Rafidain Journal of Science
Vol. 29, No.2, pp. 1-10, 2020
DOI : 10.33899/rjs.2020.165357
https://rsci.mosuljournals.com

ISSN: 1608-9391
e-ISSN: 2664-2786

Received 28/8/2019
Accepted 4/11/2019

تأثير الزيت العطري المعزول من أوراق نبات إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* في حيوية الرؤيسات الأولية للمشوكات الحبيبية *Echinococcus granulosus* من أصل أغنام خارج جسم الكائن الحي *In vitro*

اركان سعيد شيت الحياوي **عبد الخالق علوان محيميد**
قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة تكريت
E-mail: aaaarkan1979@gmail.com.

الملخص

أجريت هذه الدراسة في بداية شهر أيلول عام 2018 إلى نهاية شهر أب 2019 وقد تناولت الدراسة الحالية تأثير الزيت العطري المعزول من أوراق نبات إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* في حيوية الرؤيسات الأولية للمشوكات الحبيبية *Echinococcus granulosus* ، وذلك باستخدام جهاز التقطير البخاري المحور Clevenger، وأُختبرت الفعَّالية البيولوجية للزيت العطري لأوراق نبات إكليل الجبل وكان تأثيره فعَالا في حيوية الرؤيسات الأولية بإستخدام التراكيز 20، 30، 40، 50، 100 ملغم/مل والأوقات 15، 30، 45، 60 دقيقة، ولم تظهر فروقات معنوية لكافة التراكيز والفترات المستخدمة عند مستوى إحتمالية $P<0.05$ ، إذ أدى إلى قتل جميع الرؤيسات الأولية بنسبة 100%.

يستنتج من الدراسة الحالية النشاط البيولوجي للزيت العطري لأوراق نبات أكليل الجبل ضد الرؤيسات الأولية، لذلك ننصح بزيادة الاهتمام بهذا الجزء من المستخلص النباتي وإستخدامه ضد هذا المرض الوبائي أثناء إجراء العمليات الجراحية لاستئصال الأكياس العدرية.

الكلمات الدالة: الرؤيسات الأولية protoscoleces، إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis*، الزيت العطري essential oil .

المقدمة

عدَت معظم بلدان العالم داء المشوكات Echinococcosis أو داء العدريات Hydatid disease أو داء العدريات الكيسي Cystic hydatidosis من المعضلات الصحية للإنسان من الناحيتين الطبية والاقتصادية وواحد من أكثر الأمراض المشتركة المنشأ انتشارا في البشر (Siracusano *et al*., 2009 ; WHO, 2017 ; Gholami *et al*., 2013). فقد أعتبر من الأمراض المتوطنة في عدد من أقطار شبه الجزيرة العربية وبلدان الشرق الأوسط مثل العراق وسوريا وفلسطين ولبنان وكذلك في شمال أفريقيا والسودان وحوض بحر قزوين وأقطار أمريكا الجنوبية، ويعد أحد أهم الأمراض المهملة على مستوى العالم. إذ يعتبر هذا المرض من الأمراض الطفيلية المشتركة بين الإنسان والحيوان Zoonotic disease (Mahmoudvand *et al*., 2016 ; Ruh and Taylan,2018).

