes, 2021) منها:

1- الالكترونيات Electronics

استخدمت جسيمات الذهب النانوية لتصنيع المكونات الالكترونية في تقنيات الطباعة ثلاثية الابعاد باعتبارها طرق صديقة للبيئة وخالية من الملوثات حيث تعطي جسيمات الذهب النانوية تحسينات في كفاءة الأجهزة الالكترونية عند دمجها مع الانابيب الكربونية او البلاستيكية ينتج عنها مقاومة منخفضة وتوصيلية عالية للترانزستورات ذات الاغشية الرقيقة Thin-Film transistors (TFTs) (Cummins *et al*., 2020).

2- العلاج الضوئي Photodynamic therapy

تم اثبات فعالية جسيمات الذهب النانوية في قتل الخلايا السرطانية بطريقة تحويل الضوء الممتص الى حرارة وهذه الخاصية تفيد في تطوير علاج السرطان غير الجراحي من دون التسبب في أي ضرر للخلايا السليمة (Kalashgrani and Javanmardi, 2022). يتم القضاء على الخلايا السرطانية من خلال تسليط الاشعة تحت الحمراء بطول موجي من 700 الى 800 نانومتر على الخلايا السرطانية المملوءة بجسيمات الذهب النانوية مما يؤدي الى امتصاصها وتحويلها الى حرارة تؤدي الى رفع درجة حرارة الخلايا السرطانية وبالتالي موتها (Gerosa *et al*., 2020). ان الاشعة تحت الحمراء لها القابلية على اختراق الانسجة الحيوية مما يمكنها ان تصل الى الجسيمات الذهبية وتحويلها الى عوامل تسخين خلية بحجم النانو (Zhang *et al*., 2017).

3- توصيل العامل العلاجي Therapeutic agent delivery

تسمح نسبة المساحة السطحية الكبيرة الى الحجم لجسيمات الذهب النانوية بتغطية سطحها بمئات الجزيئات بما في ذلك عوامل الاستهداف العلاجية، العلاجات والبوليمرات المضادة للتلوث anti-fouling polymers (Du *et al*., 2018).و تمكن الخصائص الكيميائية السطحية لجسيمات الذهب النانوية من الاقتران بعوامل الاستهداف الجزيئي مثل الاجسام المضادة مما يسمح لهم باستهداف انسجة الورم وتسبب موتها المبرمج بعد ارتباطها بالخلايا السرطانية عبر التعرف على مستضدات الخلايا السرطانية (Subhan *et al*., 2021; Maghsoudnia *et al*., 2020).

4- المستشعرات Sensors

بسبب الخصائص الفيزيائية المميزة لجسيمات الذهب النانوية دخلت كمكون في أجهزة الاستشعار المتنوعة على سبيل المثال يمكن لجهاز الاستشعار اللوني المعتمد على AuNPs تحديد مدى صلاحية الأطعمة للاستهلاك البشري، واستخدمت أيضا جسيمات الذهب النانوية في أجهزة التحليل الطيفي كركائز في قياس الطاقات الاهتزازية للروابط الكيميائية وتستغل هذه الخاصية أيضا في الكشف عن البروتينات والملوثات والجزيئات الأخرى الغير معروفة وغير مثبتة بملصق molecule label free (Rastogi *et al*., 2021).

5- التصوير والتشخيص Imaging and Diagnosis

استغلت خاصية تشتيت الضوء التي تمتلكها جسيمات الذهب النانوية التي تحوله الى مجموعة من الألوان في تطبيقات التصوير الحيوي إذ تساعد كثافة جسيمات الذهب النانوية وتناثر الألوان المثيرة تحت المجهر المظلم في استخدامها كمجسات للمجهر الالكتروني النافذ (Turasan *et al.*, 2019) واستخدمت AuNPs في تشخيص امراض القلب والسرطان والعوامل المعدية من خلال الكشف عن المؤشرات الحيوية وفي القياسات المناعية حيث تم تفعيل جسيمات الذهب النانوية بالأجسام المضادة لهرمونات الحمل المميزة anti b-HCG للكشف عن هرمونات b-HCG وهي هرمونات الحمل المميزة (Pandey and Dahiya, 2016).

6- المحفزات Catalystes

تستعمل جزيئات الذهب النانوية كمحفزات لتسريع بعض التفاعلات الكيميائية المهمة مثل تفاعلات الاكسدة الانتقائية او تساهم في التقليل من التفاعل (Amina and Guo, 2020).

2-8- الفطريات النباتية الداخلية Endophytic fungi

هي احياء مجهرية قادرة على العيش في انسجة النباتات المضيفة من دون ان تسبب أي اعراض مرضية (Lata *et al.*, 2018) والفطريات الداخلية تستعمر (تستوطن) في الانسجة الداخلية للنباتات المضيفة تحت طبقة البشرة من غير ان تظهر تأثيرات سلبية عليها (Terna *et al.*, 2022; Ali *et al.*, 2018)، يوجد تنوع هائل للفطريات الداخلية في المجتمعات النباتية إذ يمكنها ان تنمو في الأوراق والسيقان دون ان تسبب امراض (Hateet, 2020)،وأوضح Chander، (2017) ان الغالبية العظمى من الأنواع النباتية ان لم يكن جميعها في النظم البيئية الطبيعية تأوي فطريات نباتية داخلية وانه تم العثور عليها في كل أنواع النباتات التي تم اختبارها وقيمت اعدادها الى اكثر من مليون فطر داخلي نباتي في الطبيعة ، ويعتقد ان اكثر من 105 مليون من الفطريات الداخلية تعيش في 270000 نوع

من النباتات الوعائية لكن عدد الأنواع الموصوفة هو فقط في حدود 70000-100000 نوع .

تمكنت الفطريات الداخلية من تأسيس علاقة تكافلية مع النباتات المضيفة حيث يحصل الفطر على العناصر الغذائية والحماية من النبات المضيف بالمقابل يفرز الفطر نواتج ايضية تتلائم مع المضيف النباتي وتساعدهما على تحمل ظروف الاجهاد الاحيائية وللأحيائية في النظم البيئية (Baron and Rigobelo, 2022).على سبيل المثال الفطر الداخلي *Curvularia protubetata* الذي يعيش داخل انسجة نبات Lanuginosum وهو نبات ارضي يعيش في المناطق الاستوائية الحارة فعند معيشة الفطر والنبات بشكل مستقل فلا يمكنهم تحمل درجات حرارة اعلى من 40 م° الا ان المعيشة التكافلية للفطر والنبات تمكنهم من تحمل حرارة تصل الى 65 م° (Dastogeer *et al.*, 2020) .ومثال اخر الفطر الداخلي *Fusarium culmarum* الذي يستوطن جميع انسجة نبات Lymus mollis عند ارتفاع مستوى الملوحة في موطنهم الأصلي فأن كلا الفطر والنبات يتحملون مستوى ملوحة البحر التي قد تصل الى 300-500 ملي مولاري من كلوريد الصوديوم اما عند نموها بشكل مستقل وغير تكافلي فأن النبات لا ينمو في الملوحة كما ان الفطر يتأخر في نموه (Das and Varma, 2009).

اهتم الكثير من العلماء بدراسة الفطريات الداخلية للنبات كمصدر للأيوض الثانوية إذ تعتبر هذه الأيوض مركبات جديدة ذات نشاط حيويا مهم بعد ان تم اكتشاف مركب Paclitaxel من الفطر الداخلي *Taxomyces andreanae* (Aly *et al.*, 2010) ،حيث تم اكتشاف مركبات ذات نشاط مضاد للبكتيريا ومبيدة للحشرات ومضادة للسرطان ومركبات مشابهة للانسولين (Slama *et al.*, 2021;Hateet, 2017) كما أشار Adeleke and Babalola، (2021) ان الفطريات الداخلية تنتج مركبات تعزز حيوية النبات من تحمل الاجهاد وزيادة الكتلة الحية (زيادة النمو) وتقليل استهلاك المياه وذلك بإفراز مواد تساعد في كفاءة امتصاص العناصر الغذائية من قبل النبات إضافة الى افراز مواد هرمونية كالجبرلين والاوكسينات Gibberelline,Auxins اللذان يعززان نمو الجذر واستطالة الساق .كما بين الباحثين Fadiji and Babalola ، (2020)

إن الفطريات الداخلية تحمي العديد من النباتات المضيفة لها من مسببات الامراض الفطرية والبكتيرية والفايروسية في ضوء انتاجها للأيوض الثانوية مثل الفينولات التي تحفز

المقاومة الجهازية systemic resistance او في ضوء عدم قدرة المسببات المرضية من التنافس مع الفطريات الداخلية بالمسافة والمورد، إذ تعمل فطريات النباتات الداخلية على تحفيز نمو النبات المضيف عبر اليات مختلفة مثل تثبيت النتروجين وإذابة المعادن وإنتاج الهرمونات النباتية (Van *et al*., 2014) كما ان لها القدرة على التطعيم الطبيعي أي تعمل كمنشط مناعي (Hardoim *et al*., 2015).

وتشير الدراسات التي أجريت على الاحياء المجهرية الداخلية على مدار السنوات الماضية ان الفطريات الداخلية تعيش في بيئة فريدة مختلفة وقد يؤثرالتنوع الكبير للفطريات الداخلية على البيئة وعلى توزيع النباتات وعلى وظائف الأعضاء والكيمياء الحيوية للنبات المضيف وعلى الرغم من 100 عام من الأبحاث التي انتجت الاف المقالات والبحوث الا ان أهمية هذه الفطريات ودراستها تتميز بالضعف والقلة تاريخيا (Sharma *et al*., 2021).

2-8-1- الفطريات النباتية الداخلية مصدر للجسيمات النانوية

للفطريات النباتية الداخلية القدرة على انتاج كميات كبيرة من الانزيمات والبروتينات التي توفر حماية للنبات المضيف من ظروف الاجهاد ومن العوامل الممرضة وتمنع من النفإذ السريع لموارد النبات إضافة لمعيشة الفطريات النباتية الداخلية في بيئة خاصة هذه الخصائص تجعلها مناسبة لانتاج الجسيمات النانوية (Purohit *et al*., 2019). على الرغم من وجود العديد من الدراسات حول الفطريات النباتية الداخلية الا ان هناك مصادر قليلة نسبيا حول تخليق الجسيمات النانوية الذهبية بإستعمال الفطريات الداخلية (Uzma *et al*., 2018; Misra *et al*., 2021).

تم تخليق جسيمات الفضة النانوية بإستعمال الفطر *Trichoderma atroviride* المعزول من النسيج الداخلي لنبات *Chiliadenus montanus* وتم اختبار قابلية هذه الجسيمات النانوية ضد مختلف البكتريا السالبة والموجبة لصبغة جرام وكذلك الفطريات المسببة لبعض الامراض للانسان (Abdel-Azeem *et al*., 2020) ،كما أجريت دراسة أخرى من قبل إبراهيم ، (2021) تضمنت تخليق جسيمات الفضة النانوية من الفطريات *Aspergillus terreus* و *A.tubingensis* و *Cladosprium uredicola* المعزولة من أوراق نبات الدفلة ،الريحان والسدر بالترتيب وقد ثبت فعالية جسيمات الفضة النانوية التي تم

تخليقها من راشح هذه الفطريات على بعض أنواع البكتريا المرضية التي تم عزلها من المصابين بالحروق والتهاب المجاري البولية .

وفي دراسة قام بها Soltani واخرون (2022) أظهرت فعالية جسيمات الذهب النانوية المضادة للفطر *Rhizoctonia solani* المسببة لتصلب الانسجة selectia لنبات الأرز حيث تم استخدام الفطر *Phoma spp* كفطر داخلي معزول من الانسجة الوعائية لاشجار الخوخ *Prunus persica* في تخليق جسيمات الذهب النانوية خارج الخلية.

2-9- السرطان The cancer

السرطان هو انقسام غير مسيطر عليه لبعض الخلايا مما يسمح لها بالنمو أكثر من الخلايا الأخرى وتكوين كتلة غير طبيعية في انسجة الجسم المتزنة (Abbas and Rehman, 2018). ان مصطلح سرطان شائع للخلايا التي تنمو وتنتشر الى أجزاء أخرى من الجسم (Peart, 2017).

على الرغم من ان أحد الأسباب الرئيسية لحدوث السرطان هي طفرات تحدث للحامض النووي مع ذلك هناك عاملان رئيسان مسببان للسرطان أحدهما هو العامل الوراثي والصفات المنقولة وراثيا وتقدر نسبته من 5-10 % والعامل الاخر هو ناجم عن أسباب بيئية نتيجة التعرض الى مواد مسرطنة او مزيج من العاملين وتقدر نسبته 90-95% (Wu *et al*., 2018; Rao *et al*., 2017).

2-9-1- سرطان الثدي The breast cancer

سرطان الثدي هو المرض الغير متجانس الذي يتصف بالتمايز غير الطبيعي لخلايا النسيج الظهارية للثدي المكونة للورم الخبيث التي تحمل انحرافات تؤدي الى عدم التنظيم لمئات او الاف من الجينات (Testa *et al*., 2020; Rostamizadeh *et al*., 2013).

يعرف سرطان الثدي على انه سرطان انسجة الثدي ،ويقصد به السرطان الموجود في الثدي أو الذي انتشر فقط الى الغدد الليمفاوية الابطية (Tufail *et al*., 2022)، يتطور سرطان الثدي عادة في القنوات و يتطور في الفصصيات او أماكن أخرى شكل (8) (Feng *et al*., 2018). وهو المرض الأكثر شيوعا ويصيب كلا الجنسين والسبب الثاني للوفاة المرتبطة بالسرطان بين النساء في جميع انحاء العالم (Waks and Winer, 2019)،ان

السبب الرئيسي للوفاة من سرطان الثدي هو الانتشار Metastasis وهو هجرة الخلايا السرطانية الى أماكن بعيدة من الجسم (Riggio *et al.*, 2021).

يتصف سرطان الثدي بميزات نسيجية وجزيئية وهي تفعيل Activation مستقبل عامل نمو البشرة HER2)Human Epidermal growth factor Receptor) الذي يشفر بواسطة الجين ERBB2 وتنشيط مستقبلات هرمون الاستروجين والبروجسترون وطفرات في جين BRCA وعلى هذا الأساس يصنف سرطان الثدي على أساس الخصائص الجزيئية والنسيجة أي وفقا لوجود مستقبلات هرمون الاستروجين والبروجسترون وعوامل نمو البشرة HER2 الى خمسة أنواع فرعية من الأورام التي تشمل مستقبلات الهرمونية الإيجابية لسرطان الثدي وهي مستقبلات الاستروجين Endrogen receptor (ER) ومستقبلات البروجسترون Progestron receptor (PR) والقسم الثاني الأورام التي لاتعبر عن مستقبلات الاستروجين والبروجسترون وعامل نمو البشرة ER,PR,HER2 تسمى الثلاثية السالبة لسرطان الثدي (Dai *et al.*, 2016).

2-9-2- علاج سرطان الثدي Treatment of breast cancer

عرف سرطان الثدي منذ العصور القديمة حيث قدمت الحضارات السابقة والتي تعود في الفترة حوالي 3500 قبل الميلاد اوصافا لسرطان الثدي واستخدموا علاجات متعددة كالأفيون ومختلف الزيوت النباتية لغرض العلاج او التخفيف من اعراض المرض وتوالت المحاولات في إيجاد حلول لهذا المرض الى ان تطور علاج سرطان الثدي وذلك بإستعمال الجراحة في القرن الثامن عشر لاستئصال الورم الخبيث (Lukong, 2017). استمر العلماء والباحثين خلال السنين الخمسون الماضية في التقصي عن طرق وعلاجات فعالة ساهمت في إطالة عمر المريض لكن دون علاج شافي تماما خصوصا في حالة انتشار الورم الى أجزاء أخرى كالدماغ والكبد والعظام (Chen *et al.*, 2017) من العلاجات الشائعة المستخدمة هي:

1- **العلاج الجراحي**: يفضل استخدام خيار استئصال الورم في حالة المرضى الذين يعانون من سرطان الثدي الاولي أي المشخص في وقت مبكر (Xie *et al.*, 2017) لكن يمكن للورم من العودة مرة أخرى بعد سنوات نتيجة لبقاء خلية او عدة خلايا سرطانية تسبب عودة الورم من جديد، كما ان استئصال الورم يعتبر كمسكن لبعض الاعراض ولا يفضل في حالة الورم المنتشر الى أجزاء أخرى من الجسم (Dare *et al.*, 2015).

2- **العلاج الاشعاعي**: يستخدم العلاج الاشعاعي أيضا في حالة سرطان الثدي الغير منتشر حيث يتسبب الاشعاع في موت الخلايا السرطانية المكونة للورم نتيجة تلف المادة الوراثية للخلايا (Baskar *et al.*, 2012). كذلك يستخدم الاشعاع لعلاج سرطان الثدي المنتشر الى أماكن أخرى في الجسم مثل العظام والدماغ والانسجة الرخوة إذ يساعد الاشعاع على التخفيف من اعرض سرطان الثدي المنتشر، ويعطى الاشعاع على شكل جرع مختلفة الشدة وحسب حالة المريض من حيث شدة وموقع انتشار المرض وعمر المريض والعمر المتوقع لبقائه على قيد الحياة فعلى سبيل المثال وحسب تجارب أجريت على مجموعة من المرضى تكون جرعة واحدة مكونة من 80Gy تكون كافية في حالة انتشار الورم لهؤلاء المرضى في العظم (Chow *et al.*, 2014).

على الرغم من ان الاشعاع يعمل على تقليل حجم الورم وبالتالي عدم الضغط على التراكيب المحيطة به الا ان من سلبياته انه لا يميز بين الخلية السرطانية والخلايا السليمة فهو يقتل كلا النوعين كما انه يتسبب ببعض الأثار الجانبية المؤقتة او الدائمة مثل تهيج وتحسس الجلد في المنطقة المعرضة للإشعاع، صعوبة في البلع والتنفس وتساقط الشعر (So *et al.*, 2021).

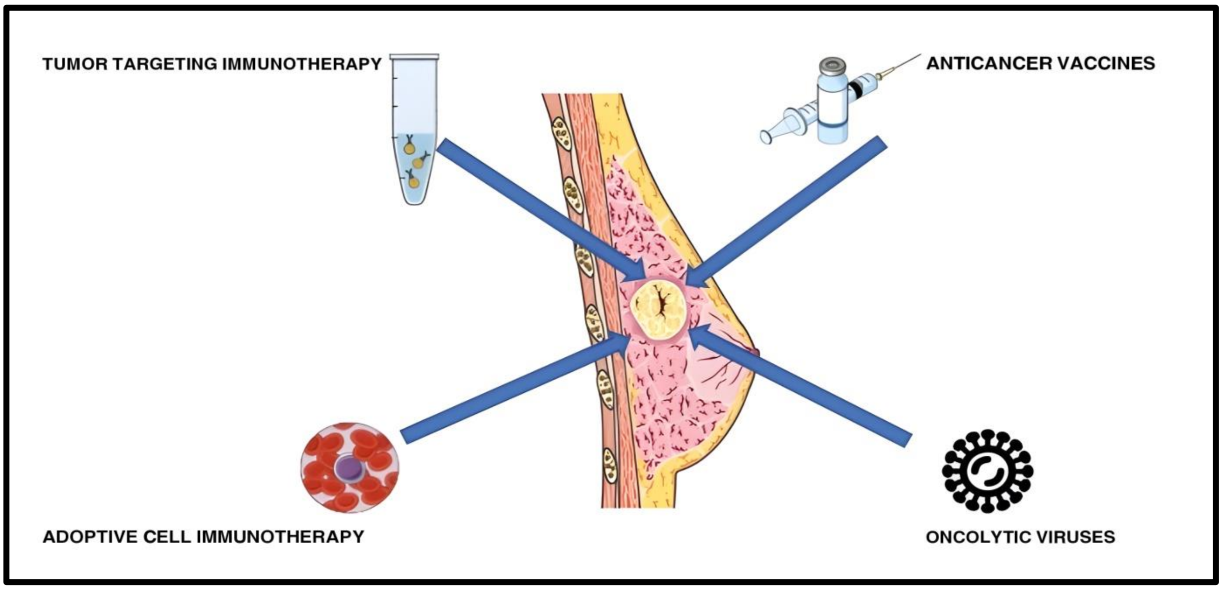
3- **العلاجات الجهازية**: يستخدم هذا النوع من العلاج في حالة سرطان الثدي الاولي أي الغير منتشر الى أجزاء أخرى من الجسم وبدرجة اقل في حالة سرطان الثدي المنتشر وهذا العلاج يستهدف الغدد الصماء أي يعتبر علاج هرموني لسرطان الثدي حيث يعتمد العلاج على المستقبلات الهرمونية الإيجابية الموجودة في الخلايا السرطانية وذلك بمنع ارتباط هرمونات الاندروجين والبروجسترون بمستقبلاتها او تعمل على تخفيض انتاج الجسم لهرمونات الاندروجين والبروجسترون (Burstein *et al.*, 2021).

على الرغم من ان العلاجات الجهازية تستخدم كبديل للعلاج الجراحي الا انها تتضمن بعض الاثار السلبية منها عدم استجابة الغدد الصماء لهذا العلاج أي مقاومة الغدد للعلاج وفي بعض الحالات تتسبب العلاجات الجهازية في جلطات دموية، هشاشة العظام وامراض القلب وغيرها (Asghari *et al.*, 2022;Jurrius *et al.*, 2020).

4- **العلاج الكيمياوي**: يستخدم العلاج الكيمياوي في حالة سرطان الثدي المنتشر ER الموجب وHER2 الموجب والسالب الثلاثي وفي بعض الحالات يستخدم مع العلاجات الجهازية لضمان تقليص او إزالة الورم الخبيث. يؤثر العلاج الكيمياوي على الخلايا الطبيعية السليمة

أيضا ويسبب طفرات في مادتها الوراثية مما يؤدي الى حدوث سرطانات من أنواع أخرى إضافة الى ذلك عدم قدرة بعض الدول في توفير بعض العلاجات الكيمياوية بسبب تكلفتها المادية الكبيرة (Costa *et al*., 2020).

5- **العلاج المناعي** :يعتبر من العلاجات الفعالة في سرطان الثدي المنتشر السالب الثلاثي ويستخدم بمشاركة العلاج الكيمياوي ويعتمد في عمله على تقوية الاستجابة المناعية ضد اورام سرطان الثدي .تم تطوير طرق مختلفة كعلاج مناعي مضاد لسرطان الثدي ويشمل العلاج المناعي الذي يستهدف الأورام ،الفيروسات الحالة للأورام واللقاحات المضادة للسرطان شكل (8)(Garcia-Aranda *et al*., 2018).حققت العلاجات نجاحا كبيرا وثبت فعاليتها ضد الورم الاولي والورم المتقدم (المنتشر) وأعطى نتائج وذلك بمحاصرة الورم ومنع انتشاره وزيادة معدل عمر المرضى المتوقع الا ان كلفة العلاج العالية إضافة الى تأثيره على مرضى سرطان الجلد المناعي الشديد والاستجابة القليلة في حالة استخدامه بدون العلاج الكيمياوي (Garcia-Aranda and Redondo, 2019).



شكل (8) أنواع العلاجات المناعية لسرطان الثدي (Garcia-Aranda and Redondo, 2019)

6- **العلاج الجيني:** يستخدم العلاج الجيني في حالة سرطان الثدي الاولي والمنتشر والهدف من العلاج هو كبت او تعديل التعبير الجيني لبعض البروتينات التي تساهم في تنظيم نمو وانقسام وهجرة الخلايا والتي يلاحظ وجودها بشكل مفرط وبنسبة عالية في سرطان الثدي الاولي والمنتشر (Cheng *et al*., 2012). تتمثل سلبيات العلاج الجيني في صعوبة معالجة كبت الجين في الخلايا الهدف وتتطلب هذه العملية استخدام فيروسات

للتعرف على الخلايا السرطانية وحمل المادة الجينية الى جينات الخلايا المكونة للورم الخبيث (Doloff and Waxman, 2014).

2-9-3- علاج سرطان الثدي بتقنية النانو

على الرغم من النجاح والنتائج الجيدة التي تم تحقيقها في السنوات الأخيرة في معالجة سرطان الثدي الا انه يستعصي الشفاء تقريبا في جميع المرضى المصابين به وتستخدم طرق الجراحة والاشعاع عادة للتسكين فقط في المرض المنتشر لذلك هناك حاجة الى علاجات أكثر وأفضل للتقليل من السمية والاثار الجانبية التي تسببها العلاجات التقليدية والتقليل من تكلفة العلاجات وبقاء المريض على قيد الحياة (Waks and Winer, 2019).

بدات بحوث التقنية النانوية الدخول في مجال الطب والصيدلة لارتباطها بصحة الانسان وفي مواجهة الامراض الأكثر خطورة وهي الامراض السرطانية فأصبحت المواد النانوية علاجا بديلا عن العلاجات الكيميائية بسبب ما تمتلكه من خواص حرارية وميكانيكية (Muddapur *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2013).وقد ساعد ابتكار تقنية الزراعة النسيجية في اختبار فعالية الجسيمات النانوية على الأورام الخبيثة حيث تعتبر تقنيات زرع الخلايا الحيوانية خارج الجسم هي أحد استعمالات التكنولوجيا الحيوية ، بالنسبة للكائن الحي تتضمن هذه العملية ادخال قطع نسيج كاملة أو مجموعة من الخلايا المتمايزة أنزيميا في الجسم حيث يتم اختبارتأثير العلاجات التجريبية على أنواع الخلايا المختلفة لأنها تحتوي على غالبية العناصر الغذائية اللازمة لتكاثر الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي مع التمكن من التحكم وإدارة الظروف التي تؤدي الى نمو الخلايا السرطانية إضافة الى القدرة في التحكم بالمدة الزمنية التي يتعرض لها مختلف الخلايا السرطانية المزروعة الى المستحضر . (Antoni *et al.*, 2015)

فعلى سبيل المثال كان العلاج الكيمياوي الكامبتوثيسين Camptothecin (Cpt) يستعمل في علاج سرطان الثدي حيث يعمل على تثبيط عمل انزيم التوبوايزومريز النووي DNA Topoisomerase حيث يتفاعل الاثنين في موقع nucleophilic مما يؤدي الى تفكك (CPT) مكونا اللاكتون وبما ان اللاكتون ضعيف الذوبان في الماء وغير مستقر عند الاس الهيدروجيني للجسم وسميته الشديدة منع من استعماله في التطبيقات السريرية لسرطان الثدي (Rajan *et al.*, 2017; Berrada *et al.*, 2005) فتم تحسين فعالية CPT وتقليل من سميته وذلك بتغليفه من الداخل encapsulation بجسيمات شحمية نانوية صلبة لا تذوب

في المذيبات العضوية فكان التأثير السمي للعلاج منخفض واكثر فعالية لخلايا خط سرطان الثدي مقارنة بالعلاج الكيمياوي المتمثل ب CPT الحر (Chi *et al*., 2020).

تعد جسيمات الذهب النانوية المصنعة حيويا ادوية جديدة لعلاج سرطان الثدي بسبب سميتها المنخفضة وتوافقها الحيوي وذات امتصاصية عالية من قبل الخلايا لذلك استخدمت على نطاق واسع في مجال الصحة وخاصة في علاج وتشخيص السرطان (Mikhailova, 2021; Peng and Liang, 2019). في دراسة Munawer واخرون، (2020) استخدمت جسيمات الذهب النانوية المخلقة من المستخلص المائي للفطر الداخلي *Cladosporium spp* المعزول من نبات *Commiphora wightii* واظهرت فعالية كبيرة ضد خط سرطان الثدي McF-7. وفي دراسة Clarance واخرون، (2020)اثبتت جسيمات الذهب النانوية التي صنعت من مستخلص الفطر الداخلي *Fusarium solani* فعالية مضادة لخط سرطان الثدي McF-7 بطريقة فحص MTT في المختبر (in vitro).

2-10- الية تثبيط جسيمات الذهب النانوية للخلايا السرطانية

على الرغم من ان الية تأثير جسيمات الذهب النانوية على الخلايا السرطانية غير كاملة الوضوح لكن اظهر كثير من الباحثين ان جسيمات الذهب النانوية يمكنها النجاح في مهاجمة الخلايا السرطانية (Haume *et al*., 2016) . واشار Lin واخرون ،(2021) ان سمية جسيمات الذهب النانوية للخلايا السرطانية تكون بأليات مختلفة منها انتاج الجذور الحرة، اكسدة الكلوتاثيون، تعطيل دورة الخلية، تنشيط بروتين الكازبيز Caspase 3 وتنخر الخلايا السرطانية وبرمجة موت الخلية شكل (9).

يعد موت الخلية المبرمج Apoptosisمن اهم الاليات المؤثرة المضادة للأورام التي تسببها جسيمات الذهب النانوية بسبب نفوذها السهل عبر الحواجز الخلوية والفتها العالية للجزيئات الحيوية المختلفة يتم تمييز الخلايا الميتة بهذه الطريقة عن طريق التغيرات الشكلية منها انكماش الخلايا، تفتيت النوى وانتشار واسع للغشاء البلازمي مما يؤدي في النهاية الى موت الخلايا ثم تقوم الخلايا البلعمة الكبيرة بابتلاع الخلايا الميتة المتبقية (Yang *et al*., 2019). على سبيل المثال بين Parveen واخرون ،(2022) فعالية جسيمات الذهب النانوية على خط سرطان عنق الرحم Hela cell وسرطان استسقاء ايرليش Ehrlich`s ascites carcinoma وخط سرطان الثدي McF-7 وقدرتها على اختراق غشاء الخلية بكفاءة مما سبب الانكماش والتحبب كمتغيرات مظهرية كما اظهر فحص MTT ان التأثير السام

لجسيمات الذهب النانوية على الخلايا السرطانية يعتمد على التركيز.كما أشار Liu واخرون، (2019) ان جسيمات الذهب النانوية كانت مسؤولة عن موت الخلية المبرمج لاثنين من خطوط خلايا سرطان الكلى البشري نتيجة نفإذية غشاء المايتوكندريا مما أدى الى اختلال وظائفها وموت الخلية المبرمج. كما أشار Gadekar واخرون ، (2021) ان جسيمات الذهب النانوية كانت سامة لخط سرطان الكبد Hep2 وكان موت الخلية المبرمج مسؤولا عن زوال خلايا الكبد المصابة.

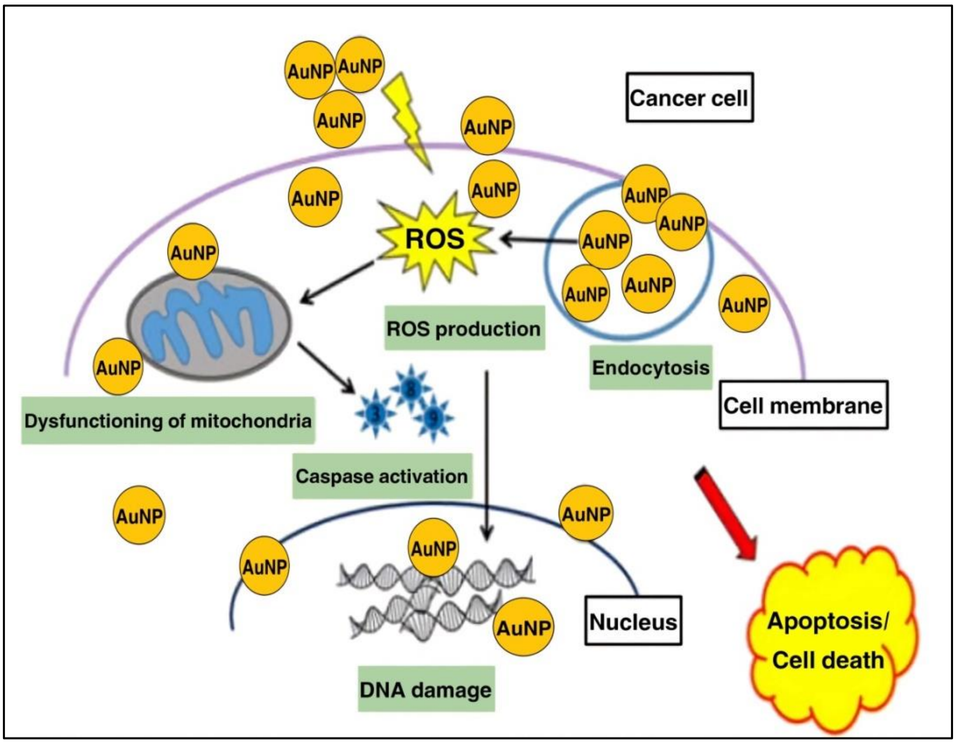
الالية الأخرى التي اقترحت وتعمل كمضاد للسرطان هي تكوين أنواع الاوكسجين التفاعلية Reaction oxygen species (ROS) او ما تسمى بالجذور الحرة داخل الخلايا السرطانية مما يؤدي الى دخول الخلية السرطانية حالة اجهاد تأكسدي والذي يسبب تلف المادة الوراثية والاغشية الحيوية وتنتهي بموت الخلية المبرمج (Kumer *et al*., 2017). تعمل الجذور الحرة على اكسدة الكلوتاثيون (GSH) الذي يعمل كمضاد اكسدة حيث يحمي الخلية من الجذور الحرة وتحوله الى الكلوتاثيون ثنائي الكبريت Glutathion disulfide (GSSG) وتنج عن ذلك تحفيز انزيم Giutathion reductase بسبب ارتفاع الجهد التأكسدي في الخلية التي تسببه الجذور الحرة ويقوم بأختزال الكلوتاثيون المتأكسد (Sathishkumar *et al*., 2015). تعد النسبة بين GSH وGSSG من اهم المؤشرات على ارتفاع الجهد التأكسدي فقد لوحظ انخفاض مستوى GSH في الخلايا السرطانية المعالجة بجسيمات الذهب النانوية بالتالي تكون زيادة توليد الجذور الحرة وأكسدة الكلوتاثيون هي واحدة من نشاطات جسيمات الذهب النانوية المضادة للسرطان (Lee *et al*., 2019).

و بينت دراسة Ke واخرون ،(2019) أدى تعرض خلايا خط سرطان عنق الرحم Hela cell الى جسيمات الذهب النانوية الى سمية هذه الخلايا من خلال توليد ROS مما سبب احداث ضرر في مسار المايتوكندريا وبالتالي موت الخلايا المبرمج. كما بين Aguilar واخرون، (2021) ان جسيمات الذهب النانوية يمكنها ان تحفز السمية الخلوية من خلال توليد ROS مما سيبب احداث اضرار في المكونات الخلوية من خلال الاجهاد التأكسدي المتكون داخل الخلايا السرطانية.

وكما أشارت دراسات أخرى منها Ganeshkumer واخرون، (2013) و Patra واخرون، (2015) وVemuri واخرون، (2019) ان تراكم جسيمات الذهب النانوية في الخلايا السرطانية المعالجة في طور G0 (طور السكون) وطور G1 (الطور الأول من دورة الخلية) وطور S (الطور الثاني من دورة الخلية) يمكن ان يلعب دورا في تنظيم دورة

الخلية ودورا في تحريض موت الخلية المبرمج، وهذ ما وجد في خط خلايا سرطان الثدي McF-7 التي عولجت بجسيمات الذهب النانوية والتي تشير النتائج الى كفاءة هذه الجسيمات النانوية في احداث توقف الخلية في مختلف مراحل دورة الخلية.

