



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

دراسة تأثير كل من المستخلص النباتي ، المستحلب النباتي والزيت الطيار لنباتي
الميرمية والبردقوش في حياتية طفيلي الشمانيا الأحشائية *Leishmania*
donovani خارج الجسم الحي *In vitro*

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة
/ علم الحيوان

كُتبت بواسطة :

هالة طالب عبد علي الطائي

(بكالوريوس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء – علوم الحياة 2018)

بإشراف :

أ.م.د. حنان زويرمخلف

إشراف ثاني:

أ.م.د. يعرب مضر القزويني

تشرين الأول / 2022 م

ربيع الأول / 1444 هـ

﴿ بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ ﴾

﴿ هُوَ الَّذِي بَعَثَ فِي الْأُمِّيِّينَ رَسُولًا مِّنْهُمْ يَتْلُو عَلَيْهِمْ آيَاتِهِ وَيُزَكِّيهِمْ وَيُعَلِّمُهُمُ

الْكِتَابَ وَالْحِكْمَةَ وَإِن كَانُوا مِن قَبْلُ لَفِي ضَلَالٍ مُّبِينٍ ﴿٢﴾

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمَ

سُورَةُ الْجُمُعَةِ - الآية (٢)

إقرار المشرف على الرسالة

أشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم
الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم
الحيوان.

التوقيع: 

الاسم: يعرب مضر القزويني

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة -
جامعة كربلاء

المشرف الثاني

٢٠٢٢ / ٩ / ٤

التوقيع: 

الاسم: حنان زوير مخلف

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة
كربلاء

المشرف الاول

٢٠٢٢ / ٩ / ٤

إقرار رئيس قسم علوم الحياة

أشهد بان إعداد هذه الرسالة قد جرى في جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة /
قسم علوم الحياة وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم
الحيوان .

التوقيع: 

الاسم: د. نصير مرزة حمزة

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية - جامعة كربلاء

٢٠٢٢ / ٩ / ٤

إقرار المقوم اللغوي

أشهدُ إن هذه الرسالة الموسومة (دراسة تأثير كل من المستخلص النباتي ، المستحلب النباتي والزيت الطيار لنباتي الميرمية والبردقوش في حياتية طفيلي اللشمانيا الأحشائية *Leishmania donovani* خارج الجسم الحي *In vitro*) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.



التوقيع :
الاسم : د. مسلم مالك الاسدي

المرتبة العلمية : أستاذ

الكلية والجامعة : جامعة كربلاء - كلية العلوم الإسلامية

التاريخ : / / ٢٠٢٢

إقرار لجنة المناقشة

نشهدُ نحنُ أعضاء لجنة المناقشة أدناه بأطلاعنا على الرسالة الموسومة ب (دراسة تأثير كل من المستخلص النباتي ، المستحلب النباتي والزيت الطيار لنباتي الميرمية والبردقوش في حيادية طفيلي اللشمانيا الأحشائية *Leishmania donovani* خارج الجسم الحي *In vitro*) وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وكل ما يتعلق بها ووجدنا إنها جديرة بالقبول بتقدير (امتياز) لنيل درجة الماجستير في علم الحيوان () .

رئيس اللجنة

التوقيع : (م)
الاسم : أحمد خضير عيسى
المرتبة العلمية : أستاذ دكتور
العنوان : جامعة بابل / كلية العلوم للبنات
التاريخ : / / ٢٠٢٢

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : علي نزار ياسين
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
العنوان : الجامعة المستنصرية / كلية التربية الاساسية
التاريخ : / / ٢٠٢٢

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :
الاسم : يعرب مضر القزويني
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : كوثر عبد الحسين مهدي
المرتبة العلمية : أستاذ دكتور
العنوان : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ : / / ٢٠٢٢

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :
الاسم : حنان زوير مخلف
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع :

الاسم :

المرتبة العلمية :
عميد كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : 2022 / 11 / 21

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

الإهداء

إلى الحبيب المصطفى خير الورى وعترته أهل الدجى والعروة الوثقى اللذين اصطفاهم الله
لحمل رسالته وتثبيت تعاليم دينه (صلوات الله عليهم أجمعين)

إلى أبي الحبيب ... قدوتي في حياتي ومثلي الأعلى ، نبض قلبي وبلسم فؤادي ، إلى والدي أمد الله في
عمره ومتعته بالصحة والعافية ، كل كلمات الشكر والحب لا تفي حقك يا سيد الرجال ، فأبنتك لازالت تكبر كل يوم
وتزداد على مسامعها " هنيئاً لك بهذا الرجل أباً " .

إلى أمي الحبيبة... إلى الكفاح الذي لا يتوقف ، إلى من علمتني معنى الأصرار وان لا مستحيل في
الحياة مع قوة الإيمان ، الى ينبوع العطاء المتفاني أقدم لك شكري وأمتناني مدى عمري أمد الله في عمرك .

إلى زوجي الغالي... إلى من نافس الغيث في العطايا ، وسكن اعماق قلبي ونال المنازل العليا ، إلى من
خطى معي خطواتي الأولى وكان خير سند لي في مسيرتي ، إلى سيد قلبي ورفيق دربي ، إلى من لولا متابعته
المستمرة وتشجيعه لي ما كان لوقوفي في هذا المكان ليحدث ، دمت لي سنداً لا يميل .

إلى أبنتي أميرة فؤادي... أبنة قلبي وثمره أيامي ، أول أفراحي ، وحنة السكر لكل مُر في حياتي ،
أنالك الله من الأيام أجملها ومن المراتب أعلاها يا زهرة عمري وحلوة السنين .

إلى أخواتي عزيزات قلبي وأزواجهن الكرماء... إلى أخواتي رقيقات طفولتي وزهور بُستان قلبي
، إلى أزواجهن أخوتي الذين لم تدهم لي والدتي ، كنتم أيادي الخير التي مُدت لي لتُعِينني ، وتذلل الصعاب
أمامي ، متعكم الله بالصحة وأدامكم لي وقر أعينكم بأولادكم.

إلى أخي واختي الصغيرين... إلى أصغر براعم شجرة عائلتي ، إلى روح المرح وسعادة البيت ،
أخوتي الصغار وأبنائي أحياناً .

أهدي لكم ثمرة جهدي ونجاحي

الباحثة

شكر وتقدير

بداية الشكر لله عز وجل اللذي أعاننا وشد من عزمنا لإكمال هذا البحث ، نشكره راعين ، الذي وهبنا الصبر والتحدي وروح المحاولة والعزم لنجعل من هذا المشروع علماً يُنتفعُ به .

أتقدم بأسمى آيات الشكر والعرفان إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء ، لا سيما قسم علوم الحياة من أساتذة تدريسيين ومنتسبين لتسهيل أمر أكمل متطلبات دراستي .

وبأجمل عبارات الشكر والأمتنان وبقلوب فائضة بالمحبة والأحترام اتقدم بها إلى الأساتذة الأجلاء المشرفين على رسالتي الدكتورة **حنان زوير مخلف** والدكتور **يعرب مضر القزويني** لسعة صدورهم ولما قدموه لي من نصائح قيمة ومساندتي وتوجيهي خلال دراستي متمنية لهم دوام الصحة والتوفيق و أرتقاء المراتب العليا .

كما و اتوجه بالشكر والتقدير إلى كل من **الدكتور محمد محمود الحلبوسي** (مدير مركز الأبحاث والتقنيات الأحيائية التابع لجامعة النهرين / جامعة بغداد) و**الأستاذ براء** على مساعدته لي لأكمال متطلبات دراستي واخص بالشكر أيضاً **الدكتورة غصون عادل** التدريسية في كلية ابن الهيثم و**الأستاذ الدكتور حسين آل مطلب** **الدهموشي** التدريسي في جامعة بابل و **الدكتورة شروق كاني** **الموظفة في مديرية تربية كربلاء ،** و**الدكتور إبراهيم جابر عبد التدريسي** في كلية العلوم / قسم علوم الحياة / جامعة بغداد و**الدكتور حسين فاضل البيرقدار** التدريسي في جامعة كركوك و**الدكتور حيدر علي محمد** التدريسي في كلية الطب البيطري /جامعة كربلاء و**الدكتور رزاق الطائي** أخصائي الأطفال و**الأستاذ جهاد عبود** مسؤول مختبر الطفيليات في مستشفى الأطفال التخصصي و**الدكتورة نيبال مطير** التدريسية في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة و**الأستاذ البابلوجي محمود شاكر عبد الله** موظف في مستشفى ابن سيف للأطفال / بغداد لتقديم المساعدة والعون لي في الجانب العملي من رسالتي .

وأنتقدم بالشكر الجزيل والأمتنان العظيم إلى **كادر قسم ترميم المخطوطات ومختبر الدراسات العليا في العتبة الحسينية المقدسة** من مسؤولون إلى المنتسبين العاملين ضمن القسم المبارك كما واخص بالذكر **الأستاذ أحمد زغير** على الدعم والمساعدة وتوفير الظروف الملائمة والأجهزة اللازمة لأنجاز الجانب العملي من رسالتي ممتنة لكل ماقدمتموه لي جعله الله في ميزان حسناتكم .

كما اتوجه بالشكر الجزيل الى المرضى والمراجعين الذين تم الحصول على عينات الدراسة منهم .

الباحثة

الخلاصة

تُعد الإصابة بداء اللشمانيا الأحشائية من المشاكل التي تواجه المرضى بشكل عام والأطفال بشكل خاص لذلك تضمنت هذه الدراسة التعرف على انتشار داء اللشمانيا الأحشائية . أجريت الدراسة المسحية في مستشفيات محافظة كربلاء والتي شملت (م.الحسين الطبية ، م.الهندية ، م.الحسينية . م.عين التمر ،م.الأطفال التخصصي) والتي أُجريت للمدة من كانون الثاني 2021 الى حزيران للسنة ذاتها ، وبعد تشخيص الحالات من قبل الأطباء الأختصاص ومن بين 252 مريض خضع للفحص ، تم تأكيد إصابة 17 فرداً منهم باللشمانيا الحشوية Visceral leishmaniasis موزعة على مستشفيات المحافظة ، وقد تناولت الدراسة الحالية مراجعة بيانات الفئة العمرية والجنس ومناطق الانتشار حسب الرقعة الجغرافية وأشهر الإصابة.

أثبتت النتائج أن أعلى نسبة إصابة سُجلت في شهر نيسان، وذلك بنسبة مئوية بلغت 0.4 % ، بمتوسط معدل عام لأشهر الإصابة بلغ 3.52%، وان أعلى أصابات حسب الرقعة الجغرافية كانت قد سُجلت في مستشفى الأطفال التخصصي التابع لقطاع المركز لمحافظة كربلاء بنسبة مئوية 8.24 % بمعدل متوسط عام للإصابات الإجمالية للمناطق التي شملها البحث 6.74 % ، كما لوحظت أن أعلى نسبة مئوية للإصابة تبعاً لعامل العمر بلغت 7.14 % وهذه النسبة هي للفئة العمرية المحصورة ما بين 5-9 سنوات كما وبينت النتائج تأثر الأطفال الذكور بالمرض أكثر من الإناث وذلك بمتوسط معدل عام بلغ 1.25 % .

تم استخدام فحص السمية الخلوية اختبار MTT assay للكشف عن تأثير المعاملة بالمستخلصات النباتية والزيوت المتطايرة لنباتي الميرمية والبردقوش على حيادية الطور الأممي السوط لطفيلي اللشمانيا الحشوية Promastigots ، أولاً تم استخدام 3 اطيف دوائية لكل نبات والمتمثلة بالمستخلصات المائية ، مستحلب نباتي ، فضلاً عن الزيت العطري المتطاير ، ثانياً أُجريت سلسلة تخافيف لعمل ستة تراكيز لكل طيف دوائي للنباتات قيد الدراسة ، تراكيز المستخلصات المائية هي 200 ، 100 ، 50 ، 25 ، 12.5 ، 6.25 $\mu\text{g/ml}$ ، والتراكيز ذاتها أُستخدمت للمستحلبات النباتية ، فيما كانت تراكيز الزيوت العطرية للنباتين كالآتي 1000 ، 500 ، 250 ، 125 ، 62.5 ، 31.25 $\mu\text{l/ml}$.

بينت نتائج فحص السمية الخلوية تحت تأثير المعاملة بالمستخلصات النباتية والزيوت الأساسية للنباتين قيد الدراسة ، ان التركيزين الأعلى للمستخلص المائي لنبات الميرمية 200 ، 100 $\mu\text{g/ml}$ كانا قد أعطيا أعلى نسبة لتنشيط النمو الخلوي بقيمة 92 %، 92.2 % ، فيما لم يُظهر المستخلص المائي لنبات البردقوش أي تأثيرات سمية على الطفيلي ، في حين أظهر التركيز الثاني 100 $\mu\text{l/ml}$ لمستحلب نبات الميرمية أعلى نسبة مئوية تثبيطية بلغت 89 % ، وقد أعطى التركيز الأول لمستحلب نبات البردقوش أعلى نسبة مئوية للتثبيط بلغت 52 % ، أما الزيوت العطرية للنباتين فقد كان التركيز الخامس 62.5 $\mu\text{l/ml}$ لزيت نبات الميرمية قد أعطى أعلى نسبة

مئوية بلغت 86 % ، فيما أظهر التركيز الأول للزيت العطري الخاص بنبات البردقوش والذي هو 1000 ml /
μl أعلى نسبة مئوية بلغت 68 % .

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
I	الخلاصة	
III	المحتويات	
VII	قائمة الجداول	
VIII	قائمة الأشكال والصور	
X	قائمة المختصرات	
1	الفصل الأول	
1	المقدمة	1
	الفصل الثاني	
4	أستعراض المراجع	2
4	نبذة تاريخية عن طفيلي اللشمانيا الأحشائي	1-2
6	شكل الطفيلي	2-2
7	تصنيف الطفيلي	3-2
9	المضيف الناقل	4-2
11	المضيف المستودع	5-2
12	دورة الحياة	6-2
14	وبائية داء اللشمانيا	7-2
18	أمراضية طفيلي اللشمانيا الأحشائية	8-2
20	طرائق تشخيص داء اللشمانيا الحشوي	9-2
20	طرائق التشخيص التقليدية لداء اللشمانيا	1-9-2
20	الفحص المجهرى	1-1-9-2
21	زرع الطفيلي	2-1-9-2

22	طرائق التشخيص المناعية	2-9-2
23	طرائق التشخيص الجزيئية	3-9-2
24	المعالجة الدوائية لداء اللشمانيا الحشوية	10-2
24	مركبات الأنتيمون خماسي التكافؤ Sb	1-10-2
25	مركب الأمفوتريسين B	2-10-2
25	النباتات الطبية	11-2
26	التصنيف العلمي لنبات الميرمية	1-11-2
27	الوصف الخارجي للنبات وانتشاره	1-1-11-2
28	المركبات الفعالة بايولوجياً لنبات الميرمية	2-1-11-2
30	نبات البردقوش	2-11-2
30	التصنيف العلمي لنبات البردقوش	1-2-11-2
31	الوصف الخارجي لنبات البردقوش وانتشاره	2-2-11-2
32	المركبات الفعالة بايولوجياً لنبات البردقوش	3-2-11-2
	الفصل الثالث	
34	المواد وطرائق العمل	3
34	الأجهزة المخبرية المستعملة	1-3
35	المواد الكيميائية	2-3
37	تصميم الدراسة	3-3
38	جمع العينات	4-3
38	عزل الطفيلي	5-3
38	الأوساط الزرعية والمحاليل المستخدمة	6-3
38	تحضير الوسط الزرعي Nove-MacNeal-Nicolle (NNN) media or Biphase media	1-6-3
39	الطور الصلب	1-1-6-3

39	المكونات الكيميائية للطور الصلب	1-1-1-6-3
39	تحضير الطور الصلب	2-1-1-6-3
40	الطور السائل / محلول لوك Locke's solution phase	2-1-6-3
40	تحضير محلول لوك	1-2-1-6-3
41	الأوساط الزرعية المستخدمة في اختبار السمية	2-6-3
41	الوسط الزرع Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium	1-2-6-3
41	مراحل تنمية طفيلي اللشمانيا الأحشائي	3-6-3
42	النباتات المستخدمة في الدراسة	7-3
42	جمع النباتات	1-7-3
43	استخلاص الزيت الأساسي المتطاير لنباتي الميرمية والبردقوش	2-7-3
44	تخفيف وتحضير التراكيز للزيوت العطرية الخام المستخرجة من نبات الميرمية والبردقوش	1-2-7-3
44	تحضير المستخلص المائي لنبات الميرمية ونبات البردقوش	3-7-3
45	تحضير وتخفيف التراكيز للمستخلص المائي لنباتي الميرمية والبردقوش	1-3-7-3
45	طريقة تحضير المستحلب النباتي لنباتي الميرمية والبردقوش	4-7-3
45	تحضير وتخفيف التراكيز للمستحلب النباتي لنباتي الميرمية والبردقوش	1-4-7-3
46	اختبار السمية الخلوية Antileishmanial assay (MTT assay)	8-3
47	طريقة إجراء اختبار قياس السمية الخلوية المضاد للشمانيا	9-3
49	التحليل الأحصائي	10-3
	الفصل الرابع	
50	النتائج والمناقشة	4

50	نسب الإصابة في محافظة كربلاء (مناطق الدراسة) حسب أشهر السنة	1-4
55	انتشار الإصابات في المناطق قيد الدراسة	2-4
56	توزيع نسب الإصابة تبعاً للفئة العمرية	3-4
57	اختبار السمية الخلوية المضاد للشمانيا تحت تأثير مستخلصات نبات الميرمية	4-4
65	اختبار السمية الخلوية المضاد للشمانيا تحت تأثير مستخلصات نبات البردقوش	5-4
	الفصل الخامس الأستنتاجات و التوصيات	
74	الأستنتاجات	
75	التوصيات	
76	المصادر	
101	الملاحق	
102	الخلاصة باللغة الأنكليزية	

قائمة الجداول

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
17	الأنواع الطفيلية المنتشرة في بعض دول العالم مع أنواع مضائفها الخازنة والنواقل الحيوية الخاصة بها	1-2
19	الأختلافات بين العدوى الحيوانية والبشرية المنشأ	2-2
34	الأجهزة والمستلزمات التي تم استخدامها في الدراسة	1-3
35	المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة	2-3
39	لتحضير لتر واحد من طور أكار الدم الصلب	3-3
40	لتحضير واحد لتر من محلول لوك	4-3
50	نسب الإصابة في مناطق الدراسة خلال الأشهر الأولى من السنة وحسب الجنس	1-4
55	نسب الإصابة للمناطق قيد الدراسة	2-4
56	نسب الإصابة حسب الفئات العمرية	3-4
59	يُبين تأثير السمية الخلوية للمستخلص المائي لنبات الميرمية على حيوية الطور امامي السوط للطفيلي الإحشائي	4-4
61	تأثير السمية الخلوية للمستحلب النباتي لنبات الميرمية على حيوية الطور امامي السوط للطفيلي الإحشائي	5-4
63	تأثير السمية الخلوية للزيت الأساسي لنبات الميرمية على حيوية الطور امامي السوط للطفيلي الإحشائي	6-4
67	تأثير السمية الخلوية للمستخلص المائي لنبات البردقوش على حيوية الطور امامي السوط للطفيلي الإحشائي	7-4
69	النسب المئوية لتثبيط نمو امامية السوط الطفيلية تحت تأثير التراكيز الستة للمستحلب النباتي لنبات البردقوش	8-4
71	النسب المئوية لتثبيط نمو الطور امامي السوط للطفيلي الإحشائي تحت تأثير التراكيز الستة للزيت الأساسي لنبات البردقوش	9-4
73	تأثير مستخلصات المرمية والبردقوش على نسبة تثبيط الخلايا الطفيلية	10-4

قائمة الأشكال والصور

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
7	A / الطور الطفيلي أمامي السوط ، B / الطور الطفيلي عديم السوط	1-2
8	يوضح الأنواع الطفيلية لجنس اللشمانيا التي تغزو الجسم البشري والأطياف البوائية المتسببة بها	2-2
10	المظهر الخارجي لأنثى ذبابة الرمل الناقلة لطفيلي اللشمانيا	3-2
13	دورة حياة طفيلي اللشمانيا الأحشائي	4-2
21	شكل لطخة طحال تحت المجهر الضوئي تظهر إصابته بالأجسام اللشمانية عديمة الأسواط	5-2
27	الشكل المظهر الخارجي لنبات الميرمية	6-2
28	التركيب الكيميائي لمركبات الفلافونويد الرئيسية	7-2
29	الهيكل الكيميائي لمركبات التربينات الرئيسية	8-2
32	الأجزاء الهوائية لنبات البردقوش	9-2
37	تصميم الدراسة	1-3
42	خلايا الطفيلي الإحشائي بالطور المسوط تحت عدسة المجهر الضوئي بقوة (40x) التي تم تنميتها في وسط RPMI-1640	2-3
43	جهاز إستخلاص الزيوت العطرية والزيت المستخلص بكمية 1ml	3-3
44	يُظهر صوراً من عملية إستخلاص المسحوق النباتي للميرمية و البردقوش	4-3
46	يوضح تحول صبغة رباعي النتراتوليوم MTT الصفراء قابلة للذوبان بالماء الى صبغة الفورمازان الزرقاء الغير قابلة للذوبان في الماء في الخلايا الحية	5-3
49	مجموعة صور لعملية اجراء اختبار MTT assay قياس السمية الخلوية للمادة الدوائية المعاملة بها حيث تمثل : A- يوضح سلسلة تخافيف أجريت للمستخلص المائي لنبات البردقوش وبنفس الطريقة تم تخفيف التركيز الأساسي لنبات الميرمية ، B- - توضح جهاز قارئ الأليزا	6-3
51	نسب الإصابة في مستشفى الحسين العام	1-4

52	نسب الإصابات في قضاء الهندية	2-4
52	نسب الإصابات في قضاء الحسينية	3-4
53	نسب الإصابة في مستشفى عين التمر التخصصي	4-4
54	نسب الإصابة في مستشفى الأطفال	5-4
58	الصفحة الدقيقة بعد زراعتها بالمعلق الخلوي مع إضافة تراكيز المادة الدوائية لنبات الميرمية مع إضافة الصبغة لأجراء اختبار السمية الخلوية MTT assay	6-4
60	النسبة المئوية لتنشيط نمو الطورأممي السوط للطفيلي الإحشائي تحت تأثير التراكيز الستة للمستخلص المائي لنبات الميرمية	7-4
62	النسبة المئوية لتنشيط نمو الطورأممي السوط للطفيلي الإحشائي تحت تأثير التراكيز الستة للمستخلص النباتي لنبات الميرمية	8-4
64	النسبة المئوية لتنشيط نمو الطورأممي السوط للطفيلي الإحشائي تحت تأثير التراكيز الستة للزيت العطري المتطاير لنبات الميرمية	9-4
66	الصفحة الدقيقة بعد زراعتها بالمعلق الخلوي ومعاملتها بالتراكيز المختلفة لأطياف المادة الدوائية لنبات البردقوش مع إضافة الصبغة لأجراء اختبار السمية الخلوية MTT assay	10-4
68	النسب المئوية السالبة لقابلية التنشيط الخلوي تحت تأثير التراكيز الستة للمستخلص المائي لنبات البردقوش	11-4
70	النسب المئوية لقابلية التنشيط للنمو الخلوي تحت تأثير التراكيز الستة للمستخلص النباتي لنبات البردقوش	12-4
72	النسب المئوية لقابلية التنشيط للنمو الخلوي تحت تأثير التراكيز الستة للزيت الأساسي المتطاير لنبات البردقوش	13-4

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح	التسلسل
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	1
CEO	Crude essential oil	2
CL	Cutanoas leishmaniasis	3
DMSO	Dimethyl sulfoxide	4
DAT	Direct agglutination test	5
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	6
EOS	Essential oils	7
FBS	Fetal bovine serum	8
HIV	Human immunodeficiency virus	9
ICTs	immunochromatographic tests	10
IFAT	indirect fluorescent antibody test	11
IHA	indirect hemagglutination assay	12
LSD	Least significant difference	13
MZ	Margement zone	14
MGA	Meglumine antimoniate	15
MCL	Mucocutanoas leishmania	16
NNN- media	Novy-McNeal-Nicolle medium and Evans modified Tobie's medium	17
Sb	Pentavalent antimony	18
PCR	Polymerase chain reaction	19
PKDL	Postkala-azardermatoleishmania	20
REC	Retinal endothelial cells	21

RPMI-1640	Roswell park memorial institute medium -1640	22
SSG	Sodium Stibogluconate	23
SAS	Statistical Analysis System	24
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences	25
IC50	The half-maximal inhibitory concentration	26
LVA	Veisceral Leishmaniasis anthroponotic	27
LVZ	Veisceral Leishmaniasis Zoonotic	28
VL	Visceral leishmaniasis	29
VitB1	Vitamine B1	30

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

المقدمة

Introduction

يعود طفيلي اللشمانيا الأحشائي *Leishmania donovani* إلى الحيوانات الإبتدائية Protozoa ، صنف السوطيات الحركية *kinetoplastid flagellates* عائلة المثقيات (Millán et al., 2014) *Trypanosomatida* ، يُعد هذا الطفيلي المسبب الرئيسي لداء اللشمانيا الحشوي Visceral leishmaniasis والذي يُعد من إشد إشكال المرض فتكاً بالجنس البشري في حال لم يتم معالجتها ، إذ ينتج عن الإصابة بمعقد أنواع اللشمانيا *L.donovani complex* والمكون من جنسين من اللشمانيا الا وهما *L.donovani* ، *L.infantum* فضلاً عن اللشمانيا الشاغاسية *L.chagasi* ، لا يمكن تمييز هذه الأنواع شكلياً ، بل يتم استخدام التقنيات الجزيئية للتعرف على انواعها (Lukeš et al., 2007).

