تم تدقيق البحث من قبل
الاستاذ:
بتاريخ:
وقد تم تصحيح كافة الاخطاء وكان البحث وفق متطلبات النشر
توقيع الاستاذ:

تقدير فاعلية مستخلصات نباتي الاس و الحبة السوداء في حيوية الرؤيسات الاولية لطفيلي الاكياس المائية:دراسة خارج الجسم *In Vitro*

.ندى محمد طه البشير,* هدى ظاهر المرسومي,** بدر محمد العزاوي
مركز البحوث الطبية، كلية الطب، جامعة النهرين. بغداد- العراق
* قسم الاحياء المجهرية، كلية الطب ، جامعة النهرين. بغداد-العراق
**قسم علوم حياة، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية. بغداد-العراق

الخلاصة

هدفت الدراسة الى أمكانية علاج مرض الاكياس المائية Hydatidosis المتسبب عن الطور اليرقي للمشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosus* باستخدام المستخلص المائي لكل من نباتي الاس *Myrtus communis* وبذور الحبة السوداء *Nigella sativa* . حيث درس تأثير هذين المستخلصين على حيوية الرؤيسات الاولية protoscolices للطفيلي خارج الجسم *in vitro* وبواقع خمسة تراكيز لكل منهما تراوحت ما بين (٣٠،٣٥،٤٠،٤٥،٥٠) ملغم /مل بدلائل الحيوية مستخدمين صبغة الايوسين المائية وحساب النسبة المئوية للحيوية .أشارت النتائج الاولية خارج الجسم ان المستخلص المائي لاوراق الاس كان أكثر فاعلية في ايقاف حيوية الرؤيسات الاولية يليه المستخلص المائي لبذور الحبة السوداء مقارنة بحالة السيطرة

EVALUATION THE ACTIVITY OF *MYRTUS . COMMUNIS* AND *NIGELLA. SATIVA* PLANT EXTRACT ON THE VIABILITY OF *ECHINOCOCCUS* PROTOSCOLICES: IN VITRO STUDY

Nada M.T. Al-Basheer,* Huda .Th. Al- Marsome , Bader M. Al –azawi**
Unite of research center, Collage of Medicin, University of Al-Nahrain .Baghdad-Iraq
*Depertment of Microbiology, Collage of Medicin, University of Al-Nahrain .Baghdad-Iraq
** Depertment of biology, Collage of Science, University of Al-Mustansryia. Baghdad-Iraq

Abstract

This study was aimed to treat the hydatid disease that caused by the larval stage of *Echinococcus granulosus* using two water plant extracts (leaves of *Myrtus communis*, seeds of *Nigella sativa*). The effect of these extracts had been studied on the viability of *E. granulosus* protoscolices *in vitro* using five concentrations of each of them ranging between (30,35,40,45,50)mg\ml for the plants extracts, The preliminary results revealed that *M. communis* extract was the most effective in killing the protoscolices *in vitr* than *N.sativa* in comparison to the control group.

المقدمة

يمثل مرض الاكياس المائية أحد المشكلات الصحية والوبائية في معظم دول العالم حيث يصاب به ٢٠٠ شخص لكل ١٠٠٠٠٠ شخص سنويا وفي العراق يعتبر من الامراض فوق المتوطنة [1].

يتسبب هذا المرض عن الطور اليرقي لطفيليات شريطية تابعة للجنس *Echinococcus* وهو من الامراض المشتركة بين الانسان والحيوان [2] وكمرض لايزال يشكل معضلة صحية واجتماعية واقتصادية وذلك لعدم ايجاد الدواء المؤثر والفعال ضده ولعدم ظهور الاعراض المرضية الابعد وصول المرض الى حالة متقدمة خاصة في الاعضاء المهمة مثل الدماغ والقلب اذا تصعب السيطرة العلاجية والجراحية له في تلك الاعضاء.

ولاهمية وخطورة المرض كانت هنالك العديد من المحاولات والحلول الغاية منها تقليل او الحد من الخمج وانتشاره . فقد كانت هناك دراسات أقريباذية اعطت نتائج واعدة [3] ودراسات فيزيائية باستخدام الاشعة فوق البنفسجية والاشعة السينية [4] أضافة الى الدراسات المناعية من خلال دراسة علاقة الطفيلي بالمضيف ودور الجهاز المناعي في مواجهة الطفيلي، ورغم ذلك بقى العلاج الجراحي من اكثر الوسائل شيوعا لحد الان [4,5] وبشكل عام فأن جميع الوسائل السابقة كانت ذات تأثيرات جانبية على المرضى . لذلك كان الاهتمام بأيجاد الوسائل البديلة كاستخدام النباتات لوفرتها في الطبيعة واحتوائها على مواد طبية فعالة حيث عمد الباحثين الى الكثير من النباتات لمعرفة مكوناتها واستخلاص مركباتها الفعالة ،ومن هذه النباتات: الحرمل ،السذاب ،الثوم وغيرها من النباتات التي تبين أنها مهمه في معالجة الكثير من الحالات المرضية.