يعد الكازبيز Caspase هو احد البروتينات التي تسبب تحلل بروتينات الخلايا وتكون مسؤولة عن موت الخلية المبرمج نتيجة لعوامل عديدة منها النمو والتخلص من الخلايا غير المرغوب فيها او للتوازن الطبيعي (Durairajanavagam *et al*., 2015).اشارت دراسة Dam واخرون، (2014) ان جسيمات الذهب النانوية تساهم في مضاعفة نشاط Caspase3 وتسبب انخفاض حيوية الخلايا الى 40%.كما بينت دراسة Ahamed واخرون، (2016) ان جسيمات الذهب النانوية شديدة السمية ضد خلايا سرطان الثدي البشري وتسبب موت الخلايا السرطانية نتيجة لتعزيز نشاط Caspase3 و Caspase9 .



شكل (9) الية عمل جسيمات الذهب النانوية ضد الخلايا السرطانية (Vinay *et al*., 2021)

2-11- جسيمات الذهب النانوية كمضادات اكسدة

تحدث داخل المحيط الخلوي عمليات أساسية منها اكسدة الغذاء للحصول على الطاقة وينتج عن هذه الفعاليات الايضية ما تسمى بالجذور الحرة وهي نوع جزيئي قادر على الوجود بشكل مستقل وحاوي على الكترون مفرد من أهم أنواع الجذور الحرة هي أنواع الاوكسجين التفاعلية (ROS) والهيدروكسيل (OH°) والاوكسجين المفرد (O°) والاوكسجين الفائق (جندل، 2015)التي لها دور أساسي في الايعازات الخلوية وتكاثر الخلايا وموت الخلايا المبرمج (Liu *et al.*, 2019). تسبب الجذور الحرة اكسدة الخلايا وتحلل الجزيئات الحيوية وتلف الحامض النووي فتعمل مضادات الاكسدة على تثبيط نشاط الجذور الحرة وذلك بالتفاعل معها بطريقة مباشرة أو غير مباشرة بواسطة الزيادة في التعبير عن انزيمات مضادات الاكسدة للتقليل من اضرار الاكسدة داخل الخلايا (Demoranville., 2022; Juan *et al.*, 2021).

هناك الكثير من العوامل التي تسبب خلل في التوازن بين انتاج الجذور الحرة وعمل مضادات الاكسدة منها التعرض الى الاشعاع والملوثات واستخدام بعض الادوية وكثرة تناول الأطعمة المحتوية على المواد الحافظة مما يسبب زيادة الاجهاد التأكسدي على نظام مضادات الاكسدة في جسم الكائن الحي مما يساهم في في نشأة كثير من الامراض منها تصلب الشرايين والشيخوخة والامراض العصبية والسرطان (Netala *et al.*, 2018; Umeno *et al.*, 2017).

اثبتت دراسات كثيرة على إمكانية استخدام جسيمات الذهب النانوية كمضادات اكسدة كونها مركبات غير سامة وامنة وتم تقدير نشاط جسيمات الذهب النانوية وقدرتها على كسح الجذور الحرة بإستعمال تحليل Diphenyl-2-picrylhydrazyl redical (DPPH)، في دراسة Joshi واخرون، (2017) تميزت جسيمات الذهب النانوية التي تم تصنيعها بإستعمال الفطر الداخلي *Cladosporium cladosporiodes* المعزول من الطحالب البحرية نشاطا وفعالية كبيرة كمضادات اكسدة .كما اظهر نشاط جسيمات الذهب النانوية المخلقة من مستخلص فطر *Aspergillus terrus* فعالية جيدة كمضادات اكسدة (Balakumaran *et al.*, 2022).و اثبتت معظم الدراسات ان الجزيئات الحيوية التي تغلف سطح جسيمات الذهب النانوية تزيد من نشاط الجسيمات كمضادات اكسدة خاصة Flavins و Polyphenol و Tannins كون نفسها هي مضادات اكسدة مما يعزز تأثير فعالية

الجسيمات النانوية ضد الجذور الحرة (Baldwin and Booth, 2022; Sana *et al*., 2021; Sutan *et al*., 2018).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materal and method

1-3 الأجهزة والمعدات المختبرية Equipment and Apparatues

جدول (3-1) الأجهزة المستخدمة في الدراسة الحالية.

ت	الجهاز	الشركة المصنعة	المنشأ
1	مسخن Microwave	Shownic	Korea
2	المازج الدوار Vortex	Labcco	Japan
3	ثلاجة Refrigerator	Vistal	Poland
4	جهاز الاشعة فوق البنفسجية UV-visible spectroscop	Shimadzu	Japan
5	جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis	Consort	Belgium
6	جهاز التقطير Water distillatory	GFR	Germnay
7	جهاز الطرد المركزي Centerifuge	Hittich	Germnay
8	الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Hot plate with magnetic stirrer	Heidolph	Germnay
9	جهاز تصوير الهلام Gel system documentation	Vilberlourmat	France
10	الحاضنة Incubator	Human Lab	Korea
11	الحاضنة الهزازة Shaking Incubator	Zenith lab	China
12	الحمام المائي Water path	Memmert	Germnay
13	فرن كهربائي Oven	Memmert	Germnay
14	كابينة الزرع Biosafety	Lab Tech	France
15	مجهر ضوئي Light Microscop	Olympus	Japan
16	الميزان الحساس Sensitive Balance	Sartorius	Germnay
17	المدور او المضخم الحراري Thermo cycler	Prime	UK
18	المؤصدة Autoclave	Hirayama	Japan

19	Vaccum pump مضخة ضغط	Knflaboport	USA
20	X-Ray diffraction جهاز حيود الاشعة السينية	Phillips	Holland
21	مجهر القوة الذرية Atomic force microscope(AFM)	NT-MDT	Russia
22	حاضنة مع ثنائي أوكسيد الكاربون CO_2 incubator	Cypress Diagnostics	Belgium
23	Microtiter reader قارئات الالواح الدقيقة	Thermo Fisher Scientific	USA
24	Laminar flow hood حجرة التدفق الصفحي	K & K Scientific Supplier	Korea

2-3 الأدوات المستخدمة في هذه الدراسة موضحة في الجدول (2-3)

جدول (3-2) يوضح الأدوات المستخدمة في الدراسة الحالية.

ت	الادوات	الشركة المصنعة	المنشأ
1	اطباق بتري Petri Dishes	Bio zek medical	Holland
2	Test tube انابيب اختبار	ALS	Canada
3	Filter paper أوراق ترشيح	Watman No.1	UK
4	Epindroff ابندروف	Bio neer	Korea
5	Cork borer الثاقب الفليني	Brand-w	Germany
6	قناني محكمة الغطاء Screw cap bottles	Pyrex	England
7	ماصات Micropipettes 0.5-10µL, 10-100µL, 100-	Dragon	China

	1000µL		
8	كفوف Gloves	Broche	Malaysia
9	شرائح زجاجية وغطاء الشريحة Slides and cover slides	Superestar	India
10	بيكرات مختلفة الاحجام Beaker	General	USA
11	دوارق مختلفة الاحجام Flask	Iso Lab	Germnay
12	محاقن طبية Disposable Syringes	Superestar	India
13	الناقل الزرعي Standard wire loop	Himedia	India
14	مصباح بنزن Benzen burner	Gallenkamp	England
15	صفائح زرع الخلايا Cell culture plate	Thermo Fisher Scientific	USA

3-3 المواد الكيميائية والاحيائية Biological and chemical materiales

المواد الكيميائية والاحيائية المستخدمة في هذه الدراسة موضحة في الجدول (3-3)

جدول (3-3) يمثل المواد الكيميائية والاحيائية المستخدمة في الدراسة الحالية

ت	اسم المادة	الشركة المصنعة	المنشأ
1	اكار Agar	KR	Chile
2	ايثانول مطلق Absolute ethanol	RBL	Spain

3	بادئات Primers	Bioneer	Korea
4	ماء منزوع الايونات Didionzation water	Ajax	Australia
5	اكاروز Agarose	Bio basic	Canada
6	ببتون Pepton	BDH	England
7	كلورامفينيكول chloramphenicol	INF	Indonosia
8	رباعي كلورات الهيدروجين ثلاثي الهيدرات (III) Hydrogen tetrachloroaurate trihydrate	Glentham	UK
9	مزيج التفاعل Master mix	Bio neer	Korea
10	صبغة اللاكتوفينول القطنية Lactophenol-cotton blue stain	Bio neer	Korea
11	كلوكوز glucose	BDH	England
12	هيبوكلورات الصوديم 5%	أربيل	العراق
13	كحول اثيلي 70% Ethanol 70%	BDH	England
16	DMF	Santa Cruz	USA

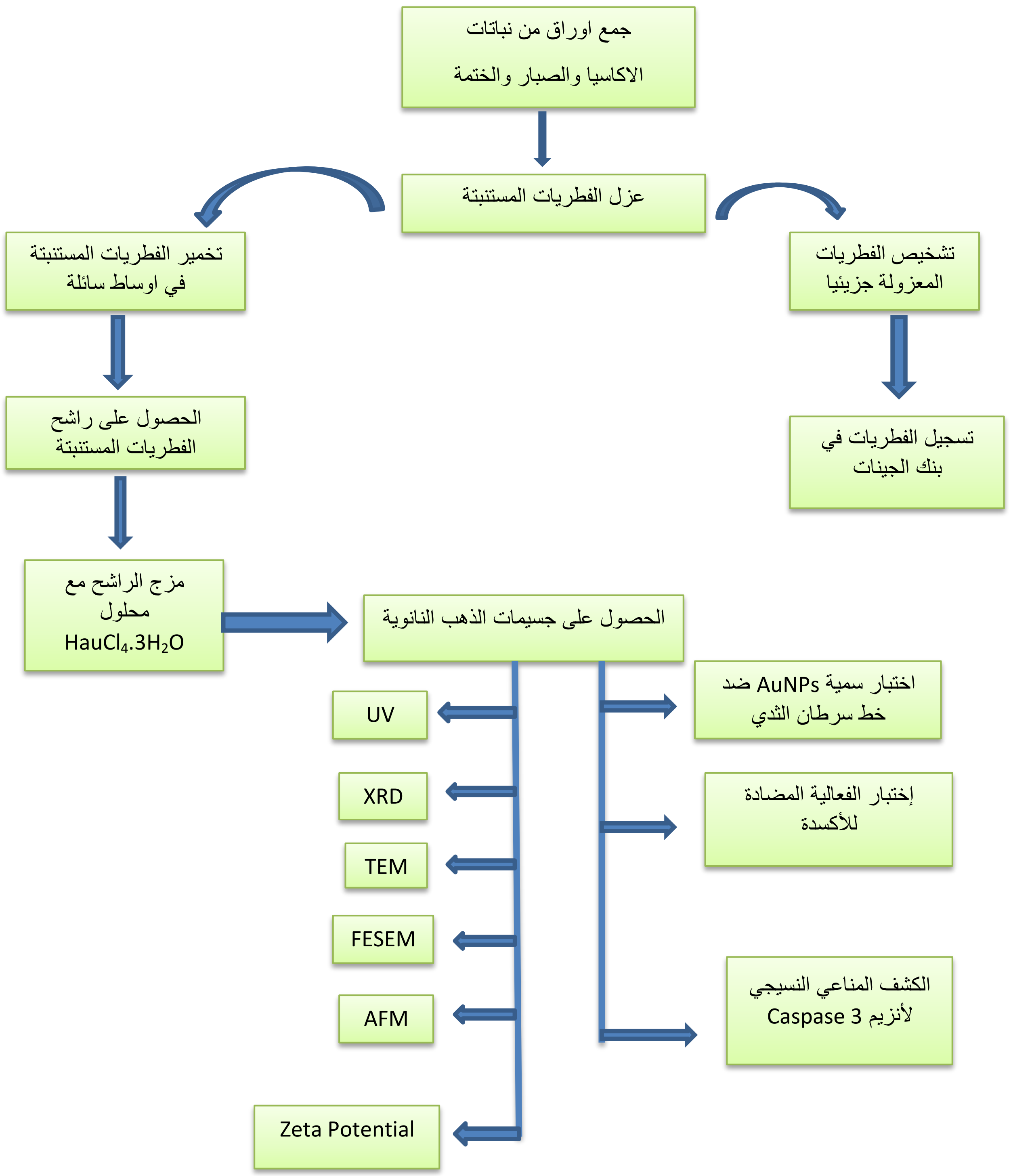
17	RPMI 1640	Gibco	USA
18	MTT stain	Sigma	USA
19	Fetal bovine serum	Gibco	USA

3-4 الأوساط الزرعية

جدول (3-4) يوضح الأوساط الزرعية والتخمرية المستخدمة في الدراسة الحالية.

ت	الأوساط الزرعية المستخدمة	طريقة التحضير	الشركة المصنعة
1	وسط اكار الدكستروز البطاطس Potata dextrose agar medium	حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة	Hi media
2	وسط مرق الدكستروز البطاطس	حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة	Hi media
3	وسط اكار الشعير Malt agar	حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة	Hi media
4	وسط Malt Glucose Pepton Yeast(MGPY)	حضر بإذابة Malt extract(3g) Yeast extract (3g) Glucose (10) Pepton (5g) Dw 1000 ml	

3-5- خطوات طرائق العمل



شكل (10) مخطط يوضح خطة عمل الدراسة البحثية (اعداد الباحثة)

3-5-1- جمع العينات

تم جمع العينات النباتية لأوراق النباتات ومن الأماكن المذكورة امامها للمدة من تشرين الثاني 2021 الى كانون الثاني 2022 كما موضح في جدول (3-5).

جدول (3-5) أسماء النباتات المستخدمة في هذه الدراسة

ت	اسم النبات	الاسم العلمي	منطقة العزل
1	الختمة	*Althea rosea*	حديقة منزلية
2	الصبار	*Opuntia ficus-indica*	حديقة منزلية
3	الاكاسيا	*Sanna surattensis*	حديقة كلية الصيدلة

3-5-2عزل فطريات النسيج النباتي الداخلي Endophyte Fungi:

اعتمدت طريقة تعقيم السطح في عزل الفطريات من النسيج الداخلي للنبات حسب طريقة (Greenfield *et al*., 2015) والتي تضمنت الخطوات التالية:

1-غسل أوراق العينات النباتية بماء الحنفية الجاري.

2- تقطيع الأوراق الى قطع صغيرة بقطر 6ملم تقريبا .

4- وضع القطع الصغيرة في محلول الكحول الاثيلي بتركيز 75% لمدة دقيقتين.

4- غمرها في محلول هيبوكلورات الصوديوم (NaClO) بتركيز 5% لمدة 3 دقائق.

5- غطست بالكحول الأثيلي بتركيز 75% لمدة 30 ثانية.

6- غسلت بعد ذلك بماء منزوع الايونات المعقم.

7- جففت القطع النباتية المقطعة بواسطة أوراق ترشيح وفي ظروف معقمة.

8- وضعت الأجزاء الورقية على اطباق بتري حاوية على وسط اكار دكستروز البطاطا الحاوي على الكلورمفينكول.

9- حضنت بدرجة حرارة 27 م° لمدة (5-7) أيام وبمعدل ثلاث مكررات.

3-5-3- تنقية وتشخيص الأنواع الفطرية قيد الدراسة:

تم تنقية الأنواع الفطرية النامية وذلك بنقلها على وسط اكار الدكستروز البطاطا واكار الشعير المحضر مسبقا والخالي من الكلورمفينكول وحضنها لمدة أسبوع بدرجة 27 م° ثم نقلت أجزاء من المستعمرات النقية المعزولة الى أوساط مائلة وحضنت بدرجة 27 م ° لمدة (5-7) أيام بعد ذلك نقلت الأوساط المائلة الى الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لغرض الحفظ. تم تشخيص الأنواع الفطرية اوليا تحت المجهر الضوئي وذلك بتحضير شرائح زجاجية Slids مصبوغة بصبغة Lacto phenol cotton blue.

4-5-3- التشخيص الجزيئي للفطريات المدروسة:

1-4-5-3 استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA من المستعمرات الفطرية

تم العمل باستخلاص الحامض النووي المنقوص الاوكسجين DNA للفطريات المعزولة والتي تم تنشيطها بعمر 5-7 أيام تبعا لخطوات الشركة المصنعة للعدة FavorPrep Fungi/Yeast Genomic DNA Extraction Mini Kit (Cat.No.: FAFYG 001) وكما يلي :

1- نقل جزء قليل جدا من المزرعة الفطرية إلى أنبوب طرد دقيق سعة 1.5 مل.
2- إضافة 1 مل من محلول FA Buffer الى الخلايا وأعاده تعليق الخلايا resuspend بإستعمال الماصة micropipette ووضع المعلق في جهاز الطرد المركزي (5000 rpm for 2 min) لإكمال التخلص من الراشح تماما.
3- إعادة تعليق الخلايا بإضافة 550µl من محلول FB Buffer ثم إضافة محلول Lyticase مع الخلط الجيد بإستعمال جهاز الدوامات Vortexing ثم حضنت لمدة نصف ساعة بدرجة 37 م° بعدها وضعت في جهاز الطرد المركزي (5000 rpm for 10 min) لغرض اكمال التخلص من الراشح تماما. هناك تحذير عند اجراء الخطوات التي تشمل استخدام محلول Lyticase وFB Buffer لانها تحتوي على مواد خطرة على صحة الانسان يجب اجراء هذه الخطوات داخل كابينة كيميائية ساحبة للدخان.

4- إضافة 350 µl من محلول TG1 Buffer وخلطه جيدا بواسطة الماصة micropipette ثم تنقل العينة الى bead tube ويمزج جيدا بواسطة جهاز المزج plus- vortex لمدة 5 دقائق.

5- إضافة 20µl من محلول انزيم البروتينيز Proteinase k ثم يخلط بجهاز الرج vortex ثم تحضن العينة لمدة 15 دقيقة عند 55 م° مع اجراء عملية المزج بعد كل خمس دقائق حضن لمدة 20 ثانية.

6- توضع الخلايا المعلقة في جهاز الطرد المركزي (5000 rpm for 1 min) ثم تنقل 200 مايكرو لتر من المعلق الى أنبوب جديد نوع microcenterfuge tube سعة 1.5 مل.

7- إضافة 200 مايكرولتر من محلول TG2 Buffer ويخلط جيدا بواسطة الماصة micropipette.

8- إضافة 200 مايكروليتر من الايثانول (96-100%) ويخلط جيدا بواسطة جهاز الرج Plus-vertexing لمدة 10 ثواني.

9- وضع خليط العينة في عمود تجميع صغير TG min ثم طرد مركزي (14000 rpm for 30 sec) ثم نضع TG minفي أنبوب تجميع جديد.

10- إضافة 400 مايكرو لتر من محلول WI Buffer مع إضافة الايثانول للمحلول ثم يوضع في جهاز الطرد المركزي (14000 rpm fr 30 sec) والتخلص من السائل المتدفق ثم يفرغ في عمود تجميع جديد TG min مرة أخرى.

11- إضافة 750 مايكرولتر من محلول wash Buffer الى عمود TG-min ووضعه في جهاز الطرد المركزي (14000 rpm for 30 sec) وتجاهل التدفق ثم تنقل الى انابيب جديدة ذات اغطية تدعى collection tube.

12- يوضع مرة أخرى في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة في الدقيقة لمدة 3 دقائق لتجفيف العمود.

13- يوضع عمود TG الصغير في أنبوب شطف.

14- إضافة 50-100 مايكرولتر من محلول Elution Buffer للغسل او dd H_2O الى منتصف غشاء عمود TG min وتوضع بشكل عمودي لمدة 3 دقائق.

15- يوضع في جهاز الطرد المركزي بأقصى سرعة 14000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة لاستخراج الحمض النووي الكلي ويخزن في درجة حرارة 4 م° او -20 م°.

3-5-4-2-الترحيل الكهربائي الهلامي لتحليل جودة الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA

1-يحضر محلول الاكاروز بإذابة 1 غم من مسحوق الاكاروز في 100 مل من TBE X1 في دورق 100 مل ونذيب المسوق بإستعمال جهاز microwave حتى يصبح المحلول صافيا.

2- يبرد المحلول الى درجة حوالي (50-55) م°.

3- إضافة صبغة Ethidium bromide الحمراء حوالي 3 مايكروليتر الى الهلام الدافئ.

4- توضع الامشاط في قالب الترحيل الكهربائي لعمل حفر ونصب محلول الاكاروز في القالب

5- يترك الاكاروز الهلامي يتجمد في درجة حرارة الغرفة ومن ثم نرفع المشط بعناية ويوضع القالب في حجرة جهاز الترحيل الكهربائي ويملئ بمحلول TBE x1 .

6- يتم خلط عينات الحامض النووي 5 مايكروليتر مع 3 مايكرولتر من صبغة Bromo phenol blue ويوضع المزيج في حفر الاكاروز بنسبة 0.5 .

7- تربط اقطاب جهاز الترحيل الحاوي على جل الاكاروز عند 70 فولت و65 امبير لمدة ساعة واحدة ونلاجظ تحرك الصبغة بعدها يفحص الحامض النووي في جهاز الاشعة الفوق البنفسجية حيث تمت مشاهدته تحت ضوء UV trans illuminatorوتم تصوير الحامض النووي بواسطة كاميرا.

3-5-4-3 تحضير البوادئ The primers preparation

تم إذابة البوادئ المجففة بالتجميد وحسب تعليمات الشركة المصنعة في 150 مايكرولتر من الماء المقطرddH_2O ليصبح التركيز النهائي 100 pmol/µl والاحتفاظ به في درجة حرارة -20 كمحلولstock للاستخدام. تم اخذ 10 مايكرولتر من محلول Stock واضافة اليه 90 مايكرولتر من الماء المقطر ddH_2O ليصبح الحجم النهائي 100 مايكرولترلكل من البادئ الامامي (Forward) والبادئ الثاني (Revisble).

جدول (3-6) يوضح تسلسل البوادئ المستخدمة في هذه الدراسة.

Primer	Primer sequences	TM C°	GC	Size of product(pb)
ITS1(F)	5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3	60.3	50%	550-650
ITS4(R)	5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3	57.8	41%	

3-5-4-4 تحضير مزيج مكونات تفاعل ال PCR

تم اجراء تضخيم الحامض النووي المستخلص حسب طريقة Aswad واخرون، (2021) بإستخدام البوادئ الموضحة في الجدول (3-6) وحسب الاضافات الموضحة في جدول (3-7) وبرنامج التضخيم في الجدول (3-8).

جدول (3-7) تحضير مزيج تفاعل ال PCR :

Components	25 µL (Final volume)
Distill water	16.5µl
Forward primer	10 picomols/µl (1µl)
Reverse primer	10 picomols/µl (1µl)
DNA	1.5µl
Taq PCR PreMix	5µl

3-5-4-5- تضخيم الدنا بواسطة جهاز التدوير الحراري

بعد تحضير خليط تفاعل البلمرة المتسلسل PCR الذي حضر حسب الجدول (3-7) وضعت العينات داخل جهاز التدوير الحراري thermal cycle وحسب البرمجة الخاصة بالفطريات وكما موضحة بالجدول (3-8) .

وبعد اكتمال تضخيم الDNA نقلت العينات الى جهاز الترحيل الكهربائي ومن ثم فحص الحامض النووي بعد انتهاء الترحيل الكهربائي في جهاز ال UV وصورت النتائج بالكاميرا ثم تم ارسال العينات الحاوية على المادة الوراثية الى معهد Macrogen في كوريا لغرض معرفة تتابع القواعد النتروجينية ومطابقتها مع العزلات في بنك الجينات NCBI.

جدول (3-8) الظروف المثلى لتضخيم الحامض النووي المستخلص من الفطريات النبات الداخلية

NO.	Phase	Tm (C°)	Time	NO.of cycle
1-	Initial Denaturation	95	5 min	1 cycle
2-	Denaturation-2	95	45 sec	35 cycle
3-	Annealing	52	1 min	
4-	Extension-1	72	1 min	
5-	Extension-2	72	5 min	1 cycle

3-5-5-التخليق الحيوي لجزيئات الذهب النانوية من الفطريات المدروسة

3-5-5-1 تحضير محلول كلوريد الذهب Preparation of $HAuCL_4.3H_2O$

تم إذابة 0.078766 g من كلوريد الذهب في 100 مل من الماء المنزوع الايونات حسب قانون المولارية وفي ظروف معتمة للحصول على محلول كلوريد الذهب بتركيز 2mM جاهز للاستخدام.

3-5-5-2 تحضير جسيمات الذهب النانوية حيويا:

تم تخليق جسيمات الذهب النانوية من مستخلص الفطريات المستنبتة بأتباع الطريقة الموصوفة من قبل (Cupta and Chundawat, 2020) حيث تم تخمير الفطريات المستنبتة في وسط MGYP او PDP لمدة (7-10) أيام في درجة حرارة 27 م° في حاضنة هزازة بمعدل 120 دورة بالدقيقة وذلك بأخذ ثلاث أقراص من المزرعة الفطرية النامية وبقطر 6 ملم لكل عزلة ووضعها في فلاسكات زجاجية سعة 1000 مل حاوية على 250 مل من الأوساط الزرعية السائلة وتم عمل مكررين لكل فطر وبعد نمو الحصيرة الفطرية تم فصل الكتلة الحيوية الفطرية بإستعمال ورق ترشيح معقم نوع Watman paper NO.1 وتحت ظروف معقمة وكذلك جهاز الطرد المركزي وتم غسلها بماء منزوع الايونات معقم جيدا لإزالة بقايا الوسط الزرعي من الخيوط الفطرية.واضيف 100 مل من الماء المنزوع الايونات المعقم لكل 10 غرام من الكتلة الفطرية ووضعت في قناني سعة 400 مل وحضنت في حاضنة هزازة بمعدل 120 دورة في الدقيقة وبدرجة حرارة 27-28 م° وفي الظلام لمدة ثلاثة أيام ،بعدها تم فصل الراشح عن الخيوط الفطرية بإستعمال جهاز Vacum device واضيف 100 مل من محلول كلوريد الذهب لكل 100 مل من الراشح الفطري بالتدريج وفي ظروف معتمة للوصول الى تركيز 1 ملي مولاري لخليط التفاعل. بعد الحصول على التغير اللوني نحصل على جسيمات الذهب النانوية كمسحوق وذلك بوضع محلول جسيمات الذهب النانوية في جهاز الطرد المركزي عند 10000 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة وكررت العملية عدة مرات مع إضافة الماء المنزوع الايونات المعقم في كل مرة لحين الحصول على جسيمات نانوية نقية جففت الجسيمات النانوية المخلقة حيويا عند درجة حرارة الغرفة وفي ظروف معقمة ومعتمة

3-5-6- التشخيص الفيزيائي لجسيمات الذهب النانوية المصنعة حيويا

استخدمت بعض التقانات الفيزيائية في دراسة خصائص جسيمات الذهب النانوية كالشكل و التركيب البلوري والحجم والتضاريس وهي:

3-5-6-1 التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية Ultra violate visible

بعد حصول التغيير اللوني للوسط الذي يحتوي الراشح الفطري مع محلول كلوريد الذهب تم نقل 2 مل من خليط التفاعل للتأكد من تكون الجسيمات الذهبية النانوية الى جهاز التحليل الطيفي UV-1800 وعند الاطوال الموجية مابين (200-800) نانومتر واستعمل الماء المنزوع الايونات كمحلول blank (Manjunath *et al*., 2017).

3-5-6--2 حيود الاشعة السينية XR diffraction

. تم تحليل جسيمات الذهب بواسطة حيود الاشعة السينية (XRD) بإستعمال مصدر اشعاع CU-KA بواسطة جهاز X`Pert High عند طول موجي (ג= 1.54060). تم قياس الحجم البلوري للجسيمات النانوية المخلقة حيويا بإستعمال معادلة شيرر (Narayanan and Sakthivel, 2011).

$$D = 0.94\boldsymbol{\lambda} \setminus \boldsymbol{\beta}\cos\theta$$

D: تمثل معدل الحجم البلوري للجسيمات المخلقة

$\boldsymbol{\lambda}$: الطول الموجي للاشعة السينية

$\boldsymbol{\beta}$: تمثل عرض القمة عند منتصف الارتفاع

ɵ: هي الزاوية التي يحصل عندها الحيود

3-5-6--3 المجهر الالكتروني النافذ Transmission electron microscope(TEM)

تم تحديد شكل وحجم جسيمات الذهب النانوية عن طريق الفحص بالمجهر الالكتروني النافذ وفقا لقوى التكبير في هذا المجهر .

3-5-6-4 المجهر الالكتروني الماسح للأنبعاث المجالي Field emission electron microscope

يعتمد هذا المجهر تقنية جديدة في توليد الالكترونات مما تعطيه دقة أكبر وقوة تكبير تصل الى 500000 مرة وبذلك يمكن لهذا النوع من المجاهر إعطاء صورة وتحليل مكونات لسطوح المواد النانوية بدقة أكبر.

3-5-6-5 مجهر القوة الذرية Atomic force microscope (AFM)

يعطي هذا النوع من المجاهر صورة ثلاثية الابعاد لشكل العينة ويقيس تضاريس جسيمات الذهب النانوية.

3-5-6-6 جهد زيتا Zeta Potential

يستخدم تحليل زيتا لمعرفة مدى تجإذب وتنافر الجسيمات المحضرة في محلولها الغروي وهو مقياس لتشتت الجزيئات واستقرارها.

3-5-7- تحديد الفعالية المضادة للأكسدة لجسيمات الذهب النانوية

تم قياس النشاط المضاد للأكسدة في المختبر لجسيمات الذهب النانوية بإستعمال طريقة فحص الجذور الحرة DPPH (Chang *et al*., 2021). إذ حضرت تراكيز (100,200,400,800) مايكرو غرام/مل من جسيمات الذهب النانوية في محلول Dimethyl sulphoxide (DMSO) ثم أضيف 1 مللتر من كل تراكيز الى 1مليلتر من مادة DPPH (0.004 ملي غرام في 100 مل من الميثانول). كما حضرت نفس هذه التراكيز لمحلول حامض الاسكوربك كعامل سيطرة موجب واضيفت الى محلول DPPH ،كما تم مزج DPPH+DMSO كعامل سيطرة سالب ثم وضعت المخاليط في مكان مظلم لمدة 30 دقيقة .تم قياس امتصاصية المخاليط بإستعمال جهاز المطياف الضوئي UV

spectroscopy عند طول موجي 517 نانومتر .تم حساب نشاط الكسح الجذري بتطبيق المعادلة التالية :

$$\%Scavenging\ of\ DPPH = [(A_{\circ} - A_1)/ A_{\circ}]\ X100$$

حيث $A_{\circ}$ يمثل مقدار امتصاصية لعامل السيطرة السالب

وA_1 يمثل امتصاصية جسيمات الذهب النانوية

3-5-8- دراسة الفعالية المضادة للسرطان لجسيمات الذهب النانوية المخلقة في المختبر

3-5-8-1- أدامة مزارع الخلايا السرطانية

تم الحصول على خلايا سرطان الثدي من وحدة بنك التكنولوجيا الحيوي من محافظة البصرة في العراق وحفظت في RPMI-1640 مكملة بنسبة 10% من مصل الابقار الجنينية و 100 وحدة / مل من البنسلين و 100 غم / مل Streptomycine .تم تمرير الخلايا مرتين الى ثلاث مرات في الأسبوع عندما تكون الخلايا قد شكلت طبقة خلوية واحدة وشغلت نسبة 70% من مساحة الطبق وحضنت عند 37م° و5% CO_2 (Al-Ali *et al*., 2022).

3-5-8-2 فحوصات السمية الخلوية Cytotoxicity assays

لتحديد التأثير السام لجسيمات الذهب النانوية على خط سرطان الثدي McF-7 تم اجراء فحص MTT على الخلايا في صفيحة تحتوي على 96 حفرة. تم زرع خطوط الخلايا السرطانية McF-7 $1*10^4$ خلية في كل حفرة (Falih *et al*., 2022) .بعد 24 ساعة تم معاملة الخلايا بجسيمات الذهب النانوية بتراكيز (1000,500,250) مايكرو غرام / مل لكل عينة.تم قياس نسبة الخلايا الحية بعد 72 ساعة من المعاملة عن طريق إزالة الوسط واضافة 28 مايكرولتر من 2 ملغرام / مل من محلول MTT وحضنت الخلايا لمدة 2 ساعة عند 37 م° بعد إزالة محلول MTT .تم إذابة البلورات المتبقية من الحفر بإضافة 100 مايكرولتر من Dimethyl sulphoxide (DMSO) بعدها حضنت لمدة 15 دقيقة عند 37 م° مع الاهتزاز (Al-Shammari *et al*., 2019).تم تحديد امتصاصية الخلايا بواسطة قارئ

الالواح الدقيقة عند طول موجي 620 نانومتر .تم اجراء الفحص بأربع مكررات (Sangour *et al.*, 2021).تم حساب معدل تثبيط نمو الخلايا (النسبة المئوية للسمية الخلوية)بتطبيق المعادلة التالية :

Proliferation rate as (PR)= B/A*100

A تعني الكثافة البصرية للحفر المعالجة،B هي الكثافة البصرية للحفر الغير معالجة

.(Sangour *et al.*, 2021) IR=100-PR

3-5-8- 3- الكشف المناعي عن بروتينات الموت الخلوي المبرمج caspase 3

لغرض إجراء الكشف المناعي عن بروتينات الموت الخلوي المبرمج)caspase 3 تم اجراء الخطوات التالية حسب طريقة (Eckle *et al.*, 2004):-

1 – زرعت الخلايا على سلايد جارج charge وبعد 24ساعة عند تشكيلها لطبقة واحدة متكاملة بنسبة 80-90%، عرضت لمادة بيتا كلوكان بتركيز 700 مايكروغرام / مل.

2 - ثبتت الخلايا بواسطة الاسيتون البارد لمدة نصف ساعة.

3- وضعت المقاطع با- 1% H_2O_2 لمدة 5 دقائق لتثبيط فعالية إنزيم peroxidase، ثم غسلت المقاطع بواسطة PBS لمدة 5 دقائق.

4- وضعت في محلول Reagent Blocking بتركيز 4 مايكرو غرام/مل لمدة ساعة واحدة.

5- بعد إزالة مادة reagent blocking من الشرائح، حضنت بـprimary antibody .

6-غسلت الشرائح بـ Phosphate buffer saline (PBS) لمدة 5 دقائق.

7-عرضت المقاطع للـsecondary antibody المخفف بـ blocking بنسبة 1-25 لمدة ساعة واحدة.

8 - غسلت المقاطع بـ PBS لمدة 5 دقائق ثلاث مرات .

9-غسلت المقاطع بالماء المقطر.

10-حضنت بصبغة الهيماتوكسيلين لمدة 5 ثواني.

11- مررت بسلسلة تصاعدية من الكحول الاثيلي (70% -90% -100%) لمدة دقيقتين لكل مرحلة.

12- مررت المقاطع بالزايلين لمدة دقيقة.

13- وضع غطاء الشريحة على الشرائح وحمل بواسطة الكندا بلسم.

14- فجصت الشرائح وصورت بواسطة المجهر الضوئي الاعتيادي نوع Leica.