تمتلك طفيليات اللشمانيا دورة حياة مكونة من مرحلتين رئيسيتين ، إذ تحتاج إلى مضيفين لأكمال دورة حياتها ، تشتمل الدورة على طورين هما : طور امامي السوط Promastigote ، يقطن القناة الهضمية للمضيف اللافقري Invertebrate host متمثلاً بذبابة الرمل Sand fly ، وطور عديم السوط Amastigote بيضوي يستوطن الخلايا الضامة للمضيف الفقري Vertebrate host متمثلاً بالإنسان (Debrabant et al., 2004;) (Hojjat, 2015).

أوضحت منظمة الصحة العالمية (WHO) بأن داء الليشمانيات Leishmaniasis أو ما يُعرف بالكالآزار Kala azar أو الحمى السوداء Black fever أو حمى دمدم Dum-Dum fever أحد أهم تسعة أمراض معدية في المناطق المدارية وشبه الأستوائية (Al-Hayali et al., 2021) ، كما ويُعد من الأمراض الطفيلية غير المسيطر عليها (Sakkas et al., 2016 ; Committee, 2010).

ينتشر داء اللشمانيات الأحشائي في 101 دولة يعيش فيها ما يقارب 350 مليون شخصاً مُعرض للأصابة ، إذ تمتاز هذه المناطق بأنها مواقع نشطة لأنتقال العدوى الطفيلية . إذ أن هناك ما يُقدر بنحو 1.3 مليون حالة تحدث سنوياً في جميع انحاء العالم ، وهو مرض طفيلي جهازي خطير تسببه طفيليات الطيف الأحشائي للمرض (Sundar & Singh, 2016; Savoia, 2015).

ينتقل داء الليشمانيا الإحشائية عن طريق النواقل الحيوية وينتج عنه الإصابة بالكلازار التي تصيب في الغالب الفئات السكانية الأشد ضعفاً والأكثر فقراً في العالم ، ومما يزيد من مخاطر الإصابة بهذا الداء هي الظروف السكانية السيئة وسوء الصرف الصحي ونقص تدابير الحماية الشخصية والهجرة المدفوعة اقتصادياً إذ يرتبط الفقر بسوء التغذية والأمراض المعدية الأخرى لاسيما أمراض نقص المناعة والتي تزيد من احتمالية الإصابة بشكل كبير بهذا الداء، إذ تنتقل طفيليات الليشمانيا إلى البشر عن طريق لسعة الرمل المصابة بطفيليات الليشمانيا من جنس *Phlebotomus sp.* أو من جنس *Lutzumia* (Alvar et al.2006) .

يوجد 20 نوعاً معروفاً من الليشمانيا يمكنها أن تصيب البشر ويمكنها أن تتسبب بأعراضاً سريرية مختلفة ، ولداء الليشمانيا ثلاث أشكال أكلينيكية سريرية معروفة هي داء الليشمانيا الجلدي Cutaneous Leishmaniasis (CL) ، وداء الليشمانيا الجلدي المخاطي Mucocutaneous Leishmaniasis (MCL) وداء الليشمانيا الإحشائية Visceral Leishmaniasis (VL) (Hakkour ; Sundar, 2002) (et al., 2020)، أكثر أنواع الليشمانيا المتوطنة في العراق هي الليشمانيا الإحشائية ، والليشمانيا الجلدية ، إذ الليشمانيا الإحشائية أشد أشكال المرض وأكثرها خطورة ، إذ ينتشر هذا النوع من داء الليشمانيا على نطاق واسع بين الأطفال دون سن الخامسة بنسبة (90%) ، إذ أن معظم الحالات تظهر في المحافظات الوسطى والجنوبية الشرقية من البلاد وتسببها *L.donovani* ، *L.infantum* (Majeed et al., 2013; Salam et al.,) (2014) .

يستخدم الكثير من المركبات الكيميائية في علاج الليشمانيا كالمركبات الأنتيمونية و البنتاميدين و الكيتوكونازول و الالوبيورينول ويذكر ان هذه المركبات لها عدة سلبيات منها نسبة السمية العالية ونقص الفعالية والكلفة العالية وعدم امتثال المريض للعلاج وذلك لطول مدة العلاج وغيرها ، في الأونة الأخيرة تزايد اهتمام العلماء بالنباتات الطبية وزراعتها والتداوي والأستطباب بها كطريقة آمنة خالية نوعاً ما من الآثار الجانبية التي تسببها الأدوية الكيميائية المصنعة ، وقد اشارت عدة أبحاث إلى أهمية النباتات الطبية وذلك لأحتوائها على مركبات فعالة لها تأثيرات مباشرة في الجسم تفتقر لها الأدوية المصنعة كيميائياً ، ولما تمتلكه من خواص علاجية فعالية يمكن ان تؤخذ فموياً (Dagley et al., 2015).

تُعد القاحات الفعالة ضد داء الليشمانيا Leishmaniasis غير متوفرة ، لذلك أصبح لتطوير استراتيجيات علاجية بديلة فعالة من حيث التكلفة أولوية عالية ، أجتذبت الجهود التي تهدف الى فحص النباتات المهمة طبياً لتحديد العوامل العلاجية الجديدة اهتماماً كبيراً في السنوات الأخيرة ، تم تحديد العديد من المستخلصات النباتية التي تظهر نشاطاً ضد الليشمانيا (Singh et al., 2011) .

يُعتقد أن فعالية بعض النباتات الطبية medicinal plants ترجع إلى زيتها الأساسي المتطاير Volatile essential oil (EO) ، وكذلك يحتوي بعضها كمية أكبر من الزيت عند مقارنته بالأنواع الأخرى من نفس جنسه (Khalil & Li, 2011).

أكدت دراسات عدة على استخدام الزيوت العطرية الخام لبعض النباتات مثل نباتات الميرمية *Salvia officinalis* ، والبردقوش *Origanum majorana* كمبيدات فطرية أو مبيدات حشرية وفي الصناعات الدوائية (Zare, 2019; Daferera et al., 2000) ، إذ تمتلك الزيوت الأساسي والمستخلصات النباتية لهذه النباتات الطبية خصائص مضادة للميكروبات التي تنتقل عن طريق الغذاء وكذلك كدواءً مضاداً للفطريات المسببة للسموم الفطرية (Ezzeddine et al., 2001)، وقد استخدم النبات كعلاج اقتصادي شعبي ضد الريبو وعسر الهضم والصداع والروماتزم (Jun et al., 2001).

نظراً لانتشار هذا النوع من الطفيليات في الآونة الأخيرة وقلّة الدراسات والأبحاث حول هذا الموضوع فقد كان هذا مدعاة للدخول في الدراسة الحالية ، فقد هدفت الدراسة إلى :

- 1 - معرفة مدى انتشار الإصابة لهذا النوع من الطفيليات في محافظة كربلاء .
- 2 - إيجاد علاج فعال مستخرج من مصادر طبيعية ضد طفيلي اللشمانيا الأحشائية .
- 3 - معرفة التراكيز الفعالة للزيوت الطيارة والمستخلص النباتي لنبات الميرمية في تثبيط نمو وحيوية الطور الأممي السوط لطفيلي اللشمانيا الإحشائية خارج الجسم الحي *In vitro* .
- 4 - قياس حساسية الطفيلي لمستخلصات نبات البردقوش وزيته الخام بتراكيزها المختلفة .
- 5 - مقارنة النسب التثبيطية لمستخلصات النباتين ، وتحديد التركيز المثبط الأعلى لنمو الطفيلي لكل مادة دوائية قيد الدراسة .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature

Review

الفصل الثاني

استعراض المراجع Literature review

1-2 نبذة تاريخية عن طفيلي اللشمانيا الأحشائي

وصفت طفيليات اللشمانيا لأول مرة في العالم القديم من قبل الطبيب الأسكتلندي David Douglas Cunningham (1843-1914) في عام 1885 وذلك عن طريق فحصه لمقطع بيولوجي لفرد مصاب بأفة جلدية في الهند في مدينة دلهي إذ وصُف على أنه أجزاء نووية ضمن التركيب الخلوي (Cunningham, 1885)، بعدها في عام 1898 وصف العالم Piotru Fokich Borovsky (1863–1932) الطفيلي من خلال فحصه خزعة جلدية في تركمانستان ورجح بأن المسبب المرضي هو عبارة عن جسيمات صغيرة وأعتبرها من الحيوانات الإبتدائية (Steverding, 2017).

تم توثيق وجود أنواع شبيهة باللشمانيا في عصور ما قبل التاريخ في اثنين من القطع الأحفورية ، إذ تم العثور على أول قطعة أحفورية تشبه اللشمانيا في أجزاء الفم والجهاز الهضمي لإنات ممثلة بالدم من ذبابة الرمل المنقرضة والمحفوظة في حجر الكهرمان طباشيري بورمي *Palaeomyia Burmitis* عمره 100 مليون سنة (Poinar & Poinar, 2004) ، إذ وصفت الأنواع الشبيهة باللشمانيا من الجنس الأحفوري *Paleoleishmania* والذي أطلق عليه اسم *P. proterus* ، كما تم العثور على *Paleoleishmania neotropicum* في أمعاء ذبابة الرمل من جنس *Lutzomyia adiketis* في كهرمان دومينيكي عمره 20-30 مليون سنة ، إذ أن سجلات الحفريات تؤكد على أن ذباب الرمل المداري ، كان ناقلاً للطفيليات الشبيهة باللشمانيا في منتصف قرن الأوليجوسين الى أوائل العصر الميوسيني ، وكذلك تم افتراض أن أصل الطفيليات الأحشائية النوع *L. infantum L. donovani* يعود إلى مناطق الشرق الأفريقي من القارة الأفريقية ، هذا بناءً على تحاليل cladistics للأنزيمات الأحادية isoenzymes (Moreno et al., 1986).

توجد أدلة على وجود داء اللشمانيات خلال العصور القديمة ، هي معرفة المجتمعات العربية القديمة بأن الأفراد المصابين بهذا الداء يكونون محميين من الأصابات المستقبلية بهذا النوع من الأمراض ، إذ أُستخدمت هذه الرؤية من قبل الناس في الشرق الأوسط وآسيا الوسطى كعوامل للمناعة النشطة ضد القرحة الشرقية

أو ما يُعرف بالنوع الجلدي من المرض ، إذ استخدموا افرازات المنطقة المصابة (الأفة الجلدية) كلقاح يُعطى في أرواف الأطفال الصغار وتحديداً الفتيات (Steverding, 2017) .

وجدت نصوص لآفات تذكرنا بالقرح الشرقية في مكتبة الملك الآشوري آشور بانيبال في القرن السابع قبل الميلاد ، يُعتقد أنها مشتقة من نصوص سابقة تعود إلى 1500- 2500 قبل الميلاد (Manson-Bahr, 1996) ، وجدت دراسة الطفيليات القديمة على 42 مومياء مصرية في مقبرة من عصر الدولة الوسطى في طيبة الغربية (1650-2050 قبل الميلاد) وجود الحمض النووي للشماني في أربع عينات ، إذ كشفت تحاليل التسلسل للحمض النووي ان المومياء الأربع مصابة بالطفيلي الأحشائي *L.donovani* مما يشير أن داء اللشمانيات الأحشائية كان موجوداً منذ العصور القديمة (Zink et al., 2006)،

يُعد العلماء العرب هم المؤرخين الرئيسيين في وصف الطيف الجلدي لداء اللشمانيات خلال العصور الوسطى ، ففي عام 930 قدم العالم العربي أبو بكر الرازي شرحاً عن انتشار الإصابات بالبتور الشرقية في محافظة بغداد (Edrissian et al., 2016) .

تم عزل مسبب مرض الكلازار خلال العام 1900 لأول مرة في الهند من قبل الطبيب الأسكتلندي William Leishman ، إذ لاحظ كائنات دقيقة مماثلة لتلك التي وصفها بروفسكي في مسحات لطحال جندي مات من المرض في دوم دوم Dum Dum (ومن هنا جاءت تسمية حمى دمدم) ، وهي بلدة تقع بالقرب من مدينة كالكوتا الهندية (Paniker, 2007) ، اشتهرت بأوضاعها الصحية السيئة إذ اعتقد حينها بأنها إحدى أنواع المتقنيات ، بعد بضعة أسابيع نشر الطبيب الأيرلندي Charles Donovan والذي كان استاذاً لعلم وظائف الأعضاء في كلية الطب في مدارس الأيرلندية ورقة تفيد بأنه عثر على أجساماً مماثلة في عينات طحال مأخوذة من جنود يعانون من الحمى وتضخم الطحال (Donovan, 1994) ، فقد عملا هذين الطبيبين بشكل مستقل عن بعضهما البعض . كما و نشر ا اكتشافهما في نفس الوقت من العام تقريباً وبعد هذا الأكتشاف سُمي الطفيلي بأسم أجسام ليشمان – دونوفان وقد اعتبرت هذه الأجسام هي المسبب العام لمرض الكلازار ، وبعدها اطلق عليه العالم الأنكليزي (Ross, 1903) اسم اللشمانيا الأحشائية (Schnur, 1989) .

بين الأخوان بريسو والأخوان سيرجن في العام 1905 وجود علاقة بين اللشمانيا والحشرات الناقلة وأثبت Donante pauer هذه الفرضية عام 1921 ثم اثبت Nicole دور الكلاب كمستودع لليشمانيا الحشوية (Kumar, 2013) .

يُعد أول انتباه لأطباء الغرب إلى داء الكالآازار في عام 1824 في جيسور بالهند (بنغلاديش الآن) إذ كان يُعتقد في البداية أنه شكل من أشكال داء الملاريا ، إذ أُعطي اسم كالآازار وهو مشتق من الكالا وتعني الأسود باللغة السنسكريتية، واللغات المنحدرة منها بما في ذلك اللغة الهندية ، وكلمة آزار وتعني الحمى في اللغة الفارسية والهندوستانية ، وقد سُمي المرض على هذا النحو لأنه يسبب اسوداد الجلد على الأطراف والبطن الذي هو أحد أعراض الشكل الهندي من المرض (Sasidharan and Saudagar, 2021) .

أشار Desjeux. (1996) بأن داء الكالآازار او اللشمانيا الأحشائية عادة ما تسببه طفيليات اللشمانيا الحشوية والتي هي : *L.donovani* والليشمانيا الشاغاسي *L.chagasi* والليشمانيا الطفولية *L.infantum*، إذ ينتشر داء اللشمانيا الأحشائية في البرازيل والهند والنيبال وبنغلادش والسودان وفي تايلاند ظهرت حالات متفرقة مستوردة خلال المدة 1985-1986 في الرجال التايلانديين الذين سافروا إلى مناطق موبوءة (Suttinont et al., 1987) في العام 1996 أُثبت وجود حالة إصابة لفتاة تبلغ من العمر 3 سنوات تسكن مقاطعة سوراتاني جنوب تايلاند (Thisyakorn et al., 1999) ، بعدها في عام 2005 تم اكتشاف حالة ثانية لرجل يبلغ من العمر 45 عام يقطن مقاطعة نان شمالي تايلاند (Kongkaew et al., 2007) .

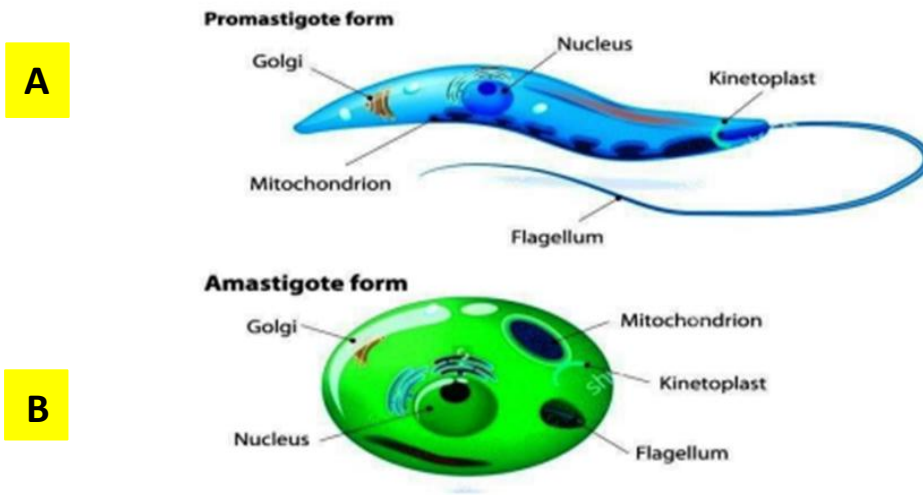
2-2 شكل الطفيلي Parasite form

يُعد طفيلي الليشمانيا الإحشائية كائن حي أحادي الخلية بشكل عام ثنائي المضيف والطور، إذ يمتلك طور مغزلي أمامي السوط يعيش في القناة الهضمية للمضيف اللاقري (أمعاء انثى ذبابة الرمل) وكذلك يتواجد عند تنميته في الأوساط الزرعية المصنعة ، إذ يكون عبارة عن خلايا متطاولة يمتلك شكلاً مغزلياً متحركاً يبلغ طوله 20-5 مايكروميتر وعرضه 1.5-3.5 مايكروميتر ويحتوي على مولد الحركة Kinetoplast يقع قريباً من النهاية الأمامية للطفيلي بمقدار 2 مايكروميتر ، يمتد منه سوطاً أمامياً يصل طوله إلى 20 مايكروناً (شكل 1-2- A) طول السوط يكون مقارباً لطول جسم الطفيلي ، ويحتوي الطور امامي السوط على نواة تكون واضحة في الجهة الخلفية من الجسم ، فضلاً عن إمتلاكه جسماً نووياً مركزياً (Rittig and Bogdan, 2000).

يكون الطور الثاني للطفيلي دائرياً أو بيضاوياً معدوم السوط صغير الحجم (شكل 1-2- B) ، إذ يبلغ طوله حوالي 3-5 مايكروميتر ، أما عرضه فيتراوح ما بين 1-3 مايكروميتر عديم الحركة يتواجد ويتكاثر داخل الخلايا البلعمية للمضيف الفقري (الثدييات) (Balaña-Fouce et al., 1998).

يُعد الطور عديم السوط للطفيلي محتويًا على سوط أيضاً يتواجد في الجيب السوطي الواقع ضمن التركيب الخلوي ولكن يكون مقيداً تماماً ولا يتم ملاحظته الا عن طريق الفحص المجهرى الألكتروني ، إن التركيب المحوري المميز للسوط لا يتم ملاحظته الا في أشكال الطور امامي السوط للطفيلي .(Alexander, 1978).

يتم التكاثر في الطورين للطفيلي عن طريق الأنتشار الطولي البسيط Longitudinal fission ، يظهر السايئوبلازم متميزاً بشكل واضح عن النواة ، فضلاً عن أملاكهما مايتوكوندرىا وفجوات وحببيبات قاعدية (Myles et al., 2007).



شكل (1-2) A الطور امامي السوط Promastigote ، B الطور عديم السوط Amastigote . (Mans et al., 2017)

3-2 تصنيف الطفيلي Parasite Classification

يُعد طفيلي الليشمانيا من الكائنات الحية التابعة إلى مملكة الأبتدائيات Protozoa ، المنتمية إلى عائلة المثقبيات Trypanosomatides التي تعود لصنف السوطيات الدموية Hemoflagellates ، تم استخدام تصنيفات مختلفة لجنس الليشمانيا ، كانت تلك المتفق عليها والتي تم طرحها بين عامين 1916 و 1987 هي تصنيفات Carl Linnaeus أحادية الترتيب اذ تستند على عدد قليل من الصفات والمراتب الهرمية (Lainson et al., 1992) .

يؤدي النمو والتطور للطفيلي في المضيف الناقل للمرض دوراً كبيراً في تصنيف الطفيلي (Killick- Kendrick, 1990)، يتطلب تحديد الأنواع الأكثر دقة طرقاً حساسة للغاية تعتمد على تحليل الأنزيم المتماثل والمقاييسات الجزيئية واستخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة (Boité *et al.*, 2012; Georgiadou *et al.*, 2015).

أكد (Schönian *et al.*, 2010) على أهمية استعمال الدراسات المتعلقة بكثافة الحامض النووي DNA والانتشار المناعي في تصنيف الطفيليات، بعد تطور الأنظمة التصنيفية تم تقسيم جنس اللشمانيا لقسمين فرعيين هما : معقدات جنس اللشمانيا اللشمانية الموجود في كل من العالمين القديم والحديث و معقدات جنس اللشمانيا فاني *L. viannia* التي تتواجد في العالم الجديد فقط كما موضح في المخطط (2-2) الآتي :

Leishmania found in humans

Subgenus	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Old World	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> [†] <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
New World	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> [†] <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> [†] <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensi</i> [‡]	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Principal tropism	Viscerotropic	Dermotropic	Dermotropic	Mucotropic

مخطط (2-2) يوضح الأنواع الطفيلية لجنس اللشمانيا التي تغزو الجسم البشري والأطياف الوبائية المتسببة بها (Committee, 2010).

تضم المجاميع الطفيلية لجنس اللشمانيا انواع من المعقدات اللشمانية تصيب البشر على وجه الخصوص متسببة بأطيايف وبائية مختلفة ورد ذكرها فيما سبق تنتقل اجناس هذه الطفيليات عادة إلى المضائف الفقرية المختلفة بواسطة لسعة أنثى ذبابة الرمل (Bhatia & Goli, 2016).

يُصنف النوع الطفيلي قيد الدراسة الحالية والمتسبب بالطيف الوبائي الحشوي من المرض والذي هو طفيلي اللشمانيا الأحشائية، اذ يستوطن هذا الطفيلي دول القارة الهندية ودول الشمال الشرقي من اسيا وأجزاء من القارة الآسيوية نفسها وبعض البلدان الجنوبية من القارة الأفريقية (Alvar *et al.*, 2012).

أشار Berman. (1988) للتصنيف الكامل لطفيلي اللشمانيا الأحشائي والذي هو:

Kingdom: Protista

Subkingdom: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Class: Zoomastigophora

Order: Kinetoplastida

Suborder: Trypanosomatina

Family: Trypanosomatidae

Genus: *Leishmania*

Specis: *donovani*

2-4 المضيف الناقل Transported host

أكد (Ready, 2013) بأن الإصابة بالطفيلي تحدث عن طريق لسعة انثى ذبابة الرمل في العالم القديم، التابعة لرتبة ثنائية الجناح Diptera الماص للدم ، وعائلة Phlebotomidae ، وتحت عائلة Phlebotominae ، و جنس

Lutzomyia Sp.

في العالم الحديث ، وتضم العائلة السابقة الأجناس التالية : *Phlebotomus* و *Chinius* ، *Sergentomyia* إذ يبلغ حجمها حوالي ثلث الى نصف حجم البعوض (Morsy et al., 1995).

تمتاز حشرة انثى ذبابة الرمل بصغر حجمها إذ يبلغ طولها حوالي 3 ملم ولها شكل محدباً ذات أجنحة متطاولة وملينة بالزغب ، وكذلك تمتلك عينان كبيرتان ذواتا لوناً غامق ، بينما لون الحشرة يكون أصفر كما موضح في الشكل (3-2) .



شكل (3-2) المظهر الخارجي لأنثى ذبابة الرمل الناقلة لطفيلي اللشمانيا (Desjeux, 1996; Roque & Jansen, 2014).