أن أهم مميزات النباتات الطبية أحتواؤها على مواد فعالة كالقلويدات Alkaloids والكلايكوسيدات Glycosides والصابونياتSaponins والزيوت العطرية Volatile oil ومواد أخرى كثيرة [6]. هذه المواد الفعالة تتجمع بتراكيز قليلة جدا في بعض أجزاء النبات مما يجعل الجسم يتقبلها بصورتها الطبيعية وبدون أية عوارض جانبية [7]. لذا عمل الباحثون على أستخلاص هذه المواد الفعالة طبيا واختبارها في توهين طفيلي الاكياس المائية مثل استخدام نبات الحرمل [8] والمستخلص المائي لنبات السعد[7] وكلاهما أثباتا فاعليتهما في الحد من خمجية المرض في التجارب داخل الجسم *in vivo* وفي خارجة *in vitro* .

نبات الاس Myrtus. communis :

شجيرة عطرية دائمة الخضرة أرتفاعها (١-٣) متر ويبلغ أحيانا (٥) متر، أوراقها صغيرة قوية بيضوية أو رمحية ملساء براقة ذات رائحة عطرية متميزة، أزهارها بيضاء وثمارها سوداء كمثرية الشكل، تم تشخيص أكثر من (٨٠) صنف لنبات الأس في مختلف أنحاء العالم ،يحوي في تركيبة الكيميائي العديد من المواد الفعالة مثل الكلايكوسيدات والراتنجات Resins والفينولات Phenols وغيرها [9].

الحبة السوداء *Nigella sativa* :

نبات عشبي حولي أرتفاعة (30-50)سم أوراقة متبادلة الوضع كثيفة ريشية مجزأة الى أجزاء رفيعة صغيرة الحجم بيضاء أو صفراء ،أزهاره كبيرة زرقاء ،ثماره صغيرة الحجم متصلة عند القاعدة ومنفصلة عند القمة ،أما البذور فهي سوداء صغيرة بيضوية الشكل خشنة الملمس مجعدة السطح لها رائحة مميزة ومذاقها لاذع ينتمي النبات الى العائلة الشقائقية،يحوي تركيبها الكيميائي العديد من المواد الفعالة مثل الكلايكوسيدات والراتنجات Resins والفينولات Phenols وغيرها.

المواد وطرائق العمل:

مصدر الطفيلي:

تم الحصول على عينات الاكياس المائية المستأصلة من المخمجين الذين أجريت لهم عمليات جراحية في مستشفى الكاظمية التعليمي. ونقلت هذه العينات بظروف معقمة الى المختبر ا لغرض التعامل معها بنفس اليوم.

عزل الرووس الاولية من الاكياس المائية:

أستخدمت طريقة Smyth(1985) [10] في عملية الفصل لاجزاء الكيس. حيث عقم الكيس باستخدام الكحول

الاثيلي بتركيز 70%. ثم سحب السائل باستخدام محقنة طبية ونقل الى قنية معقمة حيث ترسبت الرؤيسات الاولية في قعر القنية وعزل عنها السائل ثم نقلت الرؤيسات المترسبة الى انابيب معقمة حيث أجري لها نبذ مركزي بسرعة (3000xg)ولمدة 10 دقائق.بعد ذلك غسلت ثلاث مرات بالمحلول الفسيولوجي (Normal saline)وفي كل مرة تترك لمدة 5 دقائق لغرض الترسب، ثم حفظت بمحلول كرب رنكر+سائل الكيس المائي بنسبة (1:4).

فحص حيوية الرؤيسات الأولية واحتساب عددها :

- تم الفحص المباشر تحت المجهر الضوئي لملاحظة ظاهرة الاندلاق والانقلاب Evagination.
- لتحديد حيوية الرؤيسات الاولية تم استخدام صبغة الايوسين المائية حيث تكون الخلايا الحية ذات لون أخضر أما الميتة فتكون حمراء [11].