3-5-9- التحليل الاحصائي

اجري التحليل الاحصائي للبيانات بطريقة تحليل البيانات بإستعمال البرنامج الاحصائي GINSTAT إذ أجريت مقارنات بين المتوسطات الحسابية وفقا لاختبار اقل فرق معنوي المعدل (LSD) عند مستوى احتمال (0.05) وحسب (الراوي وخلف الله، 1980).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

1- العزل والتشخيص

1-1-4 عزل فطريات النسيج النباتي الداخلي

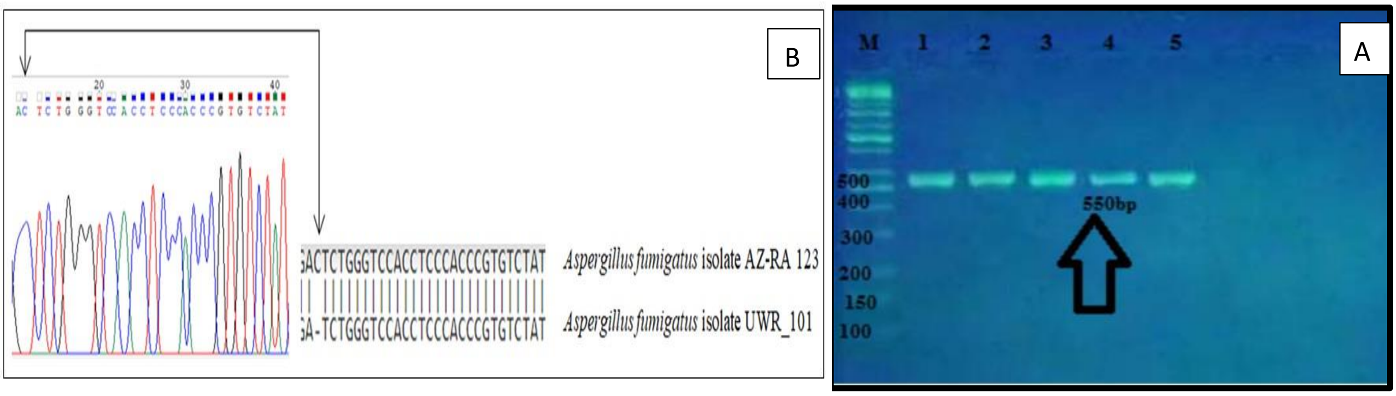
خلال الدراسة الحالية تم عزل أربعة أنواع من الفطريات من داخل النسيج النباتي لاوراق ثلاثة نباتات بطريقة تعقيم السطح وتم تشخيصها جزيئيا ،حيث تم عزل الفطر *Penicillium citrinum* isolate MEBPOO16 من أوراق نبات الختمة والفطر *Aspergillus fumigatus* isolate AZ-AR123 من أوراق نبات الصبار اما نبات الاكاسيا فقد تم عزل نوعين من الفطريات من أوراقه هي *Aspergillus fumigatus* strain Zbf-R10 و *Aspergillus tubingensis* strian HRb. اشارت دراسات عديدة منها دراسة Bolivar-Anillo واخرون ،(2020) ان هناك اكثر من 300000 نوع من النباتات البرية التي تم فحصها تحتوي في انسجتها الداخلية كائنات مجهرية وهذه الاحياء تمثل مخزونا كبيرا من الموارد الحيوية بما في ذلك المركبات الفعالة حيويا والتي لها تطبيقات محتملة للزراعة والصناعة والطب ومكافحة العوامل الممرضة وبهذا يمكن ان تضيف هذه الكائنات سمات مفيدة ومتنوعة على النباتات المضيفة لها . فهناك دراسات كثيرة اشارت الى عزل أنواع مختلفة من الفطريات من داخل النسيج النباتي منها دراسة Hateet ،(2017) إذ تم عزل الفطر *Trichoderma spp* من اوراق نبات *Ocimum basilicum* ودراسة العزاوي، (2022) إذ تم عزل مجموعة من الفطريات تعود الى شعبة Ascomycota من أوراق نبات *Moringa oleifera* وكان الفطر السائد فيها هو فطر *Aspergillus flavus*.

4-1-2- التشخيص الجزيئي للفطريات المعزولة

بعد تأكيد تضخيم الحامض النووي بإستعمال تقنية PCR وبأحجام 550 زوج قاعدي (Base pairs,bp) وبإستعمال البادئات (ITS1,ITS4) شكل (A11) تم بعد ذلك ارسال 20 مايكروليتر من نواتج الحامض النووي PCR product و50 مايكرولتر من البادئ الامامي ITS1 الى شركة مايكروجين واجري بحث Homology بإستعمال أداة البحث عن التتابع المحلي الأساسية Basic local Alignment Search Tool (BIAST) ،حيث أظهرت نتائج تحليل القواعد النيتروجينية عند مقارنتها مع البيانات المتوفر في المركز

الوطني لمعلومات التكنلوجيا الحيوية (NCBI) تشخيص اربعة أنواع من الفطريات التي تم عزلها من الانسجة الداخلية لأوراق النباتات قيد الدراسة كما في الجدول (4-1).

اتضح ان عزلة الفطر *Aspergillus fumigatus* isolate UWR 101 عزلة جديدة وذلك لوجود طفرة غرز Insertion mutation لأضافة نوكليوتيد C عند الموقع 13 زوج قاعدي شكل (B11). حيث بلغت نسبة التشابه الوراثي 99% مع عزلة الفطر *Aspergillus fumigatus* وتم تسجيلها في مركز NCBI تحت رقم ادخال No, OP288118. كما تم التشخيص الجزيئي لأنواع الفطريات قيد الدراسة هي *Penicillium citrinum* isolate MEBPOO16 و*Aspergillus fumigatus* strain Zbf-R10 و *Aspergillus tubingensis* strain HRb وبلغت نسبة التطابق 100% لهذه الفطريات مع العزلات المتواجدة في بنك الجينات.



شكل (11) Aحجم ناتج PCR بعد الترحيل الكهربائي على 1.5% هلام الاكاروز،B طفرة الغرز بإضافة نوكليوتيد C عند الموقع 13 زوج قاعدي pb

جدول (4-1) التشخيص الجزيئي للفطريات المعزولة من داخل النسيج النباتي لاوراق بعض النباتات قيد الدراسة

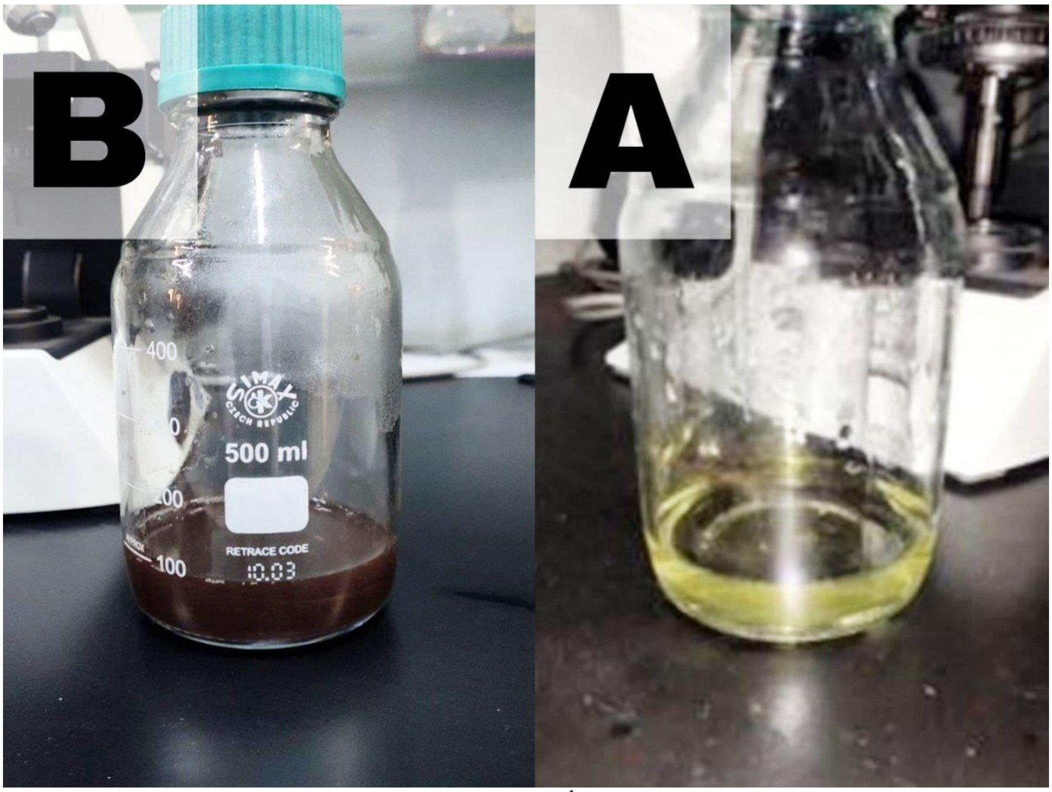
رقم العزلة	اسم السلالة الجديدة بعد تسجيلها في بنك الجينات	Accession	نسبة التطابق	اسم السلالة الفطرية
1		MT597829.1	%100	*Penicillium citrinum* isolate MEBPOO1
2		KX064986.1	%100	*Aspergillus fumigatus* strain Zbf-R10
3	*Aspergillus fumigatus* isolate AZ-RA123	OP288118	%99	*Aspergillus fumigatus* isolate UWR 101
4		KU243047.1	%100	*Aspergillus tubingensis* strain HRb

2-4 –التخليق الحيوي لجسيمات الذهب النانوية

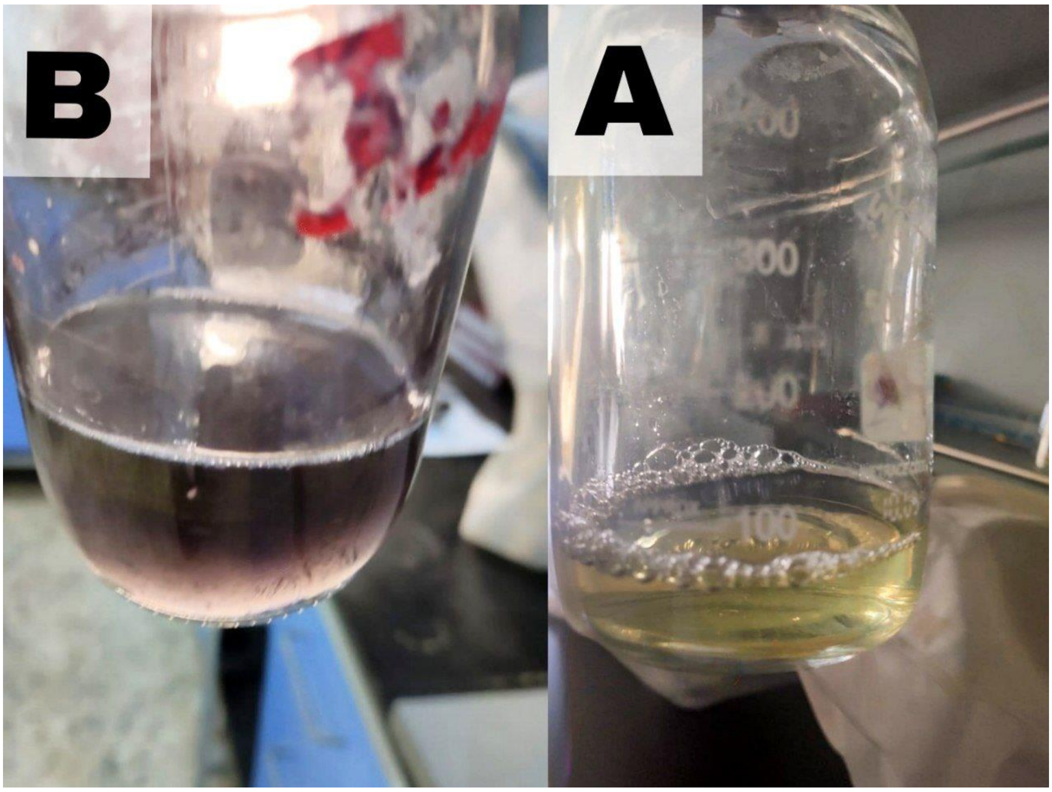
بعد انماء الفطريات المعزولة من النسيج الداخلي للنباتات المختبرة في الأوساط التخمرية (MGYP و PDP) والحصول على رواشح المزارع الفطرية الخالية من الخلايا free cell extract تم استخدام هذه الرواشح الفطرية الأربعة والمشخصة جزيئيا في التصنيع الحيوي لجسيمات الذهب النانوية واظهرت جميعها قابليتها على تكوين جسيمات الذهب النانوية في درجات حرارة وفترات مختلفة .بعد مزج المستخلص الفطري الخالي من الخلايا مع محلول كلوريد الذهب الرباعي ($HAuCl_4.3H_2O$) أظهرت النتائج حدوث تغير لوني لمزيج التفاعل مما يؤكد حدوث تفاعل اختزال لأيونات الذهب بواسطة المركبات الثانوية الفعالة الموجودة في الراشح أدى الى تكوين جسيمات نانوية إذ يعتبر التغير اللوني من الأصفر الى البنفسجي او البني او البني الداكن او الأحمر مؤشر وكشف ابتدائي بالمشاهدة البصرية عن عملية الاختزال الحيوي المسؤولة عن ظهور التغير اللوني في خليط التفاعل (Hassan *et al.*, 2022; Desai *et al.*, 2021).حيث اظهر راشح الفطر

Aspergillus fumigatus strain Zbf-R10 تغير لوني لمحلول التفاعل من الأصفر الى البني الداكن بعد مرور 24 ساعة وعند 27 م° شكل (12).فيما اظهر راشح مزرعة الفطر *Aspergillus tubingensis* strain HRb تغير لوني من الأصفر الى البنفسجي عند درجة حرارة الغرفة وبعد أسبوعين من عملية المزج شكل (13).كما اظهر راشح الفطر *A.fumigatus* isolate AZ-RA123تغير لوني الى البني بعد ان كان اصفر اللون بعد 7 أيام وعند درجة حرارة 27 م° شكل (14).اما راشح الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO16 اظهر تغير لوني من الأصفر الى البني بعد 24 ساعة من مزج الراشح مع محلول كلوريد الذهب وعند درجة حرارة 27 م° شكل (15).

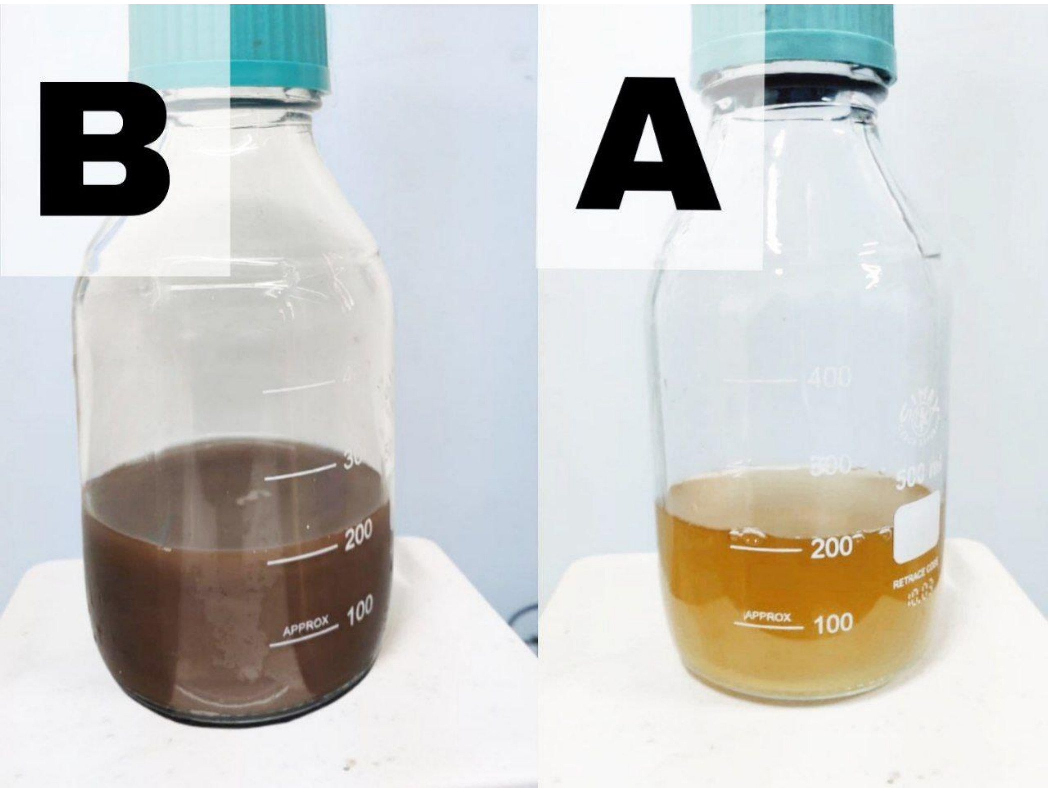
اكدت دراسات عديدة ان التغيرات اللونية بعد مزج راشح الفطريات مع محلول ملح الذهب المعدني يحصل بسبب اثارة الرنين السطحي للبلازمون Surface plasmon resonance (SPR) نتيجة حدوث عملية الاختزال لايونات الذهب وتحدث هذه الظاهرة في كثير من المعادن ومنها الذهب والتي تتفق مع دراسات (Yuan et al., 2019; Amendola *et al*., 2017; Roy *et al*., 2016; Niranjan *et al*., 2015).وبينت دراسات عديدة ان تغير ظروف التفاعل كدرجة الحرارة ومدة الحضانة وتركيز المحلول يؤثر على سرعة التفاعل وشكل الجسيمات النانوية المتكونة (Singh *et al*., 2018b; Tao *et al*., 2008) يفضل التخليق الحيوي لجسيمات الذهب النانوية خارج الخلايا Extracellular كون ان الغشاء والجدار الخلوي للفطريات يمتاز بكونه سميكا وقويا نوعا ما مما يصعب اختراقه من قبل ايونات الذهب Au^{+3} وحتى ان دخل الى الخلية وتحول الى جسيمات نانوية يجب ان يكون تركيز ايونات الذهب عالي لينتشر داخل الخلايا (Ronavari *et al*., 2021).



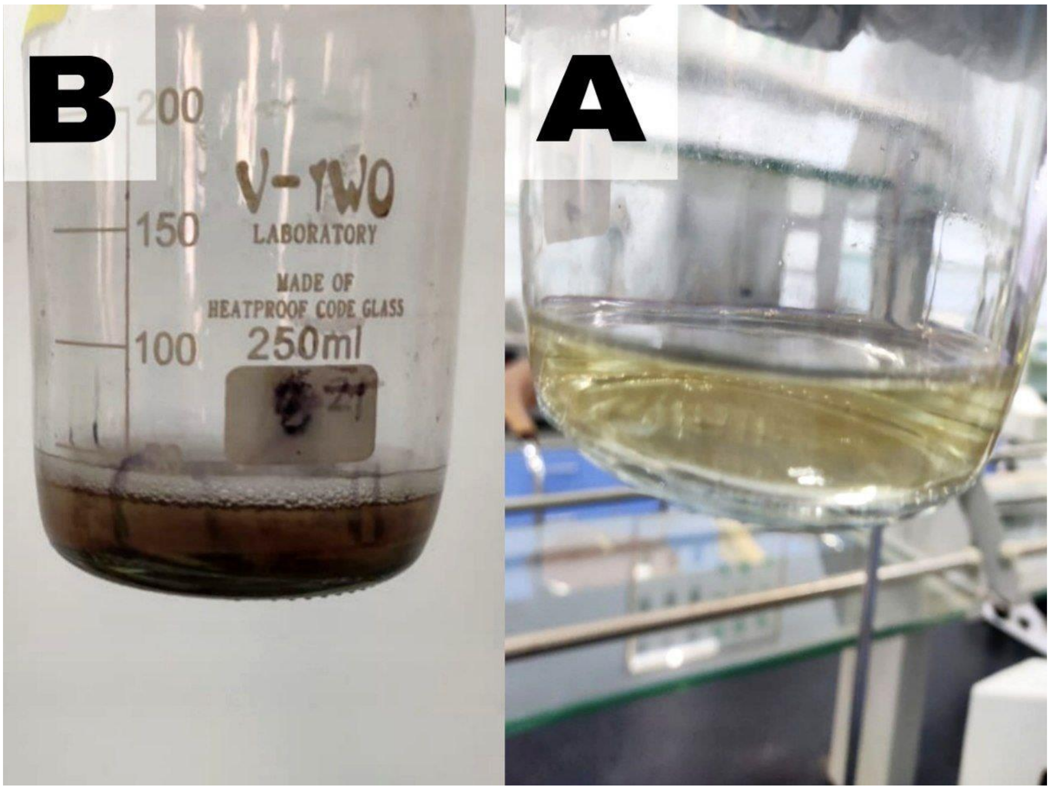
شكل (12) التغير اللوني من الأصفر الى البني الداكن لراشح مزرعة الفطر
A.tubingensis strain Zbf-R10



شكل (13) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر *A. tubingensis* strain HRb



شكل (14) التغير اللوني لراشح الفطر *A. fumigatus* isolate AZ-AR123



شكل (15) التغير اللوني لراشح الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO16

4-3-توصيف جسيمات الذهب النانوية

4-3-1 التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية UV-Visiible

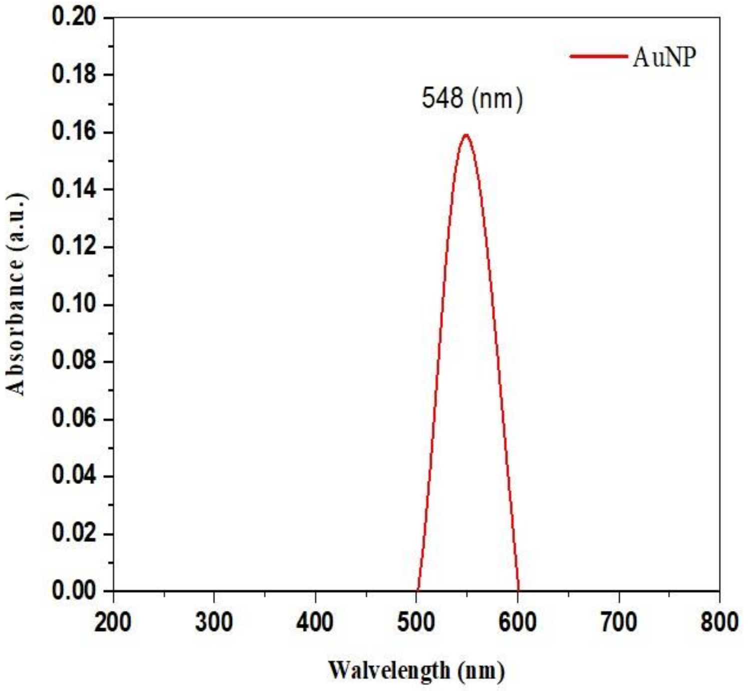
يعتبر التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية المرئية هو التقنية الأساسية الفعالة لتأكد تخليق جسيمات الذهب النانوية (Folorunso *et al.*, 2019) لذلك استخدم جهاز مطياف الاشعة المرئية فوق البنفسجية UV للكشف عن جسيمات الذهب النانوية المصنعة حيويا من الرواشح الفطرية عند الاطوال الموجية (200-800) نانومتر بعد حدوث التغير اللوني لها. أظهرت رواشح المزارع الفطرية قمم امتصاص مختلفة عند اطوال موجية محددة كما في الجدول (4-2).

جدول (4-2) قيم امتصاصية جسيمات الذهب النانوية المخلقة من الرواشح الفطرية قيد الدراسة:

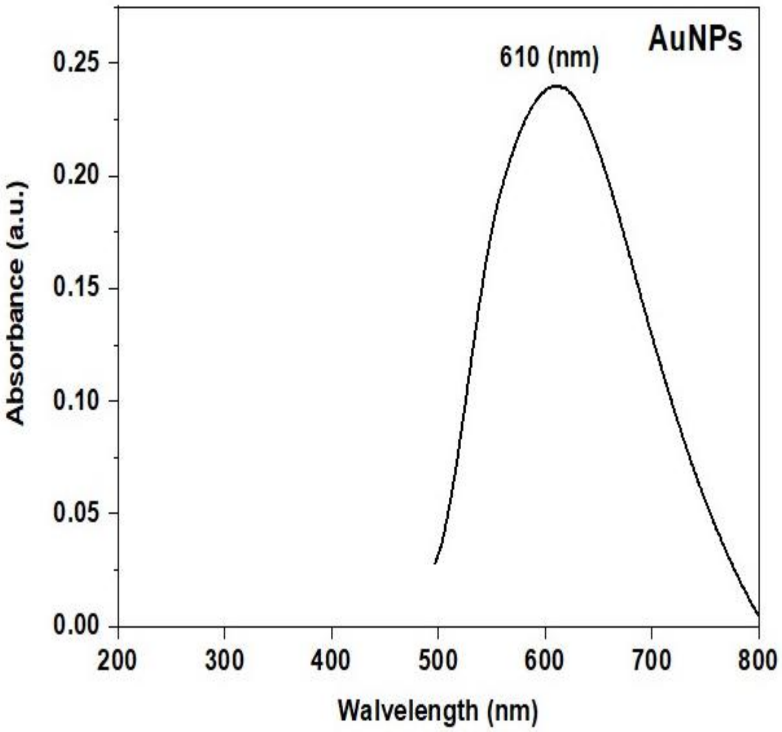
شدة الامتصاصية max_{λ}	قيمة الطول الموجي (nm)	اسم الفطر
0.16	548	*A.tubingensis* strain Zbf-R10
0.24	610	*A.tubingensis* strain HRb
0.04	569	*A.fumigatus* isolate AZ-AR123
0.5	551	*P.citrinum* isolate MEBPOO16

يعود ظهور حزم الامتصاص في المنطقة المرئية بسبب التذبذب السطحي لبلازمون ألكترونات التوصيل والتي تقترن من خلال السطح مع المجالات الكهرومغناطيسية الخارجية وهذه اهم احد الخصائص البصرية لجسيمات الذهب النانوية التي تختلف عن معدنه السائب (Ogarev *et al.*, 2018; Ghosh and Pal, 2007) لذلك تم فحص تخليق جزيئات الذهب النانوية بإستعمال التحليل الطيفي المرئي للاشعة فوق البنفسجية في المنطقة المرئية (800-200) نانومتر (Basiratina *et al.*, 2021;Shabestarian *et al.*, 2016).تتأثر قيمة الاطوال الموجية بحجم واشكال الجسيمات النانوية الناتجة فكلما كبر حجم الجسيمات زاد الطول الموجي (Aldrich, 2015).كما اكدت دراسات متعددة على تقارب الطول الموجي لجسيمات الذهب النانوية مع اغلب النتائج التي حصلنا عليها حيث ذكرت

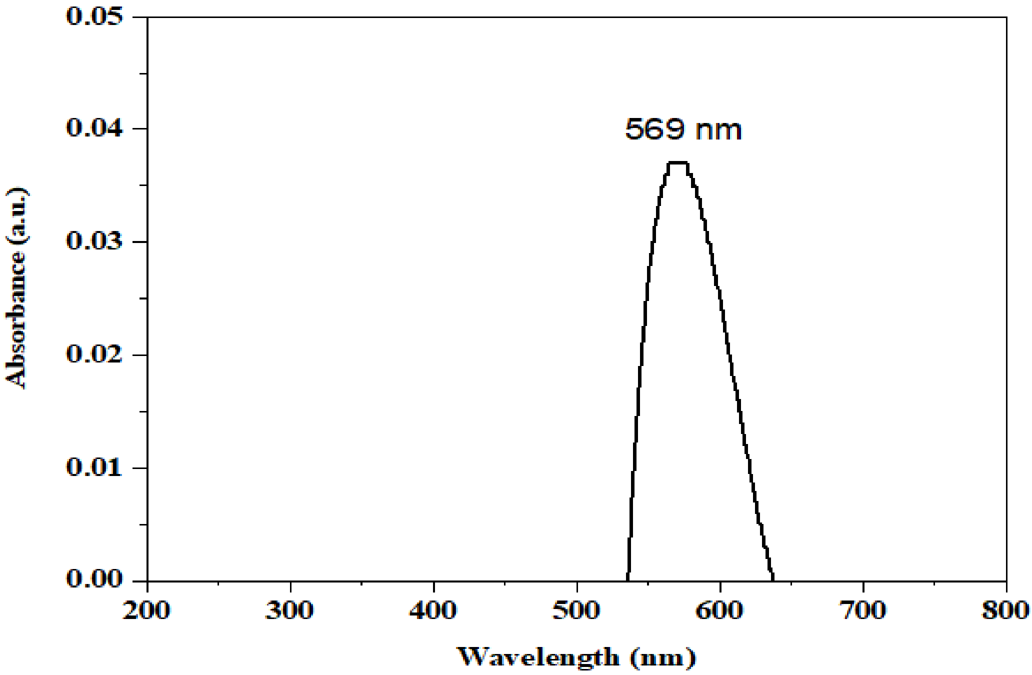
دراسة Thakker وأخرون ، (2013) ان جسيمات الذهب النانوية المصنعة خارج الخلايا من مستخلص فطر *Fusarium oxysporum* تظهر قمة امتصاص 530 نانومتر عند شدة امتصاص 3.5 .وفي دراسة أخرى أظهرت نتائج تصنيع جسيمات الذهب النانوية التي اجراها Abu-Tahon واخرون ،(2020) تمتلك امتصاصية عالية بحدود 545 نانومتر عند درجة حرارة 30 م° خلال دقيقتين من مزج محلول كلوريد الذهب براشح الفطر الخالي من الخلايا بإستعمال الفطر *Aspergillus flavus*. كما اثبتت دراسة اجراها Du واخرون ،(2011) ان جسيمات الذهب النانوية كان امتصاصيتها للضوء المرئي 545 نانومتر بدرجة 28 م° بعد فترة حضن دقيقة واحدة من فطر *Pencillium spp*. واظهرت جسيمات الذهب النانوية المخلقة من الفطر المستنبت *F.solani* رنين بلازموني عند الطول الموجي 560 نانومتر (Clarance *et al*., 2020).



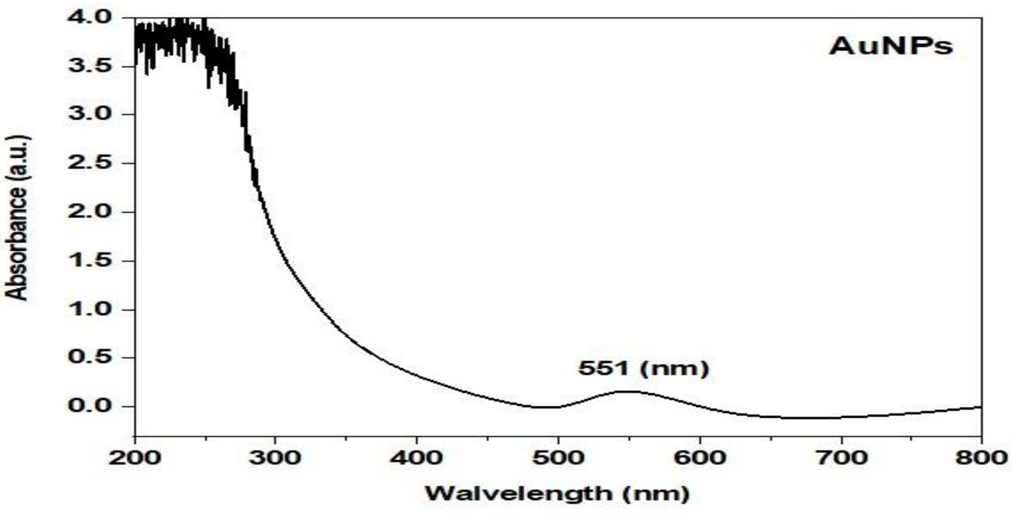
شكل (16) طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة الفطر *A.fumigatus* strain Zbf-R10



شكل (17) طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح الفطر *A.fumigatus* strain Zbf-R10



شكل (18) طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح الفطر *A. fymigatus* strain AZ-AR123

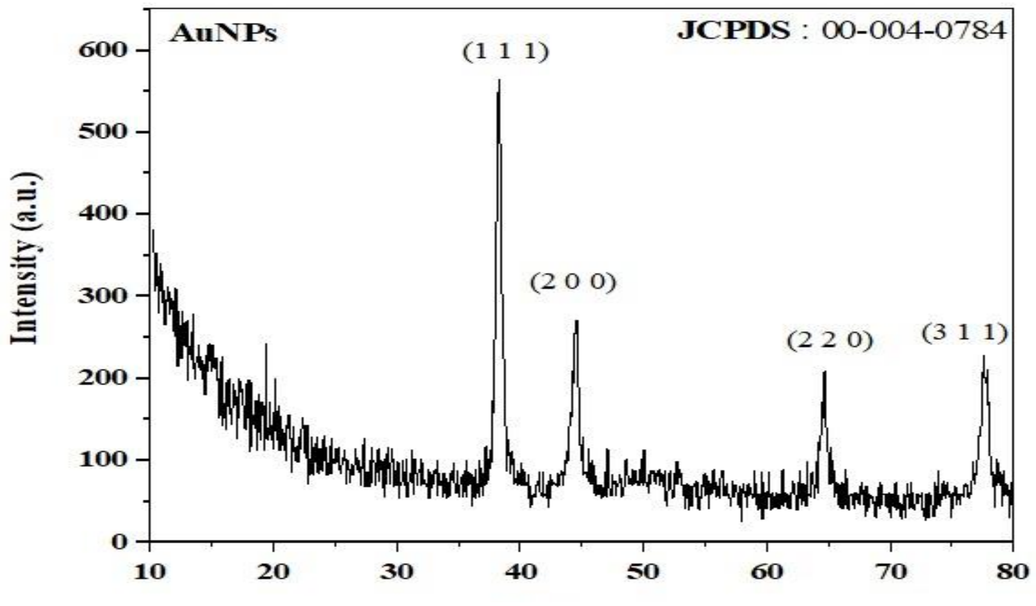


شكل (19) طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة الفطر *P. citratum* isolate MEBPOO1