يخمج الانسان بهذا الطفيلي عن طريق الطور اليرقي Larval stage (الشريطية البعدية Metacestode) لأنواع من جنس المشوكات *Echinococcus* ، ومن أهم هذه الأنواع المشوكات الحبيبية*E. granulosus* والذي يسبب داء المشوكات الكيسي Cystic echinococcosis والمشوكات متعددة الحجرات *E. multilocularis* التي تسبب داء المشوكات متعددة الحجرات Multilocular echinococcosis أو داء المشوكات السنخي أو الحويصلي Alveolar echinococcosis (Orsten *et al*., 2018) ويعتبر هذان النوعان من المشوكات من الأنواع القديمة Holaricti species، من أكثر الأنواع المشخصة سريرياً والتي تسبب أضراراً صحية واقتصادية في البلدان الفقيرة (Otero-Abad and Torgerson,2013)، تخمج أكلات الأعشاب والتي تمثل مضائف وسطية وكذلك الإنسان كمضيف عرضي بداء المشوكات الكيسي وذلك عن طريق إبتلاع بيوض الديدان البالغة التي تعيش في أمعاء المضائف النهائية final hosts والمتمثلة بالعائلة الكلبية Canidae والسنورية Felidae (Zheng *et al*., 2013). إن حركة المضائف النهائية وانتشارها بأعداد كبيرة في مساحات واسعة يلعب دورا مهما في التوزيع الجغرافي لهذا المرض والذي يصاب به كل من الإنسان والحيوان من خلال تناول الطعام والشراب الملوثين ببيوض الطفيل البالغ والتي تخرج مع براز الكلاب المصابة (Agudelo *et al*., 2016)، كما أن الإستيراد والتصدير للأغنام والمواشي المصابة قد ساعدت في وبائية Epidimulogy هذا المرض (Rostami *et al*., 2016). يمتاز هذا المرض بعدم ظهور الأعراض في بداية الإصابة، ولكن عند زيادة حجم الكيس العدري مع مرور الزمن يؤدي الى توليد ضغطا على النسج والأعضاء المجاورة له، وفي حالة إنفجاره تظهر أعراض الإصابة مثل صدمة العوار التأقية أو الحساسية Anaphylactic shock (Mandal and Dandan *et al*., 2007 ;Mandal, 2012). نتيجة للأضرار الجانبية التي تحدثها الطرق الكيميائية والجراحية لعلاج هذا المرض في الإنسان تم اللجوء إلى إستخدام الزيت العطري لكثير من النباتات في العلاج، ومن هذه النباتات هو نبات إكليل الجبل الذي يعتبر من النباتات الطبية، إذ تحتوي اوراقه على الزيوت العطرية التي يتم عزلها بواسطة جهاز التقطير الكليفنجر والتي أثبتت الكثير من البحوث فعَاليتها ضد طفيلي المشوكات الحبيبية، حيث تكون هذه الزيوت آمنة على المريض ومؤثرة على الطفيلي في الوقت نفسه (العمري، 2005؛ العبيدي، 2011؛ الجواري، 2018). هدفت الدراسة الحالية الى بيان تأثير الزيت العطري المعزول من أوراق نبات أكليل الجبل في حيوية الرؤيسات الأولية للمشوكات الحبيبية *E.granulosus*.

المواد وطرائق العمل

المحاليل والصبغات المستخدمة في دراسة الرؤيسات الأولية

محلول اليود الكحولي تركيز 1% Al-cholic Iodine 1%

حُضِر المحلول بإذابة 1 غم من اليود في 100 مل من الكحول الأثيلي بتركيز 96%.

محلول هانك الملحي Hanks Salt Solution

ويتكون هذا المحلول من:

كلوريد الصوديوم، كلوريد الكالسيوم، كبريتات المغنسيوم المائية، كلوريد البوتاسيوم، فوسفات البوتاسيوم ثنائي القاعدة، بيكاربونات الصوديوم، فوسفات الصوديوم ثنائي القاعدة المائي، كلوكوز. تم إذابة هذه المواد في لتر واحد من الماء المقطر، ثم تعقيمها بالترشيح الغشائي، إذ يستخدم هذا المحلول لحفظ الرؤيسات الأولية في الزجاج (انظر عبدالله ، 1996).

محلول دارىء الفوسفات الملحي Phosphate Buffer Saline (PBS)

ويتكون هذا المحلول من:

كلوريد الصوديوم، فوسفات الصوديوم ثنائي القاعدة المائي، فوسفات البوتاسيوم أُحادي القاعدة، وتم إذابة هذه المكونات في لتر من الماء المقطر Distilled water مع ضبط درجة الحامضية pH=7.2 (Parrin and Dempsey, 1974).

صبغة الأيوسين المائية تركيز 0.1% Aqueous Eosin 0.1% تم تحضيرها بإذابة 0.1 غم من صبغة الأيوسين المائي في 100مل من الماء المقطر ثم يتم رجه جيداً بعدها يترك الخليط وبعدها يرشح (Peacock, 1966).

مصدر الأكياس العدرية Hydatid Cystes

تم الحصول على كبد نعجة محلية مصاب بالأكياس العدرية إصابة بالغة من محلات القصابة في مدينة الموصل الصورة (1) وجلبت مباشرةً إلى المختبر في حاويات بلاستيكية حاوية على الثلج لكي لا تتأثر الرؤيسات الأولية الموجودة داخل الكيس العدري بدرجة حرارة المحيط (Smyth, 1976).