حيث أعتمد معدل العدد الكلي Total number لثلاث مكررات طريقة نقل حجم ثابت من الرؤيسات الاولية الى الحجم نفسه من صبغة الايوسين المائية [12] .

- حضر محلول كرب –رنكر(Kerbs-ringer solution)حسب طريقة Rotunno,*et. al*(1974). [13]

جمع وتشخيص وتهيئة نباتي الدراسة :

- نبات الآس *M. communis*

جمع من حديقة كلية العلوم –الجامعة المستنصرية حيث غسل وجفف في الظل بدرجة (25م)ولمدة أسبوعين حيث طحنت بعد ذلك وتم تحضير المستخلص النباتي حسب طريقة AL- Zohyri (1982) [14]، حضرت التراكيز التالية (50,45,40,35,30) ملغم /مل من محلول الخزين(600 ملغم /10 مل) من الماء المقطر ،عقمت المحاليل بتمريرها خلال اوراق الترشيح (0.45) مايكرون وحفظت في قناني معقمة.

-الحبة السوداء *N. sativa* :

تم الحصول عليها من السوق المحلية واتبع نفس الطريقة السابقة في التحضير واعتمد طريقة (1973) [15] Harborneلتحضير المستخلص المائي، ،حضرت التراكيز التالية (50,45,40,35,30) ملغم /مل من محلول الخزين(600ملغم /10 مل) من الماء المقطر ،عقمت المحاليل بتمريرها خلال اوراق الترشيح (0.45) مايكرون وحفظت في قناني معقمة

- التجربة خارج الجسم *in vitro* :

قبل الشروع بالتجارب كان لابد من القيام بمجموعة من التجارب الاولية لتحديد التراكيز الفعالة والتي تكون ضمن حدود الاستخدام السريري و بعيدة عن التراكيز السامة وجرى ذلك من خلال استعمال الخلايا البلعمية المعزولة من بريتون الفئران السليمة كنموذج لتحقيق هذا الغرض بعد تقدير حيويتها ضد التراكيز المختلفة من المستخلصين المائيين لاوراق الاس وبذور الحبة السوداء حيث كانت التراكيز السامة للخلايا البلعمية للمستخلصين هي (60) ملغم /مل ،فاستبعد هذا التركيز واستخدم الاوطا منه.

1_درس تأثير المستخلص المائي لنباتي الاس والحبة السوداء بالتراكيز التالية (50,45,40,35,30)ملغم/مل باستخدام الوسط الحافظ (كرب رنكر+سائل الكيس المائي 1:4)حيث وزعت في قاروات معقمة. أضيفت هذه التراكيز الى قارورات حاوية على معدل (400)رؤيس لكل 5مل.

2-لوحظت الحيوية يوميا وعلى مدى ٧ أيام وتم الفحص باستخدام صبغة الأيوسين المائية.

3- أعيدت التجربة ٣ مرات ثم أخذ معدل القراءات.

4- تم اضافة حجم معين من الوسط الحافظ واضيف اليه العدد نفسه من الرؤيسات الاولية حيث اعتبرت كسيطرة.

التحليل الاحصائي :

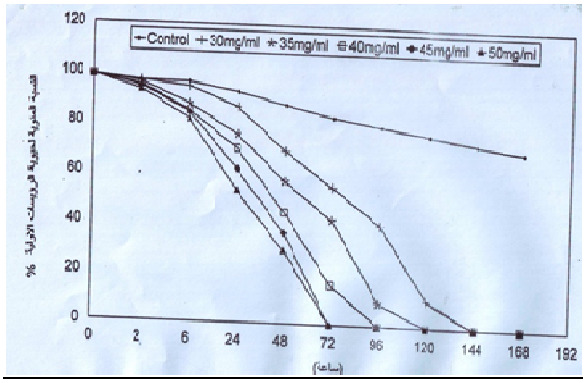
تم تحليل النتائج احصائيا بأستخدام طريقة ANOVA حيث استخدم التحليل Least Significance Differences(LSD) في حالة المقارنات المتعدد comparisonsMultiple، كما تم استخدام تحليل التباين Analysis of Variance لايجاد الفروقات المعنوية للتراكيز المختلفة والتفريق بين معدلات النسب المئوية لحيوية الرؤيسات الاولية.