4-3-2- حيود الاشعة السينية XRD

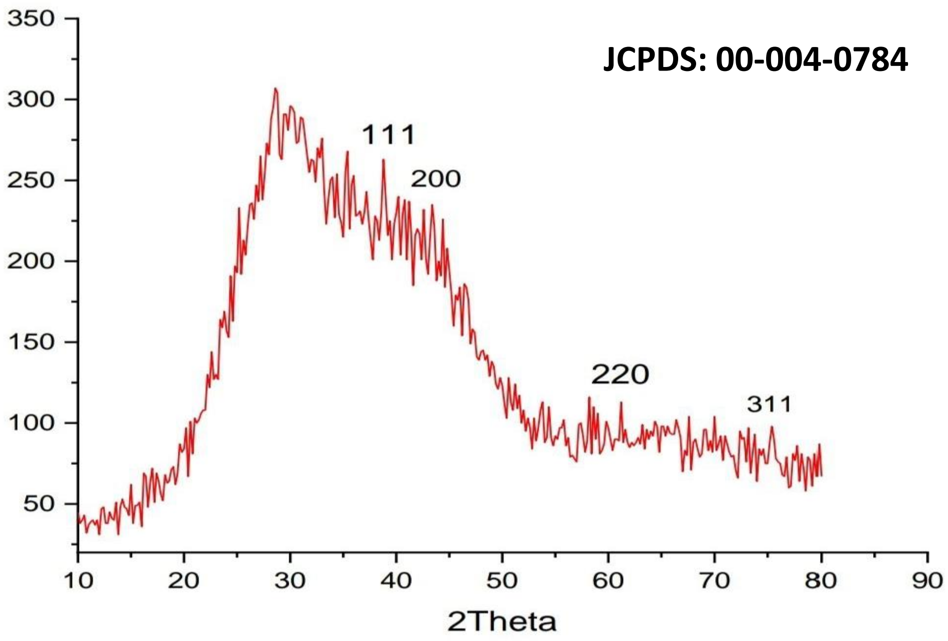
أظهرت نتائج تحليل طيف حيود الأشعة السينية لجسيمات الذهب النانوية المصنعة حيويا من مستخلص الفطريات المعزولة من النسيج الداخلي للنباتات قيد الدراسة توافق القيم التي تم الحصول عليها مع انعكاسات براغ عند زاوية 2Ө مع ملف بيانات JCPDS رقم (04-0784) كمرجع معياري لجسيمات الذهب النانوية مما يدل على ان الجسيمات الذهبية المخلقة هي ذات طبيعة بلورية تميل الى امتلاكها بنية مكعبة متمركزة الوجه. إذ خضعت اربع عزلات من هذه الفطريات الى فحص حيود الاشعة السينية XRD لاثبات التركيب البلوري وإيجاد متوسط حجم الجسيمات النانوية المخلقة بإستعمال معادلة ديبي-شيرر Debye-Scherrer . إذ اظهر راشح الفطر *A.fumigatus* strain Zbf-R10 اربع انعكاسات براغ (111)،(200)،(220)،(311) للزوايا 38.2°،44.5°،64.6°،77.6° على التوالي شكل (20) وكان معدل حجم الجسيمات النانوية بإستعمال معادلة ديبي شيرر 25.31 نانومتر. كما اظهر شكل (21) حيود الاشعة السينية XRD للجسيمات النانوية المخلقة بواسطة راشح الفطر *A. tubingensis* strain HRb حيث لوحظ التركيب البلوري للقمم عند زوايا 38.2°، 44.2°، 64.5°، 77.3° على التوالي والتي تتقابل مع المستويات البلورية لقمم انعكاسات براغ وهي (111)،(200)،(220)،(311)، وتمتلك هيكل

مكعب متمركز الوجه FCC مطابقة الى بطاقة التعريف JCPDS رقم 04-0784 الخاصة بالذهب.وكان معدل حجم الجسيمات النانوية بإستعمال معادل ديبي- شيرر-Debye Scherrer 7.4 نانومتر .اما شكل (22) يوضح حيود الاشعة السينية للفطر *A.fumigatus* isolate AZ-AR123 وشدة الحزمة المنقسمة كدالة لزاوية الحيود ، والقمم شوهدت في الشكل عند زوايا حيود 38.3° ،44.1°،66.4°، 77.5° على التوالي لهيكل مكعب متمركز الوجه بمعدل حجم بلوري يساوي 14.2 نانومتر عند القمة (111) حسب معادلة شيرر كما شوهدت بعض القمم في جميع العينات قبل زاوية الانعراج البالغة 37.3° والسبب في ذلك هو ان العينات تحتوي أيضا على مكونات عضوية بالإضافة الى جزيئات الذهب (Ashokkumar *et al*., 2016; Iranmanesh *et al*., 2020).اما الشكل (23) يكشف عن قمم قوية في جميع انحاء نمط طيف الاشعة السينية XRD لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *P.citratum* isolate MEBPOO1من قيم 2Ө تتراوح من 10 درجة الى 80 درجة فكانت قيم الزوايا من 38.3°،44.4°،64.2°،77.2° والتي تتوافق مع انعكاسات براغ (111)،(220)،(200)،(311) وهي المعايير لحيود XRD لهياكل ذهبية بلورية نقية مع هيكل مكعب متمركز الوجه fcc ،وبإستعمال معادلة ديبي شرر-Deby sherrer كان متوسط احجام البلورات لجزيئات الذهب النانوية في نطاق الذروة (111) كان 16.1 نانومتر .وهذه النتائج تتوافق مع نتائج كثير من الدراسات لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من المستخلصات الفطرية منها (Gopinath & Armugam, 2014; Amendola *et al*., 2017; Manjunath *et al*., 2017)



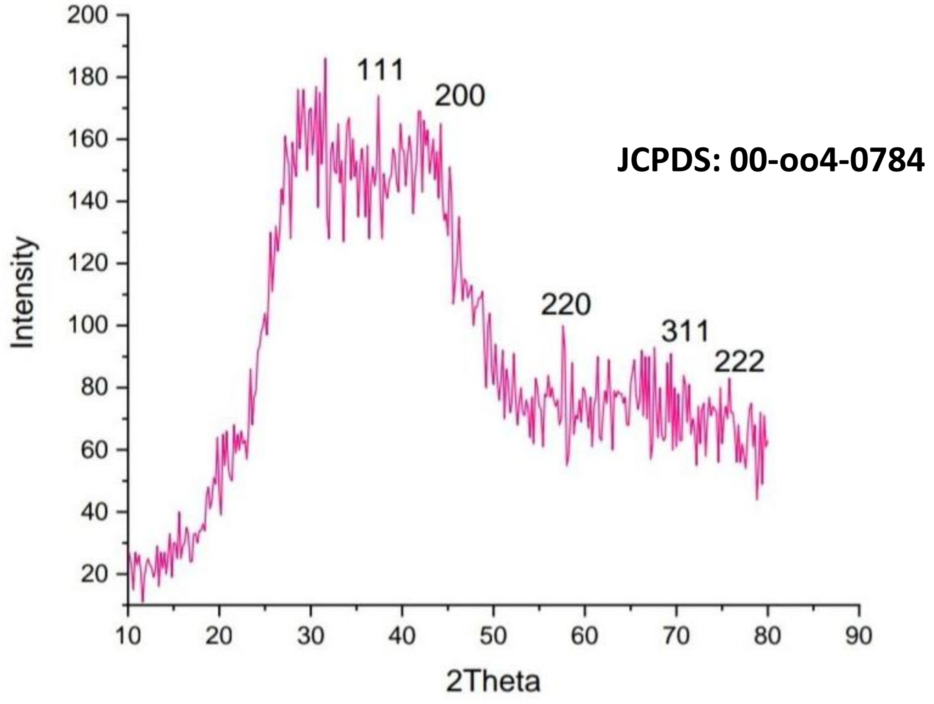
2Theta

شكل (20) نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من فطر
A.fumigatus strain Zbf-R10

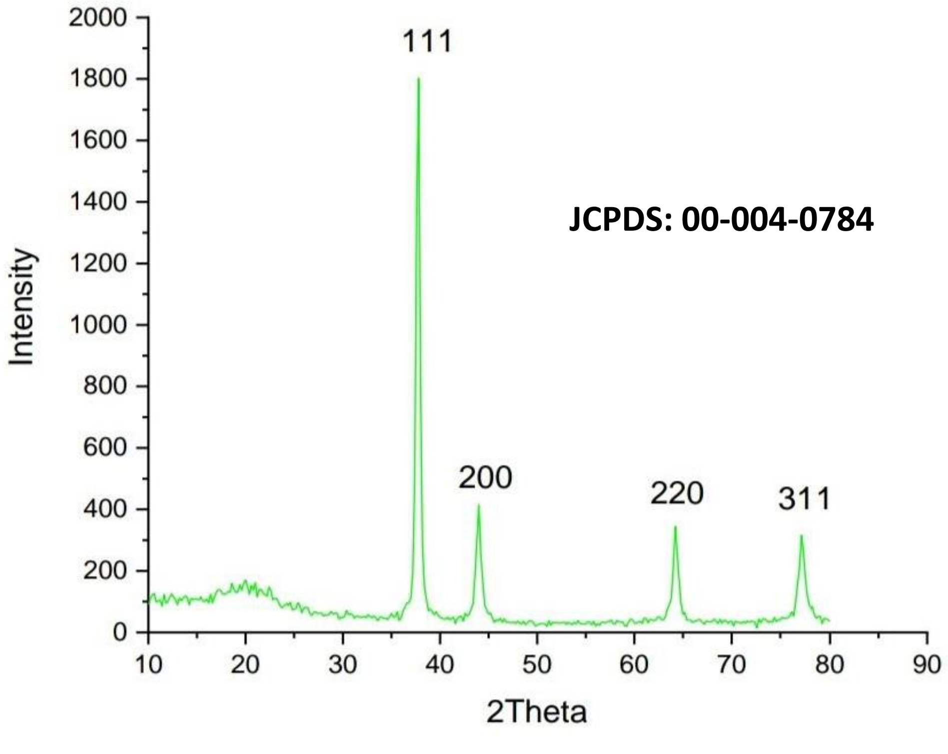


شكل (21) نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من الفطر

A.tubingensis strain HRB



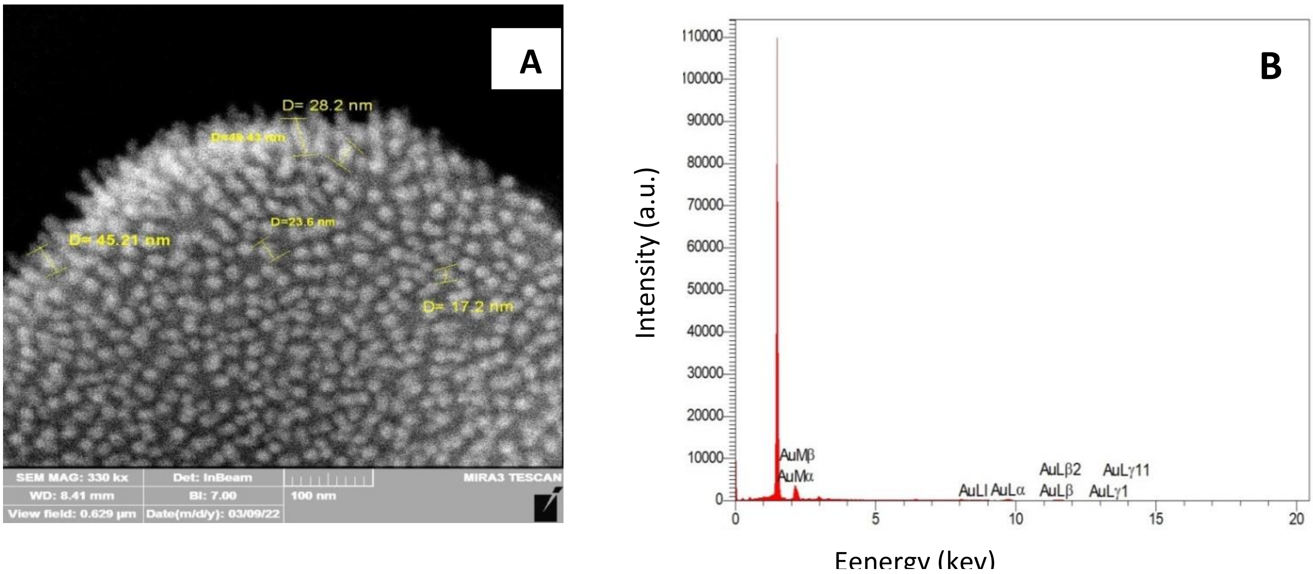
شكل (22) نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من الفطر
A.fumigatus isolate AZ-AR123



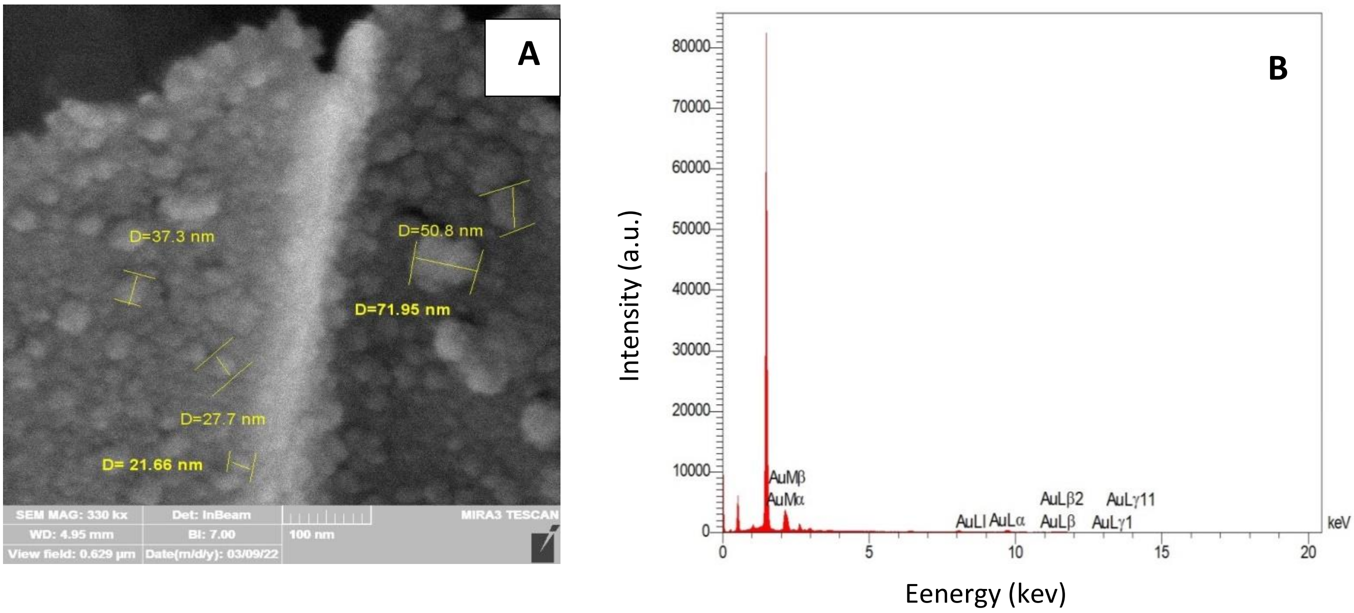
شكل (23) نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من الفطر
P.citrinum isolate MEBPOO16

4-3-3- المجهر الالكتروني الماسح للانبعاث المجالي Field emission Scanning Electron Microscope وEDX

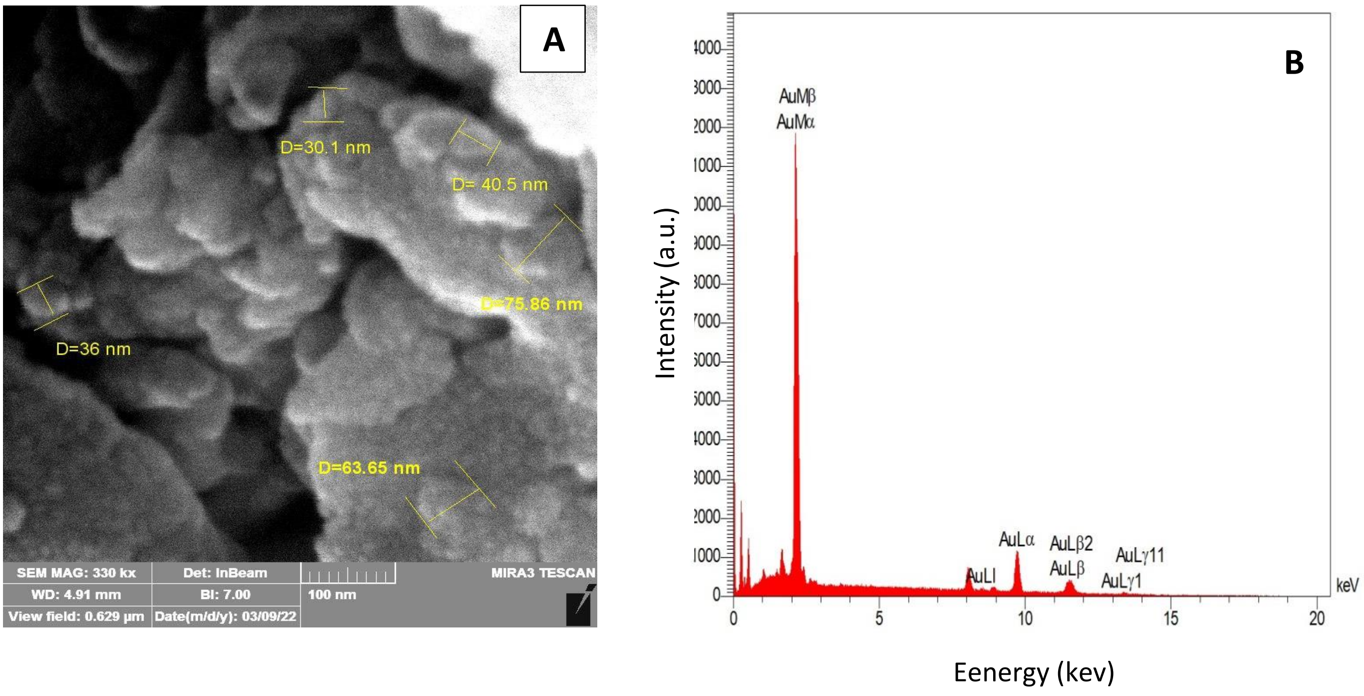
تم فحص التشكل السطحي والتركيبي والحجم والشكل لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من الرواشح المائية المستخلصة لثلاث من الفطريات المعزولة من الانسجة الداخلية للنباتات قيد الدراسة بإستعمال المجهر الالكتروني الماسح. فقد أظهرت غالبية الصور لجسيمات الذهب النانوية المصنعة من راشح الفطر *A.tubingensis* strain HRb لها شكلا كرويا وعلى شريط مقياس يبلغ 100 نانومتر عثر على جسيمات ذهب نانوية بأحجام تتراوح من 17-49.43 نانومتر شكل (24).في حين أظهرت جسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus* isolate AZ-AR123 صور متجانسة من حيث الشكل واحجام تتراوح من 21-71.9 نانومتر كما يمكن رؤية التضاريس السطحية لجسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا واشكالها الكروية الواضحة شكل (25).كما تظهر صور SEM لجسيمات الذهب النانوية المصنعة من راشح الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO16 بعض التجمعات واشكالا كروية تقريبا لجسيمات الذهب النانوية وتتراوح الاحجام مابين 30-40 نانومترشكل (26). و يظهر تحليل الاشعة السينية المشتتة للطاقة EDX عن قمم امتصاص بصرية حادة ومكثفة تكشف عن تأكيد وجود عنصر الذهب وذلك من خلال اظهار اقوى إشارة بصرية إذ تظهر البلورات النانوية الذهبية المعدنية قمة امتصاص بصرية قوية تصل الى 2.15 كيلو فولت وهو امر نموذجي للامتصاص لبلورات الذهب النانوية (Ramezani *et al.*, 2008).



شكل (24)A صور المجهر الالكتروني FESEM وB نمط EDX لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.tubingensis* strain HRb



شكل (25) A صور المجهر الالكتروني FESEM و B نمط EDX لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus* isolate AZ-AR123

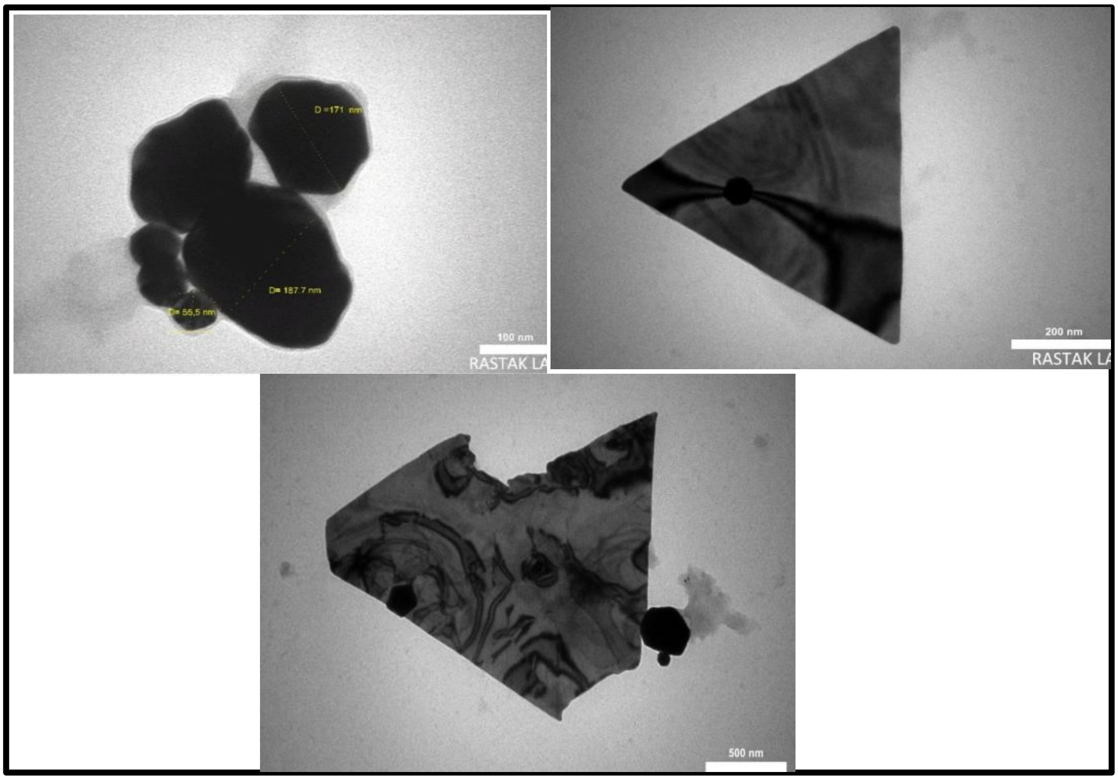


شكل (26)A صور المجهر الالكتروني FESEM و B نمط EDX لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO16

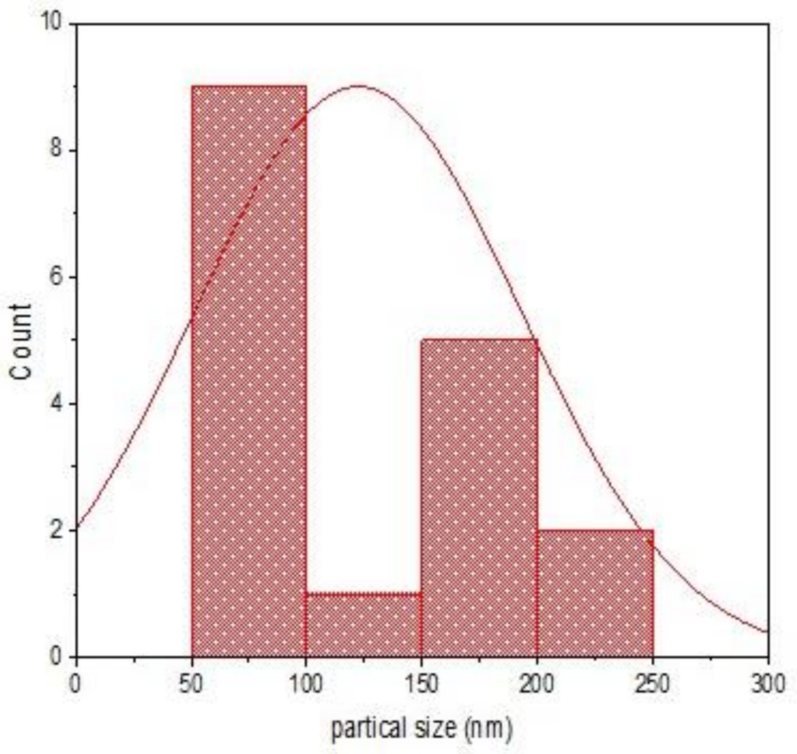
4-3-4- المجهر الالكتروني النافذ Transmission Electron Microscope

تم استخدام المجهر الالكتروني النافذ عالي الدقة TEM لغرض تحديد شكل وحجم جسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا من الرواشح الفطرية قيد الدراسة، إذ لوحظ في شكل (27) جسيمات الذهب النانوية المصنعة من راشح الفطر *A.tubingensis* strain HRb ذات احجام كبيرة تتراوح من 55-187 نانومتر وهذ يتوافق مع نتيجة طيف الاشعة البنفسجية UV كلما زادت قيمة الطول الموجي يشير الى كبر حجم الجسيمات النانوية (Haiss *et al.*, 2007)،إذ كانت الجسيمات الأصغر ذات الحجم 55 نانومتر ذات اشكال كروية ومثلثة تقريبا في حين الجسيمات الكبيرة التي يبلغ حجمها 187 نانومتر تعرض مجموعة من الاشكال الهندسية بما في ذلك المثلثات والمثلثات المقطوعة والخماسيات والسداسيات وهذه الاشكال تعتبر اشكالا هندسية نموذجية لجسيمات الذهب النانوية

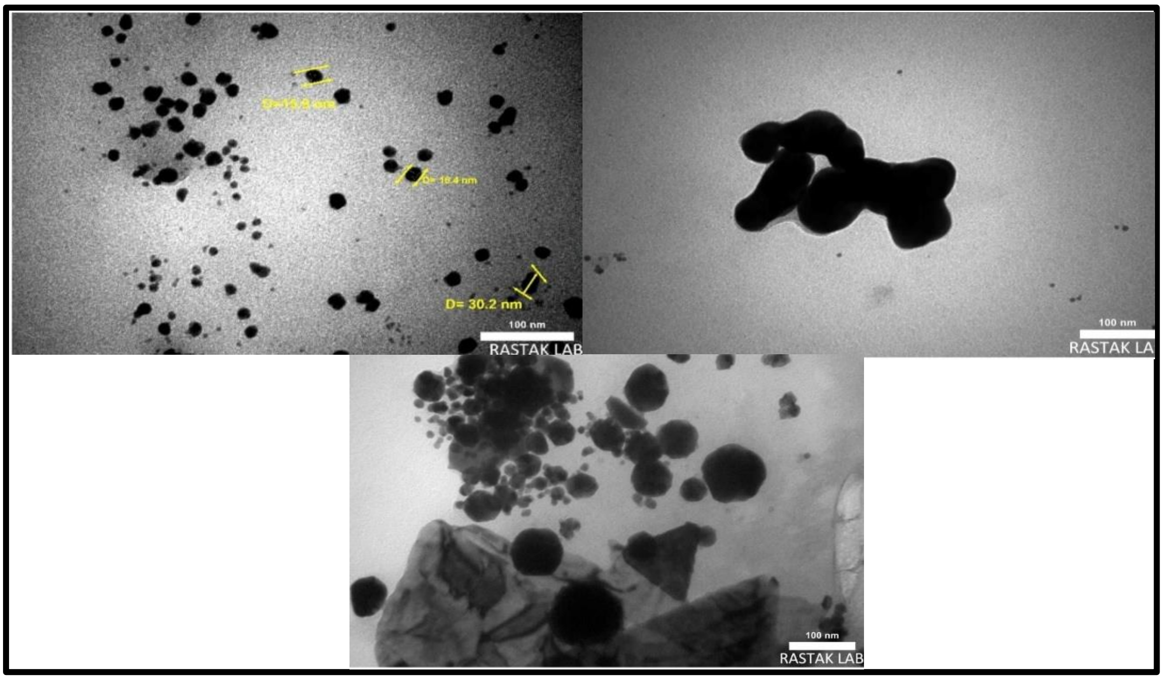
(Jadoun *et al*., 2021) وكان متوسط حجم هذه الجسيمات 122 نانومتر تم حسابه من مخطط توزيع المدرج التكراري histogram distribution شكل (28).كما كانت جسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus* isolate AZ-AR123 كروية الشكل وتتراوح احجامها من 15-30 نانومتر بمعدل حجم 14.5 نانومتر شكل (29) و (30).اما راشح الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO16 أظهرت صور المجهر الالكتروني جسيمات ذات احجام تتراوح من 12-40 نانومتر وكانت الاحجام الصغيرة للجسيمات بحدود 16.2 نانومتر ذات اشكالا كروية ومثلثة نسبيا اما الجسيمات ذات الحجام 33 نانومتر ذات اشكالا سداسية شكل (31) وكان متوسط حجم الجسيمات 12.5 نانومترشكل (32).في حين كانت احجام جسيمات الذهب النانوية المصنعة من راشح الفطر *A.fumigatus* strain Zbf-R10 تتراوح من 13-40 نانومتر ذات اشكالا كروية مع وجود بعض التجمعات للجسيمات النانوية شكل (33) وكان متوسط حجم جسيماتها 23 نانومتر شكل (34).يعتبر تحديد حجم وشكل جسيمات الذهب النانوية مهم لأنه يحدد اغلب الخصائص الفيزيائية والكيميائية مثل الرنين البلازموني والفعالية المايكروبية والتحفيز وغيرها (Ramalingam, 2019; Cheeseman *et al*., 2020).



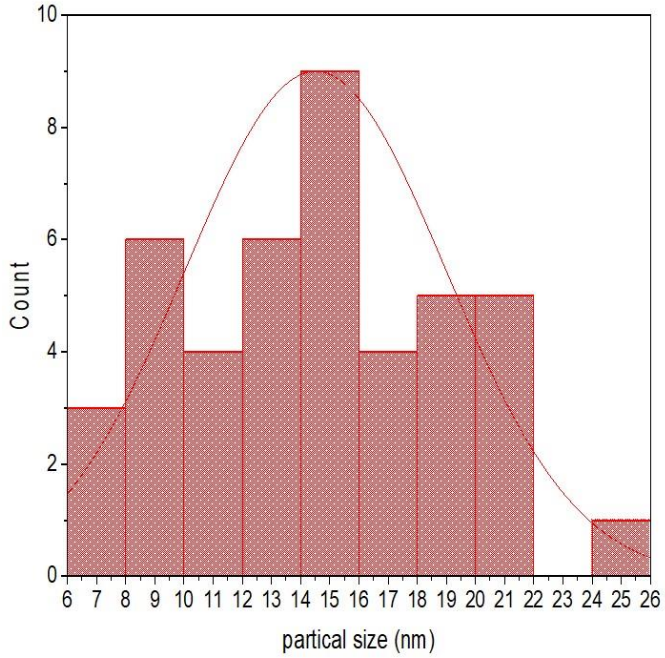
شكل (27) صور TEM لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.tubingensis* strain HRb



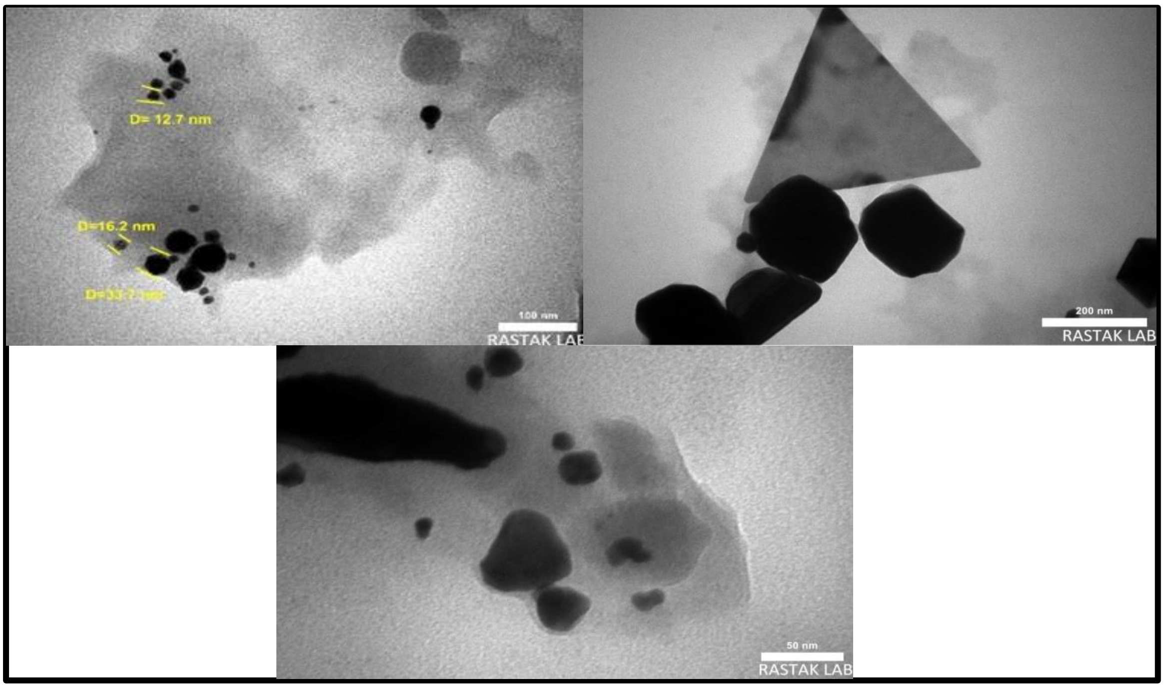
شكل (28) توزيع الحجم لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.tubingensis* strain HRb



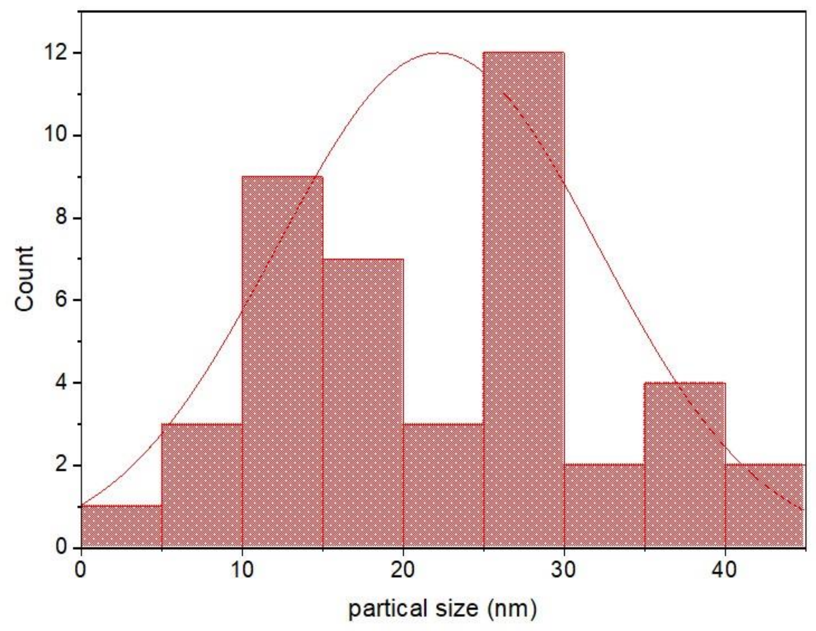
شكل (29) صور TEM لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.fumigatus* isolate AZ-AR123