يُعدى الناقل احياناً بحشرة الحرمس ، يبدأ ظهورها في المدة ما بين شهر كانون الأول إلى نهايات شهر شباط وخلال هذه المدة تحدث الأصابات عند الأنسان ، ومما يجدر الإشارة إليه أن المدة ما بين لسعة الحشرة وظهور أعراض المرض تُدعى مرحلة الحضانة Incubation period والتي تستغرق من أسابيع الى عدة شهور (Dondji et al., 2000).

أجرى الباحث (Feliciangeli et al. (1999) دراسة مسحية لبؤرة موبوءة بداء اللشمانيا الجلدية في شمال فنزويلا وذلك بهدف معرفة أوقات الظهور الموسمي لحشرة الحرمس أو ذبابة الرمل التي تتغذى على دم الأنسان Anthrophilic ومدى كثافتها خلال فصول السنة ، كما ودرس الباحث البيئة التي تعيش فيها الحشرة والتغيرات المناخية ومدى تأثيرها على كثافة الحشرة ، إذ لاحظ أن للتغيرات المناخية دوراً في ارتفاع أو انخفاض اعداد هذه الحشرات بأنواعها المختلفة لاسيما الأنواع التي تنتشر في فصل الجفاف.

تقتصر التغذية لأنثى ذبابة الرمل على الدم حصراً ، وهي ذات نشاطاً ليلياً كما وتكون عديمة الصوت عند الطيران مساءً بارتفاعات منخفضة من سطح الأرض ، ويُذكر بأن لسعتها مؤلمة ، تتكاثر في الأجواء الحارة الرطبة

ولذلك فإنها تتواجد بكثرة في فصل الصيف ، فضلاً عن ذلك فهي عادة ما تتواجد في جحور القوارض ومسكن النمل وكذلك في أكوام النباتات المتفسخة وقريبة من القمامة ، اما عن سبب تسميتها بذبابة الرمل وذلك لأن أنثى الحشرة تضع بيوضها في الرمل أو تضعها في الأماكن المنكوبة ، لتخرج من البيوض يرقات تمر بمراحل نمو مختلفة إلى أن تتحول إلى حشرة بالغة، ومن الجدير بالذكر أن مدة مرحلة النمو تختلف باختلاف نوع الحشرة ودرجة الحرارة ، ولكنها عموماً أقل من 45 يوماً (Rebollar-Téllez *et al.*, 2005; Elnaiem *et al.*, 1999).

يُعد مرض اللشمانيات المتعدد الأطياف الذي يتراوح من الآفات الجلدية ذاتية الشفاء إلى الأمراض الحشوية القاتلة ، إذ تم وصف ما يقارب 40 نوعاً من اللشمانيا (Desjeux, 1996)، وبالمقابل تم تحديد أكثر من 500 نوعاً ونوع فرعي من ذبابة الرمل حتى الآن ، ولكن تم اثبات فعالية 30 منها أي عدد محدود جداً من هذه الأنواع في نقل الأشكال المختلفة لطفيلي اللشمانيا (Killick-Kendrick, 1990) .

توجد علاقة مترابطة بين ذبابة الرمل وطفيلي اللشمانيا ، إذ أنه عادةً تخصص أنواع معينة فقط من ذبابة الرمل وتثبت قدرتها على نقل أنواع معينة من الطفيلي ، بينما تمتلك الأنواع الأخرى القدرة على أيواء عدوى تجريبية للعديد من أنواع اللشمانيا (Sacks & Kamhawi, 2001).

5-2 المضيف المستودع The reservoir host

تلعب أنواع الفقريات المختلفة مثل القطط والكلاب والثعالب وابن أوى، دور المضائف الخازنة لطفيليات اللشمانيا التي تصيب الإنسان ، إذ يمكن التمييز بين نوعين من الحيوانات التي تلعب دور المستودعات : الفقريات الأليفة إذ تتواجد بالقرب من المنازل السكنية ، والحيوانات البرية . هذا ويمكن من الناحية الوبائية التمييز بين ثلاثة أنواع من البؤر :

1- بؤرة أولى : وتلعب فيها الفقريات البرية كالقوارض والكلبيات Rodents دور الخازن لمختلف أنواع اللشمانيا ، كما ويُعد فأر الرمل السمين *Psammomys obesus* المستودع الرئيس للشمانيا الكبرى *L.migor* في الشرق

الأوسط وكذلك في أواسط اسيا ومناطق متفرقة من أمريكا اللاتينية ، إذ ينتشر داء اللشمانيات في هذه المناطق عند الحيوانات فقط ولا توجد سوى إصابات فردية بين السكان (WHO., 2010).

2- بؤرة ثنائية : تلعب الكلاب هنا دور الخازن ، فضلاً عن الثعالب والذئاب ، إذ تعد المستودعات الخازنة الرئيسة لأنواع الطفيلي المتسببة بداء اللشمانيات الحشوي في مناطق البحر الأبيض المتوسط .

3- بؤرة ثالثة : ويمثل فيها الأنسان دور المضيف الخازن الرئيس للطفيلي ، وتعد طفيليات اللشمانيا المدارية *L.tropica* هي أكثر الأنواع شيوعاً في هذه البؤر (Killick-Kendrick, 1990).

6-2 دورة الحياة Life cycle

نكر (Banuls *etal.* (2007) بأن طفيليات اللشمانيا كائنات وحيدة الخلية تعود للمتقنيات المسوطة ، ثنائية الطور، حيث تتواجد بالشكل عديم الأسواط *Non flagellated* وتسمى اجسام ليثمان – دونوفان ، تتواجد هذه الأخيرة في أجسام الثدييات *Mammals* فقط حيث تعيش وتتضاعف داخل خلايا البلاعم للمضيف الفقري ، بينما الطور الآخر يتمثل بخلية متطاولة الشكل تتميز بشكلها المسوط *flagellated* يتواجد هذا الشكل في بلعوم الفاصدة الناقلة للمرض وفي المزارع الحيوية للطفيلي .

تبدأ مراحل الإصابة بالمرض عندما تأخذ أنثى ذبابة الرمل وجبة دموية من حيوان ثدي مصاب ، فأنها تمتص الطور غير المسوط الموجود في الخلايا البلعمية وحيدة النواة من الدورة الدموية للفريسة ، في المعى المتوسط لذبابة الرمل أو المعى الخلفي يتطور عديم الأسواط إلى الطور الأمامي السوط ، إذ يتعلق في بطانة جدار الأمعاء ويتكاثر بعملية الأنتشار الثنائي الطولي *longitudinal binary fission* ، بعد أسبوع تقريباً إلى 8 أيام من دخوله القناة الهضمية للذبابة يتحول الطفيلي من الطور المسوط غير المعدي *Procyclic* الى خلية حلقيه معدية *Metacyclic* (Rogers *et al.* 2002) .

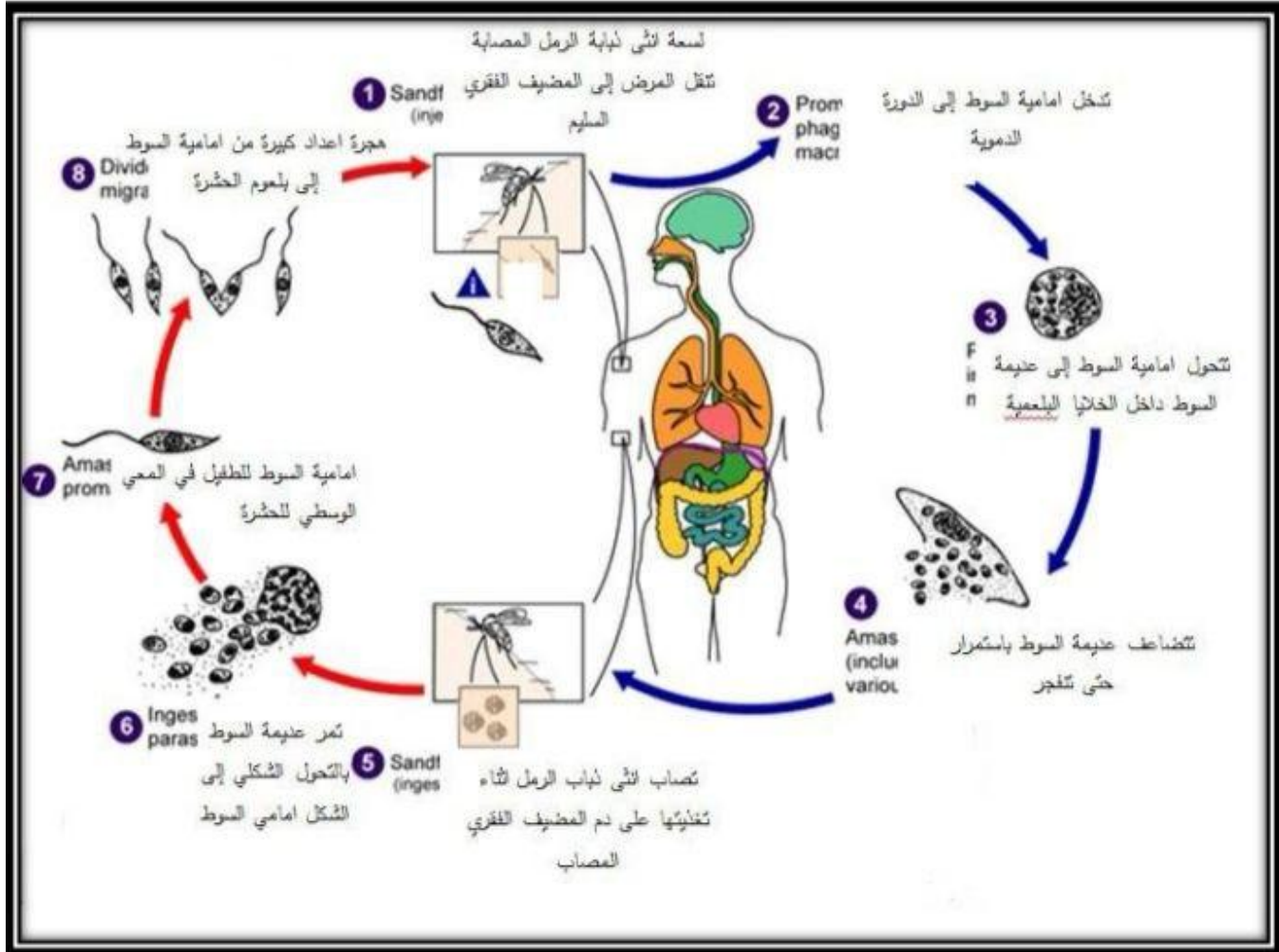
يُعد الهدف الأساسي من هذا التحول هو التغيير الذي يحدث في عديد السكريد النهائي *Lipophosphoglycan* للطفيلي والذي يلعب دوراً رئيساً في بقاء الطفيلي داخل اجسام الثدييات ، وكذلك يسمح للطفيلي بالهجرة من القناة الهضمية للحشرة الى أجزائها الفموية (Singh, 2006) .

يُهاجر الطفيلي بشكله المسوط إلى الأمام من القناة الهضمية وتحديداً (المعى الأمامي) ثم الى بلعوم الذبابة وصولاً الى خرطومها ، وهنا يمكن القول بأن الحشرة أصبحت جاهزة لحقن الطفيلي بأنسجة الفقريات ، وعندما تتغذى الذبابة مرة أخرى على دم انسان أو حيوان ثدي فأنها تقوم بإدخال الطور الأمامي السوط في جهاز دوران

العائل الجديد ، هناك يتم بلعمته عن طريق خلايا الأنسجة الضامة للأنظمة الشبكية البطانية و المفاوية للجلد او المجرى الأنفي او الأحشاء اعتماداً على النوع الطفيلي ، إذ تعيش الطفيليات داخل البلاعم وتقاوم الهضم بواسطة الأنزيمات الحالة ، بعد ذلك تتحول إلى طور عديم السوط وتتكاثر وتنمو ويزداد عددها مما يؤدي إلى تضخم الخلية البلعمية المضيئة وبالتالي انفجارها وتمزقها ، وبذلك تتحرر افراد الطفيلي الجدد لتصيب بلاعم جديدة بما في ذلك الخلايا الوحيدة المنتشرة ليصبح الكائن الفقري مصاباً بالطفيلي ثم تتغذى ذبابة الرمل على دم كائن ثدي مصاب لينتقل الطفيلي إلى القناة الهضمية للحشرة مرة أخرى ، وهكذا تستمر دورة حياة الطفيلي (Harhay *et al.*, 2011) وكما موضح في الشكل (2-4).

تظهر أعراض المرض سريرياً في غضون أسابيع إلى عدة شهور بعد الإصابة ، اعتماداً على الأنواع الفرعية لطفيلي اللشمانيا والحالة المناعية للمضيف (Dostálová & Volf, 2012; Vannier-Santos *et al.*, 2002).

يُنكر بأن الطفيلي وخلال مدة بقائه داخل القناة الهضمية للحشرة الناقلة لاسيما المعوي المتوسط يخضع لعملية نمو معقدة من قبل أنثى ذبابة الرمل الناقلة يقاوم فيها الطفيلي من أجل البقاء وذلك خلال عدة سلوكيات، منها افراز انزيمات معينة وبتبديدات مثبتة عضلياً من اجل خلق بيئة مناسبة لوجوده داخل المعوي المتوسط للذبابة الناقلة وهذا يسبب ضرراً كبيراً للتراكيب الجسمية في ذبابة الرمل (Volf *et al.*, 2004).



شكل (2-4) دورة حياة طفيلي اللشمانيا الأحشائي (Mans et al., 2017).

7-2 وبائية داء اللشمانيا Epidemiology of Leishmaniasis

تعد اللشمانيا الحشوية هي شكل من أشكال الأصابة بطفيليات اللشمانيا ، ويستخدم نوعين من المصطلحات لهذا الوباء حسب تقارير منظمة الصحة العالمية (WHO) الا وهما : داء اللشمانيا الأحشائية في العالم القديم وداء اللشمانيا الأحشائية في العالم الحديث (Committee, 2010).

أكد (Abubakar et al (2015) إن داء اللشمانيات هو السبب الرئيسي الثاني للوفيات المرتبطة بالطفيليات بعد داء الملاريا ، إذ تسبب في 62500 من اجمالي عدد الوفيات من ضمن 1000700 حالة وفاة تُعزى إلى الأمراض الطفيلية في العام 2013 .

نكرت (2016) mondiale de la Santé & Organization أن هنالك 350 مليون فرد معرضون لخطر الإصابة ، لاسيما أولئك الذين يعيشون ظروفًا اقتصادية متردية في البلدان النامية الاستوائية وشبه الاستوائية (Hotez et al., 2006; Ashford, 2000) ، إذ أن معدل الانتشار العالمي الحالي يتجاوز 12 مليوناً ، بينما يتم تشخيص أكثر من 2.5 مليون حالة جديدة سنوياً .

أشار(Alvar et al. (2012) إلى أن المرض ينتشر في 82 دولة في جميع أنحاء العالم لاسيما الدول التي مزقتها الحروب مع ظهور الغالبية العظمى من الحالات في الجزائر وإيران والمملكة العربية السعودية بما فيها العراق وسوريا وأفغانستان و السودان فضلاً عن الجزائر والبيرو.

يحدث داء اللشمانيا الحشوي في العالم القديم نتيجة الإصابة بطفيلي اللشمانيا الأحشائي الحمى السوداء بين فقراء الريف في دول الشمال الشرقي من شبه القارة الهندية فضلاً عن المتشردين ورعاة الماشية من بلدان شرقي أفريقيا (Alvar et al., 2012; Committee, 2010) ، بينما تنتشر اللشمانيا الطفولية في دول حوض البحر الأبيض المتوسط والشرق الأوسط والوسط من اسيا (Lukeš et al., 2007).

ينتج داء اللشمانيا الاحشائي في العالم الحديث عن اللشمانيا الشاغاسية والتي يكون انتشارها واسعاً في وسط والجنوب من أمريكا ، فضلاً عن المكسيك ، وكما يحدث في اللشمانيا الطفولية فإن اللشمانيا الشاغاسية قد تتسبب بطيف وبائي جلدي موضعي بغياب الطيف الأحشائي من المرض وهذا يُعد استثناءً نادراً (Kevric et al., 2015).

أكد (Zhao et al. (2017) أن المرض ينتشر بشكل واسع في مناطق غرب الصين وذلك بمعدل يبلغ 380 حالة سنوياً ، وكأجمالي إصابة عند الرضع والأطفال الصغار الذين تتراوح أعمارهم ما بين شهر -5 سنوات ما يقارب ال 67 % تقريباً (Braga et al., 2013; Petrela et al., 2010) ، إذ أن ارتفاع معدل الإصابات خلال هذه الفترة من النمو مرتبط بشكل وثيق بجهاز المناعة الوراثي وغياب القدرة على الحماية الذاتية من لسعات الحشرات عند الأطفال في هذا السن ، كما واطهرت الدراسات ان حالات الإصابة قد تنتشر ايضاً في المناطق غير المتوطنة للمرض في البلاد وذلك نتيجة السلوك البشري في السياحة والهجرة غير المنظمة ، فضلاً عن ذلك فإن معدلات الإنتشار قد تزداد في المناطق الموبوءة (Miao et al., 2017).

بينت دراسة حديثة في البرازيل إن البلاد تؤوي حوالي 90 % من المصابين بداء اللشمانيات ضمن أمريكا اللاتينية ، إذ ينتشر المرض في جميع مناطق البلاد (Alvar et al., 2012) ، في بادئ الأمر اقتصر داء اللشمانيات على المناطق الريفية من المنطقة الشمالية الشرقية من البرازيل ، بمعدل إصابة يقارب حوالي 70 %، شهدت المدن البرازيلية تفضيلاً كبيراً لهذا الوباء (Cavalcante & Vale, 2014; Albuquerque et al., 2009) ،

لاسيما ولاية ساو باولو الواقعة في المنطقة الجنوبية الشرقية وكذلك في المناطق المحيطة بها ، حيث تُعد ولاية ساو باولو من اكثر المدن اكتظاظاً بالسكان وتطوراً اقتصادياً من بين 26 ولاية في البرازيل (Naufal Spir *et al.*, 2005; Rebollar-Télez *et al.*, 2009; Andrea *et al.*, 2017).

أشار (Moheballi, 2013) إلى أن اللشمانيا الحشوية تنتشر في أجزاء مختلفة من ايران تحديداً أردبيل و الشرق من أذربيجان والمناطق المجاورة لأرمينيا إذ تعد من المناطق الموبوءة بداء بنسبة 6.0 % تقريباً ، كما وتصل نسبة الإصابة بهذا الداء الى 99.0 % عند الأطفال من هم تحت سن 12 عاماً ، علاوة على ذلك فقد ينتشر المرض في شمال غرب ايران حيث أظهرت النتائج ما لا يقل عن 3.0 % من حالات الإصابة لدى الأطفال .

يكثر أنتشار داء الكالآزار في ولاية بيهار الهندية الواقعة في الجزء الشرقي من البلاد ، والبنغال الغربية ، فضلاً عن ولاية أتر برديش، وذلك بسبب انعدام الرعاية الصحية فضلاً عن قلة الوعي السكاني حول هذا الداء ، إذ تظهر الأصابات على وجه الخصوص لدى النساء والأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين شهر -9 سنوات ، مما يؤدي ذلك إلى ازدياد حالات الوفيات بنسبة تصل الى 90 % مع ذلك فقد تنخفض هذه النسبة في حالات تلقي العلاج المناسب في المستشفيات والمراكز الصحية المتخصصة في البلاد (Bora, 1999).

ساعد مناخ الهند ذو الأمطار السنوية الغزيرة وكذلك معدلات الرطوبة التي تصل الى 70 % إضافة الى مديات درجات الحرارة التي تقع ما بين 15 -38 م⁵ وكذلك وفرة الغطاء النباتي مع وفرة المياه الجوفية والتربة الغرينية كل هذه العوامل ساعدت على نمو وتطور النواقل الحيوية لطفيلي اللشمانيا المسبب لداء الكالآزار (Prakash Singh *et al.*, 2016).

اوضحت (WHO, 2008) اليمن ، يُعد داء اللشمانيا مشكلة صحية عامة رئيسية وهو المسؤول عن حوالي 60 % من إصابات المناطق المدارية السائدة في البلاد، إذ سجلت اعلى معدلات انتشار وبائي بين أطفال المدارس في المناطق الموبوءة وذلك في محافظتي صنعاء وحجة شمال اليمن، فضلاً عن محافظة عدن جنوبي اليمن ، ومن ناحية أخرى قد تظهر إصابات بداء اللشمانيات حداثق الحيوان في العديد من دول منطقة الشرق الأوسط بما فيها اليمن (Postigo, 2010).

أشارت الدراسة (Zijlstra and El-Hassan, 2001) بأن داء اللشمانيا الأحشائي يُعد من بين أهم المشكلات الصحية في السودان ، لاسيما في المنطقة الموبوءة الرئيسية وهي المناطق الوسطى والشرقية من البلاد ، إذ حدثت العديد من الأوبئة الرئيسية كان اخرها في إقليم غرب أعالي النيل في جنوب السودان والذي تم اكتشافه في عام 1988

والذي أودى بحياة أكثر من 100000 فرداً ، إذ انتشر المرض في مناطق لم تكن معروفة سابقاً بأنها متوطنة لداء اللشمانيا ، كما ولوحظت زيادة كبيرة في عدد حالات الإصابة في المناطق الموبوءة ، تُعد معدلات الإصابة بداء اللشمانيا مرتفعة في السودان ولكنها تخضع للتنوع الموسمي وكذلك اعداد ذباب الرمل.

أوضحت دراسة (Youssef et al., 2019) في الجمهورية العربية السورية ، فإن داء اللشمانيا يسبب حالات إصابة ووفيات كبيرة في المناطق المتوطن فيها المرض ، وللظروف الإقتصادية والحالة المعيشية المتردية والحروب أثراً كبيراً ساهمت في تفشي هذا المرض وكثيراً من الأوبئة ، إذ شهدت سوريا ومخيمات اللاجئين السوريين في دول الجوار انتشاراً واسعاً لداء اللشمانيا ، من الجدير بالذكر ان اللشمانيا الطفولية هي النوع الطفيلي المسبب للطفيل الحشوي من هذا الداء ، إذ يكون انتشاره في المناطق القريبة من دمشق ودير الزور والحسكة.

نجحت السلطات الصحية في المملكة العربية السعودية من خفض حالات الإصابة المؤكدة بداء اللشمانيا الأحشائية من مئات الحالات المسجلة خلال ثمانينيات وتسعينيات القرن الماضي الى انعدام الحالات في العام 2019 ، يقتصر انتشار وتوطن المرض بشكل رئيس على مناطق الجنوب الغربي من المملكة وتحديداً منطقتي جازان وعسير ، يصيب هذا المرض الأطفال بالدرجة الأساس إذ تظهر أعراض سريرية مختلفة على المصابين (Abuzaid et al., 2020).

أشارت تقارير منظمة الصحة العالمية (WHO., 2010) تواجد بؤر متوطنة من الطفيلي الأحشائي وذلك في الوسط من العراق بين نهري دجلة والفرات بما فيها بغداد ، حتى عام 1991 إذ تم تأكيد 3000 حالة سنوياً ، بعد عام 1996 ظهرت إصابات مؤكدة في مناطق جنوب العراق ، بينما في عام 2002 تم تأكيد إصابة 840 حالة بداء اللشمانيا الحشوي في محافظة ذي قار ، وذلك بمعدل حدوث يبلغ 5/10000 . علماً أن معظم الحالات كانت بين الأطفال دون سن الخامسة ، فضلاً عن ذلك فقد ظهرت إصابات في الكلاب ايضاً .

تختلف أنواع اللشمانيا من حيث الأماكن التي تستوطنها والنواقل الحيوية الخاصة بها ، فضلاً عن اختلاف المضائف الخازنة لتلك الأنواع في العراق وبعض البلدان المجاورة و المناطق الموبوءة من العالم ، والجدول التالي يوضح ذلك.

جدول (1-2) الأنواع الطفيلية المنتشرة في بعض دول العالم مع أنواع مضائفها الخازنة والنواقل الحيوية الخاصة بها ، حسب (Kumar, 2013; WHO, 2010).