النتائج والمناقشة :

أعتمد الماء كمذيب في عملية الاستخلاص لكونه سائلا متعادلا لايؤثر سلبا او ايجابا على فعالية المركبات المستخلصة من النباتات لعدم تداخله مع تلك المركبات مقارنة مع المذيبات العضوية التي قد تحدث تداخلا سلبيا او أيجابيا مع المركبات المستخلصة [16,17]اضافة الى وجود العديد من الدراسات التي تثبت احتواء المستخلص المائي لنباتي على المركبات الفعالة ذات التأثير التثبيطي في الاحياء المجهرية [18,19]. لاجل المحافظة على حيوية الرؤيسات الاولية تم اعتماد محلول (كرب رنكر+سائل الكيس المائي) بنسبة (1:4) باعتباره المحلول الامثل، حيث كان معدل انخفاض النسبة المئوية للحيوية بطئ فقد تراوح بين(73.33±4.58-69.004-.04) % بعد مرور 7 أيام من الحفظ وذلك لاحتواء هذا المحلول على المواد العضوية واللاعضوية الضرورية لديمومة الحياة [20]

لقياس حيوية الرؤيسات الاولية باستخدام المستخلصين فقد اعتمدت صبغة الايوسين المائية دون دليلي الحركة الترجرجية او الاقلاب وذلك لاعتماد دليل الحركة الترجرجية على تركيز الباحث الى سرعة جفاف القطرة ، أما دليل الاقلاب فهو يعطي قراءات غير دقيقة وسبب ذلك قد يعود الى أن بعض الرؤيسات الحية غير قادرة على الاقلاب لاسباب فسلجية غير واضحة في حين ان ظاهرة نفاذ صبغة الايوسين هي عملية فيزيائية تتعلق بطبيعة نفاذية الغلاف الحيوي، فعند حدوث خلل فسلجي فيه فأنه ينفذ الصبغة عبره فتصطبغ الرؤيسات الميتة باللون الاحمر بينما الرؤيسات الحية تبقى محتفظة بلونها الاخضر الطبيعي [21].

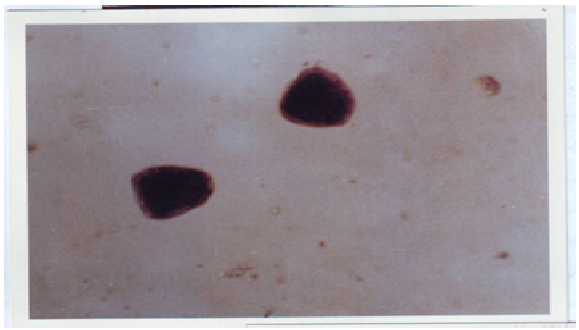
اشارت النتائج المستحصلة من تعريض الرؤيسات الاولية لتراكيز مختلفة من المستخلص المائي لاوراق الآس انخفاضا في معدل النسبة المئوية للحيوية تناسبت طرديا مع زيادة التركيز ومدة التعريض للمستخلص، فقد كانت النسبة المئوية لحيوية الرؤيسات الاولية في بداية التجربة اي عند الزمن والتركيز صفر 99 % و كذلك الحال لباقي تراكيز مجموعة السيطرة(45,40,35,30) ملغم / مل، ثم انخفضت بعد ثلاثة ايام لتصل الى 55.20%، 42.00%و16.00% عند تعريضها للتراكيز (40,35,30)ملغم /مل على التوالي من المستخلص المائي مقارنة بمجموعة السيطرة، في حين بلغت النسبة المئوية للحيوية صفر %عند أستخدام التركيزين (50,45) ملغم/مل من المستخلص مقارنة بمجموعة السيطرة التي انخفضت فيها النسبة المئوية للحيوية انخفاضا بسيطا بلغ 83.33%بعد ثلاثة ايام من بدء التجربة كما هو موضح في (الشكل ١)،وقد اشار التحليل الاحصائي الى وجود فروق معنوية واضحة عند ($P\leq0.01$)بين التراكيز المعتمدة من المستخلص لفترات زمنية محددة مقارنة بمجموعة السيطرة التي استمرت فيها حيوية الرؤيسات الاولية 71% في اليوم السابع من الحفظ في حين انعدمت الحيوية بعد ستة ايام من التعريض لاقل تركيز (30)ملغم /مل من المستخلص وبعد ثلاثة ايام من التعريض لاعلى تركيزين (50,45) ملغم/مل من المستخلص (الشكل ١).