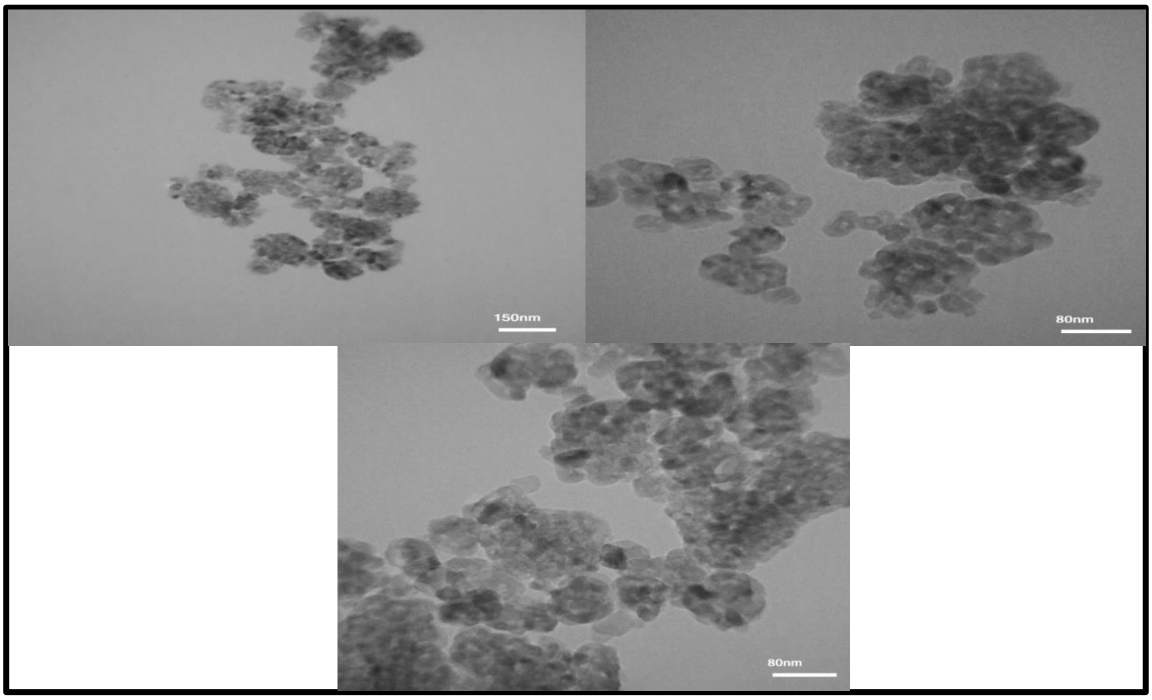
شكل (30) توزيع حجم جسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.fumigatus* isolate
AZ-AR123



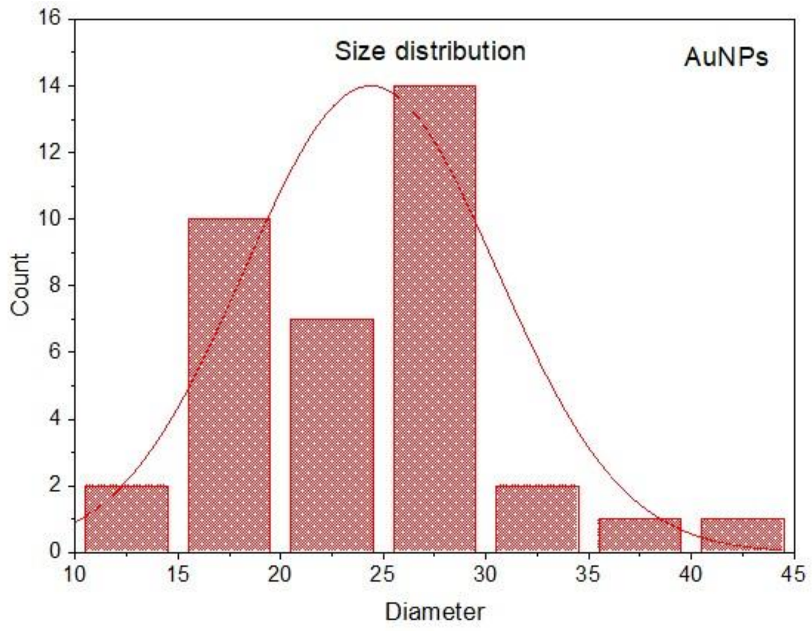
شكل (31) صور TEM لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *P.citrinum* isolate
MEBPOO16



شكل (32) توزيع الحجم لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO16



شكل (33) صور TEM لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.fumigatus* strain Zbf-R10

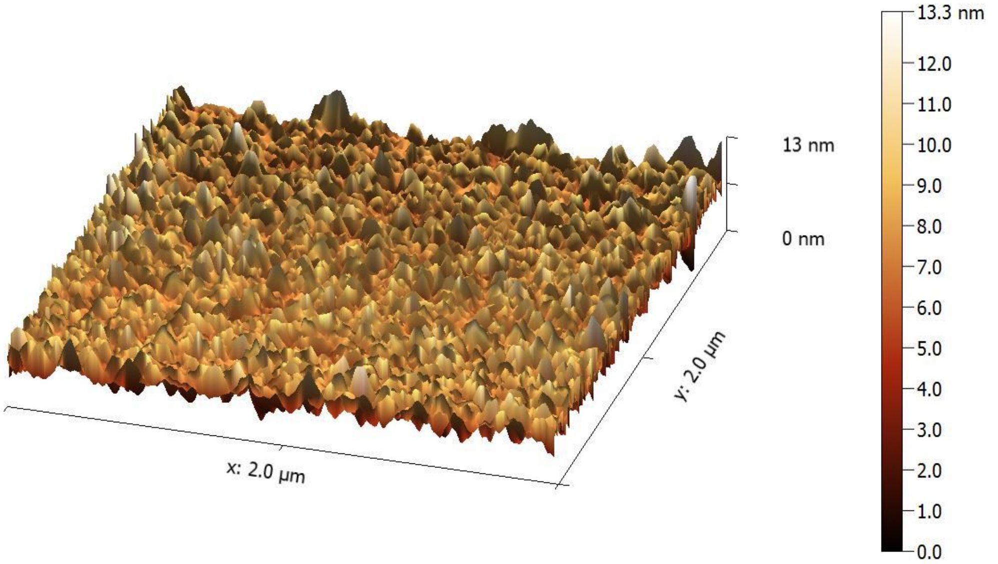


شكل (34) توزيع حجم جسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.fumigatus* strain Zbf-R10

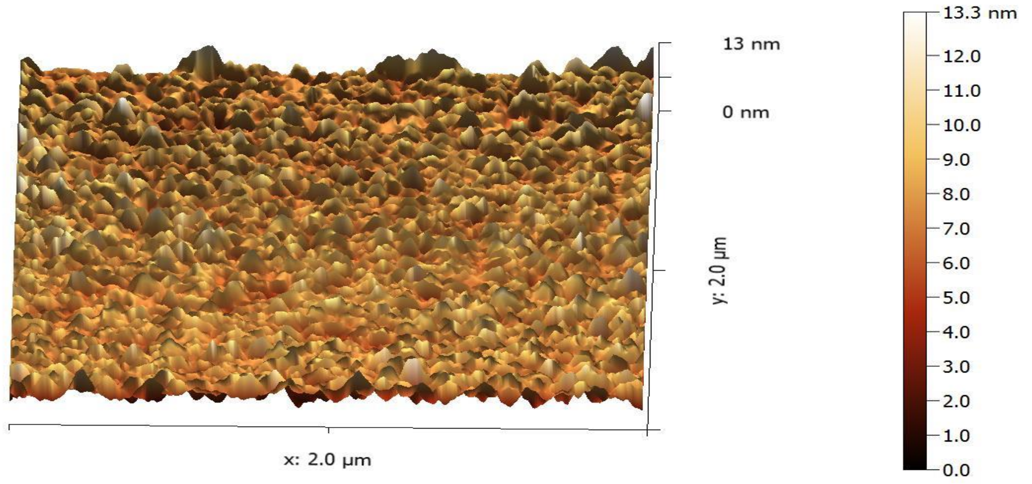
4-3-5- مجهر القوى الذرية Atomic force microscope

تستخدم تقنية الفحص المجهري للقوى الذرية AFM لمعرفة وفهم الاشكال والتضاريس والخشونة والنتوءات للأسطح من خلال هذا الفحص إذ يتم تمثيل العديد من الجسيمات والجزيئات بارتفاعات وبنية السطح مما يجعل من الممكن اجراء قياسات كمية لميزات السطح والوصول الى صور ثنائية وثلاثية الابعاد وتحليلها من جهات مختلفة (Salman & Abd, 2021).إذ كشفت صور المجهر الالكتروني AFM لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.tubingensis* strain HRbصورا ثلاثية الابعاد وثنائية الابعاد وانها كروية الشكل وذات احجام اقل من 100 نانومتر وهو ما يتوافق مع نتائج FESEM وتكون الجسيمات النانوية موزعة بشكل موحد الارتفاع حوالي 13 نانومتر شكل (35) و (36).اما راشح الفطر *A.fumigatus* isolate AZ-AR123 نلاحظ صور ثلاثية وثنائية الابعاد لجسيمات الذهب النانوية المخلقة إذ توضح هذه الصورة توزيع غير متكتل ومتعدد التشتت مع توزيع موحد لارتفاع الجسيمات النانوية حوالي 8.9 نانومتر وبمتوسط حجم حوالي 18.85 نانومتر شكل (37) و(38) .كما يعرض الشكل (39) و(40)

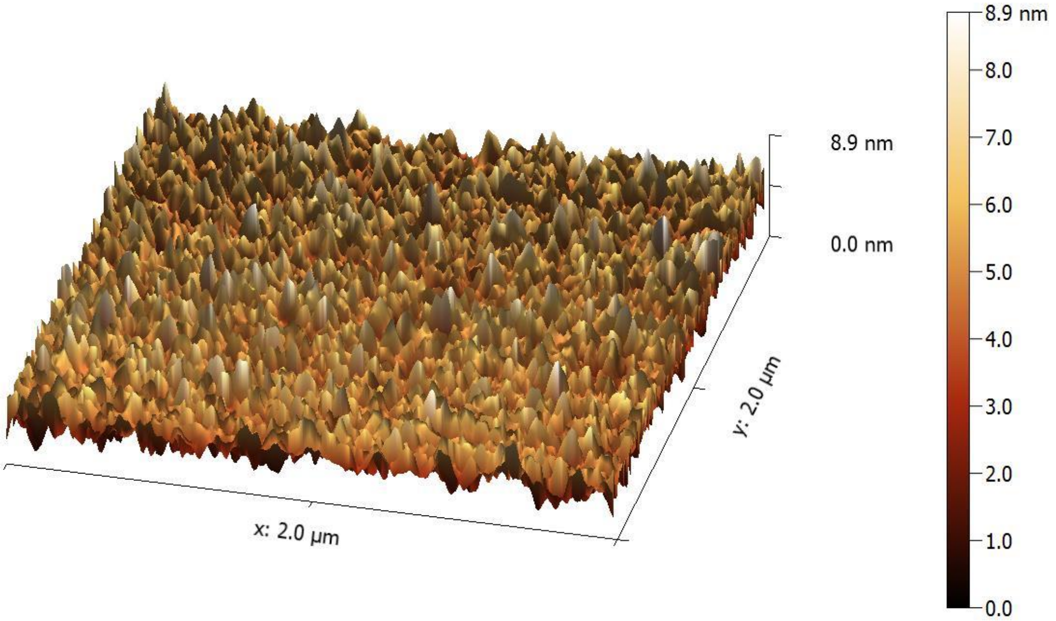
صور طوبوغرافية ثلاثية الابعاد وثنائية الابعاد لسطح جسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO16 بسمك 12 نانومتر وبمتوسط توزيع حجم جسيمات الذهب النانوية 43.48 نانومتر في مخطط توزيع التراكم الحبيبي وبأحجام تتراوح من 40-60 نانومتر .



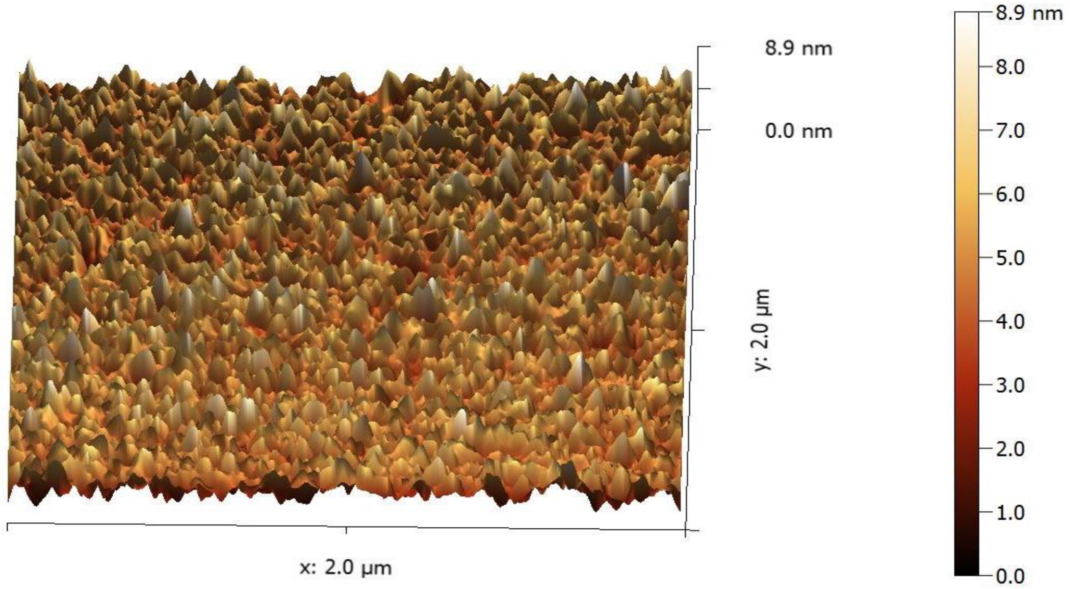
شكل (35) صورة ثلاثية الابعاد لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.tubingensis* strain HRb



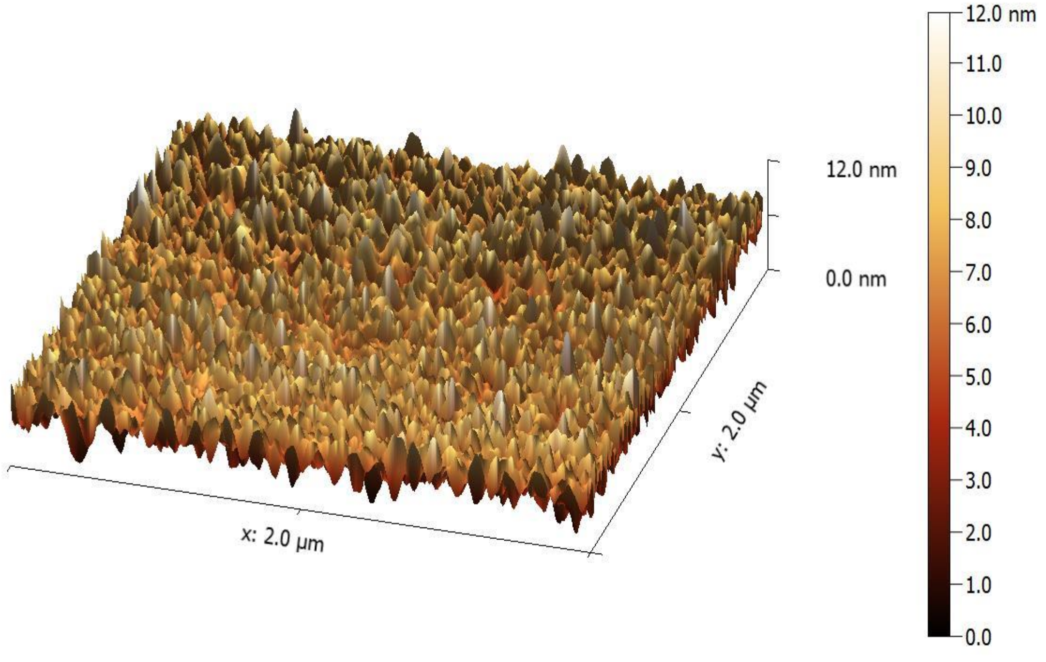
شكل (36) صورة ثنائية الابعاد لجسيمات الذهب النانوية للفطر *A.tubingensis* strain HRb



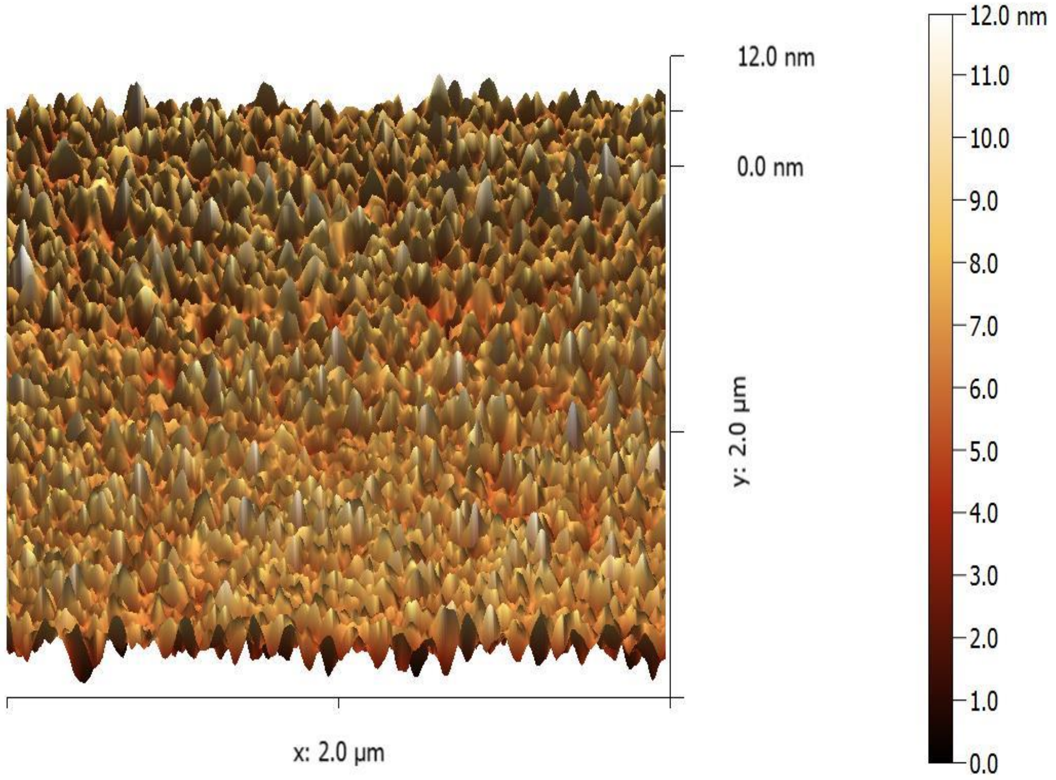
شكل (37) صورة ثلاثية الابعاد لراشح الفطر *A.fumigatus* isolate AZ-AR123



شكل (38) صورة ثنائية الابعاد لجسيمات الذهبِ النانوية للفطر *A.fumigatus* isolate AZ-AR123



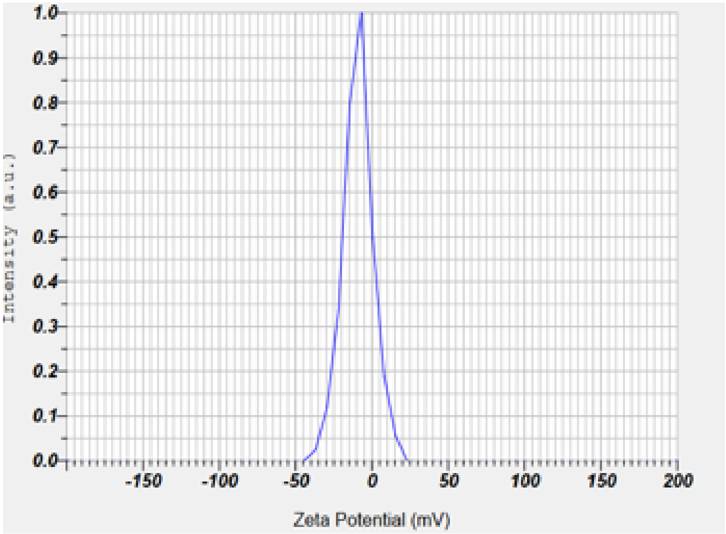
شكل (39) صورة ثلاثية الابعاد لراشح الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO16



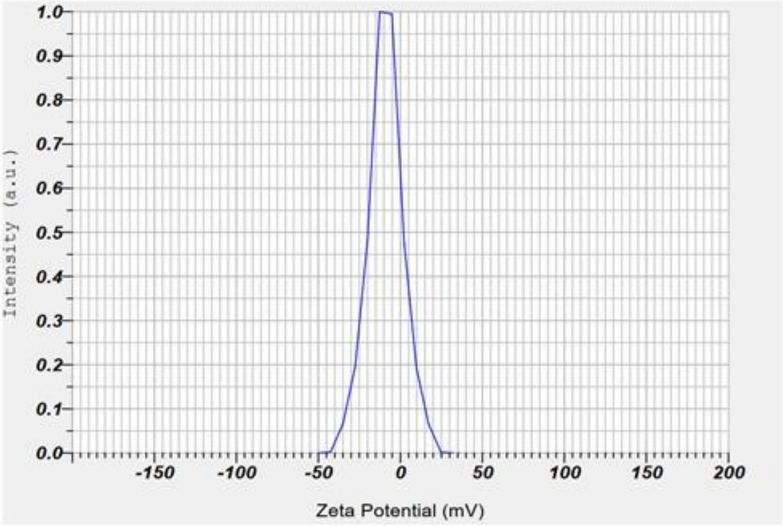
شكل (40) صورة ثنائية الابعاد لراشح الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO16

4-3-6- جهد زيتا

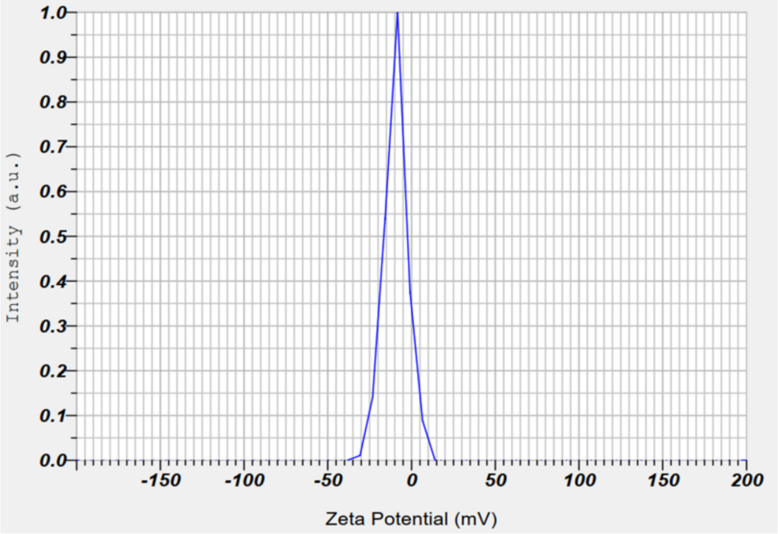
تم استخدام قياس جهد زيتا لمعرفة مدى استقرارية جسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا من الرواشح الفطرية قيد الدراسة ،حيث يعطي جهد زيتا مؤشر لاستقرارية الجسيمات النانوية داخل محلولها الغروي (Bhattacharjee,2016).تم تسجيل شحنة سطحية سالبة بإستعمال جهد زيتا لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.tubingensis* strain HRb بقيمة -9.1 مللي فولت كما في الشكل (41) إذ تشير هذه القيمة السالبة الى جودة جيدة فيما يتعلق بتجمع الجسيمات النانوية ويرجع سبب ذلك ان جسيمات الذهب النانوية محاطة بجزيئات عضوية ذات قيمة سالبة مما يقلل التجاذب بين جسيمات الذهب النانوية ويمنع التجمع وبالنهاية يزيد من استقرارية الAuNPs (Owaid *et al*., 2019).كما يوضح الشكل (42) قيمة محتملة لجهد زيتا عند -8.9مللي فولت لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus* isolate AZ-AR123 تشير هذه النتيجة الى ان سطح الجسيمات النانوية سالبة الشحنة (Deepak *et al*., 2018) والتي تشكل قوة طرد repelling force تساهم في استقرار جسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا بمرور الوقت (Galucio *et al*., 2022).في حين أظهرت جسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO16 إمكانات جهد زيتا عند -9.4 مللي فولت مع ذروة واحدة حادة شكل (43).قد تكون المواد البوليفينولية التي يطلقها الفطر هي سبب الشحنة السالبة لجسيمات الذهب النانوية وهذا الجهد السالب يفرض التباعد بين الجسيمات النانوية (Lee *et al*., 2020) مما يشير ان الجسيمات ليس لها الفة التجمع .كما ان القيمة المنخفضة لجهد زيتا يشير الى زيادة حجم الجسيمات النانوية المخلقة حيويا (Khan *et al*., 2020).



شكل (41) جهد زيتا لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.tubingensis* strain HR



شكل (42) جهد زيتا لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *A.fumigatus* isolate AZ-AR123



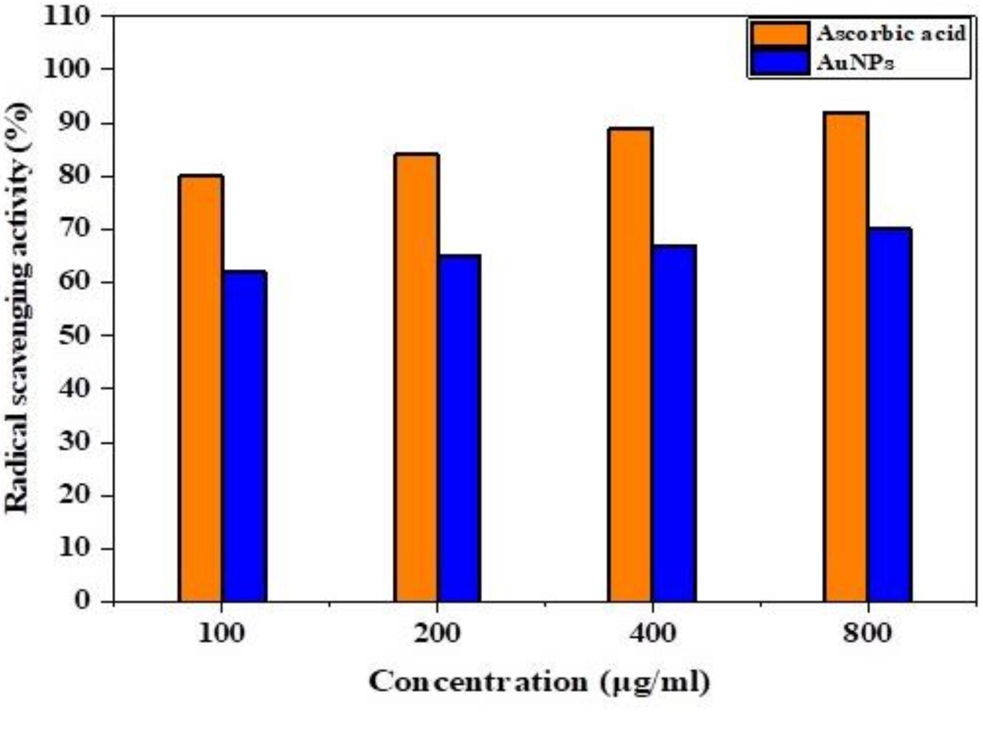
شكل (43) جهد زيتا لجسيمات الذهب النانوية لراشح الفطر *P.citrinum* isolate MEBPOO16

4-4- تأثير جسيمات الذهب النانوية المخلقة كمضادات اكسدة

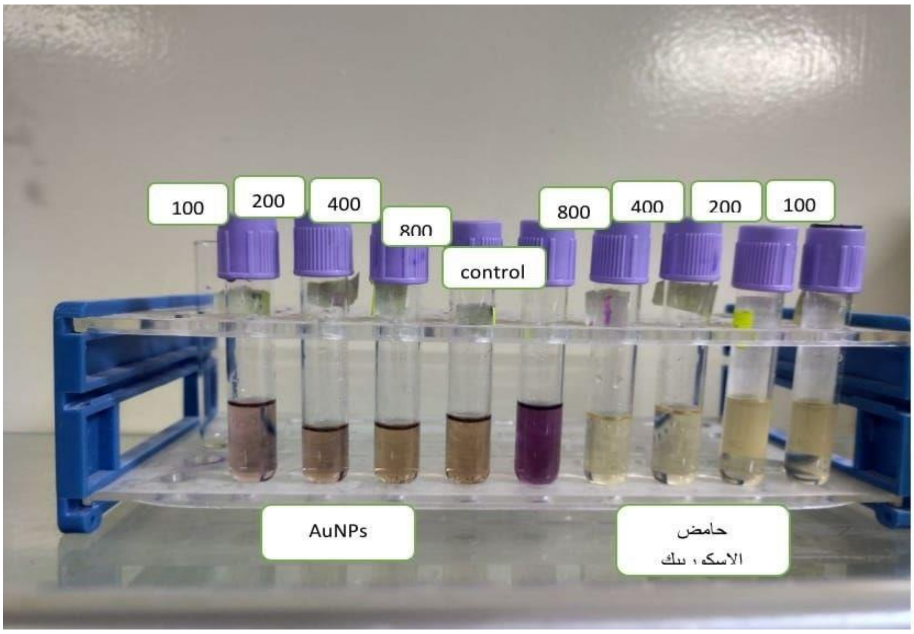
تم استخدام الجسيمات النانوية للذهب المخلقة من راشح الفطر *A.fumigatus* strain Zbf-R10 في تقييم النشاط المضاد للأكسدة لها بإستعمال مقياس الكسح الجذري لمركب (DPPH) حيث تم إيجاد الكسح الجذري اعتمادا على امتصاصية المحاليل المحضرة لكل من جسيمات الذهب النانوية وحامض الاسكوربيك بتراكيز (100,200,400,800) مايكروغرام لكل مل عند طول موجي 517 نانومتر،أظهرت النتائج ان اعلى نسبة لكسح الجذر الحر DPPH لجسيمات الذهب النانوية 71% عند تركيز 800 مايكرو غرام/مل وكانت اعلى نسبة لحامض الاسكوربك 91% عند نفس التركيز بينما كانت اقل فعالية للكسح الجذري عند تركيز 100 مايكرو غرام /مل شكل (44) وان تغير اللون من الارجواني الى الأصفر دليل على اختزال كل من جسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا للجذر الحر DPPH شكل (45) وتشير النتائج ان نشاط جسيمات الذهب النانوية كمضادات اكسدة يعتمد على التركيز وهذه النتيجة تتوافق مع دراسة Manjunath واخرون (2017)، التي بينت قدرة جسيمات الذهب النانوية المخلقة من الفطر *Pencilium*

citrinum المعزول من النباتات البحرية على الكسح الجذري وتمتلك فعالية معتمدة على التركيز.وايضا تتوافق مع دراسة Sanna واخرون ،(2014).

ان قدرة جسيمات الذهب النانوية المصنعة حيويا على كسح الجذر الحر DPPH او التقليل من نشاطه يتم بواسطة اختزاله ويحدث الاختزال نتيجة منح جسيمات الذهب النانوية او حامض الاسكوربك الالكترون او الهيدروجين للجذر الحر DPPH ويتحول الى مركب مستقر غير جذري وثابت نتيجة تقبله الالكترون او الهيدروجين، إذ يحصل تفاعل بين DPPH ومضادات الاكسدة يؤدي الى التنظيف الجذري نتيجة التبرع بالهيدروجين او الالكترون وعنده يتغير اللون من الارجواني الى الأصفر (Jabir *et al.*, 2019).اثبتت دراسات عديدة ان عوامل التغليف التي تحيط بجسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا بإستعمال الفطريات الداخلية مسؤولة عن زيادة نشاط الكسح الجذري لها وتعمل كمضادات اكسدة لاحتواءها على مجموعة الأمين (Siddiqi & Husen, 2017; Balakumaran *et al.*, 2022).



شكل (44) النسبة المئوية للكسح الجذري لحامض الاسكوربك ولجسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا من راشح الفطر A.fumigatus isolate Zbf-R-10



شكل (45) فعالية المضادة للاكسدة بطريق DPPH لحامض الاسكوربك ولجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر A.fumigatus isolate Zbf-R-10

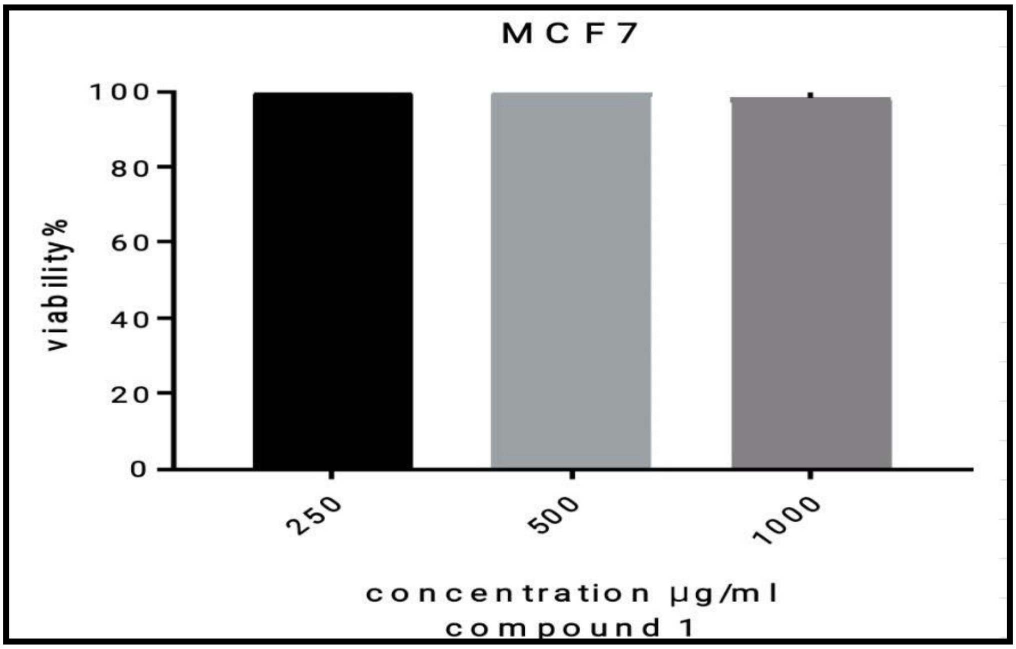
4-5- الفعالية المضادة للسرطان لجسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا ضد خط سرطان الثدي MCF-7:

استخدمت طريقة MTT لتقييم النشاط المضادة للأورام لجسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا من الرواشح الفطرية *A.tubingensis* strain HRb (عينة 1)و *A.fumigatus* isolate AZ-RA123 (عينة 2) و *P.citrinum* isolate MEBPOO16 (عينة 3) على خط سرطان الثدي البشريMCF-7. تم استخدام ثلاثة تراكيز لجسيمات الذهب النانوية لكل عينة (250,500,1000) مايكرو غرام / مل وبأربعة مكررات لكل تركيز وعند طول موجي 620 نانومتر وكذلك الكونترول (خلايا +وسط).إذ أظهرت النتائج ان العينة 1 والعينة 2 من جسيمات الذهب النانوية لم تظهر انخفاظا واضحا لحيوية الخلايا السرطانية بالتراكيز المذكورة على خط سرطان الثدي MCF-7 بعد 72 ساعة من الحضانة وعند 37 م° اما العينة 3 فقد أظهرت انخفاظ حيوية الخلايا السرطانية عند التركيز 500و 1000 مايكرو غرام / مل ولم تظهر انخفاظا للحيوية واضح للخلايا عند التركيز 250 مايكرو غرام / مل وكانت النسبة المئوية لحيوية الخلايا التي تم تعريضها لجسيمات الذهب النانوية للعينتين 1 للتراكيز الثلاثة هي (98.3,99.8,99.9) شكل (46)

وكانت النسبة المئوية لحيوية الخلايا السرطانية التي تم تعريضها لجسيمات الذهب النانوية للعينة 2 للتراكيز (1000,500,250) مايكرو غرام /مل هو (99.5,99.4,95.7) على التوالي شكل (47) اما العينة 3 فقد أظهرت انخفاظا قليلا لحيوية الخلايا بنسبة 30% تقريبا عند تركيز 500 مايكرو غرام / مل اما عند التركيز 1000 مايكروغرام /مل فقد أظهرت انخفاظا لحيوية الخلايا بنسبة 35% إذ كانت نسبة حيوية الخلايا عند تركيز 500 (70%) وعند التركيز 1000 مايكرو غرام / مل (65%) شكل (48).واكدت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروق معنوية بين تراكيز العينة الأولى والثانية بينما توجد فروق معنوية بين تراكيز العينة 3 وان التركيزين 1000 مايكوغرام /مل والتركيز 500 مايكروغرام/مل هما التركيزان المثبطان للخلايا السرطانية.