الصورة 1: كبد لنعجة مذبوحة في مدينة الموصل مصاب إصابة شديدة بالأكياس العدرية

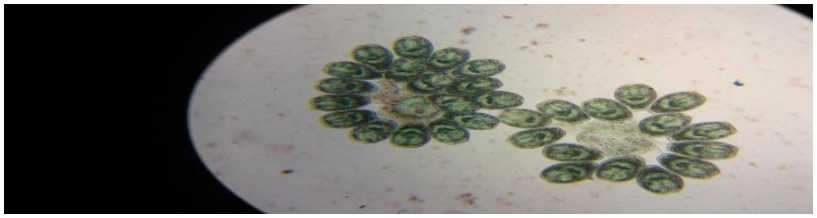
جمع الرؤيسات الأولية

تم استخدام طريقة Smyth (1985) للحصول على الرؤيسات الأولية وتم تعقيم سطح الأكياس العدرية باليود الكحولي بتركيز 1% ثم سحب جزء من السائل العدري بوساطة محقنة طبية ذات إبرة سحب بقياس G21 لتخفيف الضغط الداخلي للكيس، بعدها فرِّغت الأكياس من السائل العدري تماماً بوساطة قطارة باستور وغسل الكيس من الداخل بمحلول دارىء الفوسفات الملحي PBS، وبعدها وضع السائل مع الرؤيسات في أنابيب اختبار وأُجريت له عملية غسل بوساطة جهاز الطرد المركزي ثلاث مرات وبسرعة 3000 دورة / دقيقة، حيث أُستعمل في الغسلة الأولى محلولPBS وفي الغسلة الثانية أُستعمل محلول PBS مضافاً إليه 2000 وحدة دولية من البنسلين و 1 غم ستربتومايسين لكل لتر من محلولPBS، أما الغسلة الثالثة فقد تم استخدام محلول PBS فقط واخيرا سُحِب الطافي من السائل وأُضيف محلول PBS جديد للراسب الحاوي على الرؤيسات الأولية.

تقدير حيوية الرؤيسات الأولية

قدِّرت حيوية الرؤيسات الأولية حسب طريقة Smyth and Barett (1980) وذلك بأخذ 20 مايكروليتراً من معلق الرؤيسات الأولية في PBS وأُضيف إليه الحجم نفسه من صبغة الأيوسين المائية بتركيز 0.1% على شريحة زجاجية وفحصت مجهريا 400X، إذ أُعتبرت الرؤيسات الأولية ذات اللون الأخضر البراق حية كون أغشيتها الخلوية حية مما أدى إلى عدم إختراق الصبغة لها، بينما أُعتبرت الرؤيسات الحمراء ميتة لدخول الصبغة إليها وتلونها بها. كما وأُخذت حركة الرؤيسات الأولية بنظر الاعتبار لفحص الحيوية، وتم حساب النسبة المئوية لحيوية الرؤيسات الأولية والتي كانت 93% قبل إجراء المعاملات بالزيت العطري لنبات إكليل الجبل وحسب العلاقة التالية صورة (2).

نسبة الحيوية = عدد الرؤيسات الأولية الحية /عدد الرؤيسات الأولية الكلي في العينة المحسوبةX 100
كرِّرت العملية ثلاث مرات وأُخذ المعدل لنسبة البقاء ، بعدها تم حساب النسبة المئوية بعد كل عملية تعريض.



صورة مجهرية 2: للرؤيسات الأولية الحية من أصل أغنام محلية ، قوة تكبير 400X

مصدر النبات المستخدم في الدراسة

جمعت أوراق نبات إكليل الجبل *R. officinalis* من حدائق كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة الموصل وتم التحقق من أصنافها بالاعتماد على مصادر تصنيف النبات (Townsed *et al*., 1980). قُطفت الأوراق من الأغصان السفلى للنبات لتلافي عدم تعرضها لأشعة الشمس المباشرة قدر الإمكان لأن الزيوت العطرية للأوراق تتأثر بأشعة الشمس المباشرة. علما ان استخلاص الزيت العطري يجب أن يكون من أوراق مقطوفة حديثا.

عزل الزيت العطري لأوراق نبات إكليل الجبل باستخدام جهاز التقطير البخاري المحور الكليفنجر (Clevenger)