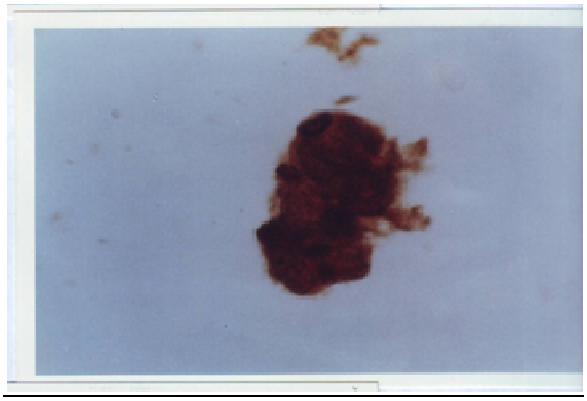
شكل١ :تأثير التراكيز المختلفة من المستخلص المائي لاوراق الاس M.communisفي حيوية الرؤيسات الاولية المعلقة في الوسط الحافظ(K.R.S+HCF,4:1)بدرجة حرارة (٢٥)م و PH (٧,٤)

أن هذه الفعالية المؤثرة لمستخلص أوراق الآس قد تعزى الى المحتوى الكيمياوي للمستخلص من المواد الفعالة مثل مركبات حامض الكربوليك(Phenols) وقدرتها على مسخ البروتينات و ايقاف فعل الانزيمات المسؤولة عن سلسلة من التفاعلات الايضية الاساس وبالتالي يفقد الكائن المجهري قدرته على لبقاء [22,23] ومركبات الفلافونات (Flavonoids) القادرة على اختزال السكريات مما يؤدي الى اختلال عملية الايض الكربوهيدراتي ومن ثم نقص في مقدار وحدات الطاقة (ATP) [23]ومركبات العفص Tannins التي لها القدرة على الارتباط بالبروتينات الموجودة في سايتوبلازم الخلية مانعا تحللها وبالتالي تتعرقل عمليات الايض المتعلقة بالنتروجين والاحماض الامينية المهمة في استمرار حيوية الكائن الحي [24].ومن ملاحظة (الشكلين 2 و ٣). يظهر جليا تأثر

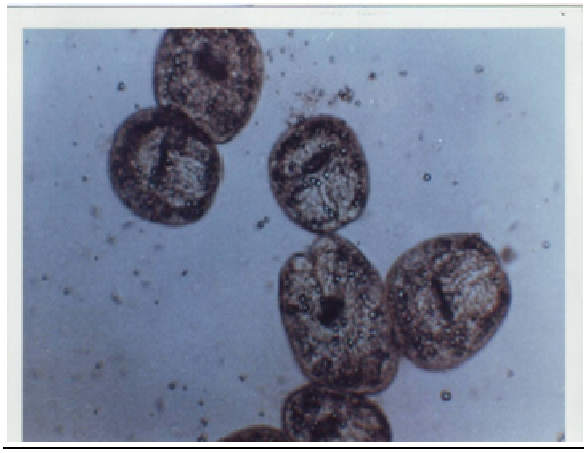
الرؤيسات الاولية المعرضة للمستخلص بالتركيزين (30 و 50) ملغم /مل على التوالي وتمثل ذلك بانكماش الحجم بشكل ملحوظ وتغير عام في الصفات المظهرية وتحطم الغلاف الخارجي وتشوه كامل للرؤيس الاولي مقارنة بحالة السيطرة الموضحة في(الشكل ٤).



الشكل 2: رؤيسات أولية معرضة للمستخلص المائي لاوراق الاس *M. communis* بتركيز (30) ملغم / مل لمدة ٣ أيام (500x)

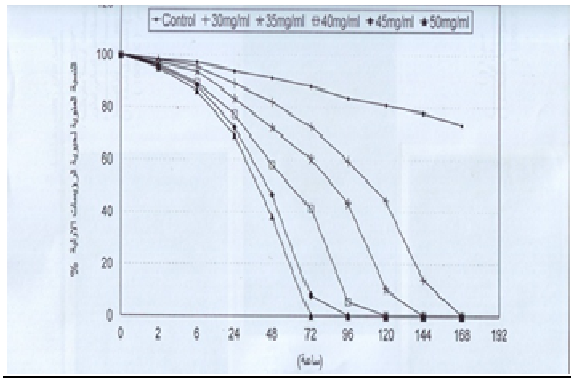


الشكل 3: رؤيسات أولية معرضة للمستخلص المائي لاوراق الاس *M. communis* بتركيز (50) ملغم / مل لمدة ٣ أيام (1000)