ان الأهمية المتزايدة لإيجاد مواد ومركبات بديلة للأدوية الكيمياوية المستخدمة في العلاج للأمراض بما فيها السرطان أصبحت ضرورة ملحة في الوقت الحاضر لاسيما ان اغلب العلاجات التقليدية هي علاجات جهازية لا تتركز داخل الخلايا السرطانية .ترتبط الخصائص العلاجية لجسيمات الذهب النانوية بأشكال واحجام والتضاريس الهندسية لها (Lin *et al.*, 2014; Alshammari and Angela, 2012) في الدراسة الحالية لم تظهر جسيمات الذهب النانوية للعينة 1و2 أي تثبيط ملموس عند التراكيز 1000,500,250 مايكروغرام / مل لخط سرطان الثدي MCF-7 ربما يعود السبب الى كبر حجم الجسيمات النانوية فقد اثبتت دراسات عديدة ان فعالية الجسيمات النانوية الذهبية على القضاء على الخلايا السرطانية يزداد كلما قل حجم الجسيمات إذ يعتبر صغر حجم الجسيمات النانوية عامل مهم في موت الخلايا السرطانية (Ismail *et al.*, 2018 ; Choi *et al.*, 2014; ; Yang *et al.*, 2019) .بينما أظهرت العينة 3 فعالية عند التركيز 1000 مايكرو غرام /مل واقل فعالية عند التركيز 500 مايكرو غرام/مل ولم تظهر فعالية عند التركيز 250مايكرو غرام/مل مما يشير الى ان سمية جسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا تزداد كلما زاد التركيز وان نسبة تثبيط هذه العينة كان اقل من النصف قد يعود السبب الى قلة مدة تعرض الخلايا السرطانية لجسيمات الذهب النانوية وتتفق هذه النتيجة مع دراسة Clarance واخرون ، (2020) إذ اثبت ان جسيمات الذهب النانوية المخلقة من الفطر المستنبت لها القدرة على تثبيط خلايا خط سرطان الثدي اعتمادا على التركيز فوجد ان تراكم الخلايا قل الى 55% بعد التعرض 120 ساعة الى تراكيز مختلفة من جسيمات الذهب النانوية المخلقة

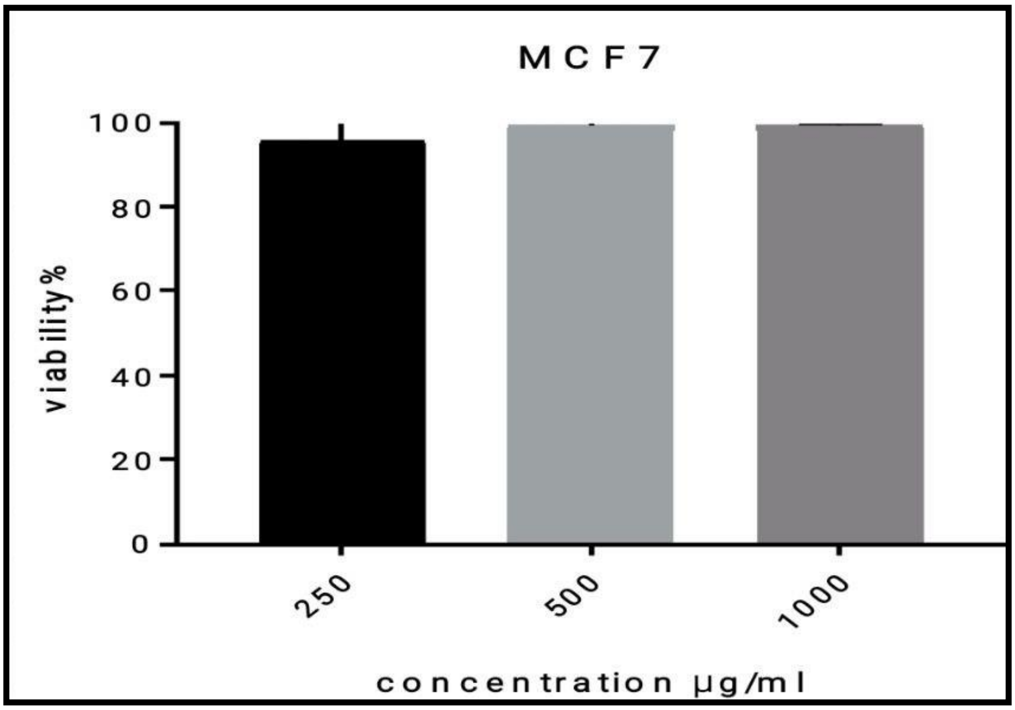
حيويا. كما اثبت KS واخرون ،(2016) ان جسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا لها فعالية ضد خط سرطان الثدي MCF-7 معتمدا على التركيز ولم يتم العثور على تثبيط بنسبة 50% بعد تعريض خط الخلايا لمدة 24 ساعة مما يدل على ان السمية الخلوية تعتمد على الوقت مما يتوجب زيادة مدة التعريض لزيادة نسبة التثبيط.



Concentration µg/ml	250	500	1000
Viability %	99.9	99.8	98.3

L.S.D. ,0,05=2.934 (N.S)

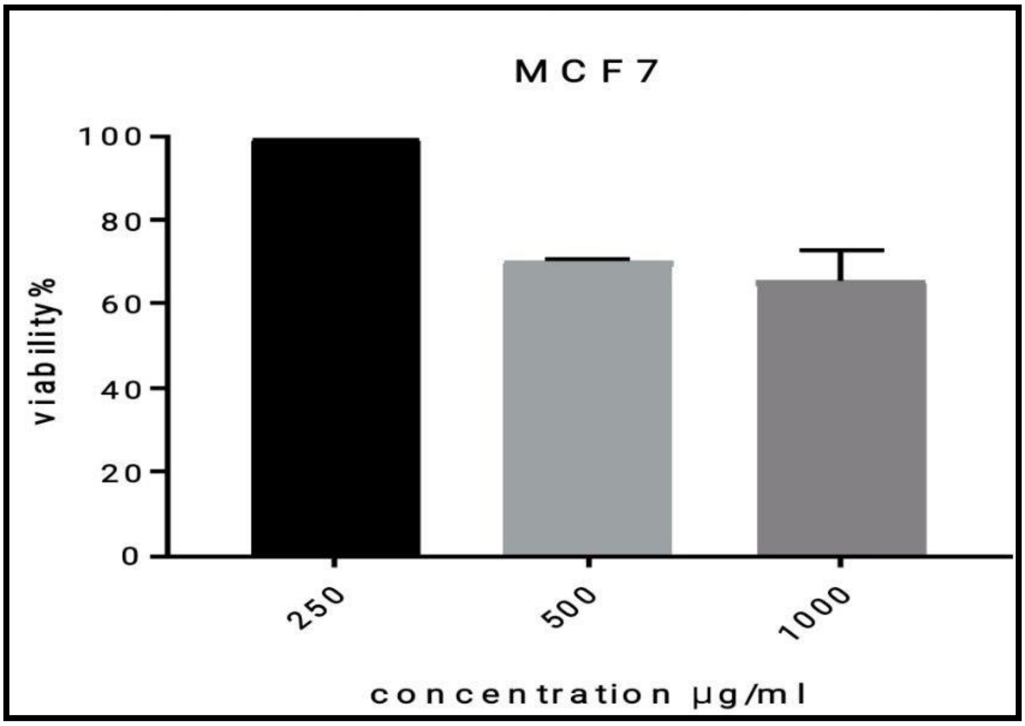
شكل (46) النسبة المئوية لحيوية الخلايا السرطانية MCF-7 المعاملة بجسيمات الذهب النانوية للعينة 1



Concentration µg/ml	250	500	1000
Viability %	95.7	99.4	99.5

L S D, 0,05=5.121 (N.S)

شكل (47) النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان الثدي MCF-7 المعاملة بجسيمات الذهب النانوية للعينة 2



Concentration µg/ml	250	500	1000
Viability %	99,7	70.6	65.5

S.L.D ,0.05=6.1

شكل (48) النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان الثدي المعاملة بجسيمات الذهب النانوية للعينة 3

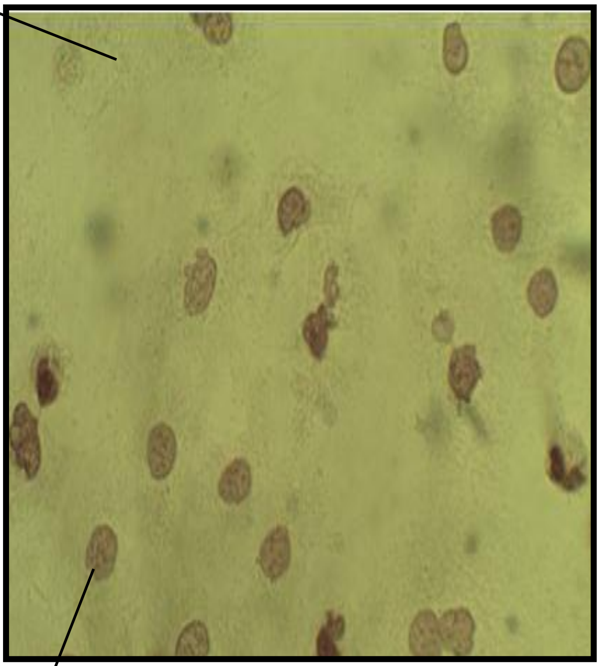
4-6- تقنية الكيمياء المناعية النسيجية لاختبار تحفيز caspase3

تتعرض الخلية الحقيقية النواة الى نوعين من أنواع الاماتة cell death وهما موت الخلية الغير مبرمج الذي يؤدي الى النخر necrosis او موت الخلية المبرمج الذي يحدث نتيجة تحفيز مسارات محددة (Jorgensen *et al*., 2017). فهناك ثلاثة مسارات رئيسية يحدث بها موت الخلية المبرمج هي اضطراب المايتوكندريا وتنشيط مستقبلات الموت واجهاد الشبكة الاندوبلازمية، تؤدي حالة تنشيط مسارات الموت والمايتوكندريا الى تنشيط الكاسبيزات المختلفة في السايتوبلازم والى تنشيط بروتين كاسبيز 3 في النهاية الذي يتسبب في موت الخلية المبرمج نتيجة تفتيت الحامض النووي DNA (Jalili *et al*., 2022) ، تم اختيار احدى طرق تحفيز الموت الخلوي وهو الموت الخلوي المعتمد على الكاسبيز 3 وكان ذلك بإستعمال تقنية الكيمياء المناعية النسيجية لاختبار تحفيز كاسبيز 3.واظهرت نتائج الفحص المجهري عدم وجود تعبير لبروتين كاسبيز 3 بعد المعاملة لمدة 72 ساعة لخط خلايا MCF-7 إذ لم يظهر تصبغ لسايتوبلازم الخلايا مع صبغة DAB شكل (49) و (50)

اشارت دراسة (Kamada *et al*., 2005; Ritter *et al*., 2000) ان تنشيط انزيم كاسبيز 3 يبدا في سايتوبلازم الخلايا من خلال شطر ال procaspase 3 ،وفي المراحل المتقدمة من تحفيز الموت الخلوي المبرمج ينتقل بروتين كاسبيز 3 الى النواة عندها يلاحظ التصبيغ في سايتوبلازم الخلايا ونواتها وهذا يؤكد عدم تحفيز الكاسبيز 3 في معاملة خلايا الدراسة الحالية تتوافق النتائج التي حصلنا عليها مع دراسة Kajani واخرون ، (2016) حيث اثبت ان موت الخلايا كان مستقل عن الكاسبيز بأعتباره الالية المحتملة لنشاط جسيمات الذهب النانوية المخلقة حيويا على خط سرطان الثدي MCF-7 وسرطان الرحم Hela cell .بينما اثبتت دراسات عديدة على قدرة جسيمات الذهب النانوية المصنعة حيويا على مضاعفة نشاط انزيمات الكاسبيز وانخفاض في حيوية الخلايا السرطانية المختلفة منها دراسة Qian واخرون ، (2019) إذ تم العثور على نشاط كاسبيز 9 و 8 و 3 في خلايا خط سرطان الرحم بطريقة تعتمد على التركيز وادى هذا التنشيط الى موت الخلية المبرمج.كما أوضح Ahamed واخرون ، (2016) ان جسيمات الذهب النانوية تكون شديدة السمية ضد خط

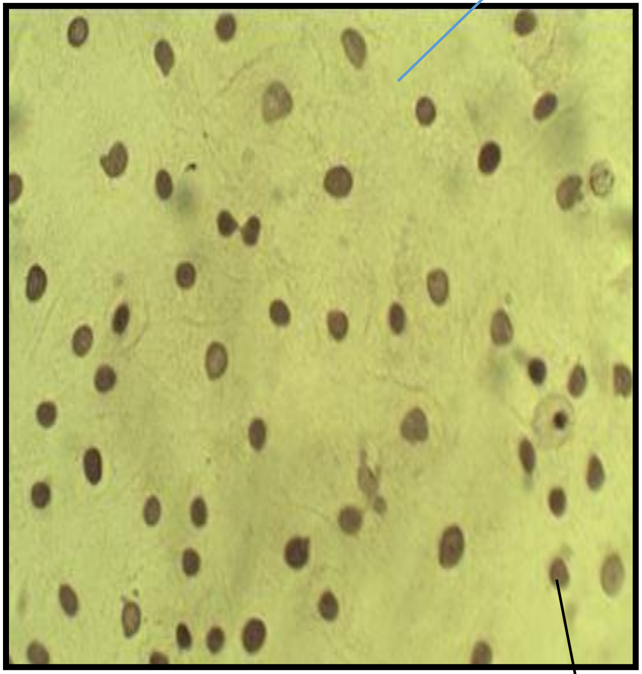
خلايا سرطان الثدي MCF-7 نتيجة لتعزيز نشاط كاسبيز 3 وكاسبيز 9 الذي يسرع في موت الخلية المبرمج .

الخلايا السرطانية



شكل (49) خلايا خط MCF-7 معاملة بجسيمات الذهب النانوية ومصبغة بصبغة ADB

بقوة X 40



شكل (50) خلايا MCF-7 غير معاملة ب AuNPs ومصبغة بصبغة ADB

بقوة X 40

أنوية الخلايا السرطانية

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Concludion and Recommendation

الاستنتاجات

1- وجود فطريات داخل الانسجة النباتية لأوراق النباتات (الختمة و الصبار و الاكاسيا).

2- أظهر التشخيص الجيني للأنواع الفطرية المعزولة إنها تعود الى جنس *Aspergillus* و *Pencillium* وعزلة واحدة سجلت كعزلة جديدة فب بنك الجينات ومنحت رقم الإدخال OP288118.

3- قابلية الفطريات المعزولة من الانسجة النباتية على انتاج جسيمات الذهب النانوية.

4- قابلية جسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *P. citrinum* isolate MEBPOO16 على خفض النسبة الحيوية للخلايا السرطانية بطريقة تعتمد على التركيز.

5- قابلية جسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *A. fumigatus* strain Zbf-R10 على كسح الجذور الحرة لمركب DPPH .

6- عدم تنشيط انزيم Caspase 3 في الخلايا المعاملة لخط سرطان الثدي MCF-7 عند معاملته بجسيمات الذهب النانوية مقارنة بغير المعاملة.

التوصيات

1- عزل فطريات من الانسجة الداخلية للنباتات الطبية والغير السامة كونها تتشابه من حيث المواد المنتجة للاستفادة من المركبات الثانوية لها.
2- استخدام الرواشح الفطرية في تصنيع جسيمات نانوية أخرى كالبلاتين والنحاس وغيرها.
3- تحسين ظروف تخليق جسيمات الذهب النانوية كدرجة الحرارة والأس الهيدروجيني والتركيز من اجل تخليق أفضل للجسيمات النانوية المعدنية
4- دراسة سمية جسيمات الذهب النانوية على كريات الدم الحمر.
5- اختبار جسيمات الذهب النانوية ضد خطوط سرطانية أخرى مثل سرطان البروستات والقولون والكبد ودراسة تأثيرها على الخطوط الطبيعية.
6- الكشف عن اليات أخرى تحفزها جسيمات الذهب النانوية المخلقة و تسبب موت الخلايا السرطانية او التقليل من حيويتها.

المصادر

References

المصادر العربية:

- إبراهيم، نور خضير (2021)**.** تقييم الفعالية الحيوية لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من قبل بعض الاحياء المجهرية. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة ميسان:105 صفحة.
- الساعدي، عباس خماس (2021). تشخيص وتوصيف المواد النانوية، بغداد، دار الأمير، الطبعة الأولى .324 صفحة.
- العزاوي، غفران محمود محمد (2022). عزل وتشخيص الفطريات المستنبتة من أوراق نبات المورنجا*Moringa sp* وإنتاج جسيمات الفضة النانوية من مستخلص الأوراق ودراسة الفعالية المضادة الحيوية تجاه بعض الاحياء المجهرية المرضية. رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم) ،جامعة بغداد:104 صفحة.
- الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله (1980)، تصميم وتحليل التجارب الزراعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة الموصل، العراق.
- جندل،جاسم محمد (2015)،مضادات الاكسدة.عمان،دار المستقبل للنشر والتوزيع،(382) صفحة.

References

Abad-Segura, E., González-Zamar, M. D., Infante-Moro, J. C., & Ruipérez García, G. (2020). Sustainable management of digital transformation in higher education: Global research trends. *Sustainability*, 12(5), 2107.

Abbas, Z., & Rehman, S. (2018). An overview of cancer treatment modalities. *Neoplasm*, 1, 139-157.

Abdel-Azeem, A., Nada, A. A., O'donovan, A., Thakur, V. K., & Elkelish, A. (2020). Mycogenic silver nanoparticles from endophytic Trichoderma atroviride with antimicrobial activity. *Journal of Renewable Materials*, 8(2), 171.

Abdel-Kareem, M. M., & Zohri, A. A. (2018). Extracellular mycosynthesis of gold nanoparticles using Trichoderma hamatum: optimization, characterization and antimicrobial activity. *Letters in applied microbiology,* 67(5), 465-475.

Abdellatif, A. A., Mohammed, H. A., Khan, R. A., Singh, V., Bouazzaoui, A., Yusuf, M., ... & Al-Omar, M. S. (2021). Nano-scale delivery: A comprehensive review of nano-structured devices, preparative techniques, site-specificity designs, biomedical applications, commercial products, and references to safety, cellular uptake, and organ toxicity. Nanotechnology Reviews, 10(1), 1493-1559.

Abdel-Raouf, N., Al-Enazi, N. M., & Ibraheem, I. B. (2017). Green biosynthesis of gold nanoparticles using Galaxaura elongata and characterization of their antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3029-S3039.

Abu-Tahon, M. A., Ghareib, M., & Abdallah, W. E. (2020). Environmentally benign rapid biosynthesis of extracellular gold nanoparticles using Aspergillus flavus and their cytotoxic and catalytic activities. *Process Biochemistry*, 95, 1-11.

Adeleke, B. S., & Babalola, O. O. (2021). Biotechnological overview of agriculturally important endophytic fungi. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 62(4), 507-520.

Aguilar, L. E., Chalony, C., Kumar, D., Park, C. H., & Kim, C. S. (2021). Phenol-Boronic surface functionalization of gold nanoparticles; to induce ROS damage while inhibiting the survival mechanisms of cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, *596*, 120267.

Ahamed, M., Akhtar, M. J., Khan, M. M., Alhadlaq, H. A., & Alrokayan, S. A. (2016). Cytotoxic response of platinum-coated gold nanorods in human breast cancer cells at very low exposure levels. *Environmental toxicology*, 31(11), 1344-1356.

Ahmed, A. A., Hamzah, H., & Maaroof, M. (2018). Analyzing formation of silver nanoparticles from the filamentous fungus Fusarium oxysporum and their antimicrobial activity. *Turkish Journal of Biology*, 42(1), 54-62.

Alaei, H., Mohammadi, A. H., & Dehghani, A. (2012). Molecular

characterization of the rDNA-ITS sequence and a PCR diagnostic technique for Pileolaria terebinthi, the cause of pistachio rust. *Phytopathologia Mediterranea*, 488-495.

Al Dabbagh, A. G. (2022). Nanotechnology; The Sience of Present and Future (Principles and Applications). *NTU Journal of Pure Sciences,* 1(3), 32-39.

Al-Ali, A.A., Alsalami, K.A.S. and Athbi, A. M. (2022). Cytotoxic effects of CeO2 NPs and β- carotine and thier ability to induce apoptosis in human breast normal and cancer cell lines. *Iraqi Journal of Science,* (63): 3.

Al-Dhabi, N. A., Mohammed Ghilan, A. K., & Arasu, M. V. (2018). Characterization of silver nanomaterials derived from marine Streptomyces sp. al-dhabi-87 and its in vitro application against multidrug resistant and extended-spectrum beta-lactamase clinical pathogens. *Nanomaterials,* 8(5), 279.

Al-Gebory, L., & Mengüç, M. P. (2018). The effect of pH on particle agglomeration and optical properties of nanoparticle suspensions. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer,* 219, 46-60.

Ali, A. H., Radwan, U., El-Zayat, S., & El-Sayed, M. A. (2018). Desert plant-fungal endophytic association: the beneficial aspects to their hosts. *In Biological Forum-An International Journal (Vol. 10, No.* 1, pp. 138-145).

Ali, N. H., & Mohammed, A. M. (2021). Biosynthesis and characterization of platinum nanoparticles using iraqi zahidi dates

and evaluation of their biological applications. *Biotechnology Reports*, 30, e00635.

Aldrich, S. (2015). Gold nanoparticles: properties and applications. *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO*.

Alshammari, A., & Angela, K. (2012). Influence of single use and combination of reductants on the size, morphology and growth steps of gold nanoparticles in colloidal mixture.

Al-Shammari, A.M.;Al-Esmaeel , W.N.; Al-Ali, A.A.; Hassan, A.A. and Ahmed , A.A.(2019). Enhancement of Oncolytic Activity of Newcastle Disease virus Through Combination with Retinoic Acid Against Digestive System Malignancies. *Molecular Therapy 2*7(4S1):126-127**.**

Aly, A. H., Debbab, A., Kjer, J., & Proksch, P. (2010). Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal diversity*, 41(1), 1-16.

Amendola, V., Pilot, R., Frasconi, M., Maragò, O. M., & Iatì, M. A. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 29(20), 203002.

Amina, S. J., & Guo, B. (2020). A review on the synthesis and functionalization of gold nanoparticles as a drug delivery vehicle. *International journal of nanomedicine*, 15, 9823.

Amina, S. J., Iqbal, M., Faisal, A., Shoaib, Z., Niazi, M. B. K., Ahmad, N. M., ... & Janjua, H. A. (2021). Synthesis of diosgenin conjugated gold nanoparticles using algal extract of

Dictyosphaerium sp. and in-vitro application of their antiproliferative activities. *Materials Today Communications, 27, 102360.*

Anjali, R., Palanisamy, S., Vinosha, M., Selvi, A. M., Sathiyaraj, G., Marudhupandi, T., ... & You, S. (2022). Fabrication of silver nanoparticles from marine macro algae Caulerpa sertularioides: Characterization, antioxidant and antimicrobial activity. *Process Biochemistry*, 121, 601-618.

Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 5517-5527.

Asghari, A., Wall, K., Gill, M., Del Vecchio, N., Allahbakhsh, F., Wu, J., ... & Maroufy, V. (2022). A novel group of genes that cause endocrine resistance in breast cancer identified by dynamic gene expression analysis. *Oncotarget*, 13, 600.

Ashokkumar, T., Arockiaraj, J., & Vijayaraghavan, K. (2016). Biosynthesis of gold nanoparticles using green roof species Portulaca grandiflora and their cytotoxic effects against C6 glioma human cancer cells. *Environmental Progress & Sustainable Energy, 35*(6), 1732-1740.

Aslam, S., Tahir, A., Aslam, M. F., Alam, M. W., Shedayi, A. A., & Sadia, S. (2017). Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi–a mini review. *Journal of Plant Interactions, 1*2(1), 493-504.

Aswad, S. A. M., Jameel, G. H., & Alobidy, E. N. J. (2021). Molecular detection of Trichophyton verrucosum infection in sheep**.** ***Diyala Journal for Veterinary Sciences-Print ISSN:*** *2410-8863*, *1*(4), 47-60.

Azad, S., Meeravali, S. N., Babu, P. C., & Kumar, K. R. (2020). Gold nanoparticles in cancer therapy: Overview and perspectives. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34-40.

Bahrulolum, H., Nooraei, S., Javanshir, N., Tarrahimofrad, H., Mirbagheri, V. S., Easton, A. J., & Ahmadian, G. (2021). Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agrifood sector. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1-26.

BalaKumaran, M. D., Ramachandran, R., Balashanmugam, P., Jagadeeswari, S., & Kalaichelvan, P. T. (2022). Comparative analysis of antifungal, antioxidant and cytotoxic activities of mycosynthesized silver nanoparticles and gold nanoparticles. *Materials Technology*, 37(6), 411-421.

Baldwin, A., & Booth, B. W. (2022). Biomedical applications of tannic acid. *Journal of Biomaterials Applications*, *36*(8), 1503-1523.

Bao, H., Lu, Z., Cui, X., Qiao, Y., Guo, J., Anderson, J. M., & Li, C. M. (2010). Extracellular microbial synthesis of biocompatible CdTe quantum dots. *Acta biomaterialia*, *6*(9), 3534-3541.

Barabadi, H., Mohammadzadeh, A., Vahidi, H., Rashedi, M., Saravanan, M., Talank, N., & Alizadeh, A. (2022). Penicillium

chrysogenum-derived silver nanoparticles: exploration of their antibacterial and biofilm inhibitory activity against the standard and pathogenic Acinetobacter baumannii compared to tetracycline. *Journal of Cluster Science,* 33(5), 1929-1942.

Baron, N. C., & Rigobelo, E. C. (2022). Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology, 13*(1), 39-55.

Barry, N. P., & Sadler, P. J. (2013). Challenges for metals in medicine: how nanotechnology may help to shape the future. *ACS nano,* 7(7), 5654-5659.

Barua, S., Gogoi, S., Khan, R., & Karak, N. (2019). Silicon-based nanomaterials and their polymer nanocomposites. *In Nanomaterials and polymer nanocomposites (*pp. 261-305). Elsevier.

Basiratnia, E., Einali, A., Azizian-Shermeh, O., Mollashahi, E., & Ghasemi, A. (2021). Biological Synthesis of Gold Nanoparticles from Suspensions of Green Microalga Dunaliella salina and Their Antibacterial Potential. *BioNanoScience,* 11(4), 977-988.

Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences,* 9(3), 193.

Berrada, M., Serreqi, A., Dabbarh, F., Owusu, A., Gupta, A., & Lehnert, S. (2005). A novel non-toxic camptothecin formulation for cancer chemotherapy. *Biomaterials,* 26(14), 2115-2120.

Bessa, M. J., Brandão, F., Viana, M., Gomes, J. F., Monfort, E.,

Cassee, F. R., ... & Teixeira, J. P. (2020). Nanoparticle exposure and hazard in the ceramic industry: an overview of potential sources, toxicity and health effects. *Environmental research*, 184, 109297.

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential–what they are and what they are not?. *Journal of controlled release*, 235, 337-351.

Bolívar-Anillo, H. J., Garrido, C., & Collado, I. G. (2020). Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus Botrytis cinerea. *Phytochemistry Reviews*, 19(3), 721-740.

Burstein, H. J., Somerfield, M. R., Barton, D. L., Dorris, A., Fallowfield, L. J., Jain, D., ... & Rugo, H. S. (2021). Endocrine treatment and targeted therapy for hormone receptor–positive, human epidermal growth factor receptor 2–negative metastatic breast cancer: ASCO guideline update. *Journal of Clinical Oncology*, 39(35), 3959-3977.

Castillo-Henríquez, L., Alfaro-Aguilar, K., Ugalde-Álvarez, J., Vega-Fernández, L., Montes de Oca-Vásquez, G., & Vega-Baudrit, J. R. (2020). Green synthesis of gold and silver nanoparticles from plant extracts and their possible applications as antimicrobial agents in the agricultural area. *Nanomaterials*, 10(9), 1763.

Castro, L., Blázquez, M. L., González, F. G., & Ballester, A. (2014). Mechanism and applications of metal nanoparticles prepared by bio-mediated process. *Reviews in Advanced Sciences and Engineering*, 3(3), 199-216.

Chander, J. (2017). Textbook of medical mycology. JP Medical Ltd.

Chang, Y., Zheng, C., Chinnathambi, A., Alahmadi, T. A., & Alharbi, S. A. (2021). Cytotoxicity, anti-acute leukemia, and antioxidant properties of gold nanoparticles green-synthesized using Cannabis sativa L leaf aqueous extract. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(4), 103060.

Cheeseman, S., Christofferson, A. J., Kariuki, R., Cozzolino, D., Daeneke, T., Crawford, R. J., ... & Elbourne, A. (2020). Antimicrobial metal nanomaterials: from passive to stimuli-activated applications. *Advanced Science*, 7(10), 1902913.

Chen, M. T., Sun, H. F., Zhao, Y., Fu, W. Y., Yang, L. P., Gao, S. P., ... & Jin, W. (2017). Comparison of patterns and prognosis among distant metastatic breast cancer patients by age groups: a SEER population-based analysis. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.

Cheng, C. W., Wang, H. W., Chang, C. W., Chu, H. W., Chen, C. Y., Yu, J. C., ... & Shen, C. Y. (2012). MicroRNA-30a inhibits cell migration and invasion by downregulating vimentin expression and is a potential prognostic marker in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 134(3), 1081-1093.

Chi, Y., Wang, Z., Wang, J., Dong, W., Xin, P., Bi, J., ... & Chen, C. P. (2020). Dimeric camptothecin-loaded mPEG-PCL nanoparticles with high drug loading and reduction-responsive drug release. *Colloid and Polymer Science*, 298(1), 51-58.

Choi, J. S., Cao, J., Naeem, M., Noh, J., Hasan, N., Choi, H. K., & Yoo, J. W. (2014). Size-controlled biodegradable nanoparticles:

preparation and size-dependent cellular uptake and tumor cell growth inhibition. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122, 545-551.

Chow, E., van der Linden, Y. M., Roos, D., Hartsell, W. F., Hoskin, P., Wu, J. S., ... & Wong, R. K. (2014). Single versus multiple fractions of repeat radiation for painful bone metastases: a randomised, controlled, non-inferiority trial. *The Lancet Oncology,* 15(2), 164-171.

Clarance, P., Luvankar, B., Sales, J., Khusro, A., Agastian, P., Tack, J. C., ... & Kim, H. J. (2020). Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using endophytic fungi Fusarium solani and its in-vitro anticancer and biomedical applications. *Saudi Journal of Biological Sciences,* 27(2), 706-712.

Colin, J. A., Pech-Pech, I. E., Oviedo, M., Águila, S. A., Romo-Herrera, J. M., & Contreras, O. E. (2018). Gold nanoparticles synthesis assisted by marine algae extract: Biomolecules shells from a green chemistry approach. *Chemical Physics Letters*, 708, 210-215.

Combes, G. F., Vučković, A. M., Perić Bakulić, M., Antoine, R., Bonačić-Koutecky, V., & Trajković, K. (2021). Nanotechnology in tumor biomarker detection: The potential of liganded nanoclusters as nonlinear optical contrast agents for molecular diagnostics of cancer. *Cancers,* 13(16), 4206.

Costa, B., Amorim, I., Gärtner, F., & Vale, N. (2020). Understanding breast cancer: From conventional therapies to

repurposed drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 151, 105401.

Cummins, C., Lundy, R., Walsh, J. J., Ponsinet, V., Fleury, G., & Morris, M. A. (2020). Enabling future nanomanufacturing through block copolymer self-assembly: *A review*. *Nano Today*, 35, 100936.

Gupta, K., & Chundawat, T. S. (2020). Time and size-dependent biogenically synthesized nanoparticles using fungus Fusarium oxysporum: A review on their preparation, characterization and biological activities. *Nanoscience & Nanotechnology-Asia*, *10*(2), 95-108.

Dai, X., Xiang, L., Li, T., & Bai, Z. (2016). Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *Journal of cancer*, 7(10), 1281.

Dam, D. H. M., Culver, K. S., & Odom, T. W. (2014). Grafting aptamers onto gold nanostars increases in vitro efficacy in a wide range of cancer cell types. *Molecular pharmaceutics*, 11(2), 580-587.

Dare, A. J., Anderson, B. O., Sullivan, R., Pramesh, C. S., Yip, C. H., Ilbawi, A., ... & Gauvreau, C. L. (2015). Surgical services for cancer care. DISEASE CONTROL PRIORITIES• THIRD EDITION, 223.

Das, A., & Varma, A. (2009). Symbiosis: the art of living. In Symbiotic Fungi (pp. 1-28). *Springer, Berlin, Heidelberg*.

Dastogeer, K. M. G., Chakraborty, A., Sarker, M. S. A., & Akter,

M. A. (2020). Roles of fungal endophytes and viruses in mediating drought stress tolerance in plants. *International Journal of Agriculture and Biology*, 24(6), 1497-1512.

Deepak, P., Sowmiya, R., Balasubramani, G., Aiswarya, D., Arul, D., Josebin, M. P. D., & Perumal, P. (2018). Mosquito-larvicidal efficacy of gold nanoparticles synthesized from the seaweed, Turbinaria ornata (Turner) J. Agardh 1848. *Particulate Science and Technology*, 36(8), 974-980.

DeMoranville, K. J., Carter, W. A., Pierce, B. J., & McWilliams, S. R. (2022). Flight and dietary antioxidants influence antioxidant expression and activity in a migratory bird. *Integrative Organismal Biology*, 4(1), obab035.

Desai, D., & Datta, M. (2015). Green synthesis of silver antimicrobials for its potential application in control of nosocomial infections.*Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 219-223

Desai, M. P., Patil, R. V., Harke, S. S., & Pawar, K. D. (2021). Bacterium mediated facile and green method for optimized biosynthesis of gold nanoparticles for simple and visual detection of two metal ions. *Journal of Cluster Science*, 32(2), 341-350.

Dewan, Th. M. (2022). Biosynthesis of silver nanoparticles by some Actinomycetes and Soil Bacteria and Determination of Antibacterial and Anticancer Activities. MSC. College of science. University of Misan.113.

Dewan, T., & Hateet, R. (2022). Detect the Antibacterial and

Antitumor of synthesized Silver Nanoparticles Using Microbacterium sp. *Revis Bionatura* 2022; 7 (2) 30.

Du, L., Xian, L., & Feng, J. X. (2011). Rapid extra-/intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by the fungus Penicillium sp. *Journal of Nanoparticle Research, 13,* 921-930.