عزل الزيت العطري لأوراق نبات إكليل الجبل باستعمال جهاز الكليفنجر، إذ وضع 50 غم من الأوراق المقطوفة حديثاً بعد غسلها من الأتربة والشوائب في الدورق الزجاجي للجهاز، وأضيف إليها 500 مل من الماء المقطر، وأجريت عملية التقطير باستخدام مصدر حراري وثبتت درجة الحرارة إلى درجة الغليان واستمرت عملية التقطير ما بين 1.5 – 2 ساعة وفق الطريقة المقترحة من قبل دستور الأدوية البريطاني British herbal (Pharmacopeia,1998). أثناء التسخين يتطاير الزيت العطري مع بخار الماء عندها يتكثف داخل المكثف الموصول بمصدر مائي للتبريد ، ثم سحب 100 مل من الزيت والماء ووضعا في قمع الفصل، وأضيف إليهما 50 مل من الإيثر وتُرك المزيج لفترة من الزمن لينفصل إلى طبقتين العليا هي الإيثر مع الزيت الطيار والسفلى هي الماء، أُخذت الطبقة العليا، وأُعيد استخلاص الطبقة السفلى (طبقة الماء) كمرحلة ثانية. جُمِعت العينات وأُضيف لها 2 - 3 غم من كبريتات المغنيسيوم اللامائية لامتصاص قطرات الماء الموجودة في طبقة الإيثر العليا، ثم بُخِّر الإيثر منها باستخدام جهاز المبخر الدوّار وفي درجة حرارة تتراوح ما بين 25 – 30 ° م. أخيراً حُفظ الزيت العطري في قنينة زجاجية معتمة محكمة الغلق وترك في الثلاجة تحت درجة 4° م لحين استخدامه في فحص الفعالية البيولوجية على الرؤيسات الأولية (الدليمي، 2014).

فحص الزيت العطري بتقانة كروماتوغرافيا الغاز GC/MS

جرى الفحص في مختبرات وزارة العلوم والتكنولوجيا/ دائرة البيئة والمياه في العاصمة بغداد باستخدام جهاز كرموتوغرافيا الغاز GC/MS موديل شيمادزو 2010 ياباني المنشأ، وذلك للتقصي عن المكونات الكيميائية المكونة للزيت العطري (Miyazawa *et al*., 2011; Wollinger *et al*., 2016 ; Rostami *et al*., 2017).

التحليل الإحصائي

حُللت النتائج إحصائياً باستخدام اختبار تحليل الجداول (F test) وتم مقارنة المتوسطات الحسابية لتحديد الاختلافات المعنوية باستخدام اختبار دنكن متعدد المدى عند مستوى إحتمالية ($P < 0.05$) لتحديد الفروق بين التراكيز والأوقات المختلفة وتأثيرها في حيوية الرؤيسات الأولية (Al-Zubaidy and Al-Falahy, 2016).

النتائج والمناقشة

تحليل وتشخيص الزيت العطري

تم تشخيص العديد من المركبات الفعّالة التي يتكون منها الزيت العطري وهي السينول Cineol ، والكامفور Camphor والألفا بينين α-Pinene ، ومجموعة التربينات Terpenes وغيرها، وتم إحتساب زمن إحتجاز كل مركب والنسبة المئوية للمساحة (الجدول 1).

اتفقت نتيجة تحليل الزيت العطري هذه مع ما توصل إليه كل من (Kačániová *et al*., 2017 ; Touazi *et al*., 2018) واللذان بينا احتواءه على السينول cineole 1.8 بنسبة 5.25% ويليه الكامفور Camphor بنسبة 6.02% ثم الألفا بينين (α-Pinene) بنسبة 18-25% ، وبينت دراسة أُخرى احتواءه على التربينات والتي تعمل كمضادات أكسدة قوية (Wollinger *et al*., 2016 ; Rostami *et al*., 2017).

الجدول 1: تحليل الزيت العطري المفصول من أوراق نبات إكليل الجبل *R. officinalis* بإستخدام تقانة GC/MS

المركبات الكيميائية المكونة للزيت العطري	RT زمن الإحتجاز	Area%النسبة المئوية للمساحة
α-Pinene	3.841	5.88
δ- Terpinene	4.092	2.72
α-Campholenal	6.287	0.43
Acetic acid,octyl ester	7.322	2.75
Bornyl acetate	8.356	0.42
Camphenone	9.459	0.13
Caryophyllene	10.454	0.10
1-Octadecene	12.040	0.31
Tetradecanoic acid	14.467	0.56
δ-Neoclovene	15.917	0.75
Diazene,(4-ethoxyphanyl)	16.652	2.71
Aromadendrene oxide-(1)	17.319	2.11
Isoaromadendrene epoxide	18.740	0.85
Culmorin	19.582	0.39
Retinoic acid	21.148	0.21
Thunbergol	21.399	0.13
Acridin-9-yl-pyridin-2-yl-amine	26.466	0.20
Benzo[b] naphtho[2,3-d]furan	28.477	9.19
α -Amyrin	28.796	0.06
Camphor	31.145	0.719
Cineol	34.798	0.625
acetate de Bornyle	37.090	0.158
borineol	38.438	0.874
Camphene	40.313	0.535