المضيف الخازن	الناقل الحيوي	الشكل السريري للمرض	نوع الطفيلي	البلد او الأقليم
الكلاب الثعالب ابن أوى	<i>P. chinensis, P. alexandri, P. wui</i> <i>P. longiductus</i>	VL VL, PKDL	<i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i>	الصين
البشر البشر حيوان الكربوع	<i>P. argentipes</i> <i>P. salehi,</i> <i>P. papatas</i>	VL CL CL	<i>L. donovani</i> <i>L. major</i> <i>L. tropic</i>	الهند
البشر الكلاب غير معروف البشر	<i>P. sergenti</i> <i>P. sergenti</i> <i>P. bergeroti</i> <i>P. duboscqi,</i>	VL VL CL CL	<i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i> <i>L. tropica</i> <i>L. major</i>	اليمن
العائلة الكلبية الكلاب	<i>P. papatasi</i> <i>P. sergenti</i> <i>P. papatasi</i>	CL CL VL	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. infantum</i>	سوريا
البشر القوارض	<i>P. orientalis,</i> Unknown	VL, PKDL, McL	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	السوان

	<i>P. papatasi</i> ,	CL	<i>L. major</i>	
القوارض البرية البشر الكلاب	<i>P. duboscqi</i>	CL, McL	<i>L. major</i>	ايران
	<i>P. papatasi</i>	CL	<i>L. tropica</i>	
	<i>P. sergenti</i>	VL	<i>L. infantum</i>	
البشر الكلاب	<i>P. kandelakii</i>	VL	<i>donovani</i>	العراق
	<i>P. sergenti</i>	CL	<i>L. tropica</i>	
	<i>P. papatasi</i>	CL	<i>L. major</i>	
	Unknown	VL	<i>L. infantum</i>	

2- 8 إمرضية طفيلي اللشمانيا الأحشائية Pathogenicity of the Visceral leishmaniasis parasite

ذكر (Ready, 2013) أن داء اللشمانيا الحشوية المتسبب بواسطة طفيلي اللشمانيا الحشوي مرضاً بشري المنشأ عادةً إذ يكون الجسم البشري هو مصدر العدوى ويمكن أن تصاب الحيوانات الأليفة القريبة منه بالعدوى الطفيلية ومن الجدير بالذكر ان هذه الحيوانات لا تشكل مصدراً للإصابة بالمرض ، على خلاف ما يحدث في حالة اللشمانيا الأحشائية المتسببة بواسطة طفيلي اللشمانيا الطفولية إذ يُعتبر حيواني المنشأ (Ready., 2010) إذ تكون الحيوانات الخازنة هي مصدر العدوى والأنسان يُصاب بالمرض ولا ينقل الإصابة للحشرة الناقلة فقد تم اكتشاف طفيليات أو أجسام مضادة حاملة للعدوى في أجسام الحيوانات الأليفة في شبه القارة الهندية (Alam et al., 2011) ، كذلك في حيوان النمس وغيرها من الثدييات البرية في شرق افريقيا(WHO., 2010).

أشارت دراسات إنه لم يتم اثبات دور العائلة الكلبية ولا الجرذان على أنها مستودعات للداء البشري المنشأ والآراء التي تدور حول هذه الجزئية متناقضة كما في الجدول التصنيفي المبسط ادناه (Mosala, 2019; Bay et al., 2018).

جدول (2-2) الأختلافات بين العدوى الحيوانية والبشرية المنشأ

داء اللشمانيا الحشوية الحيواني المنشأ	داء اللشمانيا الحشوية البشري المنشأ
الطفيلي المتسبب: <i>L. infantum</i> المضيف الخازن: الكلاب أماكن الانتشار: أمريكا اللاتينية (البرازيل)، الصين، ودول حوض البحر المتوسط	الطفيلي المتسبب: <i>L. donovani</i> المضيف الخازن: الإنسان أماكن الانتشار: الهند، اثيوبيا، السودان، النيبال، بنغلادش

بينت دراسة (Herwaldt and Magill, 2013) أن داء اللشمانيات ينجم عن معقد انواع اللشمانيا الأحشائية والتي تضم *L. donovani*, *L. infantum* والتي تسبب العدوى بالمرض في العالم القديم، والنوع *L. chagasi* يمثل هذا النوع الطفيلي المتسبب بداء الكالآازار أو اللشمانيات في العالم الحديث فضلاً عن الأنواع الطفيلية الأخرى المتسببة بالطيف الجلدي من المرض، إذ تتوطن في 88 دولة والتي تضم المناطق الإستوائية والمدارية حول العالم بإجمالي إصابة يقدر بحوالي 12 مليون إصابة بالسنة.

أشار الباحثين (Mahajan and Mohan, 1996) ان حوالي 90 % من حالات الإصابة تتركز في دول القارة الهندية والتي تضم بنغلادش، وشمال شرق الهند، النيبال، فضلاً عن السودان (دول العالم القديم)، وكذلك مناطق شمال شرق البرازيل (العالم الحديث).

مدة الحضانة للطفيلي تتراوح ما بين 10 ايام إلى سنة واحدة، وقد تكون العدوى بدون أعراض أو قد تظهر الأعراض بشكل بليغ وتتطور حالة المصاب حتى تصل إلى المرحلة القاتلة في غضون 2-3 سنوات، ففي بعض المرضى يأخذ المرض مساراً أكثر حدة، وغالباً ما يكون سبب الوفاة هو الإصابة بعدوى ثانوية، في الهند يصاب 5-10% من المرضى بداء اللشمانيات الجلدي التالي للكالآازار (PKDL) وهو متلازمة ناتجة عن عدم كفاية العلاج، على الرغم من أن بعض المرضى يتعافون من تلقاء انفسهم (Salotra et al., 2001).

أكد Murray (2002) أنه بالرغم من المجموعة الواسعة للأعراض السريرية التي تظهر عند الإصابة بالعدوى، إلا أن جميع هذه الأطياف السريرية للمرض تشترك في سمة نسجية واحدة مشتركة وهي التراكم المبكر للخلايا البلعمية وحيدة النواة في الأنسجة التي تغزوها هذه الطفيليات، مما يؤدي الى تضخم الخلايا البطانية الشبكية

(Reticular endothelial cells) للأعضاء ، إذ يؤثر تضخم الخلايا البطانية الذي يتبع الإصابة بطفيلي اللشمانيا الأحشائي على الطحال والكبد والغشاء المخاطي للأمعاء الدقيقة ونخاع العظم والغدد اللمفاوية.

أشار Kaye *et al.* (2004) بأن المنطقة الحافية (MZ) Margement zone من الطحال يُمثل موقعاً مهماً لألتقاط مسببات الأمراض المنقولة بالدم وبوابة للخلايا اللمفاوية المصابة التي تدخل منطقة اللب الأبيض من الطحال، إذ تحدث خسارة انتقائية ملحوظة لخلايا هذه المنطقة عند الإصابة بعدوى الطفيلي .

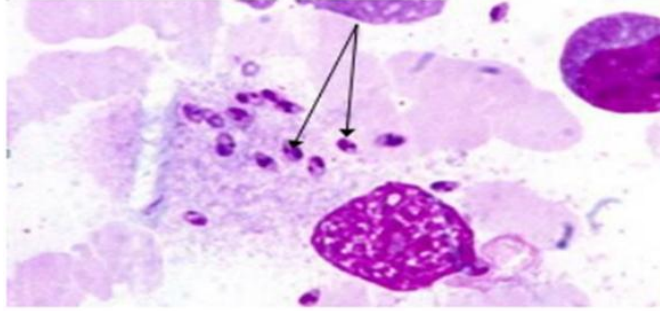
9-2 طرائق تشخيص داء اللشمانيا الحشوي Diagnostic modalities for visceral leishmaniasis

نظراً لأن السمات السريرية لداء الكالآزار الحشوي تحاكي العديد من الأمراض الشائعة الحدوث الأخرى مثل الملاريا والتيفوئيد والسل إذ يمكن ان تكون العديد من هذه الحالات المرضية موجودة مع داء اللشمانيا ، وبذلك تتبع عدة طرائق مختبرية للتأكد من وجود الطفيلي في العينات المعزولة ويمكن تصنيف هذه الطرائق التشخيصية ضمن ثلاثة مجاميع رئيسية: الطريقة التقليدية للتشخيص ، الطرائق المصلية والطرائق الجزيئية ، تختلف هذه الطرائق من حيث الحساسية والنوعية ومدة الأنجاز ، فضلاً عن الفائدة العملية ال (Sundar S, 2002; Kalter, 1994) .

1-9-2 طرائق التشخيص التقليدية لداء اللشمانيا Conventional diagnostic methods for leishmaniasis

1-1-9-2 الفحص المجهرى Microscopy

تُعد طريقة بسيطة وغير مكلفة ، تتمثل بالفحص المرئي المباشر للطور الطفيلي عديم الأسواط وذلك من خلال فحص الخزعة المأخوذة من الطحال والعقد اللمفاوية او نخاع العظم ، او الدم المحيطي إذ تنتشر فيه خلايا البلاعم المصابة ، إذ تمتاز هذه الطريقة بخصوصية عالية (Elmahallawy *et al.*, 2014; Srividya *et al.*, 2012) ، مع امكانية أخذ خزعة من الكبد واجراء الفحص المجهرى عليها بواسطة عمل لطخة رقيقة من العينة المعزولة على الشريحة الزجاجية ومن ثم تلوينها بصبغة كمزا الزرقاء (Boelaert *et al.*, 2007) ، كما موضحة في الشكل التالي (2-5).



الشكل (2-5) لطخة من نسيج طحال تحت المجهر الضوئي تظهر اصابتها بالأجسام اللشمانيا عديمة الأسواط حسب (Singh, 2006).

تعاني هذه العملية من حساسيتها الواطئة والتي تتراوح ما بين 50-85 % ، وكذلك لا يمكن اهمال المخاطر التي يتعرض لها المريض اثناء عمليات أخذ الخزع أو شطف العينات ، لاسيما عملية شطف العينة من الطحال أذ تهدد الحياة بنسبة 0.1 % من المرضى وذلك وفق دراسات أجريت في الهند (Sundar, 2002) ، في كينيا (Boelaert et al., 2007) ، تُعد خزعة الكبد اكثر اماناً من خزعة الطحال (Ready, 2010)، على الرغم من أنها أقل حساسية منها .

اشار (Moody and Chiodini, 2000) إلى إن عملية شطف نخاع العظمي طريقة اكثر اماناً من كلا الطريقتين السابقتين ، إذ تتراوح حساسيتها ما بين 53-86 % ولكنها أعلى في المصابين بفيروس نقص المناعة البشري المكتسب HIV (Cota et al., 2013).

2-1-9-2 زرع الطفيلي Parasite Culture

تُستخدم هذه الطريقة من أجل الكشف عن الطفيليات التي لا تظهر خلال تقنية الفحص المجهرى المباشر ، إذ يجري استنبات العينات السريرية في اوساطٍ زرعية سائلة ثنائية الطور (Schneider's insect medium, M199, or Grace's medium) ، ويدعى وسط شنابير او اوساطاً صلبة احادية الطور (Novy-McNeal) (Nicolle medium and Evans modified Tobie's medium) ، ويدعى (NNN) وبالرغم من كون طريقة زرع العينات هي الطريقة الأفضل في تشخيص طفيلي اللشمانيا ، إلا أنها تفتقر إلى الحساسية العالية والتي يمكن تحسينها عن طريق اجراء الزراعة عدة مرات لنفس العينة السريرية مع التأكد من وجود اعداد طفيلية أكثر ، إذ تتنوع الأوساط الزرعية حسب الأنواع الطفيلية ، إذ يكون بعضها صعب النمو وبالتالي يتطلب أوساطاً أغنى ، كما يحدث في اللشمانيا البرازيلية ، يتطلب لنمو العزلات الطفيلية درجة حرارة تتراوح ما بين 22-28 درجة سيليزية (Sundar & Rai, 2002).

تُستخدم اوساط زرعية مختلفة منها وسط RPMI1640 وهو الوسط الزرعى المستخدم في الدراسة الحالية ، والذي يُعد وسط زرعى غني بالمواد والمعادن والعناصر المغذية التي توفر بيئة ملائمة لنمو الطور أمامي السوط للطفيلي خارج الجسم الحي (Schuster & Sullivan, 2002 ; Rodríguez *et al.*, 1994).

يمر نمو الطفيلي بأربعة مراحل تبدأ بطور الكمون أو السكون ،الذي يستمر لمدة يومين من الزرع بعدها يليه الطور اللوغارتمي ، الذي يبتدأ من اليوم الثالث الى الخامس ، ومن ثم يتبع ذلك طور الأستتباب والذي يبدأ من اليوم السادس وحتى الثامن من الزرع ، إذ يصل فيه عدد الطفيليات الى حده الأعظم عن طريق تكاثر الخلايا الطفيلية ،بينما في اليوم التاسع تبدأ مرحلة الإنحلال والهبوط وتستمر الى نهاية الزرع (Mottram, 2008).

2-9-2 طرق التشخيص المناعية Immunodiagnostic methods

تمثل الإختبارات المصلية من اكثر الطرائق شيوعاً لتشخيص داء اللشمانيا إذ تكون اكثر حساسية من باقي طرائق التشخيص بشكل عام ، على مدى السنوات الماضية تم استخدام العديد من طرائق التشخيص بواسطة مستضدات مختلفة للكشف عن الأجسام المضادة لداء اللشمانيا ، وحسب (Chappuis *et al.*, 2007; Elmahallawy *et al.*,) (Savoia, 2015& 2014; Ready, 2014; Srividya *et al.*, 2012) فإن هذه الطريقة في التشخيص تعتمد على عدة انواع من الأختبارات وهي موضحة كما يلي :

1-اختبار التراص المباشر (DAT) Direct Agglutination Test

2- اختبار الأجسام المضادة الفلورية غير المباشرة (IFAT) Indirect Fluorescent Antibody Test

3- اختبار التراص الدموي غير المباشر (IHA) Indirect Hemagglutination Assay

4- فحص الأنزيم المناعي المرتبط بالأنزيم (ELISA) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

5- اختبارات الكروموتوغرافيا المناعية (ICTs) ImmunoChromatographic Tests

2-9-3 الطرائق الجزيئية Molecular methods

أشار(de Paiva-Cavalcanti *et al.* (2015) إلى ان الأختبارات القائمة على اساس تفاعل البلمرة المتسلسل PCR أصبحت التقنيات الجزيئية الأكثر شيوعاً واستخداماً وبشكل متزايد ، وذلك بسبب الحساسية العالية والنوعية

والاختبارات المختلفة للعينات المستخدمة ، فضلاً عن القيود التي يتم إثباتها عادةً بواسطة الطرائق التقليدية في علم الطفيليات والأمصال (Srividya *et al.*, 2012) .

أكد Fukutani *et al.* (2014) بأن تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR يتم استخدامها بنجاح في الكشف عن عدوى اللشمانيا غير المصحوبة بأعراض فضلاً عن تشخيص ومتابعة المرضى ممن لديهم إصابة مؤكدة بعدوى داء اللشمانيا ، إذ أن العاملون بهذه الطريقة يكونون قادرين على تحديد الإنتكاسات والعدوى في المصابين خلال مدة العلاج (Cota *et al.*, 2013).

يُستخدم فحص تفاعل البلمرة المتسلسل PCR على نخاع العظم والطحال فضلاً عن العقد اللمفاوية والدم المحيطي فضلاً عن ذلك عينات الأمصال ، إذ تُعد هذه التقنية ذات حساسية وخصوصية عالية على العينات المأخوذة من الدم ونخاع العظم (De Ruiter *et al.*, 2014) ، وفي العقد الماضي اظهر هذا التفاعل الذي تم ادخاله حديثاً على عينات الأدرار المأخوذة من المرضى المؤهلين مناعياً حساسية عالية تصل الى (96.6 %) ونوعية (100 %) (Motazedian *et al.*, 2008).

صنفت منظمة الصحة العالمية داء اللشمانيات على أنه مرض غير خاضع للسيطرة كما وتؤكد على ضرورة إيجاد برامج بحثية لتحسين آليات المكافحة للنواقل و طرائق التشخيص للعدوى ، بما في ذلك تطوير وسائل علاجية لإحتواء مزيداً من الحالات الإصابة المؤكدة وتقليل عدد الوفيات نتيجة هذا الداء (, mondiale de la Santé & WHO., 2016; Murray *et al.*, 2005)

10-2 المعالجة الدوائية لداء اللشمانيا الحشوية visceral leishmaniasis

أوضح Moore & Lockwood. (2010) بأن خيارات العلاج المتاحة لداء اللشمانيا الحشوية لها مشاكل تتعلق بالفعالية والتأثيرات الجانبية الضارة ، فضلاً عن التكلفة العالية ، هذا ما يجعل العلاج مشكلة معقدة لاسيما في الدول الفقيرة.

تُعد مشتقات الانتيمون خماسي التكافؤ Pentavalent antimony (Sb) هي الخيار العلاجي الأكثر استهلاكاً من قبل الأطفال والبالغين في جميع المناطق والذي يمثل علامة تجارية يتم استخدامه من أكثر من 50 عاماً ، بينما تمثل المركبات الأمفوتريسين B، والأمينوسيديين ، والمركبات الدهنية من الأمفوتريسين B هي الخيار الثاني (Murray, 2002).

2-10-1-10-2 مركبات الأنتيمون خماسي التكافؤ Sb

تشمل مشتقات الأنتيمون خماسي التكافؤ Sb مركب SSG ومركب MGA ميغلويمين أنتمونات ، إذ يتوفر هذا الأخير تجارياً على شكل حقن عضلية ووريدية تحت مسمى Glucantime ، تحتوي كل 5 ml منها على 1500m MGA ، إذ يستعمل في الدول الناطقة بالفرنسية ، ويتوفر SSG تجارياً تحت اسم بنتوستام Pentostam وهذا الأخير يستخدم في الدول الأنكليزية (Croft & Coombs, 2003).

تستخدم مركبات الأنتيمون في علاج اللشمانيا الحشوية ، إذ تُعطى بجرعة تساوي 40 ملغ / كغم باليوم وتستمر لمدة 28 يوم ، يتم اخذ الجرعة عن طريق الحقن الوريدي او العضلي ، ولكن في بعض الدول لاسيما ولاية بيهار الهندية التي تضم مايقارب 90 % من الحالات الجديدة سنوياً ، إذ لم يعد Sb مفيداً ، إذ اظهر عدم استجابة اولية او معالجة فورية لمعالجة الحالات كما يمكن أن تؤدي المعالجة باستخدام المشتقات الأنتيمونية إلى ظهور اثار جانبية عدة متمثلة بتسارع ضربات القلب عند الحقن العضلي للـ MGA وكذلك اضطرابات كبدية ، كلوية أو وعائية كل هذه العوامل جعلت التوجه كبير إلى استخدام مركبات دوائية أخرى أكثر فاعلية (Croft & Sundar et al., 2000) Coombs, 2003).

2-10-2-10-2 مركب الأمفوتريسين Amphotericin B

بيّن Singh et al. (2005) إن المركب المعني هو مضاد حيوي متعدد الأثيلين يستخدم بعد اثبات عدم الاستجابة العلاجية الفورية أو الأولية لمركب الأنتيمون خماسي التكافؤ في ولاية بيهار الهندية تحديداً ، إذ يؤثر بشكل اساسي على الفطريات، فضلاً عن اللشمانيات والمثقبيات *Trypanosoma cruzi* وقد أثبت أن سبب التأثير الانتقائي لهذا الدواء يعود إلى ألفته العالية للأرغوستيرول ، والتي تعد من أهم الستيروولات في الكائنات الدقيقة المذكورة سلفاً ، ومما يجدر الإشارة إليه أن هذه الستيروولات غير موجودة في خلايا الثدييات وتختلف حساسية أنواع اللشمانيا لهذا الدواء بحسب اختلاف نمط هذه الستيروولات (Sundar et al., 2000).

أكد Thakur et al. (1999) إن الأمفوتريسين B يُعد علاجاً فعالاً أثبتت فعاليته في علاج ولكن له عيوب تشتمل على الأعراض الجانبية المضرّة والسمية علاوة على ذلك الحاجة الى الحقن البطيء بالتسريب الوريدي على مدى 4 ساعات والعلاج الطويل الأمد ، إذ يصل الى 30 يوماً ، هذا بالإضافة الى التكلفة الأجمالية للعلاج المرتفعة نسبياً ، ومع ذلك فقد تمت الاستفادة من العلاج الكيميائي في تطوير مركبات دهنية فيزيولوجية من الأمفوتريسين B

مضادة لداء اللشمانيات وقد اثبتت فعاليتها في العلاج مقارنة بالعقار الأم وغيرها من الأدوية المستخدمة في مكافحة داء اللشمانيا الحشوية والعديد من أنواع العدوى الطفيلية (Berman et al., 1998).

11-2 النباتات الطبية The medicinal plants

تُعد النباتات الطبية مهمة جداً في العلاجات الدوائية ، كما وتمتلك دوراً حيوياً في تصنيع أعداد كبيرة من الأدوية الجديدة ، وذلك لأن المصدر لهذه النباتات يكون متاح ويمكن الحصول عليه بسهولة ، وأيضاً تكون الأدوية المصنعة من النباتات العشبية الطبية آمنة وغير سامة ، ولها العديد من الاستخدامات كعلاج لكثير من الأمراض (Raof & Mohamed, 2020)

ينتج من استخراج خلاصات النباتات الطبية ، إنتاج تركيبية كيميائية معقدة ضخمة بما في ذلك مركبات الفلافونويد ، والقلويدات ، والفينيل بروبانويد ، والستيروول ، والتريبيبيويدسن ، فضلاً عن الزيوت الأساسية (Sundar & Singh, 2018) .

تُعد الزيوت الأساسية عبارة عن تركيبية كيميائية معقدة معزولة عن النباتات ومستقلباتها الثانوية تتكون من 10-60 تركيبية خليط بتركيزات مختلفة ، لكن مكونات محددة (2-3 مكونات رئيسية) تحدد الخصائص البيولوجية للزيوت الأساسية.

تستخدم الزيوت العطرية الخام على نطاق واسع في علم الأدوية نظراً لخصائصها البيولوجية كعقار مضاد للتشنج ومسكنات. المهدئات ومضادات الالتهاب ومضادات الميكروبات ومضادات الديدان ومضادات الحيوانات الإبتدائية ، أظهر العديد من نشاطاً مثبطاً على الحيوانات الأبتدائية. ولا سيما طفيلي اللشمانيا (Andrade et al., 2016).

1-11-2 التصنيف العلمي نبات الميرمية Scientific classification of *Saliva officinalis*

يُعد نبات طبي، يُعرف أيضاً بأسم حكيم الحديقة (Saga)، حكيم الطهي وهو نبات عشبي له استخدامات عديدة في الطهي والطب موطنه الأصلي جنوب أوروبا والبحر الأبيض المتوسط ، ولكنه بات منتشراً الآن في جميع انحاء

العالم ، تم استخدام النبات منذ العصور القديمة لمختلف الأمراض البشرية (Craft *et al.*, 2017) ، يُصنف النبات حسب (Müller-Wille & Reeds, 2007):

Kingdom: Plant

Subkingdom :Embryophytes

Phylum: Euphyllophytina

Subphylum: Spermatophyta

Order: Lamiales

Suborder: Lamiaceae

Family: Nepetoide

Sub Family: Mentheae

Genus: *Saliva*

Specis: *officinalis*

1-1-11-2 الوصف الخارجي للنبات وانتشاره External description of the plant and its spread

يُعد نبات الميرمية شجرة دائرية معمرة تنتمي إلى تحت عائلة النعناعيات Mentheae وهو أكبر جنس في هذه العائلة ، يضم ما يقارب 900 نوع ، موطنها الأصلي مناطق الشرق الأوسط والمغرب على وجه الخصوص ، فضلاً عن مناطق البحر الأبيض المتوسط واليوم تنتشر في جميع انحاء العالم لاسيما أوروبا وأمريكا الشمالية (Wichtl, 2001; Miura *et al.*, 2004) ، تستخدم في الطب الشعبي ، في آسيا وأمريكا اللاتينية يتم استخلاص علاجات مختلفة لأنواع الاضطرابات بما في ذلك النوبات القلبية والقرحة ، النقرس، الروماتيزم والالتهابات ، وغيرها من الاعتلالات الجسمية المتنوعة بما فيها ارتفاع نسبة السكر بالدم والأورام السرطانية (Pedro *et al.*, 2016)

أكد Garcia *et al.* (2016) أن هذا النبات في السنوات الأخيرة كان موضع الدراسات المكثفة لتوثيق إستخداماته العلاجية العديدة وأيجاد تأثيراته البايولوجية .

تم استخدام نبات الميرمية في أوروبا لعلاج عسر الهضم الخفيف (حرقة المعدة والانتفاخ) التعرق المفرط ، والأضطرابات الإدراكية المتعلقة بتقدم العمر ، فضلاً عن التهابات الحلق والجلد (Perry *et al.*, 1999) (Adams *et al.*, 2007)، الشكل (6-2) التالي يوضح المظهر الخارجي لنبات الميرمية .