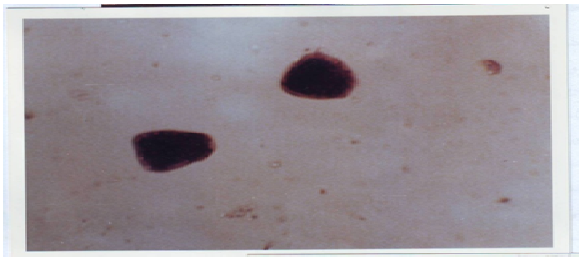
الشكل 4:رؤيسات أولية لمجموعة السيطرة (1000X)

اشارت نتائج الحبة السوداء الى وجود علاقة طردية تمثلت بانخفاض النسبة المئوية للحيوية مع زيادة تركيز المستخلص، حيث بلغت النسبة المئوية لحيوية الرؤيسات الاولية في الـزمن والتركيز صفر 100%ثم انخفضت بعد مرور ثلاثة ايـام مـن التعريض حتى وصلت الى 72.72% ،60.22%،41.28%عند استخدام التركيز (40,35,30)ملغم /مل على التوالي. انخفضت الحيوية الى 7.95% عند تعريضها للتركيز 45 ملغم / مل، في حين وصلت الى صفر % عند التركيز 50 ملغـم / مـل مـن المستخلص مقارنة بمجموعة السيطرة التي كانت النسبة المئوية لحيوية الرؤيسات فيها تشير الى 88% بعد ثلاثة ايام من بـدء التجربة كما في (الشكل 1)



شكل١:تأثير التراكيز المختلفة من المستخلص المائي لاوراق الاس M.communis في حيوية الرؤيسات الاولية المعلقة في الوسط الحافظ(K.R.S+HCF,4:1)بدرجة حرارة (٢٥)م و PH (٧,٤)

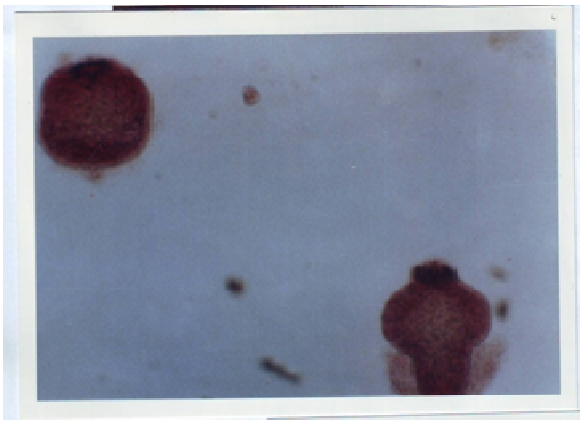
ومن خلال التحليل الاحصائي لهذه النتائج يظهر جليا وجود فروقات معنوية عند ($P\leq0.01$) بين مختلف تراكيز المستخلص المعرضة لها الرؤيسات الاولية للفترات الزمنية المحددة مقارنة بمجموعة السيطرة التي اظهرت فيها الرؤيسات الاولية نسبة مئوية للحيوية بلغت 72.33%في اليوم السلبع للحفظ بينما وصلت الى صفر % بعد سبعة أيام من تعريض الرؤيسات الاولية لاوطأ تركيز 30 ملغم/مل من المستخلص وبعد ثلاثة أيام من التعريض لاعلى تركيز 50 ملغم / مل من المستخلص كما موضح في (الشكل 2).



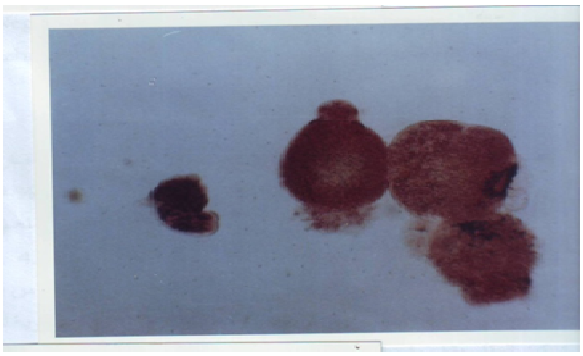
الشكل 2: رؤيسات أولية معرضة للمستخلص المائي لاوراق الاس *M. communis* بتركيز (30) ملغم / مل لمدة ٣ أيام (500x)

ان التأثير التثبيطي الذي أظهره استخدام تراكيز مختلفة من مستخلص بذور الحبة السوداء في حيوية الرؤيسات الاولية قد يفسره احتواء مستخلصة على مواد فعالة تتمثل بالفلافونات Flavonoids والعفص Tanninsوالقلوانيات Alkaloids ومركبات الثايمو كوين Thymoquinone.