تأثير الزيت العطري لأوراق نبات إكليل الجبل *R. officinalis* في حيوية الرؤيسات الأولية للمشوكات الحبيبية *E.granulosus* من أصل أغنام في الزجاج

أظهرت النتائج الحالية تأثير الزيت العطري لأوراق نبات إكليل الجبل على الرؤيسات الأولية للمشوكات الحبيبية من أصل أغنام في الزجاج وعند إجراء اختبار دنكن عدم وجود فروقات معنوية بين المعاملات عند مستوى إحتمالية ($P< 0.05$) إذ أظهرت التراكيز المختلفة التأثير نفسه في أوقات التعريض المختلفة (الجدول 2). إذ كان تأثير التركيز 20 ملغم/مل في زمن 15 دقيقة

مساوياً لتأثير التركيز 100 ملغم/مل في زمن 60 دقيقة واللذان سببا موت جميع الرؤيسات الأولية بنسبة 100% الصورة (3) مقارنة مع مجموعة السيطرة والتي أعطت أعلى نسبة حيوية للرؤيسات الأولية والبالغة 93% في الصورة (4).

لم تظهر فروقات معنوية بين جميع التراكيز عند مستوى إحتمالية ($P<0.05$) بالنسبة للمعدل العام للتراكيز المستعملة، إذ بلغت نسبة تخفيض الحيوية للرؤيسات الأولية ولجميع التراكيز 18.6%، أما بالنسبة للمعدل العام لأوقات تعريض الرؤيسات الأولية لم تظهر أيضاً فروقات معنوية بين جميع الأوقات في التأثير على حيوية الرؤيسات الأولية، مقارنة مع مجموعة السيطرة والتي كانت نسبة حيويتها 93%.

الجدول 2: تأثير الزيت العطري لأوراق نبات إكليل الجبل *R. officinalis* في حيوية الرؤيسات الأولية للمشوكات الحبيبية *E.granulosus* من أصل أغنام في الزجاج وحسب اختبار دنكن

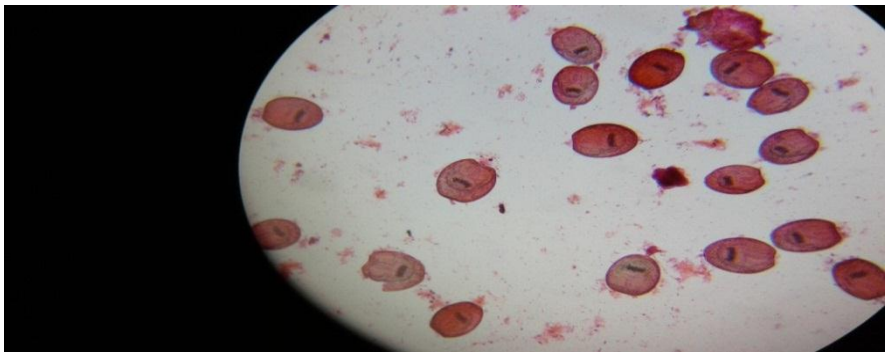
الوقت / التركيز	السيطرة	معدل عدد الرؤيسات الأولية الحية في				المعدل العام للتراكيز
		15 دقيقة	30 دقيقة	45 دقيقة	60 دقيقة	
20 ملغم/ مل	%93	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	18.6 b
30 ملغم/ مل		0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	18.6 b
40 ملغم/ مل		0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	18.8 b
50 ملغم/ مل		0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	18.6 b
100 ملغم/مل		0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	18.6 b
المعدل العام للوقت		15.5b	15.3b	15.1b	14.9b	

*الأحرف المتشابهة تعني عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى إحتمالية $P < 0.05$