Du, Y., Xia, L., Jo, A., Davis, R. M., Bissel, P., Ehrich, M. F., & Kingston, D. G. (2018). Synthesis and evaluation of doxorubicin-loaded gold nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Bioconjugate chemistry,* 29(2), 420-430.

Durairajanayagam, D., Agarwal, A., & Ong, C. (2015). Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reproductive biomedicine online*, 30(1), 14-27.

Ealia, S. A. M., & Saravanakumar, M. P. (2017, November). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *In IOP conference series: materials science and engineering* (Vol. 263, No. 3, p. 032019). IOP Publishing.

Eckle, V. S., Buchmann, A., Bursch, W., Schulte-Hermann, R., & Schwarz, M. (2004). Immunohistochemical detection of activated caspases in apoptotic hepatocytes in rat liver. *Toxicologic pathology,* 32(1), 9-15.

Elbahnasawy, M. A., Shehabeldine, A. M., Khattab, A. M., Amin, B. H., & Hashem, A. H. (2021). Green biosynthesis of silver nanoparticles using novel endophytic Rothia endophytica: Characterization and anticandidal activity. *Journal of Drug*

Delivery Science and Technology, 62, 102401.

El Domany, E. B., Essam, T. M., Ahmed, A. E., & Farghali, A. A. (2018). Biosynthesis physico-chemical optimization of gold nanoparticles as anti-cancer and synergetic antimicrobial activity using Pleurotus ostreatus fungus. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *8*(5), 119-128.

Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8, 467.*

Falih. S M. , Al-saray S. T, .Alfaris A. A. and Al-Ali A.A. (2022). The synergistic effect of eucalyptus oil and retinoic acid on human esophagus cancer cell line SK-GT-4. *Egyptian journal of medical human genetics, 23:70*

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., ... & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77-106.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: *An overview. International journal of cancer,* 149(4), 778-789.

Folorunso, A., Akintelu, S., Oyebamiji, A. K., Ajayi, S., Abiola, B., Abdusalam, I., & Morakinyo, A. (2019). Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of gold nanoparticles

from leaf extracts of Annona muricata. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 9(2), 111-117.

Gadekar, G. P., Ghaoshal, K. P., & Ghatole, A. M. (2021). Butea Monosperma Bark Extract To Its Green Synthesis Of Silver Nanoparticles And Their Antioxidant, Total Flavonoid Content And Antimicrobial Activities. *Journal of Applied Biological Sciences*, 15(1), 64-74.

Galúcio, J. M., de Souza, S. G. B., Vasconcelos, A. A., Lima, A. K. O., da Costa, K. S., de Campos Braga, H., & Taube, P. S. (2022). Synthesis, characterization, applications, and toxicity of green synthesized nanoparticles. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *23*(3), 420-443.

Gan, L., Zhang, S., Zhang, Y., He, S., & Tian, Y. (2018). Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles by a halotolerant Bacillus endophyticus SCU-L. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(7), 582-588.

Ganeshkumar, M., Sathishkumar, M., Ponrasu, T., Dinesh, M. G., & Suguna, L. (2013). Spontaneous ultra fast synthesis of gold nanoparticles using Punica granatum for cancer targeted drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106, 208-216.

Ganguly, M., Pal, A., Negishi, Y., & Pal, T. (2013). Synthesis of highly fluorescent silver clusters on gold (I) surface. *Langmuir*, 29(6), 2033-2043.

García-Aranda, M., & Redondo, M. (2019). Immunotherapy: a challenge of breast cancer treatment. *Cancers, 11*(12), 1822.

García-Aranda, M., Pérez-Ruiz, E., & Redondo, M. (2018). Bcl-2 inhibition to overcome resistance to chemo-and immunotherapy. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3950.

Gerosa, C., Crisponi, G., Nurchi, V. M., Saba, L., Cappai, R., Cau, F., ... & Fanni, D. (2020). Gold nanoparticles: a new golden era in oncology?. *Pharmaceuticals, 13*(8), 192.

Ghosh, S. K., & Pal, T. (2007). Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications. *Chemical reviews*, 107(11), 4797-4862.

Golińska, P., Wypij, M., Rathod, D., Tikar, S., Dahm, H., & Rai, M. (2016). Synthesis of silver nanoparticles from two acidophilic strains of Pilimelia columellifera subsp. pallida and their antibacterial activities. *Journal of Basic Microbiology*, 56(5), 541-556.

Gopinath, K., & Arumugam, A. (2014). Extracellular mycosynthesis of gold nanoparticles using Fusarium solani. *Applied Nanoscience*, 4(6), 657-662.

Graeser, Y., & Saunte, D. M. (2020). A hundred years of diagnosing superficial fungal infections: Where do we come from, where are we now and where would we like to go?. *Acta dermato-venereologica, 100*(9), 216-224.

Greenfield, M., Pareja, R., Ortiz, V., Gómez-Jiménez, M. I., Vega, F. E., & Parsa, S. (2015). A novel method to scale up fungal endophyte isolations. *Biocontrol Science and Technology*, 25(10),

1208-1212.

Haiss, W., Thanh, N. T., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV− Vis spectra. *Analytical chemistry, 79*(11), 4215-4221.

Hammami, I., & Alabdallah, N. M. (2021). Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. *Journal of King Saud University-Science, 33*(7), 101560.

Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., ... & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and molecular biology reviews, 79*(3), 293-320.

Hashim, A.I.(2020). Cytotoxity effects of silver nanoparticles prepared from Escherichia coli culture filtrates on vero cell line.MSC.Collage of science.University of Mustansiriyah.115

Hassan, S. E. D., Fouda, A., Radwan, A. A., Salem, S. S., Barghoth, M. G., Awad, M. A., ... & El-Gamal, M. S. (2019). Endophytic actinomycetes Streptomyces spp mediated biosynthesis of copper oxide nanoparticles as a promising tool for biotechnological applications. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 24*(3), 377-393.

Hassan, H., Sharma, P., Hasan, M. R., Singh, S., Thakur, D., & Narang, J. (2022). Gold nanomaterials–The golden approach from synthesis to applications. *Materials Science for Energy*

Technologies.

Hateet, R. R. (2017). Isolation and Identification of Three Bioactive Compounds from Endophytic Fungus Trichoderma sp. Al-Nahrain *Journal of Science*, 20(2), 108-113.

Hateet, R. R. (2020). GC-MS Analysis of extract for Endophytic fungus Acremonium coenophialum and its Antimicrobial and Antidiabetic. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, *13*(1), 119-123.

Hateet, R. R., & Ibrahim, N. B. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles from Staphylococcus lentus isolated from Ocimum basilicum and their antibacterial activity. *Comunicata Scientiae*, 12, e3545-e3545.

Haume, K., Rosa, S., Grellet, S., Śmiałek, M. A., Butterworth, K. T., Solov'yov, A. V., ... & Mason, N. J. (2016). Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review. *Cancer nanotechnology*, *7*, 1-20.

Horikoshi, S., & Serpone, N. (Eds.). (2013). *Microwaves in nanoparticle synthesis: fundamentals and applications. John Wiley & Sons.*

Hosseini, M., Mashreghi, M., & Eshghi, H. (2016). Biosynthesis and antibacterial activity of gold nanoparticles coated with reductase enzymes. *Micro & Nano Letters*, 11(9), 484-489.

Ibrahim, E., Fouad, H., Zhang, M., Zhang, Y., Qiu, W., Yan, C &

Chen, J. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles using endophytic bacteria and their role in inhibition of rice pathogenic bacteria and plant growth promotion. *RSC advances*, *9*(50), 29293-29299.

Ijaz, I., Gilani, E., Nazir, A., & Bukhari, A. (2020). Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chemistry Letters and Reviews*, *13*(3), 223-245.

Iranmanesh, S., Shahidi Bonjar, G. H., & Baghizadeh, A. (2020). Study of the biosynthesis of gold nanoparticles by using several saprophytic fungi. *SN Applied Sciences*, *2*(11), 1-11.

Ismail, E. H., Saqer, A. M., Assirey, E., Naqvi, A., & Okasha, R. M. (2018). Successful green synthesis of gold nanoparticles using a Corchorus olitorius extract and their antiproliferative effect in cancer cells. *International journal of molecular sciences*, *19*(9), 2612.

Italiano, F., Agostiano, A., Belviso, B. D., Caliandro, R., Carrozzini, B., Comparelli, R., ... & Trotta, M. (2018). Interaction between the photosynthetic anoxygenic microorganism Rhodobacter sphaeroides and soluble gold compounds. From toxicity to gold nanoparticle synthesis. Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces*, *172*, 362-371.

Jabbar, R., & Hussein, N. N. (2021). Evaluation the antibacterial activity of biosynthesis silver nanoparticles by lactobacillus gasseri bacteria. Journal of Applied Sciences and Nanotechnology, 1(3), 86-95.

Jabir, M. S., Taha, A. A., Sahib, U. I., Taqi, Z. J., Al-Shammari, A. M., & Salman, A. S. (2019). Novel of nano delivery system for Linalool loaded on gold nanoparticles conjugated with CALNN peptide for application in drug uptake and induction of cell death on breast cancer cell line. *Materials Science and Engineering*: C, 94, 949-964.

Jadoun, S., Arif, R., Jangid, N. K., & Meena, R. K. (2021). Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: *A review*. *Environmental Chemistry Letters*, *19*(1), 355-374.

Jalili, S., Ehsanpour, A. A., & Javadirad, S. M. (2022). The role of melatonin on caspase-3-like activity and expression of the genes involved in programmed cell death (PCD) induced by in vitro salt stress in alfalfa (Medicago sativa L.) roots. *Botanical Studies*, *63*(1), 1-11.

Javed, R., Zia, M., Naz, S., Aisida, S. O., & Ao, Q. (2020). Role of capping agents in the application of nanoparticles in biomedicine and environmental remediation: recent trends and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, *18*(1), 1-15.

Jena, J., Pradhan, N., Dash, B. P., Sukla, L. B., & Panda, P. K. (2013). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using microalga Chlorococcum humicola and its antibacterial activity. *Int J Nanomater Biostruct*, *3*(1), 1-8.

Jorgensen, I., Rayamajhi, M., & Miao, E. A. (2017). Programmed cell death as a defence against infection. *Nature reviews immunology*, *17*(3), 151-164.

Joshi, C. G., Danagoudar, A., Poyya, J., Kudva, A. K., & Dhananjaya, B. L. (2017). Biogenic synthesis of gold nanoparticles by marine endophytic fungus-Cladosporium cladosporioides isolated from seaweed and evaluation of their antioxidant and antimicrobial properties. *Process Biochemistry, 63*, 137-144.

Joy, B. (2020). Why the future doesn't need us: Our most powerful 21st-century technologies-robotics, genetic engineering, and nanotech-are threatening to make humans an endangered species. *In Emerging Technologies: Ethics, Law and Governance* (pp. 47-63). Routledge.

Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(9), 4642.

Jurrius, P., Green, T., Garmo, H., Young, M., Cariati, M., Gillett, C., ... & Purushotham, A. (2020). Invasive breast cancer over four decades reveals persisting poor metastatic outcomes in treatment resistant subgroup–the "ATRESS" phenomenon. *The Breast*, 50, 39-48.

Kajani, A. A., Bordbar, A. K., Esfahani, S. H. Z., & Razmjou, A. (2016). Gold nanoparticles as potent anticancer agent: green synthesis, characterization, and in vitro study. *RSC advances, 6*(68), 63973-63983.

Kalashgrani, M. Y., & Javanmardi, N. (2022). Multifunctional Gold

nanoparticle: As novel agents for cancer treatment. *Advances in Applied NanoBio-Technologies*, 1-6.

Kalpana, V. N., Kataru, B. A. S., Sravani, N., Vigneshwari, T., Panneerselvam, A., & Rajeswari, V. D. (2018). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using culture filtrates of Aspergillus niger: Antimicrobial textiles and dye degradation studies. *OpenNano, 3*, 48-55.

Kamada, S., Kikkawa, U., Tsujimoto, Y., & Hunter, T. (2005). Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein (s). *Journal of Biological Chemistry, 280*(2), 857-860.

Kamalakannan, S., Gobinath, C., & Ananth, S. (2014). Synthesis and characterization of fungus mediated silver nanoparticle for toxicity on filarial vector, Culex quinquefasciatus. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res, 24*(2), 124-132.

Ke, Y., Al Aboody, M. S., Alturaiki, W., Alsagaby, S. A., Alfaiz, F. A., Veeraraghavan, V. P., & Mickymaray, S. (2019). Photosynthesized gold nanoparticles from Catharanthus roseus induces caspase-mediated apoptosis in cervical cancer cells (HeLa). Artificial cells, *nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 1938-1946.

Keefe, J. C., & Rome, N. (2007). A brief introduction to precious metals. *AMMTIAC Quarterly*, 2(1), 9-14.

Kelmani Chandrakanth, R. (2020). Antibacterial Activity of Biogenic Zinc oxide Nanoparticals synthesised from Enterococcus

faecalis.

Khan, M., Ahmad, F., Koivisto, J. T., & Kellomäki, M. (2020). Green synthesis of controlled size gold and silver nanoparticles using antioxidant as capping and reducing agent. *Colloid and Interface Science Communications, 39,* 100322.

Kim, S. H., Nam, O., Jin, E., & Gu, M. B. (2019). A new coccolith modified electrode-based biosensor using a cognate pair of aptamers with sandwich-type binding. *Biosensors and Bioelectronics, 123,* 160-166.

Kitching, M., Ramani, M., & Marsili, E. (2015). Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up. *Microbial biotechnology, 8*(6), 904-917.

Kobashigawa, J. M., Robles, C. A., Ricci, M. L. M., & Carmarán, C. C. (2019). Influence of strong bases on the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the ligninolytic fungi Trametes trogii. *Saudi journal of biological sciences, 26*(7), 1331-1337.

Koch, T., Fathi, A., & Addo, M. M. (2021). The COVID-19 vaccine landscape. *Coronavirus Disease-COVID-19,* 549-573.

Koul, B., Poonia, A. K., Yadav, D., & Jin, J. O. (2021). Microbe-mediated biosynthesis of nanoparticles: *Applications and future prospects. Biomolecules, 11*(6), 886.

Krajina, B. A., Proctor, A. C., Schoen, A. P., Spakowitz, A. J., & Heilshorn, S. C. (2018). Biotemplated synthesis of inorganic materials: An emerging paradigm for nanomaterial synthesis inspired by nature. *Progress in Materials Science, 91,* 1-23.

KS, U. S., Govindaraju, K., Prabhu, D., Arulvasu, C., Karthick, V., & Changmai, N. (2016). Anti-proliferative effect of biogenic gold nanoparticles against breast cancer cell lines (MDA-MB-231 & MCF-7). *Applied Surface Science, 371*, 415-424.

Kumar, D., Mutreja, I., Chitcholtan, K., & Sykes, P. (2017). Cytotoxicity and cellular uptake of different sized gold nanoparticles in ovarian cancer cells. *Nanotechnology*, 28(47), 475101.

Kumar, S., Aharwal, R. P., Jain, R., & Sandhu, S. S. (2021). Bioactive molecules of endophytic fungi and their potential in anticancer drug development. *Current Pharmacology Reports*, *7*, 27-41.

Kurapov, P. B., & Bakhtenko, E. Y. (2018). Gold nanoparticles in the diagnosis and treatment of cancer. *Bulletin of Russian State Medical University, (*6), 79-85

Kushwaha, A., Singh, V. K., Bhartariya, J., Singh, P., & Yasmeen, K. (2015). Isolation and identification of E. coli bacteria for the synthesis of silver nanoparticles: characterization of the particles and study of antibacterial activity. *Eur J Exp Biol*, 5(1), 65-70.

Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S. K., & White Jr, J. F. (2018). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Letters in applied microbiology, 66*(4), 268-276.

Lee, E., Jeon, H., Lee, M., Ryu, J., Kang, C., Kim, S ., & Kwon, Y. (2019). Molecular origin of AuNPs-induced cytotoxicity and mechanistic study. *Scientific reports, 9*(1), 1-13.

Lee, K. X., Shameli, K., Yew, Y. P., Teow, S. Y., Jahangirian, H., Rafiee-Moghaddam, R., & Webster, T. J. (2020). Recent developments in the facile bio-synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) and their biomedical applications. *International journal of nanomedicine, 15,* 275.

Li, J., Li, Q., Ma, X., Tian, B., Li, T., Yu, J., & Hua, Y. (2016). Biosynthesis of gold nanoparticles by the extreme bacterium Deinococcus radiodurans and an evaluation of their antibacterial properties. *International journal of nanomedicine, 11,* 5931.

Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C., & Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology advances, 32*(4), 711-726.

Lin, G., Revia, R. A., & Zhang, M. (2021). Inorganic Nanomaterial-Mediated Gene Therapy in Combination with Other Antitumor Treatment Modalities. *Advanced Functional Materials, 31*(5), 2007096.

Liu, R., Pei, Q., Shou, T., Zhang, W., Hu, J., & Li, W. (2019). Apoptotic effect of green synthesized gold nanoparticles from Curcuma wenyujin extract against human renal cell carcinoma A498 cells. *International Journal of Nanomedicine, 14,* 4091.

Louis, C., & Pluchery, O. (Eds.). (2017). Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology. *World Scientific.*

Lukong, K. E. (2017). Understanding breast cancer–The long and winding road. *BBA clinical, 7,* 64-77.

Lv, Q., Zhang, B., Xing, X., Zhao, Y., Cai, R., Wang, W., & Gu, Q.

(2018). Biosynthesis of copper nanoparticles using Shewanella loihica PV-4 with antibacterial activity: Novel approach and mechanisms investigation. *Journal of hazardous materials, 347,* 141-149.

Madani, S. Z. M., Safaee, M. M., Gravely, M., Silva, C., Kennedy, S., Bothun, G. D., & Roxbury, D. (2020). Carbon nanotube–liposome complexes in hydrogels for controlled drug delivery via near-infrared laser stimulation. *ACS Applied Nano Materials, 4*(1), 331-342.

Madkour, L. H. (2019). Introduction to nanotechnology (NT) and nanomaterials (NMs). *In Nanoelectronic Materials* (pp. 1-47). Springer, Cham.

Maghsoudnia, N., Eftekhari, R. B., Sohi, A. N., Zamzami, A., & Dorkoosh, F. A. (2020). Application of nano-based systems for drug delivery and targeting: *a review. Journal of Nanoparticle Research, 22*(8), 1-41.

Manisha, D. R., Ramchander, M., Prashanthi, Y., & Pratap, M. P. R. (2014). Phototrophic bacteria mediated synthesis, characterisation and antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nanosci Nanotechnol Int J, 4*(2), 20-24.

Manjunath, H. M., Joshi, C. G., & Raju, N. G. (2017). Biofabrication of gold nanoparticles using marine endophytic fungus–Penicillium citrinum. *IET nanobiotechnology, 11*(1), 40-44.

Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., &

Baradaran, B. (2017). The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review. *Advanced pharmaceutical bulletin, 7*(3), 339.

Matteucci, F., Giannantonio, R., Calabi, F., Agostiano, A., Gigli, G., & Rossi, M. (2018, July). Deployment and exploitation of nanotechnology nanomaterials and nanomedicine. *In AIP conference proceedings* (Vol. 1990, No. 1, p. 020001). AIP Publishing LLC.

Mikhailova, E. O. (2021). Gold Nanoparticles: Biosynthesis and Potential of Biomedical Application. *Journal of Functional Biomaterials, 12*(4), 70.

Misra, M., Sachan, A., & Sachan, S. G. (2021). Role of fungal endophytes in the green synthesis of nanoparticles and the mechanism. *In Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-technology* (pp. 489-513). Academic Press.

Mohamad Nor, N., & Wazir, M. (2022). Pb2+ Removal by Using Activated Coconut Waste Modified with Different Metal Oxide Nanoparticles. *ESTEEM Academic Journal, 18,* 1-10.

Molnár, Z., Bódai, V., Szakacs, G., Erdélyi, B., Fogarassy, Z., Sáfrán, G., ... & Lagzi, I. (2018). Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi. *Scientific reports, 8*(1), 1-12.

Moraga, N. B., Irazusta, V., Amoroso, M. J., & Rajal, V. B. (2017). Bio-precipitates produced by two autochthonous boron tolerant

Streptomyces strains. *Journal of environmental chemical engineering*, *5*(4), 3373-3383.

Muddapur, U. M., Alshehri, S., Ghoneim, M. M., Mahnashi, M. H., Alshahrani, M. A., Khan, A. A., ... & Ahmad, M. Z. (2022). Plant-Based Synthesis of Gold Nanoparticles and Theranostic Applications: *A Review*. *Molecules*, 27(4), 1391.

Mughal, B., Zaidi, S. Z. J., Zhang, X., & Hassan, S. U. (2021). Biogenic nanoparticles: Synthesis, characterisation and applications. *Applied Sciences*, *11*(6), 2598.

Mulvaney, P. (2015). Nanoscience vs Nanotechnology Defining the Field. *ACS nano*, *9*(3), 2215-2217.

Mulvihill, J. J., Cunnane, E. M., Ross, A. M., Duskey, J. T., Tosi, G., & Grabrucker, A. M. (2020). Drug delivery across the blood–brain barrier: recent advances in the use of nanocarriers. *Nanomedicine*, *15*(2), 205-214

Munawer, U., Raghavendra, V. B., Ningaraju, S., Krishna, K. L., Ghosh, A. R., Melappa, G., & Pugazhendhi, A. (2020). Biofabrication of gold nanoparticles mediated by the endophytic Cladosporium species: Photodegradation, in vitro anticancer activity and in vivo antitumor studies. International *Journal of Pharmaceutics*, *588*, 119729.

Nadaf, N. Y., & Kanase, S. S. (2019). Biosynthesis of gold nanoparticles by Bacillus marisflavi and its potential in catalytic dye degradation. *Arabian Journal of Chemistry*, *12*(8), 4806-4814.

Nangare, S. N., & Patil, P. O. (2020). Affinity-based nanoarchitectured biotransducer for sensitivity enhancement of surface plasmon resonance sensors for in vitro diagnosis: a review. *ACS Biomaterials Science & Engineering, 7*(1), 2-30.

Netala, V. R., Bukke, S., Domdi, L., Soneya, S., G. Reddy, S., Bethu, M. S., ... & Tartte, V. (2018). Biogenesis of silver nanoparticles using leaf extract of Indigofera hirsuta L. and their potential biomedical applications (3-in-1 system). *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 46*(sup1), 1138-1148.

Neyaz, N., Siddiqui, W. A., & Nair, K. K. (2014). Application of surface functionalized iron oxide nanomaterials as a nanosorbents in extraction of toxic heavy metals from ground water: a review. *International Journal of Environmental Sciences, 4*(4), 472.

Niranjan Dhanasekar, N., Ravindran Rahul, G., Badri Narayanan, K., Raman, G., & Sakthivel, N. (2015). Green chemistry approach for the synthesis of gold nanoparticles using the fungus Alternaria sp. *Journal of microbiology and biotechnology, 25*(7), 1129-1135.

Nur, Y. (2013). *Gold nanoparticles: synthesis, characterisation and their effect on Pseudomonas flourescens* (Doctoral dissertation, University of Birmingham).

Ogarev, V. A., Rudoi, V. M., & Dement'Eva, O. V. (2018). Gold nanoparticles: synthesis, optical properties, and application. Inorganic Materials: *Applied Research, 9*(1), 134-140.

Okamoto, T., Nakamura, T., Sakota, K., & Yatsuhashi, T. (2019). Synthesis of single-nanometer-sized gold nanoparticles in liquid–liquid dispersion system by femtosecond laser irradiation. *Langmuir, 35(*37), 12123-12129.

Ovais, M., Khalil, A. T., Ayaz, M., Ahmad, I., Nethi, S. K., & Mukherjee, S. (2018). Biosynthesis of metal nanoparticles via microbial enzymes: a mechanistic approach. *International journal of molecular sciences, 19*(12), 4100.

Owaid, M. N., Rabeea, M. A., Aziz, A. A., Jameel, M. S., & Dheyab, M. A. (2019). Mushroom-assisted synthesis of triangle gold nanoparticles using the aqueous extract of fresh Lentinula edodes (shiitake), Omphalotaceae. Environmental Nanotechnology, *Monitoring & Management, 12,* 100270.

Pandey, P., & Dahiya, M. (2016). A brief review on inorganic nanoparticles. *J Crit Rev, 3*(3), 18-26.

Parsa, R. (2011). *Nanoelectromechanical relays for low power applications*. Stanford University.

Parveen, M., Kumar, A., Khan, M. S., Rehman, R., Furkan, M., Khan, R. H., & Nami, S. A. (2022). Comparative study of biogenically synthesized silver and gold nanoparticles of Acacia auriculiformis leaves and their efficacy against Alzheimer's and Parkinson's disease. *International Journal of Biological Macromolecules, 203,* 292-301.

Patil, M. P., Bayaraa, E., Subedi, P., Piad, L. L. A., Tarte, N. H., & Kim, G. D. (2019). Biogenic synthesis, characterization of gold

nanoparticles using Lonicera japonica and their anticancer activity on HeLa cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 51*, 83-90.

Patkar, N. B., Sharan, M., & Twain, M. (2019). Did Nanotechnology Flourish During the Roman Empire and Medieval Periods?. *History of Nanotechnology: From Pre-Historic to Modern Times,* 113-140.

Patra, S., Mukherjee, S., Barui, A. K., Ganguly, A., Sreedhar, B., & Patra, C. R. (2015). Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. *Materials Science and Engineering:* C, 53, 298-309.

Paul, W., & Sharma, C. P. (2020). Inorganic nanoparticles for targeted drug delivery. *Biointegration of medical implant materials*, 333-373.

Peng, J., & Liang, X. (2019). Progress in research on gold nanoparticles in cancer management. *Medicine, 98*(18).

Pourali, P., Badiee, S. H., Manafi, S., Noorani, T., Rezaei, A., & Yahyaei, B. (2017). Biosynthesis of gold nanoparticles by two bacterial and fungal strains, Bacillus cereus and Fusarium oxysporum, and assessment and comparison of their nanotoxicity in vitro by direct and indirect assays. *Electronic Journal of Biotechnology, 29,* 86-93.

Pourali, P., Yahyaei, B., & Afsharnezhad, S. (2018). Bio-synthesis of gold nanoparticles by Fusarium oxysporum and assessment of their conjugation possibility with two types of β-lactam antibiotics

without any additional linkers. *Microbiology, 87*(2), 229-237.

Prema, P., Iniya, P. A., & Immanuel, G. (2016). Microbial mediated synthesis, characterization, antibacterial and synergistic effect of gold nanoparticles using Klebsiella pneumoniae (MTCC-4030). *RSC advances, 6*(6), 4601-4607.

Purohit, J., Chattopadhyay, A., & Singh, N. K. (2019). Green synthesis of microbial nanoparticle: *approaches to application. In Microbial Nanobionics* (pp. 35-60). Springer, Cham.

Qian, L., Su, W., Wang, Y., Dang, M., Zhang, W., & Wang, C. (2019). Synthesis and characterization of gold nanoparticles from aqueous leaf extract of Alternanthera sessilis and its anticancer activity on cervical cancer cells (HeLa). *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 47*(1), 1173-1180.

Qin, W., Wang, C. Y., Ma, Y. X., Shen, M. J., Li, J., Jiao, K., ... & Niu, L. N. (2020). Microbe-Mediated Extracellular and Intracellular Mineralization: Environmental, Industrial, and Biotechnological Applications. *Advanced Materials, 32*(22), 1907833.

Qu, R., Zhang, W., Liu, N., Zhang, Q., Liu, Y., Li, X., ... & Feng, L. (2018). Antioil Ag3PO4 nanoparticle/polydopamine/Al2O3 sandwich structure for complex wastewater treatment: dynamic catalysis under natural light. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 6*(6), 8019-8028.

Qureshi, A., Blaisi, N. I., Abbas, A. A., Khan, N. A., & Rehman, S. (2021). Prospectus and development of microbes mediated

synthesis of nanoparticles. In Microbial nanotechnology: *Green synthesis and applications* (pp. 1-15). Springer, Singapore.

Rafique, M., Tahir, M. B., Rafique, M. S., & Hamza, M. (2020). History and fundamentals of nanoscience and nanotechnology. *In Nanotechnology and photocatalysis for environmental applications* (pp. 1-25). Elsevier.

Rajan, M., Krishnan, P., Pradeepkumar, P., Jeyanthinath, M., Jeyaraj, M., Ling, M. P., ... & Kumar, S. S. (2017). Magneto-chemotherapy for cervical cancer treatment with camptothecin loaded Fe 3 O 4 functionalized β-cyclodextrin nanovehicle. *RSC advances, 7*(73), 46271-46285

Rajathi, F. A. A., Parthiban, C., Kumar, V. G., & Anantharaman, P. (2012). Biosynthesis of antibacterial gold nanoparticles using brown alga, Stoechospermum marginatum (kützing). Spectrochimica Acta Part A: *Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 99,* 166-173.

Ramalingam, V. (2019). Multifunctionality of gold nanoparticles: Plausible and convincing properties. Advances in Colloid and *Interface Science, 271,* 101989.

Ramezani, N., Ehsanfar, Z., Shamsa, F., Amin, G., Shahverdi, H. R., Esfahani, H. R. M., ... & Shahverdi, A. R. (2008). Screening of medicinal plant methanol extracts for the synthesis of gold nanoparticles by their reducing potential. *Zeitschrift für Naturforschung B, 63*(7), 903-908.

Rao, C. N. R., Kulkarni, G. U., Thomas, P. J., & Edwards, P. P.

(2002). Size-dependent chemistry: properties of nanocrystals. *Chemistry–A European Journal, 8*(1), 28-35.

Rao, C. V., Asch, A. S., & Yamada, H. Y. (2017). Frequently mutated genes/pathways and genomic instability as prevention targets in liver cancer. *Carcinogenesis, 38*(1), 2-11.

Rastogi, S., Kumari, V., Sharma, V., & Ahmad, F. J. (2021). Gold Nanoparticle-based Sensors in Food Safety Applications. *Food Analytical Methods*, 1-17.

Riggio, A. I., Varley, K. E., & Welm, A. L. (2021). The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer. *British journal of cancer, 124*(1), 13-26.

Ritter, P. M., Marti, A., Blanc, C., Baltzer, A., Krajewski, S., Reed, J. C., & Jaggi, R. (2000). Nuclear localization of procaspase-9 and processing by a caspase-3-like activity in mammary epithelial cells. *European journal of cell biology, 79*(5), 358-364.

Rónavári, A., Igaz, N., Adamecz, D. I., Szerencsés, B., Molnar, C., Kónya, Z., ... & Kiricsi, M. (2021). Green silver and gold nanoparticles: Biological synthesis approaches and potentials for biomedical applications. *Molecules, 26*(4), 844.

Rostamizadeh, L., Fakhrjou, A., Montazeri, V., Estiar, M. A., Naghavi-Behzad, M., Hosseini, S., ... & Sakhinia, E. (2013). Bcl-2 gene expression in human breast cancers in iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 14*(7), 4209-4214.

Roy, S., Das, T. K., Maiti, G. P., & Basu, U. (2016). Microbial

biosynthesis of nontoxic gold nanoparticles. *Materials Science and Engineering:* B, 203, 41-51.

Roychoudhury, P., Dąbek, P., Gloc, M., Golubeva, A., Dobrucka, R., Kurzydłowski, K., & Witkowski, A. (2021). Reducing Efficiency of Fucoxanthin in Diatom Mediated Biofabrication of Gold Nanoparticles. *Materials, 14*(15), 4094.

Safaepour, M., Shahverdi, A. R., Shahverdi, H. R., Khorramizadeh, M. R., & Gohari, A. R. (2009). Green synthesis of small silver nanoparticles using geraniol and its cytotoxicity against fibrosarcoma-wehi 164. *Avicenna journal of medical biotechnology, 1*(2), 111.

Sangour, M.H.; Ali, I.M.: Atwan, Z.W. and Al-Ali, A.A. (2021). Effect of Ag nanoparticles on viability of MCF-& and Vero cell lines and gene expression of apoptotic genes. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 22:9.

Sanna, V., Pala, N., Dessi, G., Manconi, P., Mariani, A., Dedola, S., ... & Sechi, M. (2014). Single-step green synthesis and characterization of gold-conjugated polyphenol nanoparticles with antioxidant and biological activities. *International journal of nanomedicine, 9,* 4935.

Sana, S. S., Singh, R. P., Sharma, M., Srivastava, A. K., Manchanda, G., Rai, A. R., & Zhang, Z. J. (2021). Biogenesis and application of nickel nanoparticles: A review. *Current Pharmaceutical Biotechnology, 22*(6), 808-822.

Saravanan, M., Barik, S. K., MubarakAli, D., Prakash, P., &

Pugazhendhi, A. (2018). Synthesis of silver nanoparticles from Bacillus brevis (NCIM 2533) and their antibacterial activity against pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis, 116,* 221-226.

Sardul, S. S., Harshita, S., & Shyamji, S. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles by endophytic fungi: Its mechanism, characterization techniques and antimicrobial potential. *African Journal of Biotechnology, 16*(14), 683-698.

Sathishkumar, M., Pavagadhi, S., Mahadevan, A., & Balasubramanian, R. (2015). Biosynthesis of gold nanoparticles and related cytotoxicity evaluation using A549 cells. *Ecotoxicology and environmental safety, 114,* 232-240.

Seca, A. M., & Pinto, D. C. (2018). Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *International journal of molecular sciences, 19*(1), 263.

Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., & Maiti, P. (2018). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal transduction and targeted therapy, 3*(1), 1-19.

Shabestarian, H., Homayouni-Tabrizi, M., Soltani, M., Namvar, F., Azizi, S., Mohamad, R., & Shabestarian, H. (2016). Green synthesis of gold nanoparticles using sumac aqueous extract and their antioxidant activity. *Materials Research, 20,* 264-270.

Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. K., & Poinern, G.

E. J. (2015). Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *Materials, 8*(11), 7278-7308.

Sharma, H., Rai, A. K., Dahiya, D., Chettri, R., & Nigam, P. S. (2021). Exploring endophytes for in vitro synthesis of bioactive compounds similar to metabolites produced in vivo by host plants. *AIMS microbiology, 7*(2), 175.

Shen, W., Qu, Y., Pei, X., Li, S., You, S., Wang, J., ... & Zhou, J. (2017). Catalytic reduction of 4-nitrophenol using gold nanoparticles biosynthesized by cell-free extracts of Aspergillus sp. WL-Au. *Journal of hazardous materials, 321*, 299-306.

Shi, W. (2021). Application of Multifunctional Nanomaterials Combined with Sports Rehabilitation Training in the Diagnosis and Treatment of Cardiovascular Diseases. *Integrated Ferroelectrics, 216*(1), 81-93.

Siddiqi, K. S., & Husen, A. (2017). Recent advances in plant-mediated engineered gold nanoparticles and their application in biological system. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40, 10-23.

Siddique, R. H., Gomard, G., & Hölscher, H. (2015). The role of random nanostructures for the omnidirectional anti-reflection properties of the glasswing butterfly. *Nature communications, 6*(1), 1-8.

Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., ... & Ward, E. (2012). Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians, 62*(4), 220-

241.

Singh, D. K., Kumar, J., Sharma, V. K., Verma, S. K., Singh, A., Kumari, P., & Kharwar, R. N. (2018a). Mycosynthesis of bactericidal silver and polymorphic gold nanoparticles: *physicochemical variation effects and mechanism. Nanomedicine, 13*(2), 191-207.