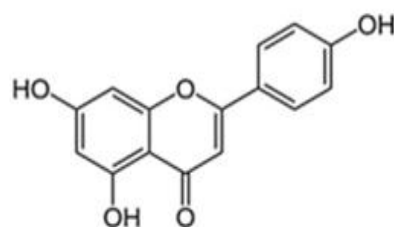


الشكل (6-2) المظهر الخارجي لنبات الميرمية (Ghorbani & Esmailizadeh, 2017).

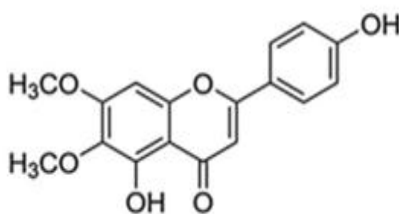
2-1-11-2 المركبات الفعالة بايولوجياً لنبات الميرمية Bioactive compounds of *Salvia officinalis*

يوجد المواد الكيميائية النشطة بايولوجياً في الأجزاء النباتية الرئيسية المتمثلة بالأوراق والأزهار والساق، تشتمل هذه التراكيب على مجموعة كبيرة واسعة من القلويدات والكاربوهيدرات والأحماض الدهنية، ومشتقات الجليكوسيد (مثل، جليكوسيدات القلب، جليكوسيدات الفلافونويد، الصابونين)، فضلاً عن احتواءها على المركبات الفينولية مثل (الكومارين، الفلافونويد، العفص) كما تحتوي على بولي اسيتلين، المنشطات، التربينات بأنواعها (monoterpenoids, diterpenoids, trit diterpenoids)، فضلاً عن ذلك يحتوي النبات على الشمع والزيت الأساسي (Badiee *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2000).

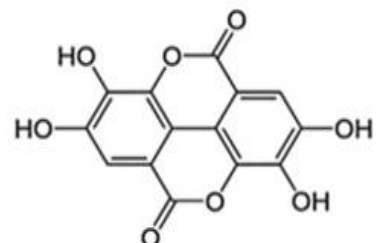
الشكلين التاليين يظهران هيكل مركبات الفلافونويد الرئيسية والتربينات flavonoids and terpenes على التوالي المعزولة من نبات الميرمية ، وحسب (Ghorbani & Esmailzadeh, 2017) .



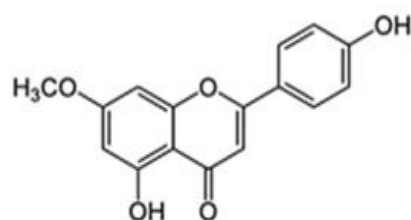
Apigenin
(C₁₅H₁₀O₅)



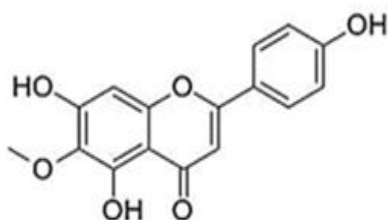
Cirsimaritin
(C₁₇H₁₄O₆)



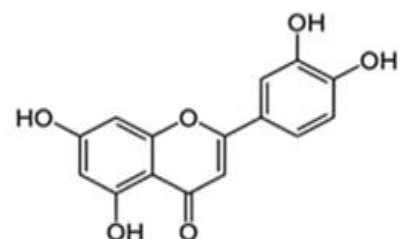
Ellagic acid
(C₁₄H₆O₈)



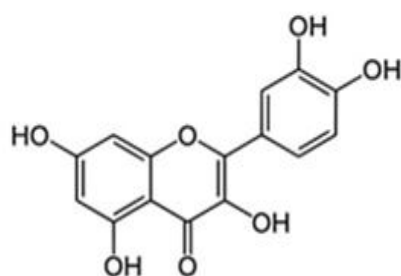
Genkwanin
(C₁₆H₁₂O₅)



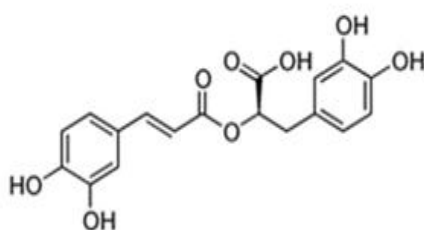
Hispidulin
(C₁₆H₁₂O₆)



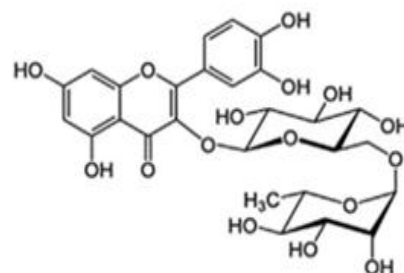
Luteolin
(C₁₅H₁₀O₆)



Quercetin
(C₁₅H₁₀O₇)

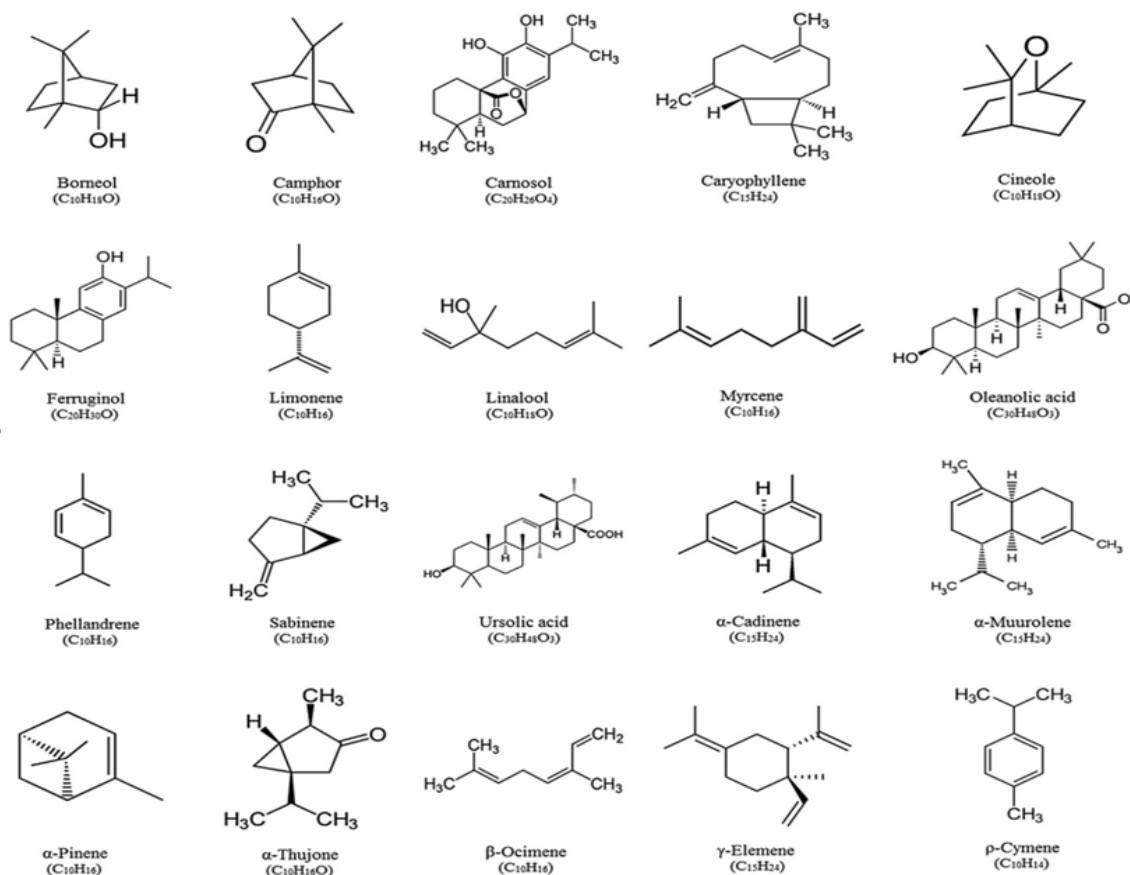


Rosmarinic acid
(C₁₃H₁₆O₈)



Rutin
(C₂₇H₃₂O₁₆)

الشكل (7-2) التركيب الكيميائي لمركبات الفلافونويد الرئيسية



الشكل (2-8) الهيكل الكيميائي لمركبات التربينات الرئيسية

تُظهر هذه الأشكال معظم المواد الكيميائية النباتية التي تم عزلها لنبات الميرمية من الزيت العطري ، والمستخلص الكحولي ، فضلاً عن المستخلص المائي ، إذ تم تمييز أكثر من 120 مكوناً أساسياً في الزيت النباتي المحضر من الأجزاء الهوائية للنبات ذاته ، إذ تشمل المكونات الرئيسية للزيت على (البورنيول Borneol ، الكافور Camphor ، كاريوفيلين Caryophyllene ، سينول Cineole ، أليمين Elemene ، هومولين Humulene ، اللين Ledene ، بينين Pinene ، ثوجون Thujone) (Hayouni *et al.*, 2008; Länger *et al.*, 1996).

تُعد مكونات المستخلص المائي لنبات الميرمية ، غنية بالفلافونويد لاسيما حمض الروزمارينيك Rosmarinic acid ومركب luteolin-7-glucoside ، فضلاً عن حمض الروزمارينيك وحمض الأيلاجيك Ellagic acid من أكثر مركبات الفلافونويد وفرة في المستخلص المائي يليه حمض الروتين Rutin إضافةً إلى Chlorogenic acid, quercetin (Hernández-Saavedra *et al.*, 2016).

تُعد الكربوهيدرات الأكثر انتشاراً في نبات الميرمية هي (الأرابينوز Arabinose ، وجلالكتوز Galactose ، جلوكوز Glucose ، المانوز Mannose ، الزايلوز Xylose ، وكذلك أحماض اليورونيك Uronic acids ، والرامنوز Rhamnose) (Capek & Hřibalová, 2004).

أشار (2003) Veličković *et al.* المركبات الكيميائية الأكثر وفرة بين الزهور والساق والأوراق (الأجزاء الهوائية) لنبات الميرمية ، سنجد ان مركب اللينالول Linalool هو اكثر المواد الكيميائية النباتية الموجودة في الساق ، اما عن الزهور فتمتلك أعلى مستوى من مركبات الفا- بينين و السينيول α -pinene cineole ، والمركبات الكيميائية التي تشمل البورنيل اسيتيت Borneyl acetate وكامفين Camphene ، كافور Camphor ، هومولين Humulene ، ليمونين Limonene ، ثوجون Thujone تُعد من أكثر المواد الكيميائية النباتية المتواجدة في الأوراق .

بينت دراسة (2013) Russo *et al.* أن نبات الميرمية مثل كل النباتات العشبية تتأثر وتتغير تراكيبه الكيميائية بالإعتماد على عدة عوامل بيئية منها وفرة المياه والطقس المعتدل فضلاً عن الرطوبة .

2-11-2 نبات البردقوش *Origanum majorana*

1-2-11-2 التصنيف العلمي لنبات البردقوش *Origanum*

marjoram

يُعرف بالبردقوش الحلو كأسم شائع ، كما عُرف سابقاً بأسم *Majorana hortensis* Moench وكأسم مرادف غير متجانس يُعرف بالأسم *Origanum dubium* Boiss وكذلك *Origanum majorana* ، وهو نبات عشبي ينتمي الى العائلة الشفوية ، وهو واحد من 200 جنس ينتمي لنفس العائلة ، إذ يتم تصنيفه وحسب (Bouyahya *et al.*, 2021).

Kingdom:Plant

Phylum: Euphyllophytina

Subphylum: Spermatophyta

Class: Magnoliophyta

High Order: Lamianae

Order: Lamiales

Family: : Lamiaceae

Genus:*Origanum*

Species:*majorana*

2-2-11-2 الوصف الخارجي والانتشار Morphological and distribution

أكد الباحث (Pimple *et al.* (2012) أن نبات البردقوش موطنه بلاد البحر الأبيض المتوسط ، وهو شجرة فرعية معمرة ، نصف كثيفة ، تنمو سنوياً ، وهو عشب عطري حساس للبرودة ، بالإضافة إلى طعمه اللذيذ ، إذ ينمو بارتفاع يقارب 30-60 سم ، له سيقان مربعة ضاربة إلى اللون الأحمر متعددة الفروع ، تتجمع لتكون كومة شجيرية ، الساق يتميز بلونه الأخضر مع البقع الحمراء المنتشرة عليه ، وكذلك إحتواءه على الشعر ، بينما الأوراق تكون ناعمة بسيطة متعرجة وبيضاوية الشكل او مستطيلة ، ذات لوناً اخضر رمادياً ، مرتبة عكس بعضها البعض على الجذع المربع ، ملمسها ناعم للغاية بسبب إحتوائه على شعيرات يبلغ طول الأوراق 0.5-1.5 سم وعرضها من 0.2 الى 0.8 سم ، يحتوي البردقوش على ازهار ، صغيرة ذات شفتين بيضاء أو زهرية شاحبة مع نقوش خضراء رمادية ، تنفتح في شكل عناقيد في منتصف الصيف الى أواخره كما موضح في شكل (2-9) (Vasudeva, 2015).



الشكل (2- 9) الأجزاء الهوائية لنبات البردقوش (Vasudeva, 2015).

اشار Vasudev. (2015) إلى أن البردقوش يمكن زراعته في تربة طينية جافة ودافئة وجيدة التصريف ، كما ويحتاج إلى اشعة الشمس الكاملة تقريباً أو شبه الظل أو بدون ظل كونه يتحمل الجفاف ، يتم تكاثره بالبذور كونه يُعد من النباتات البذرية ، يستخدم النبات في جميع انحاء العالم على إنه ضمن التوابل التي تستخدم في الطهي وذلك بسبب قوة رائحته.

3-2-11-2 المركبات الفعالة بايولوجياً لنبات البردقوش Bioactive compounds of

Origanum majorana

بينت دراسة (Fleisher & Sneer, 1982) أن البردقوش يمتاز بنكهته اللاذعة ، إذ اظهر التحليل العشبي وجود زيت طيار بشكل خاص كمكون رئيس ، نظراً لطبيعته العطرية فقد استخدم في الطهي كتوابل تُضاف للطعام ، كما اظهرت نتائج الأختبارات الكيميائية النباتية المختلفة وجود مركبات كيميائية فعالة مثل تربينويد و الفلافونويد والعفص في المستخلص الكحولي للنبات المعني ، بينما يوجد الصابونين والكاربوهيدرات في المستخلص المائي للنبات ذاته (Singla & Vasudeva, 2014).

يحتوي الزيت الأساسي لنبات البردقوش على تربينين (31.15 %) Terpinen ، هايدرات السابينين Cis- Sabinene hydrate (% 15.76) ، سايمين (6.83 %) P-Cymene ، فضلاً عن مركب السابينين Sabinen (% 6.91) و مركب (3.86 %) Trans-sabinene hydrate ، بينما يُعد المركبان (65 %) Carvacrol و الثايمول (4 %) Thymol هما المكونان الرئيسان في الزيت العطري لنبات البردقوش (Raina & Negi, 2012) .

أكد Horwitz, *et al.* (1970) إلى أن جميع تلك المكونات السابق ذكرها تعطي لنبات البرقوق خصائص صحية غاية في الأهمية ، اذ يعمل كمضاد للالتهابات والميكروبات ، ومضاد للفايروسات كما يعمل كمهدىء ومضاد للأكتئاب من خلال تناول منقوع اوراقه وازهاره على شكل شاي ، كما ويستخدم زيتة لعلاج نزلات البرد.

اوضح (Raina and Negi. (2012 أن لنبات البردقوش استخدامات عدة بالإضافة إلى استخدامه في صناعة مختلف المواد التجميلية مثل الصابون والزيوت العطرية ، اذ يعمل على تنشيط جهاز المناعة ويخفض الكوليستيرول وبذلك يقلل من تصلب الأوعية الدموية بفضل احتواءه على مركب الروزمارينيك ، فضلاً عن ذلك فهو يعمل على تقليل خطر التعرض لضعف الذاكرة (الزهايمر) كما ويستخدم لتعقيم اروقة المستشفيات والأسطح التي تكثر عليها الميكروبات وذلك لخصائصه المطهرة .

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

1-3 الأجهزة المختبرية المستعملة : أستعمل عدداً من الأجهزة والمستلزمات المختبرية في الدراسة ، كما موضحة في الجدول (1-3) .

جدول (1-3) الأجهزة والمستلزمات التي تم استخدامها في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	اسم الجهاز	ت
Jeitech, Korea	Hood with U.V light	1 الكابينة المعقمة
JssI, Korea	Shaker incubator	2 الحاضنة الهزازة
TEKA, Spain	Refrigerator	3 ثلاجة
Thermoala, Germany	Centrifuge	4 جهاز الطرد المركزي
Sartorius, Germany	Electrical sensitive balance	5 ميزان الكتروني حساس
Bio Basic ,Canada	Micropipettes	6 ماصات مجهرية
Volac, England	Pyrex	7 زجاجيات مختلفة
Jordan	Medical Syringe	8 محاقن طبية
China	Pipets tips	9 خراطيش
Olympus, Japan	Microscope	10 مجهر ضوئي
Elphor- Germany	Para-Film	11 شريط شمعي
Labtech ,Korea	Autoclave	12 جهاز التعقيم الكهربائي
Germany	Clavengre	13 جهاز استخلاص الزيت الطيار
China	Eppendrofs tubes	14 انابيب ابندروف

China	Universal tube	انابيب زجاجية	15
(England)	Slide counter	شرائح عد	16
England	Slides	شرائح زجاجية اعتيادية	17
Avusturya/Germany	ELISA reader	قارئ الأليزا	18
HYSC/KOREA	Cooling Incubator	حاضنة مبردة 26c	19
Germany	Oven	فرن كهربائي	20
China	Filter papers	اوراق ترشيح	21
Falcon/USA	Microtiter plate 96 well	صفيحة ذات 96 حفرة	22
Sciencz /China	Water bath	حمام مائي	23
Hettich/Germany	Microcenterfuge	جهاز الطرد المركزي المجهري	24

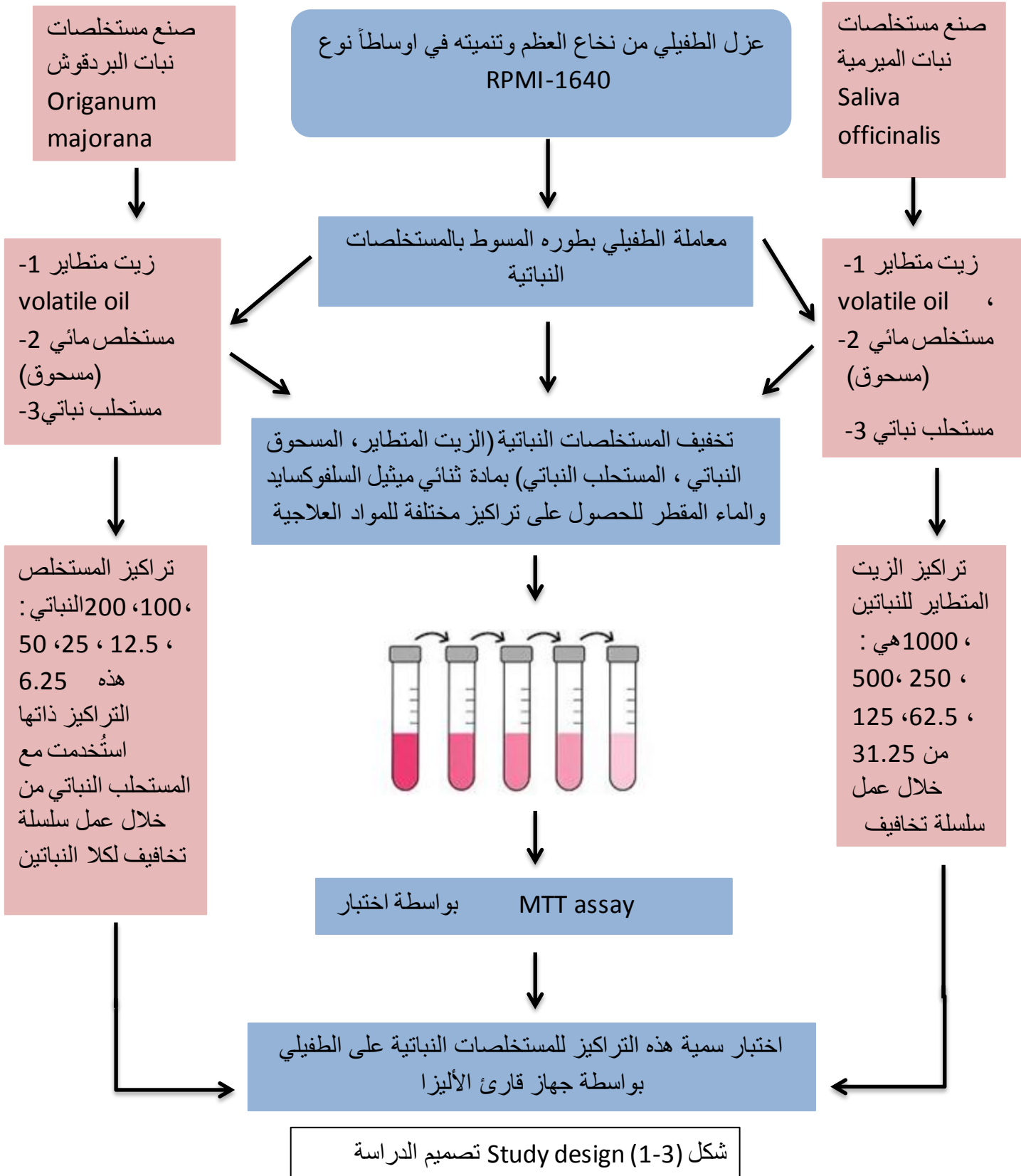
2-3 المواد الكيميائية Chemical materials

جدول (2-3) المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	اسم المادة الكيميائية	ت	
Heiltrpfen ,Germany	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	ثنائي ميثيل السلفوكسيد	1
USA American Bioinnovation	Roswell Park Memorial institute Medium	وسط زرعي - RBMI-1640	2
USA, Gibco	Fetal bovine serum	مصل مغذي FBS	3
Capricorn scientific GmbH/Germany	Antibiotic-penicillin streptomycin	مضاد حيوي بنسيليوم	4

University of Kerbala	Saliva officinales aqueous extract	مستخلص مائي لنبات الميرمية	5
University of Baghdad	Sage volatile oil	زيت طيار لنبات الميرمية	6
University of Baghdad	Marjoram volatile oil	زيت طيار لنبات البردقوش	7
University of Kerbala	Marjoram aqueous extract	مستخلص مائي لنبات البردقوش	8
Introt/ Biotechnology/ KOREA	3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT)	صبغة التترازوليوم	9
Vital Aire/Saudi Arabia	Distilled water	ماء مقطر	10
Romil pure chemistry, UK	Isopropanol, 70% Ethanol	مطهر عام	11

3-3 تصميم الدراسة Study design



4-3 جمع العينات Samples collection

تضمنت الدراسة فحص 252 شخصاً اشتبه بأصابته بداء اللشمانيا الحشوي بعد تشخيص الحالات من قبل الأطباء الأختصاص في أمراض الأطفال والباطنية في مستشفيات محافظة كربلاء بأقضيئها ونواحيها والتي شملت (مستشفى الحسين التعليمي ، مستشفى الهندية ، مستشفى عين التمر العام ، مستشفى الحسينية ، مستشفى الأطفال) وللفترة من كانون الثاني 2021 إلى حزيران 2021 ، إذ تم تأكيد إصابة 17 فرداً بداء اللشمانيا الأحشائية موزعة على المستشفيات المذكورة اعلاه ، وضعت العينات المستخلصة من نخاع العظم للمرضى في أنابيب محتوية على الأوساط الزرعية المحضرة وحضنت في مختبر الدراسات التابع للعبة الحسينية المقدسة وبدرجة حرارة 26 م⁵ وهي الدرجة الملائمة لنمو الطور المسوط للطفيلي لحين اجراء معاملتها بالمستخلصات النباتية العلاجية ، مع تدوين المعلومات الكاملة للمرضى الذين ثبتت اصابتهم .