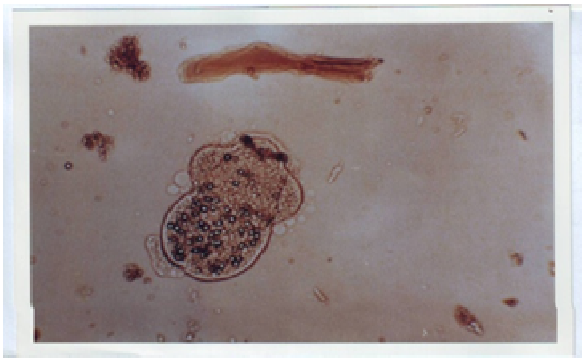
وقد سبقت الاشارة الى الية الفعل التثبطي لكل من مركبات Flavonoidsو Tannins، اما تثبيط مركبات Alkaloids للطفيلي فقد يعزى الى تداخل هذه المركبات في سلسلة تفاعلات ايض البروتينات الضرورية لاستمرار حيوية الكائن المجهري، او قدرتها على تحطيم الجدار الخلوي وما يحويه من بروتينات ودهون وبالتالي هلاك الطفيلي [25]و على اساس تثبيط الايض الكاربوهيدراتي من خلال التأثير على المايتوكوندريا وبالتالي عرقلة آلية التنفس مؤديا الى موت الطفيلي [26] اما تاثير Thymoquinone فهو التداخل في انزيمات السلسلة التنفسية الحاوية على مجموعة الثايول (كبريت–هيدروجينSH) ومن خلال الاحلال والابدال في مجموعة(الاوكسجين –الكربون، C=O) المرتبطةبـ Thymoquinone حيث تحوله الى [21] Thymohydroquinone. ومن ملاحظة (الشكلين ٤ و٥) يظهر بوضوح تأثر الرؤيسات الاولية المعرضة للتركيزين 50,30 ملغم /مل على التوالي من المستخلص المائي لبذور الحبة السوداء وقد تمثل ذلك بتحطم جزئي لجدار الرؤيس الاولي و انكماش نسبي في الحجم وتحطم الاشواك مقارنة بحالة السيطرة الموضحة في (الشكل 6).



الشكل ٤. رؤيسات اولية معرضة للمستخلص المائي لبذور الحبة السوداء *N.sativa* بتركيز (30) ملغم /مل لمدة ٣ أيام (1000X)



الشكل 5: رؤيسات اولية معرضة للمستخلص المائي لبذور الحبة السوداء *N.sativa* بتركيز (50) ملغم /مل لمدة ٣ أيام (1000X)



الشكل ٦: رؤيسات اولية لمجموعة السيطرة (1000X)

من ملاحظة الفعل التثبيطي للمستخلصين المائيين ومن خلال التحليل الاحصائي وجدنا تباين كبير بين المعاملات من حيث التراكيز المستخدمةوالفترات الزمنية المحددة لايقاف الحيوية وهلاك الطفيلي ،كما كان التباين قائما بين التراكيز و أزمان كل معاملة، وقد أوضحت الاشكال هذه النتائج عند مقارنتها بحالة السيطرة ويمكننا تعليل ذلك التنوع في التأثيروالاستجابة يكون مرتبطا أساسا باختلاف المادة الفعالة وتركيزها ونواتج تأيضها

داخل الخلايا ، ولتأكيد هذه النتائج نوصي باجراء تجارب أخرى داخل الجسم(*in vivo*)على الحيوانات المختبرية ..

المصادر:

1- AL-Dabagh,M.A. and AL-Janabi,T.A., 1990 Science of Hydatid cysts .Al-Iitidal company for printing .Baghdad.pp.12.

2- Kharebov,A.;Nahmias,J. and El-On,J.,1997 Cellular and humoral immune responses of hydatidosis patients to *E. granulosus* purified antigens .Am.J.Trop.Med.Hyg.,57(5):619-625.

3- Morris, D.L.;Richards,K.S.;Clarkson,M.J. and Taylor,D.H., 1990 Comparison of Albendazole and Paraziquantel therapy of *E. granulosus* in naturally infected sheep.Vet.Parasit.,36:83-90.