Singh, P., Pandit, S., Mokkapati, V. R. S. S., Garg, A., Ravikumar, V., & Mijakovic, I. (2018b). Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. International journal of molecular sciences, 19(7), 1979.

Slama, H. B., Chenari Bouket, A., Alenezi, F. N., Pourhassan, Z., Golińska, P., Oszako, T., & Belbahri, L. (2021). Potentials of endophytic fungi in the biosynthesis of versatile secondary metabolites and enzymes. *Forests, 12*(12), 1784.

So, W. K., Law, B. M., Ng, M. S., He, X., Chan, D. N., Chan, C. W., & McCarthy, A. L. (2021). Symptom clusters experienced by breast cancer patients at various treatment stages: *A systematic review. Cancer Medicine, 10*(8), 2531-2565.

Soltani Nejad, M., Samandari Najafabadi, N., Aghighi, S., Pakina, E., & Zargar, M. (2022). Evaluation of Phoma sp. Biomass as an Endophytic Fungus for Synthesis of Extracellular Gold Nanoparticles with Antibacterial and Antifungal Properties. *Molecules, 27*(4), 1181.

Song, W. C., Kim, B., Park, S. Y., Park, G., & Oh, J. W. (2022). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using Sargassum

horneri extract as catalyst for industrial dye degradation. *Arabian Journal of Chemistry, 15*(9), 104056.

Speed, D., Westerhoff, P., Sierra-Alvarez, R., Draper, R., Pantano, P., Aravamudhan, S., ... & Shadman, F. (2015). Physical, chemical, and in vitro toxicological characterization of nanoparticles in chemical mechanical planarization suspensions used in the semiconductor industry: towards environmental health and safety assessments. *Environmental Science: Nano, 2(*3), 227-244.

Srinath, B. S., Namratha, K., & Byrappa, K. (2018). Eco-friendly synthesis of gold nanoparticles by Bacillus subtilis and their environmental applications. *Advanced Science Letters, 24*(8), 5942-5946.

Subhan, M. A., Attia, S. A., & Torchilin, V. P. (2021). Advances in siRNA delivery strategies for the treatment of MDR cancer. *Life Sciences, 274,* 119337.

Subramani, K., Elhissi, A., Subbiah, U., & Ahmed, W. (2019). Introduction to nanotechnology. In *Nanobiomaterials in clinical dentistry* (pp. 3-18). Elsevier.

Sunderam, V., Thiyagarajan, D., Lawrence, A. V., Mohammed, S. S. S., & Selvaraj, A. (2019). In-vitro antimicrobial and anticancer properties of green synthesized gold nanoparticles using Anacardium occidentale leaves extract. *Saudi Journal of Biological Sciences, 26*(3), 455-459.

Sutan, N. A., Manolescu, D. S., Fierascu, I., Neblea, A. M., Sutan, C., Ducu, C., ... & Fierascu, R. C. (2018). Phytosynthesis of gold and silver nanoparticles enhance in vitro antioxidant and mitostimulatory activity of Aconitum toxicum Reichenb. rhizomes alcoholic extracts. *Materials Science and Engineering:* C, 93, 746-758.

Taha, Z. K., Hawar, S. N., & Sulaiman, G. M. (2019). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles from Penicillium italicum and its antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities. *Biotechnology letters, 41*(8), 899-914.

Tao, A. R., Habas, S., & Yang, P. (2008). Shape control of colloidal metal nanocrystals. *small, 4*(3), 310-325.

Taylor, M. W. (2014). *A history of cell culture. In Viruses and man: a history of interactions* (pp. 41-52). Springer, Cham.

Terna, T. P., Mohamed Nor, N. M. I., & Zakaria, L. (2022). Histopathology of Corn Plants Infected by Endophytic Fungi. *Biology, 11*(5), 641.

Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E. (2020). Breast cancer: a molecularly heterogenous disease needing subtype-specific treatments. *Medical Sciences, 8*(1), 18.

Thakker, J. N., Dalwadi, P., & Dhandhukia, P. C. (2013). Biosynthesis of gold nanoparticles using Fusarium oxysporum f. sp. cubense JT1, a plant pathogenic fungus. *International Scholarly Research Notices,* 2013

Tripathi, G. K. (2019). Engineered Nanomaterials And Their

Properties: A Review. Biosci. *Biotech. Res. Comm, 12,* 764-771.

Tripathi, R. M., Shrivastav, B. R., & Shrivastav, A. (2018). Antibacterial and catalytic activity of biogenic gold nanoparticles synthesised by Trichoderma harzianum. *IET nanobiotechnology, 12*(4), 509-513.

Tufail, M., Cui, J., & Wu, C. (2022). Breast cancer: molecular mechanisms of underlying resistance and therapeutic approaches. *American Journal of Cancer Research, 12*(7), 2920.

Turasan, H., Cakmak, M., & Kokini, J. (2019). Fabrication of zein-based electrospun nanofiber decorated with gold nanoparticles as a SERS platform. *Journal of Materials Science, 54*(12), 8872-8891.

Umeno, A., Biju, V., & Yoshida, Y. (2017). In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes. *Free radical research, 51*(4), 413-427.

Uzma, M., Raghavendra, V. B., & Girisha, S. T. (2018). Biogenesis of gold nanoparticles, role of fungal endophytes and evaluation of anticancer activity-A review. *Eur. J. Biomed. Pharm. Sci, 5,* 319-329.

Van J, Shaw M, Grant-Downton R (2014). Botrytis species: Relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue*? Mol Plant Pathol 15*:957–961.

Vaseghi, Z., Nematollahzadeh, A., & Tavakoli, O. (2018). Green methods for the synthesis of metal nanoparticles using biogenic

reducing agents: *a review*. *Reviews in Chemical Engineering*, *34*(4), 529-559.

Vemuri, S. K., Banala, R. R., Mukherjee, S., Uppula, P., Subbaiah, G. P. V., AV, G. R., & Malarvilli, T. (2019). Novel biosynthesized gold nanoparticles as anti-cancer agents against breast cancer: Synthesis, biological evaluation, molecular modelling studies. *Materials Science and Engineering: C,* 99, 417-429.

Vinay, S. P., Sumedha, H. N., Shashank, M., Nagaraju, G., & Chandrasekhar, N. (2021). In-vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic potential of gold nanoparticles synthesized using novel Elaeocarpus ganitrus seeds extract. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, *6*(1), 127-133.

Vinosha, M., Palanisamy, S., Muthukrishnan, R., Selvam, S., Kannapiran, E., You, S., & Prabhu, N. M. (2019). Biogenic synthesis of gold nanoparticles from Halymenia dilatata for pharmaceutical applications: Antioxidant, anti-cancer and antibacterial activities. Process Biochemistry, 85, 219-229.

Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama, 321*(3), 288-300.

Wang, R., Billone, P. S., & Mullett, W. M. (2013). Nanomedicine in action: an overview of cancer nanomedicine on the market and in clinical trials. *Journal of Nanomaterials*, 2013.

Wang, X. J., Chen, J. Y., Fu, L. Q., & Yan, M. J. (2020). Recent advances in natural therapeutic approaches for the treatment of

cancer. *Journal of Chemotherapy, 32*(2), 53-65.

Wickes, B. L., & Wiederhold, N. P. (2018). Molecular diagnostics in medical mycology. *Nature communications*, 9(1), 1-13.

Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., & Hannun, Y. A. (2018). Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nature communications, 9*(1), 1-12.

Xie, Y. H., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal transduction and targeted therapy, 5*(1), 1-30.

Xie, Y., Lv, X., Luo, C., Hu, K., Gou, Q., Xie, K., & Zheng, H. (2017). Surgery of the primary tumor improves survival in women with stage IV breast cancer in Southwest China: a retrospective analysis. *Medicine, 96*(22).

Xu, Q., Gao, X., Zhao, S., Liu, Y. N., Zhang, D., Zhou, K., ... & Bowen, C. (2021). Construction of Bio-Piezoelectric Platforms: From Structures and Synthesis to Applications. *Advanced Materials, 33*(27), 2008452.

Yadav, V. K., Yadav, K. K., Cabral-Pinto, M. M., Choudhary, N., Gnanamoorthy, G., Tirth, V., ... & Khan, N. A. (2021). The processing of calcium rich agricultural and industrial waste for recovery of calcium carbonate and calcium oxide and their application for environmental cleanup: *A review. Applied Sciences, 11*(9), 4212.

Yang, W., Liang, H., Ma, S., Wang, D., & Huang, J. (2019). Gold nanoparticle based photothermal therapy: Development and

application for effective cancer treatment. Sustainable Materials and Technologies, 22, e00109.

Yang, X., Yang, M., Pang, B., Vara, M., & Xia, Y. (2015). Gold nanomaterials at work in biomedicine. *Chemical reviews*, *115*(19), 10410-10488.

Zadeh, F. A., Bokov, D. O., Salahdin, O. D., Abdelbasset, W. K., Jawad, M. A., Kadhim, M. M., ... & Khatami, M. (2022). Cytotoxicity evaluation of environmentally friendly synthesis Copper/Zinc bimetallic nanoparticles on MCF-7 cancer cells. Rendiconti Lincei. *Scienze Fisiche e Naturali*, 1-7.

Zeh, G. (2020). *Oligo-Aminoferrocenes for Cancer Treatment* (Doctoral dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU)).

Zhang, X., Qu, Y., Shen, W., Wang, J., Li, H., Zhang, Z., ... & Zhou, J. (2016). Biogenic synthesis of gold nanoparticles by yeast Magnusiomyces ingens LH-F1 for catalytic reduction of nitrophenols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *497*, 280-285.

Zhang, R. R., Schroeder, A. B., Grudzinski, J. J., Rosenthal, E. L., Warram, J. M., Pinchuk, A. N., ... & Weichert, J. P. (2017). Beyond the margins: real-time detection of cancer using targeted fluorophores. *Nature reviews Clinical oncology*, *14*(6), 347-364.

الملاحق

Appendex

ملحق رقم (1) يبين تسلسل القواعد النتروجينية للفطريات المعزولة من النباتات قيد الدراسة بإستعمال برنامج Blast

29. Penicillium citrinum isolate MEBP0016 436bp **100%**
MT597829.1

GGCCCCGCGCCCGCCGACGGCCCCCCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCT
AT

AACGAAATTAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAA
CG

CAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA
AC

GCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCT
C

AAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCCCGCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGG
CAG

CGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGC
CC

GGCCGGCGCCAGCCGACCCCCAACCTTTAATTATCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTA
GG

GATACCCGCTGAACTT

30. Aspergillus fumigatus strain Zbf-R10 **551bp** **100%**
KX064986.1

CGAGTGAGGCCTCTGGGTCACCTCCCACCCGTGTCTATCGTACCTTG
TTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGACGGCCGCCGGGGAGGCCTTGC
GCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCT
GAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAAACTTTCA
ACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTG
AACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAG
CGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCC
CCTCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCG
GTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCTGCTCTGTAGGCCCGGCCG
GCGCCAGCCGACACCCAACTTTATTTTTCTAAGGTTGACCTCGGATC
AGGTAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

32. Aspergillus fumigatus isolate UWR_101 551 bp 99%

KY465755.1

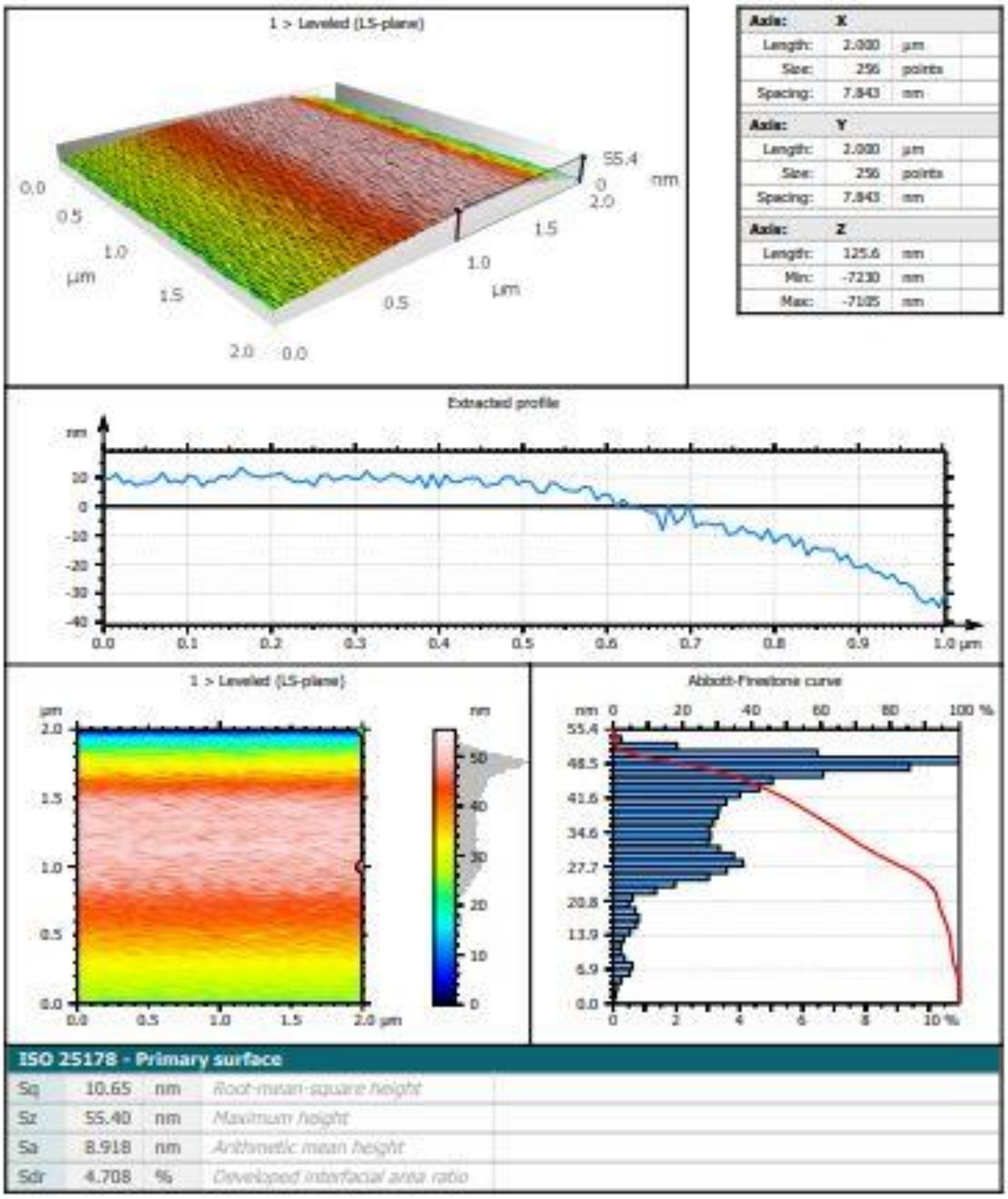
TTCGGAGTGAGACTCTGGGTCCACCTCCCACCCGTGTCTATCGTACC
TTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGACGGCCGCCGGGGAGGCCT
TGCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGT
TCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCT
TTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCC
GAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGT
CCCCCTCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGT
CCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCTGCTCTGTAGGCCCGG
CCGGCGCCAGCCGACACCCAACTTTATTTTTCTAAGGTTGACCTCGG
ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC

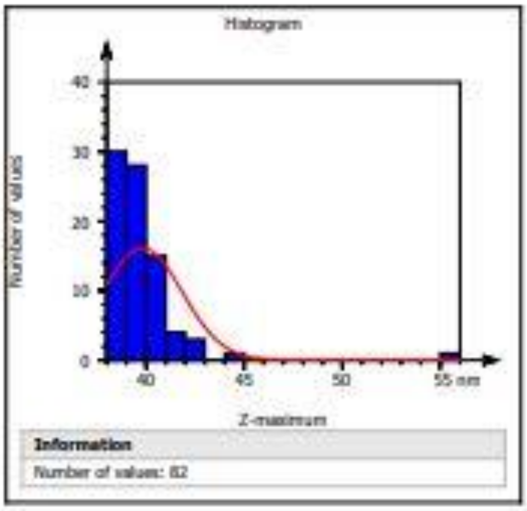
33. Aspergillus tubingensis strain HRb 547 bp 100%

KU243047.1

AGGGTCTTTGGGCCACCTCCCATCCGTGTCTATTATACCCTGTTGCT
TCGGCGGGCCCGCCGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGCGCCTTTGCCCC
CCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAG
CGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAA
TGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACG
CACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC
ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTC
TCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCC
TCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGC
CTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGG
TAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA

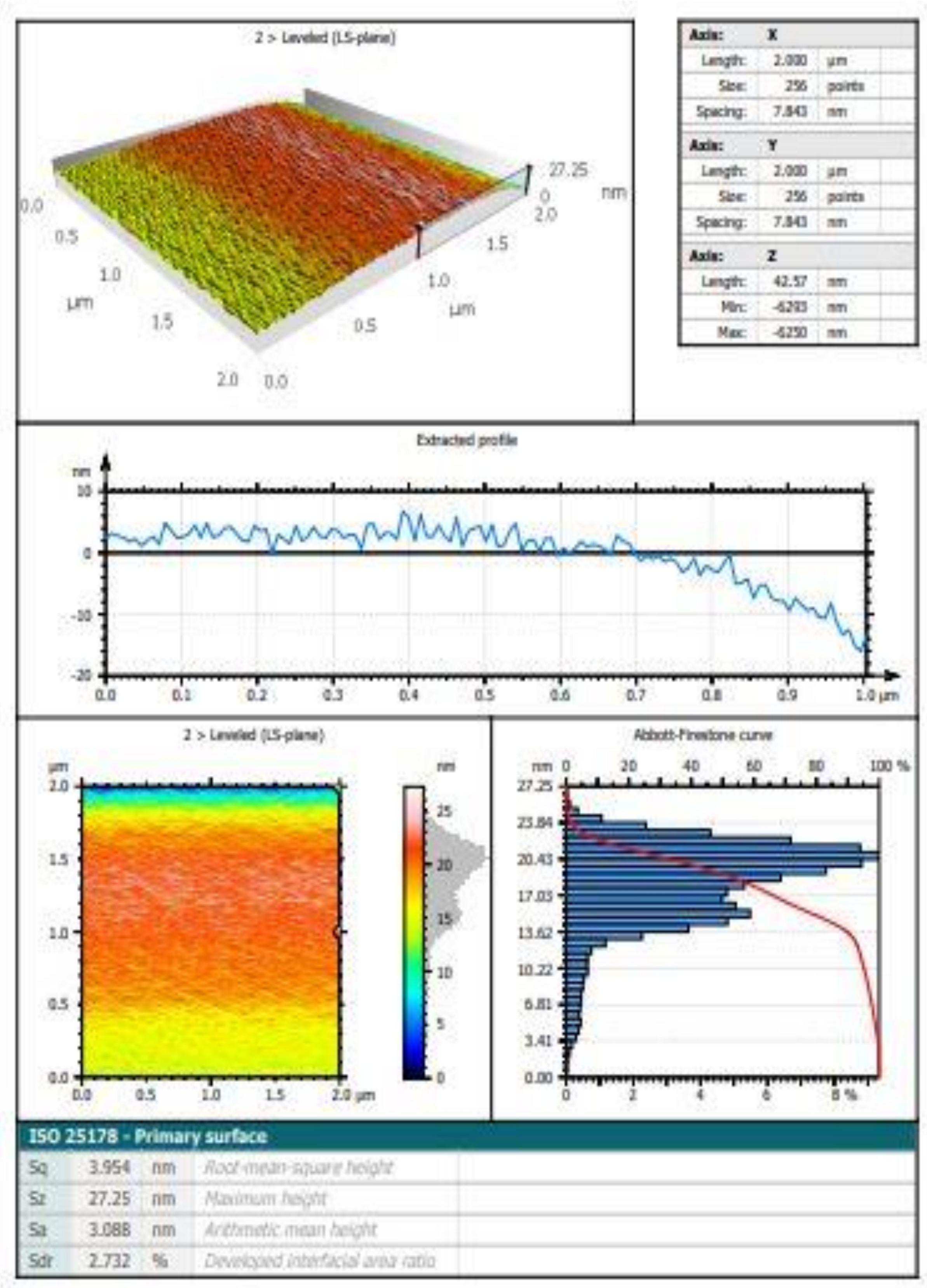
ملحق رقم (2) يبين قراءات جسيمات الذهب النانوية المخلقة من الفطر *A. tubingensis* strain HRb بواسطة جهاز AFM

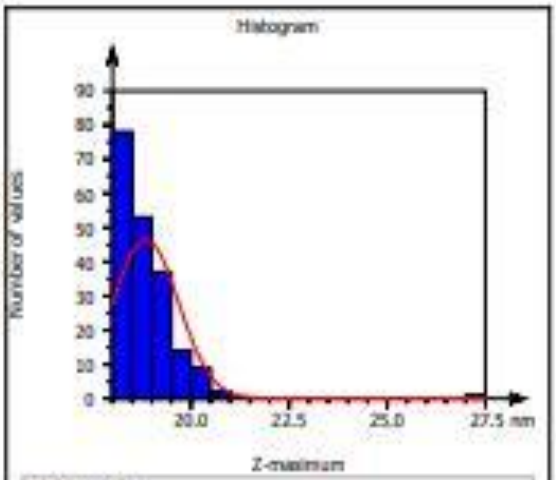




ISO 25178 - Roughness (S-L)		
F: [Workflow] Leveled (LS-plane)		
S-filter (λs): None		
L-filter (λc): Gaussian, 0.0008 mm		
Height parameters		
Sq	2.832	nm
Ssk	-2.159	
Sku	11.47	
Sp	7.776	nm
Sv	19.27	nm
Sz	27.05	nm
Sa	1.884	nm
Functional parameters		
Smr	100.0	%
Smc	2.795	nm
Sxp	7.782	nm
Spatial parameters		
Sal	0.1078	µm
Str	*****	
Std	5.245	°
Ssw	0.01416	µm
Hybrid parameters		
Sdq	0.3141	
Sdr	4.840	%
Functional parameters (Volume)		
Vm	9.218e-05	µm³/µm²
Vv	0.002887	µm³/µm²
Vmp	9.218e-05	µm³/µm²
Vmc	0.00183	µm³/µm²
Vvc	0.00238	µm³/µm²
Vvv	0.0005073	µm³/µm²
Functional parameters (Stratified surfaces)		
Sk	5.004	nm
Spk	1.835	nm
Svk	6.099	nm
Smr1	9.744	%
Smr2	87.38	%
Spq	1.949	
Svq	7.600	
Smq	88.11	
Sak1	89395	nm³/µm²
Sak2	384738	nm³/µm²
Spkx	4.951	nm
Svkx	17.09	nm
Warnings		
Str: The autocorrelation lobe touches the edges. Try to level the...		

ملحق رقم (3) قراءات جهاز AFM لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *fumigatus* isolate AZ-AR123.



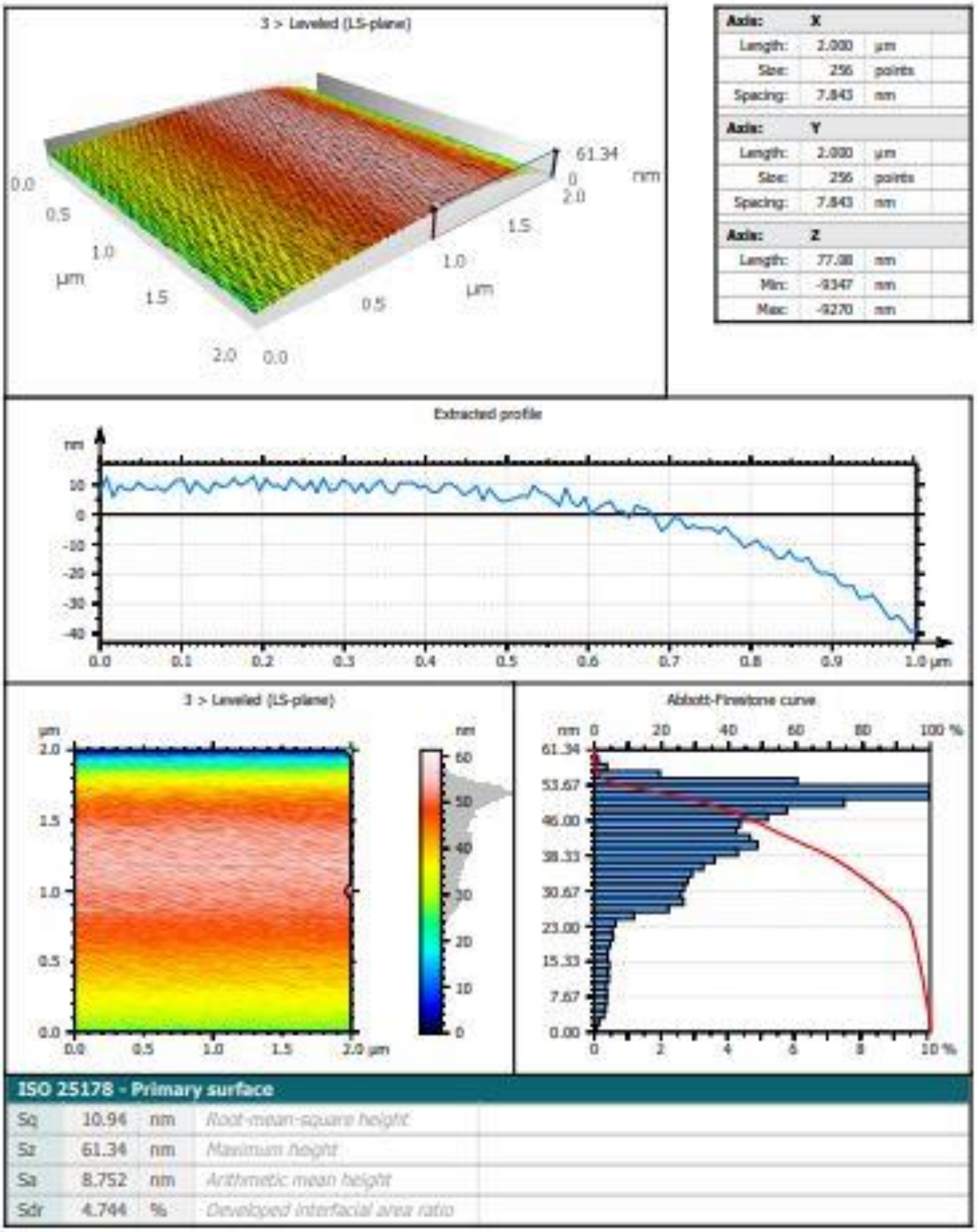


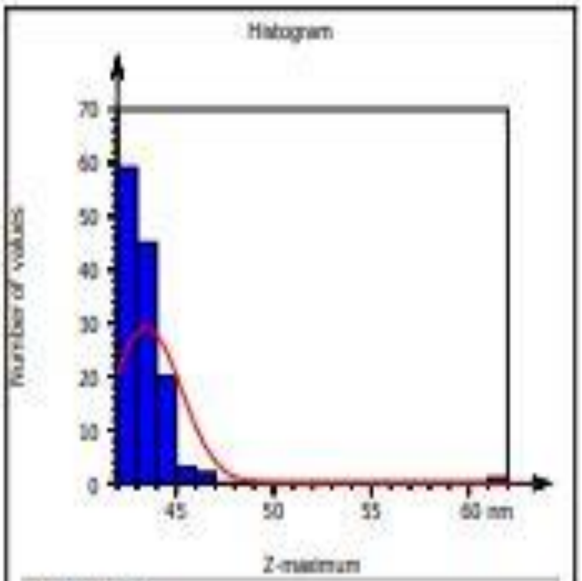
Information

Number of values: 194

ISO 25178 - Roughness (S-L)		
F: [Workflow] Leveled (LS-plane)		
S-filter (λs): None		
L-filter (λc): Gaussian, 0.0008 mm		
Height parameters		
Sq	1.694	nm
Ssk	-1.206	
Sku	6.917	
Sp	5.902	nm
Sv	10.82	nm
Sz	16.72	nm
Sa	1.235	nm
Functional parameters		
Smr	100.0	%
Smc	1.885	nm
Sxp	4.272	nm
Spatial parameters		
Sal	0.00796	µm
Str	*****	
Std	178.7	°
Ssw	0.02265	µm
Hybrid parameters		
Sdq	0.2374	
Sdr	2.721	%
Functional parameters (Volume)		
Vm	6.45e-05	$\mu m^3/\mu m^2$
Vv	0.00195	$\mu m^3/\mu m^2$
Vmp	6.45e-05	$\mu m^3/\mu m^2$
Vmc	0.001301	$\mu m^3/\mu m^2$
Vvc	0.001687	$\mu m^3/\mu m^2$
Vvv	0.0002628	$\mu m^3/\mu m^2$
Functional parameters (Stratified surfaces)		
Sk	3.618	nm
Spk	1.274	nm
Svk	3.028	nm
Smr1	9.280	%
Smr2	88.49	%
Spq	1.383	
Svq	4.250	
Smq	91.46	
Sak1	59116	$nm^3/\mu m^2$
Sak2	174284	$nm^3/\mu m^2$
Spkx	3.960	nm
Svkx	9.144	nm
Warnings		
Str: The autocorrelation lobe touches the edges. Try to level the...		

ملحق رقم (4) قراءات جهاز AFM لجسيمات الذهب النانوية المخلقة من راشح الفطر *Penicillium citrinum* isolate MEBP0016





Information
Number of values: 130

ISO 25178 - Roughness (S-L)		
F: [Workflow] Leveled (LS-plane)		
S-filter (λs): None		
L-filter (λc): Gaussian, 0.0008 mm		
Height parameters		
Sq	3.335	nm
Ssk	-2.536	
Sku	13.20	
Sp	8.616	nm
Sv	22.12	nm
Sz	30.74	nm
Sa	2.121	nm
Functional parameters		
Smr	100.0	%
Smc	3.069	nm
Sxp	10.68	nm
Spatial parameters		
Sal	0.1070	µm
Str	*****	
Std	0.7277	°
Ssw	0.01416	µm
Hybrid parameters		
Sdq	0.3151	
Sdr	4.661	%
Functional parameters (Volume)		
Vm	9.861e-05	$\mu m^3/\mu m^2$
Vv	0.003167	$\mu m^3/\mu m^2$
Vmp	9.861e-05	$\mu m^3/\mu m^2$
Vmc	0.001927	$\mu m^3/\mu m^2$
Vvc	0.002518	$\mu m^3/\mu m^2$
Vvv	0.0006494	$\mu m^3/\mu m^2$
Functional parameters (Stratified surfaces)		
Sk	5.293	nm
Spk	1.958	nm
Svk	7.855	nm
Smr1	9.775	%
Smr2	86.86	%
Spq	2.077	
Svq	12.45	
Smq	91.66	
Sa1	95713	$nm^3/\mu m^2$
Sa2	516087	$nm^3/\mu m^2$
Spkx	5.516	nm
Svkx	19.93	nm
Warnings		
Str: The autocorrelation lobe touches the edges. Try to level the...		

ملحق رقم(5) التحليل الاحصائي لجسيمات الذهب النانوية المحضرة مختبريا في فحص MTT

Variate: الفطر الأول

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	2	6.620	3.310	0.98	0.411
Residual	9	30.270	3.363		
Total	11	36.890			

المتوسطات	1	2	3
	99.90	99.85	98.30

l.s.d.0.05 2.934 (N.S)
cv% 1.8

***** Analysis of variance *****

Variate: الفطر الثاني

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	2	37.52	18.76	1.83	0.215
Residual	9	92.24	10.25		
Total	11	129.76			

المتوسطات	1	2	3
	95.70	99.40	99.50

l.s.d.0.05 5.121 (N.S)
cv% 3.3

***** Analysis of variance *****

Variate: الفطر الثالث

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
C1	2	2723.28	1361.64	73.05	<.001
Residual	9	167.76	18.64		
Total	11	2891.04			

المتوسطات	1	2	3
	A 99.7	B 70.6	B 65.5

l.s.d.0.05 6.91
cv% 5.5

ملحق رقم (6) صور تبين جسيمات الذهب النانوية عند التنقية والتجفيق

Summary

In the current study, samples of plant leaves (Aloe vera, Acacia, John were collected on the period between November 2020-mid-January 2021 from different areas of Misan governorate such as the college of Pharmacy Garden, college of science and home garden. Plant samples were brought to the biotechnology laboratory at the faculty of science university of Misan, the numbers of fungi were isolated by surface sterilization method. The fungi were initially diagnosed with light microscopy, and then four types of endophyte fungi were diagnosed molecularly using polymerase chain reaction technique (PCR). The fungus *Aspergillus fumigatus* isolate AZ-RA123 was isolated and identified from the leaves of the aloe vera plant, the fungus *Penicillium citrinum* isolate MEBPOO16 was isolated and identified from the leaves of the seal plant, the fungus *Aspergillus fumigatus* strain Zbf-R10 and the fungus *Aspergillus tubingensis* strain HRb were isolated from the leaves of the acacia plant. Gold nanoparticles were prepared by mixing fungal filtrate with gold tetrachloride solution $HAuCl_4 .3H_2O$. The results showed a color change occurred as an indicator and preliminary evidence of the formation of gold nanoparticles, the gold nanoparticles was confirmed by examining the UV-ViS spectrophotometer, λ_{max} of samples were in the range of 548 -620 nm. The physical characterization of the biologically synthesized gold nanoparticles included X-ray diffraction, transmission electron microscope (TEM), scanning electron microscope (SEM), atomic force microscope (AFM), and zeta potential. The results showed that X-ray diffraction

examination revealed that the gold nanoparticles possess a face-centered cubic structure (FCC). The results of the TEM examination showed that their sizes range from 12–187 nm and that they have different shapes. The results of the atomic force microscope examination of the two- and three-dimensional images of the biosynthetic gold nanoparticles also proved that they have dimensions within the nanoscale. The results of the zeta examination showed that the gold nanoparticles acquired negative surface charges that helped their non-repulsion and stability at the values (-9.4, -9.1, -8.9) mV. Also, the anti-tumor biological activity against the breast cancer cell line MCF-7 was evaluated for gold nanoparticle solutions. It was found that gold nanoparticles prepared from Penicillium citrinum isolate MEBPOO16 only have anti-cancer activity at concentrations of 1000 and 500 µg/ml, with an inhibition rate of 35% and 30%, respectively, with a mechanism that is not depend on the activation of the enzyme caspase-3. The results of the statistical analysis confirmed the existence of significant differences between the concentrations that inhibit cancer cells at a significant level of 0.05. The effectiveness of gold nanoparticles prepared from Aspergillus fumigatus strain Zbf-R10 as antioxidants was evaluated by the scavenging method by the radical of DPPH (22,-diphenyl-1-picrylhydrazyl), the results showed that gold nanoparticles have the highest antioxidant activity with a scavenging percentage of 71% at a concentration of 800 µg/ml.

Ministry of Higher Education
And Science Research
University of Misan
Collage of Science
Department of Biology

Biosynthesis of Gold Nanoparticles By Some Endophytic Fungi and Determination Of Their Biological Activities As Anti-Oxidant And Anti-Cance

Submitted to the council of the college of science \ university of Misan as partial fulfilment of the requriements for the master degree in biology

By

Azhar Mohammed Alewi

B.Sc.Biology(2001)

Supervised

Assist . Prof . Dr. Rashid Rahim Hateet

January 2023 A.D 1444A.H