5-3 عزل الطفيلي Parasite isolate

تقليدياً يتم عزل طفيلي اللشمانيا الأحشائية من نخاع العظم للمرضى ، بعد بتشخيصها من قبل أطباء الأطفال الأختصاص وحسب طريقة (Al-Hussaini et al., 2017) ، اذ تمت هذه العملية بمساعدة طبيب الأطفال المختص إذ جرى مسح منطقة اخذ العينة والتي تتمثل بعظمة الحوض اسفل الظهر بالكحول الأثيلي بتركيز %70 ثم تُركت لتجف قليلاً بعد ذلك جرى وضع القليل من المخدر الموضعي على منطقة سحب العينة ، ومن ثم يرسل المريض الى طبيب التخدير لغرض حقن المريض بالمخدر الوريدي البسيط ، بعدها يتم ادخال أنبوبة سحب النخاع العظمي ، إذ تكون بشكل انبوب رفيع (مجوفة) يتم ادخالها في عظمة الحوض لسحب عينة من سائل نخاع العظم واخرى من نسيج النخاع العظمي (Noyes et al., 1998; Hatam et al., 1997).

بواسطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR تم الحصول أيضاً على عزلات محضرة للطفيلي (Yaseen & Ali, 2016) من مركز الأبحاث والتقنيات الأحيائية التابع لجامعة النهرين – بغداد اذ مثلت هذه العزلات عناصر سيطرة السالبة ، أما العينات المأخوذة من المرضى فقد مثلت عناصر السيطرة الموجبة.

6-3 الأوساط الزرعية والمحاليل المستخدمة Culture media and solutions used

1-6-3 تحضير الوسط الزرعى Nove-MacNeal-Nicolle (NNN) media or Biphasic media

يتكون هذا الوسط الزرعى من طورين ، الطور الصلب والطور السائل ، يستخدم للتنشيط ، تنمية وزراعة طفيلي اللشمانيا الأحشائية ، وقد تم اعداد الطورين حسب (WHO 1984).

Solid phase الصلب 1-1-6-3

The chemical ingredient of solid 1-1-1-6-3 المكونات الكيميائية للطور الصلب
phase

جدول (3-3) لتحضير لتر واحد من طور أكار الدم الصلب يتطلب المواد التالية:

الوزن المطلوب	المادة الكيميائية	ت
16.00 g	Blood agar	1
33.30 g	Brain heart infusion	2
8.00 g	Glucose	3
100 ml	Defibrinated rabbit blood	4
1000 µg/ml	Antibiotic (penicillin and streptomycin)	5
900 ml	Distilled water	6

: Solid-phase preparation الصلب 2-1-1-6-3 تحضير الطور الصلب

1- يتم اضافة المواد المذكورة أنفاً في الفقرة اعلاه ، تُذاب هذه المواد في الماء المقطر بعد ضبط درجة الأس الهيدروجيني على 7.4 pH ، بعد ذلك يوضع المزيج في جهاز التعقيم البخاري لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 121°C.

- 2- يبرد السائل ثم يُضاف له دم ارنب ، فضلاً عن المضاد الحيوي البنسيليوم (penicillin, streptomycin) ومن ثم يخلط جيداً .
- 3- تم اخذ 20 ml من المزيج تحت ظروف تعقيم عالية ونقلت الى انابيب زجاجية معقمة بسعة 20 ml ، ووضعت بشكل مائل وذلك للحصول على اكبر مساحة سطحية للنمو.
- 4- تُحفظ الأنابيب الزجاجية الحاوية على الوسط الزراعي المحضر في درجة حرارة الغرفة ولمدة 24 ساعة للتأكد من خلوها من التلوث .

2-1-6-3 Locke's solution phase / محلول لوك / طور السائل

جدول (4-3) لتحضير لتر واحد من محلول لوك يتطلب المواد الكيميائية الموضحة ادناه:

ت	المادة الكيميائية	الوزن المستخدم
1	NaCl	9.00 g
2	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.32 g
3	KCl	0.42 g
4	NaHCO ₃	0.2 g
5	Sulfate	200 g
6	D-glucose	2 g
7	Antibiotic	1000 µg/ml
8	Distilled water	1000 ml

1-2-1-6-3 تحضير محلول لوك preparation of Locke's solution

- 1- بعد اذابة المواد الكيميائية اعلاه في ورق زجاجي بغطاء بسعة 1000 ml بالماء المقطر مع ضبط الحموضة بدرجة pH 7.0 ، بعدها يتم وضع المزيج في جهاز التعقيم البخاري بدرجة حرارة 121 c ولمدة 15 دقيقة .
- 2- يُبرد المزيج ثم يتم اضافة المضاد الحيوي اليه ليصبح جاهزاً .

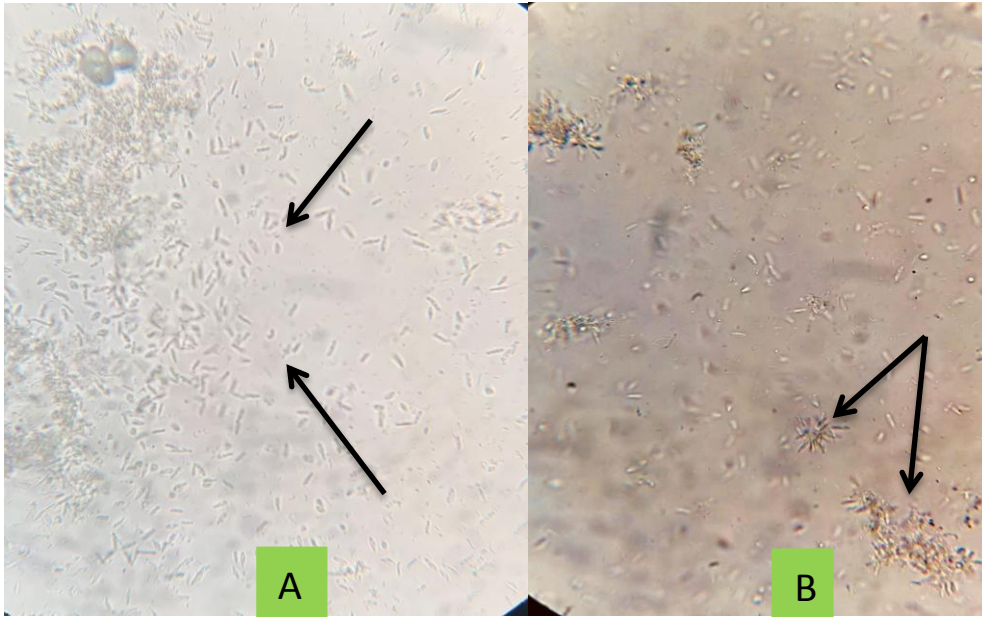
2-6-3 الأوساط الزرعية المستخدمة في اختبار السمية Media for cytotoxicity assay**1-2-6-3 Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) الوسط الزراعي medium**

يُعد وسط RPMI-1640 من أهم الأوساط الزرعية التي طورها الباحث (Minowada *et al.*, 1972) أُستخدم لزراعة الخلايا البشرية الطبيعية والسرطانية ، مع اضافة مصل الجنين البقري بمقدار 5-20% (Paiva & Careta, 2019).

يتم تحضير وسط RPMI-1640 بأضافة 9ml في انبوبة زجاجية معقمة مع اضافة 1 ml مايقارب 10% من مصل الجنين البقري (gibco®) ، وكذلك يتم اضافة 100µl مايقارب 1% من المضاد الحيوي البنسيليوم الى الوسط الزراعي.

3-6-3 مراحل تنمية طفيلي المشمانيا الأحشائي culture *Leishmania donovani*

تمت تنمية وتنشيط الطفيلي بطوره الأمامي السوط في وسط NNN ، بعد ذلك تم نقله إلى وسط RPMI-1640 مع اضافة 10% من مصل الجنين البقري و1% من المضاد الحيوي (penicillin and streptomycin) في ظروف معقمة جداً ، ثم وضع في حاضنة مبردة بدرجة حرارة c 26 ، وهي الدرجة الملائمة لنمو الطور الطفيلي المسوط إذ تمت هذه العملية في مختبر الدراسات التابع للعتبة الحسينية المقدسة وبعد مرور 72 ساعة تم فحص الأوساط الزرعية المُحضنة مسبقاً للتأكد من نمو الطور المسوط للطفيلي عن طريق اخذ قطرة من الوسط وفرشها على شريحة زجاجية ومن ثم إجراء الفحص المجهرى للشريحة المحضرة تحت عدسة بقوة 40x عند التأكد من ظهور الطور المسوط للطفيلي تم نقل 5µl من العزلة الأساسية إلى أنبوبة أخرى حاوية على الوسط الزراعي ذاته وبنفس الحجم وذلك لعمل مزارع ثانوية Sub culture للعزلة الطفيلية بهدف اكاثر الخلايا وتنقيتها من التلوث ، بعد ذلك تبدأ مرحلة الطور اللوغارتمي للطفيلي ، عندها سنلاحظ ظاهرة التورد لخلايا طفيلية متجمعة كما موضح في الشكل (2-3) ادناه :



الشكل (2-3) خلايا الطفيلي الأحشائي بالطور المسوط تحت عدسة المجهر الضوئي بقوة (40x) التي تم تنميتها في وسط RPMI-1640 وحُضنت في الحاضنة المبردة تحت 26°C : A / يمثل خلايا لشمانية احادية، B / يمثل ظاهرة التورد للطفيلي .

في حال عدم ظهور النمو للطور الطفيلي المسوط في العزلة المحضرة ، تُعد سالبة ويتم التخلص منها (Noyes *et al.*, 1998; Hatam *et al.*, 1997) .

7-3 النباتات المستخدمة في الدراسة The plants

1-7-3 جمع النباتات Plants collection

تم الحصول على النباتات (الميرمية ، البردقوش) بحالتها المجففة والمنقاة من الأتربة من محلات العطارة المتواجدة في محافظة كربلاء بعد أن تم تشخيصها من قبل الأستاذ مساعد الدكتور نيبال مطير ، ومن ثم جرى غربلتها لتخليصها من بقايا الأتربة وعزل أوراقها ومن ثم طحنها وذلك لتهيئتها لعمل المستخلصات النباتية التالية:

2-7-3 استخلاص الزيت الأساسي المتطاير لنباتي الميرمية والبردقوش (Essential oils extraction for *Salvia officinalis* and *Origanum majorana*)

تمت عملية استخلاص الزيت العطري المتطاير للنباتين (الميرمية والبردقوش) كلاً على حدا وذلك وفقاً للطريقة المعمول بها في دستور الأدوية الأوربي (Europe, 1997)، اذ تمت عملية الأستخلاص في مختبرات جامعة بغداد /كلية علوم / قسم علوم الحياة ، وتعتمد هذه العملية على تقطير الماء لمدة 3 ساعات في جهاز إستخلاص الزيت المتطاير والخطوات التالية توضح عملية استخلاص 1ml من الزيت العطري كما يلي:

1- غربلة النباتات لغرض تخليصها من الغبار والأتربة ، أخذت الأوراق لغرض طحنها بجهاز الطاحونة الكهربائية ، ثم تم وزن 100g ووضعها في دورق زجاجي flask خاص بجهاز الأستخلاص مع إضافة 500ml من الماء المقطر إلى الدورق ثم يخلط جيداً.

2- تم تسخين جهاز التقطير بواسطة مصدر حراري عند درجة حرارة 60 م⁵ لمدة ثلاث ساعات من أجل تبخير الماء الذي يحتوي على الزيت العطري المتطاير ، وعند طرف الجهاز تم تبريد البخار المحتوي على الزيت المتطاير ليتم تكثيفه وتجميعه مع الماء بحجم 100ml من خلال الصنبور المكثف .

3- بعد جمع الزيوت العطرية الخام للنباتين ، أحتفظ بها بعيداً عن اضاءة الغرفة وبدرجة حرارة منخفضة (في الثلجة) .



الشكل (3-3) جهاز استخلاص الزيوت العطرية والزيت المستخلص بكمية 1ml.

3-7-3 تخفيف وتحضير التراكيز للزيوت العطرية الخام المستخرجة من نبات الميرمية ونبات البردقوش

بعد استخلاص الزيوت الخام للنباتين بواسطة جهاز الأستخلاص كلاً على حدا ، تم تحضير محلول قياسي Stock بتركيز $1000\mu\text{g/ml}$ من الزيت العطري بالتخفيف وذلك بأخذ $100\mu\text{l}$ من الزيت الطيار، ثم اذابتها في مزيج متكون من 5ml من مادة ثنائي مثيل السلفوكسايد (DMSO) Dimethylsulfaxide مع 5ml من الماء المقطر ، ثم عمل من المحلول القياسي هذا التراكيز الستة المطلوبة في الدراسة الحالية وهي كما يلي : ($\mu\text{g/ml}$ 1000 – 500 – 250 – 125 – 62.5 – 31.25) بعد ذلك تم تخزينها في درجة حرارة الغرفة بعيداً عن الضوء (Abdullah & Alqaisi, 2022).

3-7-3 تحضير المستخلص المائي لنبات الميرمية ونبات البردقوش Preparation and dilution of the aqueous extract of *sage* and *marjoram*

تم وزن 50g من المسحوق النباتي الجاف لكلا العينات النباتية كلاً على حدة ، ومن ثم جرى مزجه مع 500ml من الماء المقطر في دورق زجاجي سعته 1000ml واغلق بواسطة القطن وورق الألمنيوم ووضع في الحاضنة الهزازة ، ثم ترك لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة الغرفة وبعدها رشح الخليط بأستخدام عدة طبقات من الشاش الطبي للتخلص من العوالق ، بعد ذلك طرد مركزياً بسرعة 3000 دورة /دقيقة لمدة 10 دقائق ، ثم رشح المستخلص بأستعمال أوراق ترشيح نوع Whatman NO 0.1 ، ومن ثم تم طرد السائل المتكون بواسطة جهاز الطرد المركزي لغرض التخلص من كل العوالق المتبقية فيه كما في شكل (3-4) (Hernández-Pérez et al., 1994).



الشكل (3-4) صوراً من عملية استخلاص المسحوق النباتي للميرمية و البردقوش.

1-3-7-3 تحضير وتخفيف التراكيز للمستخلص المائي لنباتي الميرمية والبردقوش

Preparation and dilution of concentrations of aqueous extract of *S.officinalis* and *O. marjora*

حسب (Rios *et al.*, 1987) تم تحضير المحلول القياسي للمستخلصات النباتية وذلك بأخذ 2g من المستخلص النباتي لكل من النباتين والمحضر في الفقرة اعلاه ، واذيبت هذه الكمية في 10ml من الماء المقطر المعقم وبذلك أصبح تركيز المحلول القياسي 200 µg/ml واعتبار هذا التركيز أساساً لعمل التراكيز المطلوبة في الدراسة عن طريق عمل سلسلة تخافيف ، إذ مثلت ستة تراكيز وهي (, 100 , 50 , 25 , 12.5 , 6.25 µg/ml) .

4-7-3 طريقة تحضير المستحلب النباتي لنباتي الميرمية والبردقوش

Preparation of vegetable emulsion of *S.officinalis* and *O. marjora*

جرى استخلاص المستحلب النباتي اثناء عملية استخلاص الزيت العطري المتطاير ، إذ تكون نتيجة تكثيف الماء الحاوي على قطرات الزيت ، وبعد تفريغ الزيت من جهاز الاستخلاص سوف يُلاحظ تكون ماء ضبابي حاوي على قطرات زيتية ، يتم سحبه بواسطة المحقنة الطبية والأحتفاظ به في أنبوبة زجاجية معقمة بعيداً عن الضوء وبدرجة حرارة منخفضة نسبياً (في البراد) (Cassiday, 2014).

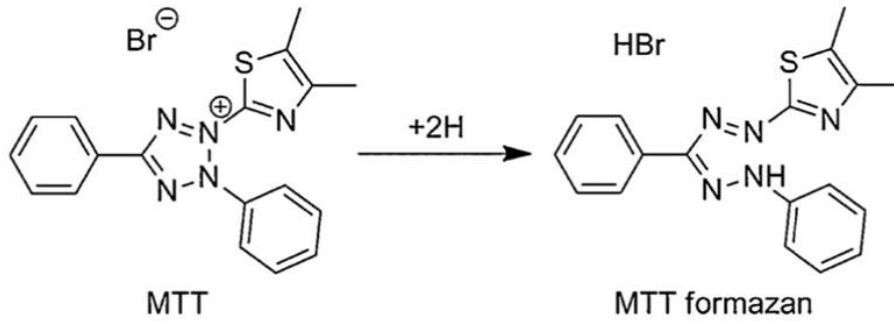
1-4-7-3 تحضير وتخفيف التراكيز للمستحلب النباتي لنباتي الميرمية والبردقوش

Preparation and dilution of the concentrations of the vegetable emulsion of *S.officinalis* and *O. marjora*

تم اخذ 2µl من المستحلب النباتي الذي تم الحصول عليه اثناء استخلاص الزيت الأساسي للنباتين والذي تم ذكر طريقته في الفقرة (2-5-3) (Ferhat *et al.*, 2007) ، بعدها أذيب في 10ml من خليط ماء مقطر بمقدار 9 ml و DMSO بمقدار 1ml ليصبح محلول بتركيز 200µl/ml حيث مثل هذا التركيز محلولاً قياسيماً أعدت منه التراكيز الستة المطلوبة بواسطة عمل سلسلة تخافيف والتراكيز هي (, 100 , 50 , 25 , 12.5 , 6.25 µg/ml) .

8-3 اختبار السمية الخلوية (MTT assay) Antileishmanial assay

أحدى التقنيات المستخدمة لقياس الحيوية الخلوية أو إمكانات السمية الخلوية للأدوية هي مقايسة او اختبار MTT (الأختبار اللوني) ، إذ تعتمد آلية هذا الأختبار على تحويل رباعي الترازوليوم الأصفر القابل للذوبان في الماء [3-(4, 5- dimethyl-thiazolyl-2)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide] MTT تؤخذ من قبل الخلايا الحية الى صبغة فورمازان الزرقاء غير القابلة للذوبان في الماء كما في الشكل (3-5) ، إذ تتشكل هذه الصبغة نتيجة انزيم الماييتوكونديريا Succinate-dehydrogenase داخل اجسام الخلايا الحية ، إذ تتناسب كمية الصبغة المشكلة (الفورمازان الأزرق غير القابل للذوبان في الماء) بشكل مباشر مع عدد الخلايا الحية (Grela et al., 2018).



الشكل (3-5) يوضح تحول صبغة رباعي الترازوليوم MTT الصفراء قابلة للذوبان بالماء الى صبغة الفورمازان الزرقاء غير القابلة للذوبان في الماء في الخلايا الحية (Grela et al., 2018) .

أن صبغة MTT تذوب في ثنائي مثيل السلفوكسيد DMSO لتعطي لوناً أرجوانياً ، عند طول موجي بمقدار 620 نانومتر ، شدة اللون الأرجواني تتناسب طردياً مع عدد الخلايا القابلة للحياة ، تم حساب النسبة المئوية لسمية المادة الدوائية المعاملة بالخلايا الطفيلية من خلال هذه المعادلة (Sylvester, 2011).

$$\text{Inhibition percentage} = \frac{\text{Control N} - \text{Samples}}{\text{Control N}} \times 100\%$$

9-3 طريقة اجراء اختبار قياس السمية الخلوية المضاد للشمانيا Conducting an anti-leishmaniasis cytotoxicity test by MTT assay

1- في صفيحة المايكروتيتير ذات ال 96 well (حفرة) ، تمت اضافة $100\mu\text{l}$ من الوسط الزراعي RBMI-1640 الحاوي على خلايا للشمانيا بطورها الأمامي السوط بحالة نشطة لحفر الصفيحة الأولى ذات التسلسل من (A-G) بالنسبة لنبات الميرمية) وكذلك تم زرع حفر الصفيحة الثانية بالوسط الحاوي على خلايا للشمانيا ايضاً من (B-H) بالنسبة لنبات البردقوش (بأستثناء بعض الحفر تُركت فارغة .

2- تمت اضافة مائة مايكروليتر من التركيز الأول للمستخلص المائي لنبات الميرمية في الحفر الثلاث الأولى من الصفيحة الأولى، ومائة مايكروليتر من التركيز الأول للمستخلص المائي لنبات البردقوش حيث كان التركيز الأول للمستخلصين النباتيين هو $200\mu\text{g/ml}$ ومنه تم عمل سلسلة التخفيف للتركيز الباقية (الأضافة تمت في الثلاث حفر الأولى من التسلسل A للصفيحة الخاصة بنبات الميرمية ، ومن التسلسل B للصفيحة الخاصة بنبات البردقوش) .

3- تم بعد ذلك اضافة التركيز الثاني $100\mu\text{l/ml}$ في حفر الصفيحة الأولى الخاصة بنبات الميرمية كما يلي: $1B, 2B, 3B$ ، واطافة نفس التركيز لنبات البردقوش في ثلاث حفر من الصفيحة الثانية الخاصة بنبات البردقوش والتي مثلت التسلسل $4C, 5C, 6C$ وهكذا تمت اضافة بقية التراكيز حسب تسلسل الحروف المتبقية للصفيحتين كلاً على حدا بواقع ثلاث مكررات (3 حفر لكل تركيز) .

4- تمت اضافة $100\mu\text{l/ml}$ من التركيز الأول الذي كان $1000\mu\text{l/ml}$ للمستحلب النباتي في الحفر التي تلي تسلسل الحفرة A^3 ، أي تمت الأضافة في الثلاث حفر التي تليها وهي $4A, 5A, 6A$ من صفيحة نبات الميرمية ، والأضافة تمت في الحفر $7B, 8B, 9B$ بالنسبة للصفيحة الثانية الخاصة بنبات البردقوش.

5- بعدها تمت اضافة $100\mu\text{l/ml}$ من التركيز الثاني للمستحلب النباتي للنباتين والذي يمثل محلول بتركيز $500\mu\text{l/ml}$ في الحفر ذات التسلسل $4B, 5B, 6B$ بالنسبة لصفيحة نبات الميرمية ، وتمت اضافة التركيز الثاني المعمول لنبات البردقوش في حفر الصفيحة الثانية الخاصة به والتي تبدأ بالتسلسل $7C, 8C, 9C$ وهكذا تمت اضافة بقية التراكيز لكل صفيحة حسب التسلسل الخاص بيها للنباتين وبواقع ثلاث حفر لكل تركيز

6- تم اضافة 100µl/ml من التركيز الأول للزيت الطيار الخاص بنبات الميرمية والذي مثل محلولاً بتركيز 1000µl/ml في الحفر الثلاث ما قبل الأخيرة بالنسبة للصفحة الأولى والتي كانت بالتسلسل $^7A, ^8A, ^9A$ ، وبالتسلسل $^{10}B, ^{11}B, ^{12}B$ بالنسبة للصفحة الثانية الخاصة بنبات البردقوش .

7- بعد ذلك تمت اضافة 100µl/ml من التركيز الثاني للزيت العطري الخاص بنبات الميرمية والذي كان بتركيز 500µl/ml في الحفر الثلاث ذات التسلسل $^7B, ^8B, ^9B$ ، اما في الصفحة الخاصة بنبات البردقوش فقد تمت اضافة محلولاً للزيت العطري الخاص بنبات البردقوش و بنفس التركيز السابق ولكن في الحفر ذات التسلسل $^{10}C, ^{11}C, ^{12}C$ وهكذا لبقية التراكيز لكل صفحة وحسب تسلسل الحروف الموجودة على صفحة المايكروتيتر المستخدمة للأجراء الإختبار .

من ثم تم حضن الصفائح المزروعة والمعاملة بالتراكيز النباتية في الحاضنة المبردة بدرجة حرارة 26 م⁵ ولمدة 24 ساعة بعدها تم اخراج الصفائح من الحاضنة ، واطافة 15µl من صبغة ال MTT لكل حفرة معاملة بالمادة الدوائية فضلاً عن حفر السيطرة السالبة المزروع فيها المعلق الخلوي بدون اضافة أي مستخلص نباتي لها وكذلك حفر السيطرة الموجبة التي مثلت الحفر الأربع من التسلسل G للصفحة الأولى الخاصة بنبات الميرمية ، وحفر السيطرة السالبة المعاملة بعقار البننتوستام التي مثلت الأربع حفر الأولى من التسلسل H في الصفحة الثانية الخاصة بنبات البردقوش ، ايضاً تمت اضافة الصبغة اليها بمقدار 15µl ، بعدها تم حضن الصفائح للنباتين لمدة 4 ساعات في الحاضنة المبردة بدرجة حرارة 26 م⁵ ومن ثم تم اخراجها بعد انقضاء المدة واطافة 40µl من مادة ال DMSO لكل حفرة بما فيها حفر السيطرة الموجبة والسالبة ومن الجدير بالذكر إن هذه العملية تمت بطرف معقمة جداً بداخل جهاز الكابينة المعقمة (Hood) ، وبعد انقضاء مدة ثلاث دقائق من اضافة مادة ال DMSO تم ادخال الصفيحتين للنباتين مباشرة الى جهاز قارئ الأليزا ELISA reader لإظهار النتائج ونسب التثبيط للمواد الدوائية المعاملة بها كما في الشكل (3-6) .