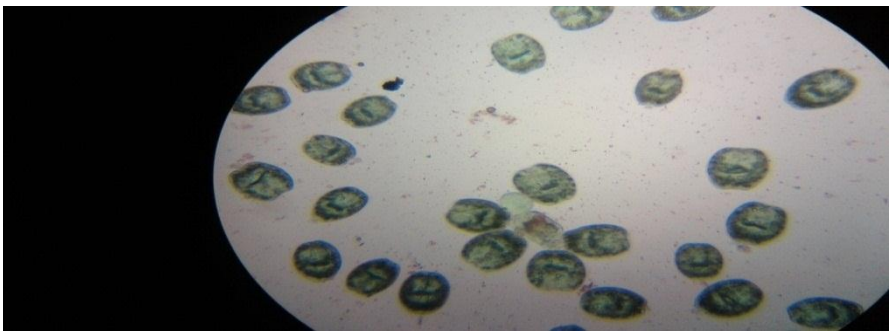
أستخدمت الزيوت العطرية منذ آلاف السنين في حفظ الأغذية والأدوية والطب البديل، وفي الآونة الأخيرة تم استخدام الزيوت العطرية للأعشاب الطبية المختلفة بشكل متزايد في علاج العديد من الأمراض والإصابات (Khan *et al*., 2010). أظهرت العديد من الدراسات الفعّالية البيولوجية للزيوت العطرية المختلفة ضد الديدان الطفيلية (Yadav and Singh, 2011)، اتفقت الدراسة الحالية مع نتائج Albanese *et al*., 2009 حيث أظهر الزيت العطري لأوراق نبات إكليل الجبل تأثيره المميت على الرؤيسات الأولية للمشوكات الحبيبية، ربما يعزى تأثير الزيت العطري للنباتات بشكل عام ولإكليل الجبل بشكل خاص لإحتوائه على العديد من المركبات الكيميائية والموضحة في (الجدول 1)، إذ تؤثر مركباته الكيميائية كافة على الرؤيسات الأولية من خلال تحليل غشاء خلايا طبقة الجليد فيها والذي أدى إلى موت الخلايا وبالتالي السماح لصبغة الأيوسين بالنفاذ إلى داخل جسم الرؤيس الأولي، أو ربما أثّر على الوظيفة الإبرازية للخلايا اللهبية فيها وهذا بدوره يؤثر على التنظيم الأُزموزي مما أدى إلى تراكم الفضلات النتروجينية فيها وبالتالي موتها، أو ربما أثَّر هذا الزيت على وظائف أغشية العضيات الحية لخلايا الطفيلي (Ezatpour *et al*., 2015 ; Mahmoudvand *et al*.,2016).

إتفقت النتائج الحالية مع ما توصلت إليه دراسة (Mahmoudvand *et al*., 2014) واستنتجوا تأثير الزيت العطري لحبة البركة *Nigella sativa* في حيوية الرؤيسات الأولية وظهر أعلى تأثير للزيت بالتركيز 10 ملغم/مل في زمن 10 دقيقة من التعريض، إذ تسبب بقتل الرؤيسات الأولية بنسبة 100%. كما واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع استنتاجات دراسة

(Keyhani *et al*., 2017)، إذ أوضحوا تأثير الزيت العطري لنبات الكمون *Cuminum cyminum* في حيوية الرؤيسات الأولية وظهر أعلى تأثير للزيت بالتركيزين 25 و50 ميكرولتر/مل وفي الوقتين 10 و20 دقيقة، إذ تسببا بقتل جميع الرؤيسات الأولية بنسبة 100% .



الصورة المجهرية 3: توضح تأثير الزيت العطري في حيوية الرؤيسات الأولية بتركيز 20 ملغم/مل في زمن 15 دقيقة، قوة تكبير400X



الصورة المجهرية 4 : توضح حيوية الرؤيسات الأولية في معاملة السيطرة للزيت العطري في زمن15دقيقة، قوة تكبير400X

المصادر العربية

الجواري، رنا سهيل عبدالله (2018) . تأثير قلف جذر وساق الرمان (المستخلص الكحولي) على حيوية ومحتوى الاحماض الدهنية لرؤيسات المشوكة الحبيبة في دراسة خارج الجسم الحي. المجلة العراقية للعلوم البيطرية. **32** (2)، 189–194.

الدليمي، فاطمة ابراهيم سلطان (2014). فصل وتشخيص عدد من النواتج الطبيعية لأزهار بعض النباتات الطبية وتأثيراتها الأحيائية والتآزرية مع الفينازين المعزول من جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* ضد بعض أنواع الأحياء المجهرية الممرضة. أطروحة دكتوراه، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، 240 ص.

عبدالله، إبراهيم احمد (1996). تحديد بعض سلالات المشوكات الحبيبية(Batsch,1786)*Echinococcus granulosus* وتمييزها في محافظة نينوى–العراق. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، 220 ص.

العبيدي، سماح محمد حسن (2011) . تأثير بعض المستخلصات النباتية في حيوية الرؤيسات الأولية للمشوكات الحبيبية *Echinococcus granulosus* من أصل أغنام في الزجاج ونموها داخل الجسم الحي. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، 124 ص.

العمري، أرقم محمد أزهر (2005). تأثير مستخلصات نباتات الشفلح والسبحبح والآس في حيوية ونمو الرؤيسات الأولية للمشوكات الحبيبية *Echinococcus granulosus* من أصل إنسان وأغنام خارج الجسم الحي ونموها داخله. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، 130 ص.