4- Mentes,A.;Yalaz,S.;Killi,R. and Altintas,N., 2000Radical treatment for hepatic *Echinococcus* .HPB.,2(1):49-54.

5- Brunetti,E.,Kem,P.,Vuitton,DA. 2010 Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans.Acta .Trop.114(1):1-16(Abstract)

6- Mossa,M.J.and Jaber,S., 1987 Medicinal plant of Sudia ARABIA.,1:1-14.King Saud university of Libraries.pp.,5-14.

7- Agowan,S.S., 1999 Effect of water plant extract for *Cyperus rotunduslinn* on experimental infection of hydatid cyst in mice .M.Sc. Thesis, Coll.Vet.Med.Univ. Baghdad.

8- Hao,W.;Jun,L.;Mei-Xiang, L.and Bing-li,Y., 1995 Surgical experience and drug treatment human alveolar and cystic echinococcosis in liver and abdomen in northwest of china . International Congress of Hydatidology. Limassol-Cyprus.6-10 Nov

9- Lawrence,B.M.,1990 Progress in essential oils.Part 3.Perfume Flavoure.,15:63-69

10- Smyth,J.D.,1985In vitro culture of Echinococcus spp. In :Proceedingsof the 13th . Int.Congr. of Hydatidology. Madrid ,1985,pp.,84-89.

11- Smyth,J.D. and Barret,N.J., 1980 Procedure for testing the viability of human hydatid cysts following surgical removal , especially after chemotherapy . Trans.Roy.Soci. Trop. Med . Hyg.,74 (5):649-652.

12- Wangoo,A.;Ganguly,N. and Mahajan, R., 1989.Phagocytic function of monocytes in murine model of *E. granulosus* of human origin .Indian .J.Med.Res.,89:40-42.

13- Rotunno,C.A.; Kammerer,W.S.;Esandi,M. and Cerejido,M., 1974.Studies on the permeability to water,Sodiumand chloride of the hydatid cyst of E. granulosus.J.Parasit.,60(40):613-620.

14- AL-Zohyri,A.M., 1982 Study of some pharma and chemical features of *M. communis* . M.Sc.Thesis,Coll.Vet.Med.,Univ.Baghdad.

15- Harborne,J.B.1973 Phytochemical Methods.Halsted Press.John Wiely and Sons, New York.

16- AL-Hilli,F.A., 2000 Study of Antimicrobial effect of leaves extract from *Callistemon citrinus* on *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients. M.Sc. Thesis , Coll.Sci.,Univ.AL-Mustansiriya.

17- Leven,M.;Baragh,D.A.;Mertens,F.;Vlietink,A. and Lammens,E.,(1979). Screening of higher plants for biological activities . Antimicrobial activity. Plant Medica.,36(4):311-32

18- AL-Thahab,A.A.,1998 Efficiency of some Iraqi plant extracts in some disease bacteria. M.Sc. Thesis, Coll.Sci., Univ. Baghdad

19- AL-Tmimy,A.A.,2001. Efficiency of *N.sativa* extracts against experimental infection with *E.coli* in white mice .M.Sc.Thesis,Coll.Edu., Uni. Baghdad.

20- AL-Rubhie,S.S.,1999.Effect of some plant extracts in attenuation protoscolices of *E. granulosis* (*in vitro*) and (*in vivo*) in white mouse. M.Sc. Thesis, Coll. Sci., Univ. Baghdad

21- Risan,F.A., 1994 . A study of the possibility of attenuation of protoscolices of *E. granulosus* using different types of Laser rays .M.Sc.Thesis, Coll.Sci.,Univ.Baghdad.

22- Jawetz,E.;Melnick,J.L.andAdelberg,E.A.,1987 . Review of Medical Microbiology.17th ed. Lange Medical Publication, California, USA. .

23- Sarkar,D.;Sharma,A. and Talukder,G., 1996 Plant extracts as modulators of genotoxic effects .Botan.Rev.,62(4):257-300 .

24- John,T.J. and Mukundan,P., 1979.Virus inhibition by tea,caffeine and tannic acid .Indian,J. Med.Res.,69:542-545.

25-Anthony,H.R., 1976 Chemical microbiology .An Introduction to Microbial Physiology .3rd ed.Butterworthand Co.London

26 - Delorenzi,J.C.;Attias,M.;Gattas,C.R.; Andrade,M.;Rezende,C.;Pinto,A.C.;and Saraiva,E.M., 2001. Anti-Leishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis* .Antimicrob.Agents.Chemother.,45(5):1349-1354