شكل (3-6) مجموعة صور لعملية إجراء اختبار MTT assay قياس السمية الخلوية للمادة الدوائية المعاملة بها حيث تمثل : A- سلسلة تخفيف أجريت للمستخلص المائي لنبات البردقوش وبنفس الطريقة تم تخفيف التركيز الأساسي لنبات الميرمية ، B- - جهاز قارئ الأليزا .

10-3 التحليل الإحصائي Statistical analysis

تم استخدام برنامج التحليل الإحصائي SAS 2012. Statistical Analysis System ، للكشف عن تأثير عوامل الاختلاف في معاملات الدراسة ، كذلك تم استخدام اختبار LSD (Analysis of Variation-ANOVA) قيمة اقل فرق معنوي للمقارنة المهمة بين الوسائل المستخدمة، إذ تم التعبير على البيانات على اساس معادلة متمثلة بالمتوسط + الانحراف القياسي (SD) ، على مستوى احتمالية 0,05 .

بالأضافة الى ذلك تم استخدام برنامج التحليل الإحصائي SPSS وبرنامج الأكلسل Excel 2010 وذلك لحساب قيمة التركيز الذي يثبط نمو الخلايا الطفيلية ، إذ يمثل المحور السيني X لوغاريتم التركيز ، بينما يمثل المحور الصادي Y نسب التثبيط (Abe et al., 2012) .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and

Discussion

4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1 نسب الإصابة في محافظة كربلاء (مناطق الدراسة) حسب أشهر السنة

أوضحت النتائج الواردة في جدول (4-1) بأن أعلى نسبة إصابة في شهر نيسان كانت قد سُجلت في مستشفى الأطفال التخصصي التابع لقطاع المركز ، وذلك بنسبة مئوية بلغت 0.4 % ، إذ مثلت هذه القيمة النسبة المئوية للإصابات بين الأطفال الذكور فقط خلال الشهر ذاته، بمتوسط معدل عام بلغ 1.25 %.

جدول (4-1) نسب الإصابة في مناطق الدراسة خلال الأشهر الأولى من السنة وحسب الجنس

X ² المحسوبة	المجموع	م. الاطفال		م. عين التمر		م. الحسينية		م. الهنديّة		م. الحسين		الاشهر
		انثى	ذكر	انثى	ذكر	ذكر	أنثى	ذكر	أنثى	ذكر	أنثى	
22.27	0.29	0.66	0.2	0	1	0	0	0	0	1	0	كانون2
	0.17	0	0.2	0	0	0.33	0	0.5	0	0	0	شباط
	0.17	0	0	0.5	0	0.66	0	0	0	0	0	آذار
	0.29	0.33	0.4	0.5	0	0	0	0.5	0	0	0	نيسان
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	أيار
	0.58	0	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	حزيران
	3.52	0.17	0.2	0.11	0.5	0.17	0	0.11	0	0.58	0	المجموع
قيمة X ² المحسوبة : 1.46												

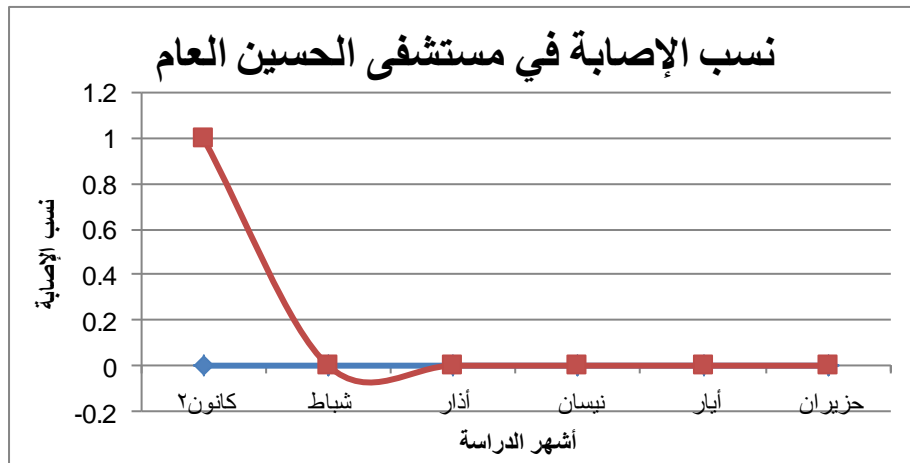
قيمة X² بلغت 22.27 بالنسبة لأشهر الإصابة
 قيمة X² بلغت 1.46 بالنسبة للذكور والإناث
 قيمة X² بلغت 8.56 بالنسبة لمناطق الدراسة

عند $p \leq 0.05$ {

أما في شهر آذار فقد سُجلت أعلى نسب إصابة في المستشفيات العامة التابعة لقضائي الحسينية وعين التمر ، وذلك بنسب مئوية 0.66% ، 0.5% على التوالي علماً ان الأصابات كانت قد سُجلت بين الإناث حصراً في المرفقين

الصحيين السابق ذكرهما أعلاه ، بينما في شهر أيار لم تُسجل أي إصابة بداء اللشمانيا الحشوية في أي من المناطق قيد الدراسة ، وقد أشارت النتائج الإحصائية الى وجود فروقات معنوية بين أشهر السنة في نسب الأصابات إذ بلغت قيمة χ^2 المحسوبة 22.27 وهي اكبر من القيمة الجدولية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ ، في حين لم تُلاحظ وجود فروق معنوية في نسب الإصابات بين الذكور والإناث ، إذ بلغت قيمة χ^2 المحسوبة 1.46 وهي اصغر من القيمة الجدولية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ ودرجة حرية 1، وكذلك لا يوجد فروق معنوية في نسب الأصابات بين مناطق قيد الدراسة إذ بلغت قيمة χ^2 المحسوبة 8.56 وهي اصغر من القيمة الجدولية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ ودرجة حرية 4.

يُشير شكل (1-4) الى وجود إصابات بداء اللشمانيا الحشوي في قطاع المركز لمحافظة كربلاء وللإناث على وجه الخصوص دون الذكور خلال شهر كانون الثاني ، وذلك بنسبة مئوية بلغت 1% وهي تمثل أعلى نسبة إصابة للإناث ، في حين انعدمت الإصابات بالنسبة للعينة المدروسة ذاتها في بقية أشهر الدراسة إذ لم تسجل أي نسبة مئوية للأشهر الأخرى على حدٍ سواء ، بينما لم تسجل أي إصابة للذكور خلال الشهر المذكور او الأشهر الأخرى قيد الدراسة في مستشفى الحسيني العام ، ومن خلال النتائج نلاحظ بشكل عام عدم وجود علاقة ارتباط في نسب الإصابة بين الذكور والإناث .

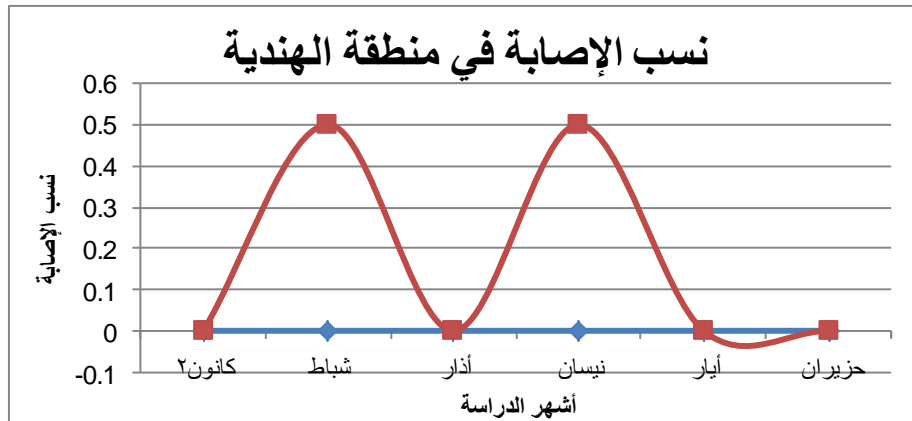


شكل (1-4) نسب الإصابة في مستشفى الحسين العام

أذ : ■ تمثل الإناث ، ■ تمثل الذكور

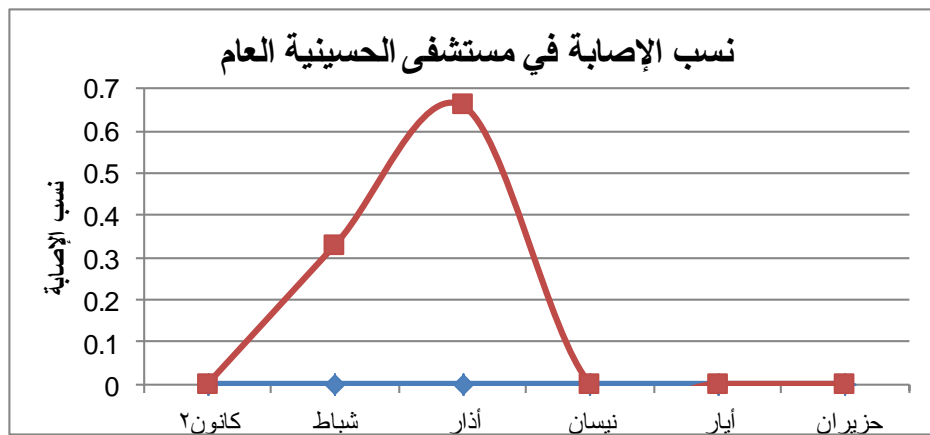
يتبين من نسب الإصابات في منطقة الهندية شكل (2-4) ان اعلى نسب إصابة سُجلت في الشهرين شباط ونيسان للإناث أيضاً وذلك بنسبٍ مئوية بلغت 0.5% ، 0.5% على التوالي ، في حين لم تُسجل أصابات بين

الإناث في بقية اشهر الدراسة اذ بلغت النسبة 0 %، كما ولم يتم تسجيل أي اصابة بين الذكور في مستشفى الهندية العام خلال الأشهر قيد الدراسة ، ومما تقدم يتضح عدم وجود علاقة إرتباط في نسب الإصابة بين الذكور والإناث .



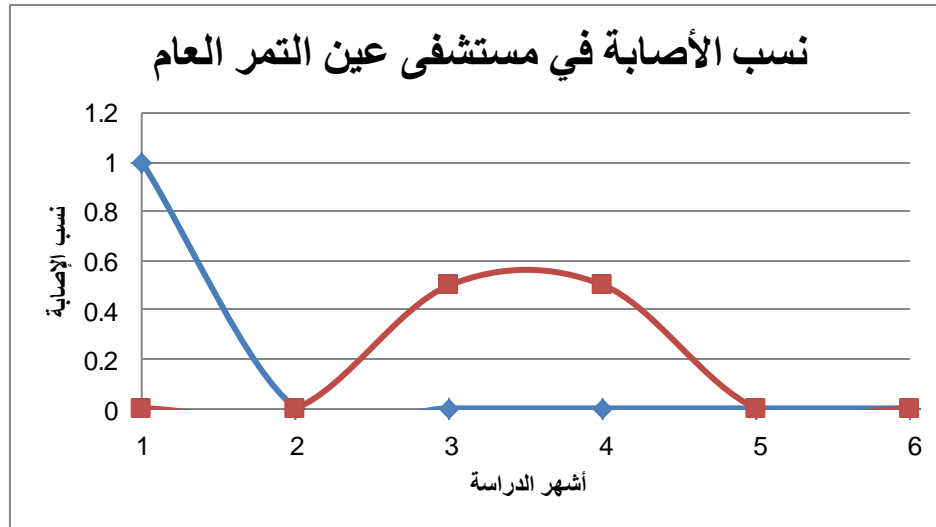
شكل (2-4) نسب الإصابات في قضاء الهندية ، أذ : ■ الإناث ، ■ الذكور

بالمقارنة مع نتائج الإصابات في منطقة قضاء الحسينية يتضح من شكل (3-4) بأن أعلى نسباً للإصابات بداء اللشمانيا الأحشائي كانت قد سُجلت في شهري شباط وأذار بين صفوف الإناث أيضاً وبقيمٍ مئوية بلغت 0.33% ، 0.66% على التوالي ، في حين لم تُسجل إصابات بين الإناث في بقية الأشهر قيد الدراسة ، بينما لم يتم تسجيل أي إصابة بالداء الحشوي بالنسبة للذكور خلال الأشهر المدروسة وللمنطقة المذكورة ذاتها .



شكل (3-4) نسب الإصابات في قضاء الحسينية ، إذ : ■ للإناث ، ■ للذكور

أوضحت النتائج المبينة في شكل (4-4) بأن منطقة عين التمر كانت سجلت أصابات بالطفيلي الأحشائي لكل من الذكور والإناث على فترات زمنية متباينة ، في شهر كانون الثاني شهدت مستشفى عين التمر التخصصي تسجيل أصابة للذكور فقط دون الإناث خلال الشهر المذكور وذلك بنسبة مئوية بلغت 1% حيث مثلت هذه القيمة أعلى نسبة مئوية كانت قد سُجلت خلال شهر كانون الثاني لفئة الذكور ، في حين لم تُسجل أي أصابات للعينة ذاتها خلال بقية الأشهر قيد الدراسة ، أما عن الإصابات لفئة الإناث فقد تم تسجيل حالات إصابة بالداء الحشوي وخلال الشهرين آذار ونيسان ، وذلك بنسبة مئوية بلغت 0.5% لكل من شهرين الوارد ذكرهما فيما سبق ، بينما لم تسجل مستشفى عين التمر العام أي أصابات لفئة الإناث في أشهر الدراسة المتبقية كانون الثاني ، شباط ، أيار ، حزيران ومما تقدم يتضح بأنه لا توجد علاقة ارتباط في نسب الإصابة بين فئتي الذكور والإناث .



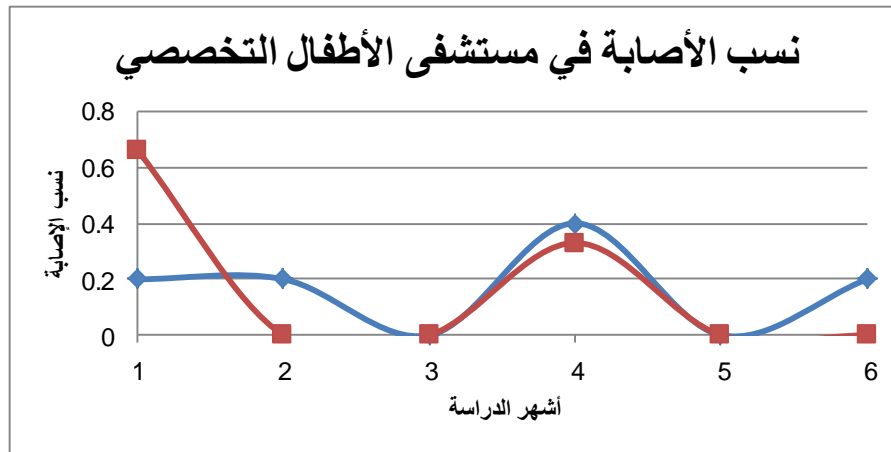
شكل (4-4) نسب الإصابة في مستشفى عين التمر التخصصي

أذ : ■ تمثل الإناث ، ■ تمثل الذكور

أشارت النتائج الموضحة في شكل (4-5) ان مستشفى الأطفال العام التابع لقطاع المركز في محافظة كربلاء كانت قد شهدت تسجيل أصابات متفرقة لكلا الفئتين الذكور والإناث وعلى فترات زمنية متباينة في الأشهر الأولى من السنة ، إذ كانت حالات الإصابة بالداء الحشوي بين الذكور هي الأعلى مما عليه في الإناث ، وذلك بنسبة مئوية بلغت 0.2% لكل من شهر كانون الثاني وشباط وحزيران على التوالي ، بينما في شهر نيسان بلغت النسبة المئوية للإصابة 0.4% إذ مثلت هذه الأخيرة النسبة الأعلى لإصابات الذكور ضمن المنطقة قيد الدراسة ، ولم تُسجل مستشفى الأطفال أي أصابات تُذكر لكل من الذكور والإناث خلال فترة شهري آذار وأيار،

أما بالنسبة لإصابات الإناث خلال شهر كانون فقد سجلت أعلى نسبة مئوية بين صفوف هذه الفئة خلال الشهر ذاته وذلك بنسبة بلغت 0.66% ومن ثم سجلت نسبة مئوية بمقدار 0.33% خلال شهر نيسان وبذلك تكون ثاني أعلى نسبة إصابة للإناث ، علماً أن الأشهر شباط وحزيران لم تشهد تسجيل أي إصابة بالطيفي الأحشائي بالنسبة للإناث ، مما تقدم يتضح لنا بأن الطيفي يصيب الذكور بنسبة أعلى من الإناث وهذا ما اتفق مع الدراستين، (Al-Ani et al., 2013; Mohebal, 2012) إذ ذكرا الباحثين بأن معدلات الإصابة بالداء تنشط عند الذكور أكثر من الإناث ، وقد يكون السبب في قلة حركة واختلاط الإناث وبالتالي تعرض الذكور للسعات الذباب أكثر من الإناث ، وهذا ما أتفق مع الدراسة (Kumar & Bumb, 2007) .

يُلاحظ من النتائج الموضحة في جدول (4-1) بأن أعلى نسباً للإصابة بالطيفي لوحظت في شهري كانون الثاني ونيسان وهذا ما اتفق مع الدراسة (Al-Ani et al., 2012) ودراسة (Rahi et al., 2013) وقد يعود السبب لموسم أنتشار ذباب الرمل إذ تنشط خلال فصل الصيف وتحدث للسعات المعدية في الفترة ما بين حزيران إلى تشرين الأول ولكن الأعراض السريرية تبدأ بالظهور بعد فترة حضانة تتراوح بين عدة اسابيع الى أشهر أي مع بداية فصل الربيع والشتاء وهذا ما اتفقت معه الدراسة (Aoun et al., 2013) .



شكل (4-5) نسب الإصابة في مستشفى الأطفال إذ : ■ الإناث ، ■ الذكور

النتائج السابقة بينت بأن مستشفى الحسين الطبية كانت قد سجلت أقل نسب إصابة مقارنةً بباقي المستشفيات قيد الدراسة ولا سيما مستشفى الأطفال والتي كانت قد احتلت المرتبة الأولى من حيث عدد الإصابات المسجلة ، وقد يعود السبب في قلة عدد الإصابات المسجلة في المستشفى الحسين العام الى وعي سكان المحافظة

بخصوصية مستشفى الأطفال التخصصي ومدى جاهزيته لاستقبال الحالات الصحية للأطفال بكل أطيافها ، بالإضافة الى معرفة المراجعين بأن مستشفى الأطفال تمتلك طاقم طبي متخصص لعلاج العوارض الصحية لهذه الفئة العمرية ، لاسيماً وان المرفقين الصحيين يقعان ضمن قطاع المركز ذاته لمحافظة كربلاء.

2-4 انتشار الإصابات في المناطق قيد الدراسة

أوضحت النتائج المبينة في جدول (2-4) أختلاف نسب الإصابات بالطفيلي وذلك بأختلاف الرقعة الجغرافية للمناطق التي سلطت الدراسة الحالية الضوء عليها إذ تراوحت نسب الإصابة بين 1.92 % في مستشفى الحسين الطبية و 8.09 % في مستشفى الحسينية العام التابع لقضاء الحسينية ، وبينما أعطت المناطق الأخرى المتمثلة بمستشفى الهندية العام التابع لقضاء الهندية ، ومستشفى عين التمر التابع لقضاء عين التمر نسباً مئوية بلغت 6.45 % ، 7.69 % على التوالي ، في حين أعطت مستشفى الأطفال التخصصي التابعة لقطاع المركز لمحافظة كربلاء نسبة مئوية بلغت 8.24% ، وقد بلغ معدل الإصابات الإجمالية للمناطق التي شملها البحث 6.74 % .

جدول (2-4) نسب الإصابة للمناطق قيد الدراسة

منطقة الدراسة	عدد المفحوصين	عدد المصابين	نسبة الإصابة	X ² المحسوبة
م. الحسين الطبية	52	1	1.92	1.69
م. الهندية	31	2	6.45	0.57
م. عين التمر	39	3	7.69	0.04
م. الحسينية	33	3	8.09	0.04
م. الأطفال	97	8	8.24	6.22
المجموع	252	17	6.74	8.56

قيمة (x²) الجدولية 3.841 عند :

درجة حرية df = 1 ، ومستوى احتمالية p ≤ 0.05

أشارت النتائج الموضحة في الجدول اعلاه بأن المعدل الإجمالي لنسب الإصابة بلغ 6.74 % وهي نسبة قليلة مقارنةً بنتائج الدراسات التي أجريت إذ ذكر (Rahi et al. (2013) بأن نسبة الإصابة في محافظة بغداد بلغت 48 % ، أما في محافظة الأنبار فقد ذكر الباحث (Al-Ani et al. (2012) بأن نسبة الإصابة بالطفيلي بلغت 2.6 % وهي نسبة تُعد قليلة مقارنةً بنتائج الدراسة الحالية ، وفي ميسان بينت دراسة مقارنة بأن نسبتها بلغت

3.5 % (Alkaisi et al., 2015) ، في حين بلغت نسبة الإصابات بالداء الأحشائي في المملكة العربية السعودية 0 Zero في عام 2019 وذلك حسب الدراسة (Abuzaid et al. (2020) والتي شملت مناطق متعددة من المملكة ، بينما في دراسة (Iqbal et al. (2002) أجريت في الكويت أوضحت بأن نسبة الإصابة المئوية بلغت 6.5 % ، وفي تركيا بلغت نسبة الإصابة بلغت 7.4 % حسب دراسة للباحث (Sakru et al. (2007) ، وقد يُعزى هذا الاختلاف الى طبيعة الظروف الاقتصادية والمعيشية والعرقية للأفراد في المجتمعات المختلفة ، وقد أشارت النتائج الإحصائية الى أنه لا توجد فروقات في نسب الإصابة تبعاً للمناطق قيد الدراسة .

3-4 توزيع نسب الإصابة تبعاً للفئة العمرية

يَتبين من خلال النتائج الواردة في جدول (3-4) اختلاف نسب الإصابات وذلك تبعاً للمرحلة العمرية ، اذ لوحظت أن اعلى نسبة مئوية للإصابة بلغت 7.14 % وهذه النسبة هي للفئة العمرية المحصورة ما بين 5-9 سنوات مقارنة بأقل نسبة بلغت 6.34 % والتي كانت للمرحلة العمرية المحصورة بين 10-14 سنة ، في حين سجلت الفئة العمرية الأصغر بعدد السنوات والتي تراوحت بين 1-4 سنة نسبة مئوية للإصابة بقيمة 6.59 % وتُعد مقارنة للنسبة التي سبقتها .

جدول (3-4) نسب الإصابة حسب الفئات العمرية

الفئة العمرية (سنة)	العدد المفحوص	العدد المصاب	النسبة المئوية %	X ² المحسوبة
4-1	91	6	6.59	0.028
9-5	98	7	7.14	0.35
14-10	63	4	6.34	0.45
المجموع	252	17	6.74	0.828

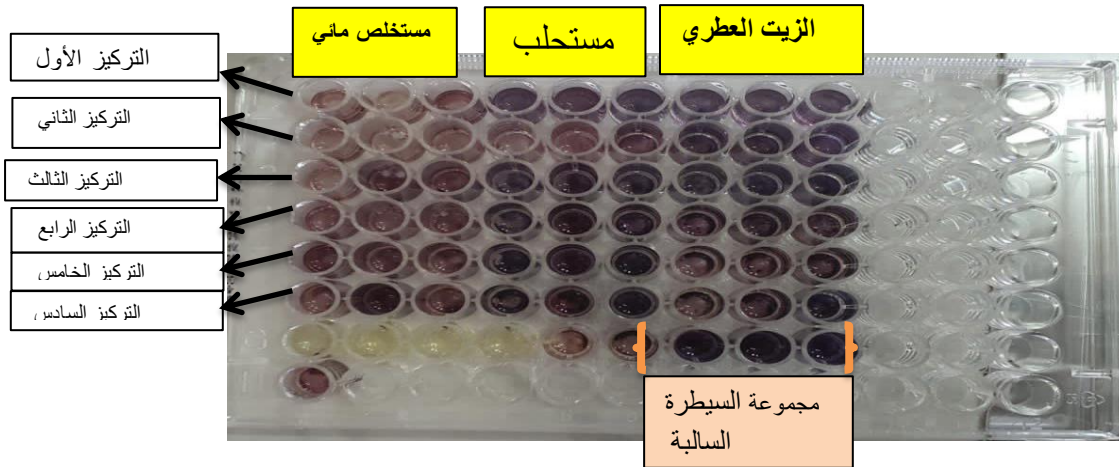
قيمة (x²) الجدولية 3.841 عند :

درجة حرية df = 1 ، ومستوى احتمالية p ≤ 0.05

وبالنظر الى نتائج الدراسة الحالية الوارد ذكرها أعلاه يُلاحظ بأنها لا تتفق مع دراسة (Mniouil *et al.* (2017) إذ أشار الباحث في دراسته الى ان نسب الإصابة تزداد في الفئات العمرية الواقعة ما بين 1-4 سنة وهذا أيضاً ما اتفقت عليه دراسة مقارنة (Alkaisi *et al.*, 2015) ، وفي دراسات أخرى اختلفت نسب الإصابة وذلك بالاعتماد على الاختلاف في الفئات العمرية المدروسة ففي دراسة (Collin *et al.* (2004) أشار الباحث بأن الفئة العمرية من 5-9 كانت قد سجلت نسبة أصابة بلغت 9.9 % إذ تُعد هذه النسبة مُقاربة لنتائج الدراسة الحالية وقد اتفقت مع نتائج دراسة (Mohebal (2013) ودراسة (Bora. (1999) إذ اكد الباحث بأن معدلات الإصابة تظهر بين الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين 1 شهر -9 سنة على وجه الخصوص ، وقد اوضحت نتائج التحليل الإحصائي الى عدم وجود فروق معنوية بين الأختلافات في نسب الإصابة تبعاً للفئات العمرية التي تقع ضمن دائرة بحث الدراسة الحالية ، وقد رُجح ان يكون السبب في زيادة نسبة الإصابة للفئة العمرية 5-9 سنوات هو لزيادة عدد ساعات اللعب في الهواء الطلق وكثرة الاختلاط وبالتالي التعرض الى لسعات الذباب الناقل بشكل اكثر مما هو عليه في الفئات العمرية الأخرى .