المصادر الأجنبية

Agudelo, H.N.I.; Brunetti, E.; McCloskey, C. (2016). Cystic echinococcosis. *J. Clin. Microbiol.*, **54**, 518-23.

Albanese, A.A.; Elissondo, M.C.; Gende, L.; Eguaras, M.; Denegri, M.G. (2009). Echinococcus granulosus: in vitro efficacy of *Rosmarinus officinalis* essential oil on protoscoleces. *Intern. J. Essen. Oil Therapeu*., **3**(2-3), 69-75.

Al-Zubaidy, Kh.M.; Al-Falahy, M.A. (2016). "Principle and Procedures of Statistics and Experimental". University of Duhok, Press, Iraq. 396 p.

British Herbal Pharmacopoeia (1998). "British Herbal Medicine Association". Bournemouth, 4th ed., pp. 164-165.

Dandan, I.S.; Soweid, A.M.; Abiad, F. (2007). Hydatid Cysts. *Intern. J. Clin. and Exper. Med.*, **158**(3),231–233.

Ezatpour, B.; Saedi, D.E.; Mahmoudvand, H.; Azadpour, M.; Ezzatkhah, F. (2015). In vitro and in vivo antileishmanial effects of *Pistacia khinjuk* against *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. *Evid Based Complement Alternat Med*., 14-19.

Gholami, S.H.; Rahimi-Esboei, B.; Ebrahimzadeh, M.A.; Pourhajibagher, M. (2013). In vitro effect of *Sambucus ebulus* on scolices of hydatid cysts. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*., **17**, 1760-1765.

Kačániová, M.; Terentjeva, M.; Kántor, A.; Tokár, M.; Puchalski, C.; Ivanišová, E. (2017). Antimicrobial Effect of Sage (*Salvia officinalis L*.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis L*.) Essential Oils on Microbiota of Chicken Breast. *Proc. Latvian Acad. Sci., Section B*, **71** (6), 461-467. DOI: 10.1515/prolas-2017-0081.

Keyhani, A.; Kareshk, A. T.; Oliaei, R. T.; Mahmoudvand, H. (2017). Protoscolicidal effects and acute toxicity of essential oil and methanolic extract of *Cuminum cyminum* seeds. *Marmara Pharma. J*., **21**(3), 551-557.

Khan, R.; Zakir, M.; Afaq, S.H.; Latif, A.; Khan, A. U. (2010). Activity of solvent extracts of *Prosopis spicigera*, Zingiber officinale and Trachyspermum ammi against multidrug resistant bacterial and fungal strains. *J. Infec. in Develop. Countr.*, **4**(5), 292–300.

Mahmoudvand, H.; Dezaki, E.S.; Kheirandish, F.; Ezatpour, B.; Jahanbakhsh, S.; Harandi, M. F. (2014). Scolicidal Effects of Black Cumin Seed (Nigella sativa) Essential Oil on Hydatid Cysts. *Korean J. Parasitol.*, **52**(6), 653-659.

Mahmoudvand, H.; Saedi, D.E.; Ezatpour, B.; SharifiI ; Kheirandish, F.; Rashidipour, M. (2016). *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of *Pistacia vera* essential oil. *Planta Medica* ; **82**, 279-284.

Mandal, S.; Mandal, M.D. (2012). Human cystic echinococcosis: epidemiologic, zoonotic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Asian Pac. J. Trop. Med*., **5**(4), 253-260.

Miyazawa, M.; Marumoto, S.; Kobayashi T.; Yoshida S.; Utsumi Y. (2011). Determination of characteristic components in essential oil from *Wisteria brachybotrys* Using gas chromatography – olfactometry Incremental dilution technique. *Academy of Chemistry of Globe. Rec. Nat. Prod*. **5**(3), 221-227.

Orsten, S.; Boufana, B.; Ciftci, T.; Akinci, D.; Karaagaoglu, E.; Ozkuyumcu, C. (2018). Human cystic echinococcosis in Turkey: a preliminary study on DNA polymorphisms of hydatid cysts removed from confirmed patients. *Parasitol. Res*., **117**, 1257-1263.

Otero-Abad, B.; Torgerson, PR. (2013). Asystematic review of the epidemiology of echinococcosis in domestic and wild animals. *Plos. Negl. Trop. Dis*., **7**(6), 22- 49.

Parrin, D.D.; Dempsey, B. (1974). "Buffers for pH and Metal Ion Control". Chapman and Hall Ltd., London,(1st ed.), pp. 161-162.

Peacock, H.A. (1966). "Elementary Microtechnique". Edward Arnold Publisher Ltd. London. 3rd ed., 547 p.

Rostami, A.; Taheri, M.; Gholizadeh, M.; Seyyedtabaei, S.J.; Raeghi, S.; Fallahi, S. (2016). Scolicidal effect of some herbs on *Echinococcus granulosus* Protoscoleces: a Systematic Literature Review. *Herbal Med. J.*, **1**(1), 212-220.

Rostami, H.; Seidavi, A.; Dadashbeiki, M.; Asadpour, Y.; Simões, J.; Laudadio, V.; Tufarelli, V. (2017). Oxidative stability of chilled broiler breast meat as affected by dietary supplementation with rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) powder and vitamin E. *Food Sci. and Nutri*., **5**(4), 904-910.

Ruh, E.; Taylan O.A. (2018). Cystic echinococcosis in Northern Cyprus: A Literature Review. *Cyprus J. Med Sci*. **3**(3), 193-196.

Siracusano, A.; Teggi, A.; Ortona, E. (2009). Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis*., **1**(1), 70-77.

Smyth, J.D. (1976). "Introduction to Animal Parasitology". Hodder and Stronghton. Ltd. London. 2nd ed., 466 p.

Smyth, J.D. (1985). "In Vitro Culture of Echinococcus spp". Proceeding of the 13th. Int. Con. Hydatid. Madrid, pp. 84-95.

Smyth, J.D.; Barrett, N.J. (1980). Procedures for testing the viability of human hydatid cysts following surgical removal specially after chemotherapy. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*., **74**, 649-652.

Touazi, L.; Aberkane, B.; Bellik, Y.; Moula, N.; Iguer-Ouada, M. (2018). Effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* (L.) on rooster sperm motility during 4°C short-termstorage. *J. Vet. Worl*., **11**(5), 590-597.

Townsed, C.C.; Geuest, E.; Omar; S.A.; Al-Khayat, A.H. (1980). Flora of Iraq, Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, *Baghdad*. **8**(2), 990- 993.

Wollinger, A.; Perrin, É.; Chahboun, J.; Jeannot, V.; Touraud, D.; Kunz, W. (2016). Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *Comp. Rend. Chim.*, **19**(6), 754-765.

World Health Organization, (2017). Meeting of the WHO Informal Working Group on Echinococcosis (WHO-IWGE), Geneva, Switzerland, 15-16 December 2016. Geneva,Switzerland: World Health Organization; 2017 (WHO/HTM/NTD/NZD/2017.01).

Yadav, P.; Singh, R. (2011). A review on anthelmintic drugs and their future scope. *Intern. J. Pharm. and Pharmaceut. Sci*., **3**(3), 17–21.

Zheng, H.; Zhang, W.; Zhang, L.; Zhang, Z.; Li, J.; Lu, G.; Zhu, Y.; Wang, Y.; Huang, Y.; Liu, J.; Kang, H.; Chen, J.; Wang, L.; Chen, A.; Yu, S.; Gao, Z.; Jin, L.; Gu, W.; Wang, Z.; Zhao, L.; Shi, B.; Wen, H.; Lin, R.; Jones, M.K.; Brejova, B.; Vinar, T.; Zhao, G.; McManus, D.P.; Chen, Z.; Zhou, Y.; Wang, S. (2013). The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat. Genetic*., **45** (10), 1168-1175.

Effect of Essential Oil Isolated from *Rosmarinus officinalis* Leaves on the Vitality of *Echinococcus granulosus* Protoscoleces of Sheep Outside the Organism *in vitro*

Arkan S. Sheet **Abdulkhaliq A. Mahaimed**

Department of Biology\ College of Education for Pure Sciences\University of Tikrrit

ABSTRACT

This study was carried out at the beginning of September 2018 to the end of August 2019, the current study involves the effect of the essential oils of rosemary plant leaves on vitality of *Echinococcus granulosus* protoscolices. So using modified drip-type steam distillation device (Clevenger), the biological effectiveness of the essential oils were tested and its effect was effective

in vitality of primacies protoscolices using concentrations 20, 30, 40, 50, 100 mg / ml and times of 15, 30, 45, 60 minutes and didn't show a significant difference among used concentrations and duration on the probability level $p<0.05$, this led to the mortality of all protoscolices with 100% percentage in all duration and concentrations used on the test.

Deduced from the current study the biological activity of the essential oils of rosmary leaves against the protoscolices, so we recommend increasing interest in these extracts and it's use against this epidemic disease and during surgery to remove the hydatid cysts.

Keywords: Protoscoleces, *Rosmarinus officinalis*, essential oil.