4-4 اختبار السمية الخلوية المضاد للشمانيا تحت تأثير مستخلصات نبات الميرمية Anti-leishmaniasis cytotoxicity test under the influence of *S.officinalis* extract

كشفت النتائج عن التأثيرات المثبطة للمستخلص المائي ، الزيت العطري الخام ، والمستحلب لنبات الميرمية على نمو خلايا طفيلي اللشمانيا الأحشائي بطورها الأمامي السوط ، إذ اظهر فحص السمية الخلوية الذي أُجري بواسطة اختبار MTT assay في لوحة المايكروتيتير microtiter plate اختلافاً في الأمتصاص اللوني وذلك بالاعتماد على التراكيز الستة المعاملة بها والتي اختلفت حسب نوع المادة الدوائية ، اذ كانت تراكيز المستخلص المائي كما يلي : 200 µg/ml – 100 – 50 – 25 – 12.5 – 6.25 ، اما تراكيز الزيت العطري فكانت – 31.25 1000µl/ml - 500 – 250 – 125 – 62.5 ، وتراكيز المستحلب كانت - 100 – 50 – 25 – 12.5 – 6.25 200µl/ml والشكل التالي يوضح الصفيحة بعد زرعها بالمعلق الخلوي وحضنها لمدة 24 ساعة ومن ثم معاملتها بالمادة الدوائية بأطيافها الثلاث وحسب التراكيز المذكورة اعلاه لكل مادة ، وبعد مرور اربعة ساعات من الحضانة في الحاضنة المبردة ، تمت اضافة صبغة MTT لها مع مادة DMSO



شكل (4-6) صفيحة المايكروتيتير بعد زراعتها بالمعلق الخلوي مع اضافة تراكيز المادة الدوائية لنبات الميرمية مع اضافة الصبغة لأجراء اختبار السمية الخلوية MTT assay .

اظهرت نتائج اختبار السمية الخلوية للصفحة الخاصة بنبات الميرمية الموضحة في شكل (4-6) وجود فروق بين الحفر ، ومما يجدر الإشارة اليه ان حفر مجموعة السيطرة السالبة تألفت من (معلق خلوي *L. media* + *donovani* promastigotes) فقط ومجاميع الحفر المتبقية قد احتوت على معلق خلوي ووسط زرعي مضاف اليها تركيز معين من تراكيز اطيف المادة الدوائية الثلاث المتمثلة بمستخلصات نبات الميرمية (مستخلص مائي ، ومستحلب ، زيت عطري) وكل مادة تختلف بتراكيزها المستخدمة في الأختبار اللوني MTT assay ، ولحساب النسبة المئوية لصلاحية الخلايا تحت تأثير التركيز المعين للنوع الدوائي المعين ، وقياس تأثيرات التراكيز المختلفة لمستخلصات نبات الميرمية في تثبيط نمو الخلايا ، تم استخدام معادلة نسبة التثبيط (Meerloo *et al.*, 2011) الموضحة ادناه :

$$\text{inhibition percentage} = \frac{\text{N- control - samples}}{\text{N- control}} \times 100\%$$

إذ :

inhibition percentage : تمثل نسبة المئوية لحيوية الخلية

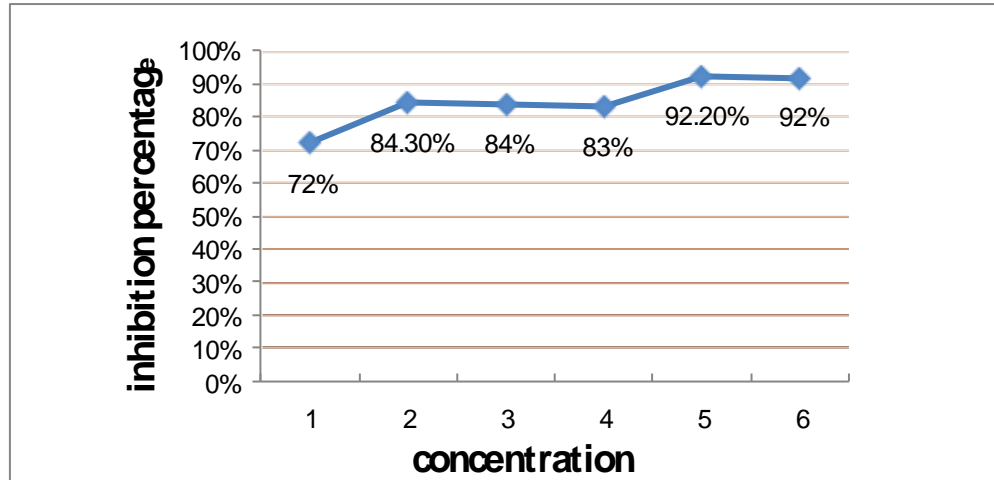
N- control : تمثل مجموع قيم حفر السيطرة السالبة

Samples : تمثل مجموع قيم المكررات الثلاث لكل تركيز تمت المعاملة به

اشارت النتائج الموضحة في جدول (4-4) أن أعلى تركيزين (200، 100) $\mu\text{g/ml}$ أظهر أعلى تأثير مثبط مضاد لنمو الطفيليات بعد المعاملة ، قيمة اقل فرق معنوي LSD عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) بنسبة مئوية بلغت 92 % عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) ، علاوة على ذلك اظهر التركيز $50 \mu\text{g/ml}$ تأثير مثبط لنمو الخلايا اذ بلغت نسبته المئوية 83% ، بينما تساوى التركيزين 25 ، $12.5 \mu\text{g/ml}$ بتأثيرهما المضاد للطفيليات بنسبة مئوية تثبيطية بلغت 84 % مع وجود فارق عشري بسيط بينهما ، اما التركيز الأدنى والذي كان $6.25 \mu\text{g/ml}$ فقد أعطى نسبة تثبيط مئوية بقيمة 72 % والتي مثلت ادنى نسبة مضادة لنمو الطفيليات والتي تعود لأقل تركيز مستخدم للمستخلص المائي لنبات الميرمية كما في الشكل (4-7) ، و بالمقارنة مع نسبة تثبيط مجموعة السيطرة السالبة Control-N.

جدول (4-4) تأثير السمية الخلوية للمستخلص المائي لنبات الميرمية على حيوية امامية السوط للطفيلي الأحشائي

النسبة المئوية للتثبيط (%)	Mean \pm SD	تراكيز المستخلص المائي لنبات الميرمية ($\mu\text{g/ml}$)
92	0.0269 \pm 0.0549 b	200
92.2	0.0280 \pm 0.0373 b	100
83	0.063 \pm 0.128 b	50
84	0.059 \pm 0.0146 b	25
84.3	0.0513 \pm 0.0109 b	12.5
72	0.111 \pm 0.226 b	6.25
0	0.322 \pm 0.657 a	Control
$(\chi^2) = 9.210$ **	*0.8391	LSD value
إذ * تمثل نسبة الاحتمالية ($P \leq 0.05$) ، بينما تمثل ** مستوى الاحتمالية ($P \leq 0.01$)		



شكل (4-7) النسبة المئوية لتثبيط نمو امامية السوط للطفيلي الأحشائي تحت تأثير التراكيز الستة للمستخلص المائي لنبات الميرمية .

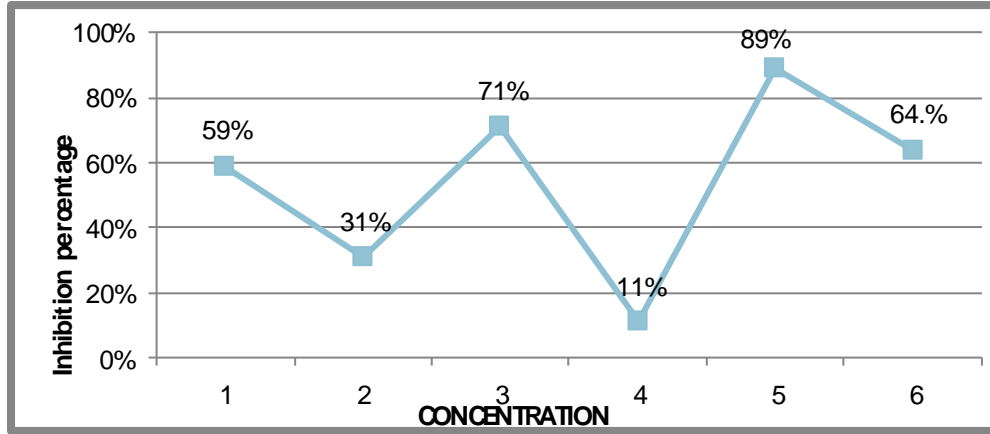
بالنظر للنتائج الواردة في الجدول اعلاه نلاحظ بأن المستخلص المائي لنبات الميرمية يمتلك فعالية لتثبيط النمو للحيوانات الأبتدائية، وهذا ما يتفق مع دراسة مقارنة عن تأثيرات المستخلص المائي المثبطة بالإضافة الى فعاليته الواعدة في سمية الخلايا (Afonso *et al.*, 2019) ومع الدراسة (Martins *et al.* (2015) فيما اختلفت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسة (Serakta *et al.* (2013) التي أجريت لتحري فاعلية المستخلص المائي لنبات الميرمية لتثبيط النمو الخلوي للخلايا اللشمانية، إذ أكد الباحث قابلية المستخلص المائي على التثبيط الكلي لنمو الخلايا الطفيلية .

فيما اظهرت نتائج فحص السمية الخلوية (اختبار MTT assay) لطفيلي اللشمانيا الإحشائية تحت تأثير المستحلب النباتي لنبات الميرمية، والذي حُضر منه ستة تراكيز وهي 6.25 – 12.5 – 25 – 50 – 100 – 200 $\mu\text{l/ml}$ كما في جدول (5-4) الموضح أدناه :

جدول (4-5) تأثير السمية الخلوية للمستحلب النباتي لنبات الميرمية على حيوية امامية السوط للطفيلي الأحشائي

النسبة المئوية للتثبيط (%)	Mean ± SD	تراكيز المستحلب النباتي لنبات الميرمية (µl/ml)
64	0.126 ± 0.259	200
89	0.033 ± 0.068	100
11	0.227 ± 0.464	50
71	0.113 ± 0.230	25
31	0.224 ± 0.457	12.5
59	0.081 ± 0.165	6.25
0	0.322 ± 0.657	Control
(χ^2)=6.635 **	0.9956*	LSD value
إذ *تمثل نسبة الاحتمالية (P≤0.05) ، بينما تمثل **مستوى الاحتمالية (P≤0.01)		

أعطت التراكيز الستة للمستحلب النباتي لنبات الميرمية نسباً مئوية كالأتي : حيث اظهر التركيز الثاني 100 µl/ml اعلى نسبة مئوية لتثبيط النمو الخلوي لأمامية السوط ، وكانت 0.89 % عند مستوى احتمالية P≤0.01 ، قيمة اقل فرق معنوي LSD عند مستوى احتمالية P≤0.05 ، ومن ثم جاء التركيز الرابع 25 µl/ml بالمرتبة الثانية من حيث قابليته على القتل الخلوي بنسبة مئوية بلغت 0.71 % ، ومما يجدر الإشارة اليه بأن التركيز الثالث والذي كان 50µl/ml كان قد اعطى اقل نسبة قابلية لقتل الخلايا الطفيلية وذلك بنسبة مئوية بلغت 0.11 % ثم تدرجت باقي التراكيز بالنسب المئوية ، اذ كانت النسبة المئوية للتركيز الأول هي 0.64 % ، بينما التركيز الخامس والذي هو 12.5 اعطى نسبة بلغت 0.31 % ، في حين ان التركيز السادس والأخير 6.25µl/ml اعطى نسبة مئوية بمقدار 0.59 % نتائج نسب التثبيط جرت بالمقارنة مع نسبة تثبيط مجموعة السيطرة السالبة Control-N كما في الشكل (4-8) التالي .



شكل (4-8) النسبة المئوية لتثبيط نمو امامية السوط للطفيلي الأحشائي تحت تأثير التراكيز الستة للمستحلب النباتي لنبات الميرمية

بالمقارنة مع النتائج الواردة في جدول (4-5) يتضح لنا القابلية المتفاوتة لمستحلب نبات الميرمية على تثبيط النمو الخلوي للطور امامي السوط للطفيلي وذلك تبعاً لتراكيزه التي تمت معاملة الخلايا الطفيلية بها ، وقد يعود السبب الى تركيب المستحلب الذي يتمكن من الوصول الى الخلية المستهدفة وذلك بالأعتماد على حجم جزيئات المحلول ، علماً ان استخدام مركبات المستحلبات النباتية تمثل تقنية دوائية جديدة لمعالجة الأمراض المتسببة بواسطة الحيوانات الأبتدائية ومنها طفيليات الشمانيا وقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة مقارنة أجريت لقياس تأثير المستحلبات النباتية على نمو الخلايا الطفيلية (Pund & Joshi, 2017).

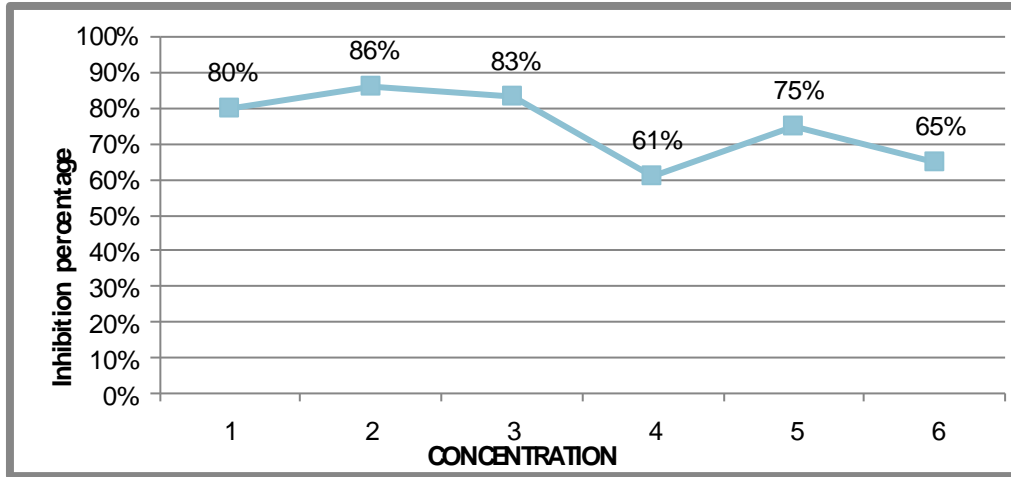
بينما اعطت تجارب المعاملة بالتراكيز الستة للزيت الأساسي الخام لنبات الميرمية نتائج مغايرة على ما هو عليه في المستخلص المائي والمستحلب للنبات ذاته على حدٍ سواء وكما موضح في جدول (4-6) أدناه :

جدول (6-4) تأثير السمية الخلوية للزيت الأساسي لنبات الميرمية على حيوية امامية السوط للطفيلي الأحشائي

النسبة المئوية للحيوية (%)	Mean ± SD	تراكيز الزيت الأساسي لنبات الميرمية (µl/ml)
65	0.123 ± 0.251	1000
75	0.082 ± 0.167	500
61	0.135 ± 0.276	250
83	0.054 ± 0.110	125
86	0,045 ± 0,093	62.5
80	0.073 ± 0.149	31.25
0	0,322 ± 0,657	Control
(χ^2)= 9.210**	0.7814*	LSD value
أذ * تمثل نسبة الاحتمالية (P≤0.05) ، بينما تمثل ** مستوى الاحتمالية (P≤0.01)		

اشارت النتائج التي ورد ذكرها أعلاه بأن للتراكيز الواطئة للزيت العطري قابلية اكثر على تثبيط النمو لخلايا الطفيلي الأحشائي على خلاف ما أظهرته نتائج اختبار السمية الخلوية MTT assay لأمامية السوط الطفيلية تحت تأثير التراكيز العليا للزيت العطري المتطاير لنبات الميرمية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.01$ ، قيمة اقل فرق معنوي LSD عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ ، ومن الجدير بالذكر ان تراكيز الزيت العطري للنبات قيد الدراسة كانت كما يلي 1000 – 500 – 250 – 125 – 62.5 – 31.25 µl/ml ، اذ اعطى التركيز الخامس ما قبل الأخير والذي هو 62.5µl/ml اعلى نسبة للقتل بلغت 86 %، وقد حل التركيز الرابع 125µl/ml بالمرتبة الثانية من حيث قابليته التثبيطية للنمو الخلوي بنسبة مئوية مقدارها 83 % ، اما المرتبة الثالثة فقد احتلها التركيز السادس 31.25µl/ml اذ اظهر نسبة تثبيط مئوية بلغت 80 % ، في حين

تدرجت التراكيز المتبقية مُعطيةً نسباً مئوية متراوحة بلغت قيمها 75 % ، 65 % ، 61 % للتراكيز ، 250µl/ml ، 500µl/ml ، 1000µl/ml على التوالي ، نتائج نسب التثبيط جرت بالمقارنة مع نسبة تثبيط مجموعة السيطرة السالبة Control-N وكما موضح في الشكل (9-4) .



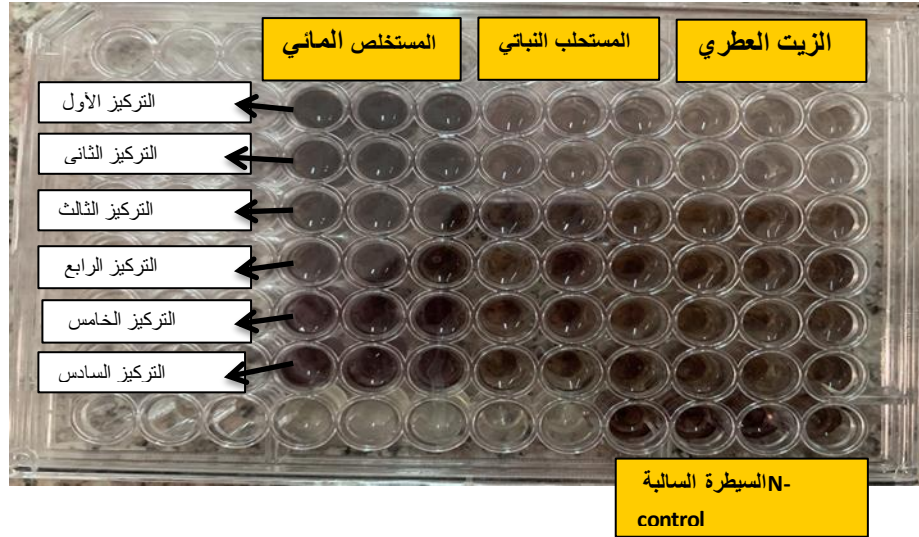
الشكل (9-4) النسبة المئوية لتثبيط نمو امامية السوط للطفيلي الأحشائي تحت تأثير التراكيز الستة للزيت العطري المتطاير لنبات الميرمية .

بينت النتائج الواردة في جدول (4-6) أن للزيت الأساسي المتطاير لنبات الميرمية فعالية عالية لتثبيط نمو الطور أمامي السوط للطفيلي ، لاسيما عند استخدامه في تراكيزه الواطئة دون العالية وقد يرتبط هذا بتركيب جدار الخلية الطفيلية وذلك نظراً لخصائصه التي تسهل عملية تحلل الخلايا ، وهذا ما يتفق مع الدراسة (Ultee *et al.* 2002 ، أما عن سبب عدم فعالية التراكيز العليا للزيت المتطاير فقد يعود السبب الى نشوء ردة فعل لغشاء الخلية الطفيلية ضد التراكيز العليا وبالتالي حالت دون إختراق الغشاء الخلوي ، فيما رجح أن يعود السبب إلى المركبات الفعالة التي يحتويها الزيت المتطاير والتي يمكن أن تتفاعل بشكل متباين مع أغشية الماييتوكونديريا لتوليد الجذور الحرة التي تؤكسد الجزيئات الكبيرة للطفيلي مما يؤدي إلى موته عن طريق موت الخلايا المبرمج وهذا ما اتفقت معه دراسة (Tariku *et al.* (2010) .

5-4 اختبار السمية الخلوية المضاد للشمانيا تحت تأثير مستخلصات نبات البردقوش Anti-leishmaniasis cytotoxicity test under the influence of *Origanum majorana* extract

أوضحت نتائج فحص السمية الخلوية بواسطة الأختبار اللوني MTT assay الذي أُجري لقياس القابلية السمية لمستخلصات نبات البردقوش بأطوارها الثلاث (المستخلص المائي ، المستحلب ، الزيت العطري الخام) على نمو الخلايا الطفيلية امامية السوط لطفي للشمانيا الحشوية، إذ أُجري هذا الإختبار في صفيحة مايكرو تيتير microtiter plate ذات 96 حفرة، إذ اظهر الفحص اختلافاً في الإمتصاص اللوني لصبغة MTT ، وذلك حسب كمية التركيز الذي تمت المعاملة به ، إذ استخدمت ستة تراكيز لكل طيف دوائي لنبات البردقوش وقد جرى تحضيرها بالإعتماد على عدة خطوات كما تم ذكره في جزء المواد وطرائق العمل .

التراكيز الستة للمستخلص المائي (المسحوق النباتي) لنبات البردقوش كانت كما يلي ، 25 ، 50 ، 100 ، 200 ، 6.25 ، 12.5 $\mu\text{g/ml}$ ، بينما حُضرت التراكيز الستة للمستحلب النباتي للنبات ذاته وكانت 25 ، 50 ، 100 ، 200 ، 6.25 ، 12.5 $\mu\text{g/ml}$ ، في حين تراكيز الزيت المتطاير لنبات البردقوش هي : 125 ، 250 ، 500 ، 1000 ، 31.25 ، 62.5 $\mu\text{g/ml}$ ، والشكل التالي يُظهر صفيحة المايكرو تيتير بعد ان تمت زراعتها بالمعلق الخلوي ، وحضنها لمدة 24 ساعة ، ومن ثم جرى معاملتها بالتراكيز المختلفة لأطياف المادة الدوائية ، لكل تركيز ثلاث مكررات ، وبعد مرور 4 ساعات تم اخراجها من الحاضنة المبردة وازافة صبغة MTT ومادة DMSO لكل حفرة بكميات محسوبة تم ذكرها في جزء المواد وطرائق العمل ، بعد ذلك تم الحصول على النتائج المطلوبة لإختبار السمية الخلوية بواسطة قراءات جهاز قارئ الإليزا.



الشكل (4-10) صفيحة المايكروتيتير ر بعد زراعتها بالمعلق الخلوي ومعاملتها بالتركيز المختلفة لأطياف المادة الدوائية لنبات البردقوش مع اضافة الصبغة لأجراء اختبار السمية الخلوية MTT assay

اظهرت نتائج اختبار السمية الخلوية Cytotoxicity للصفحة الخاصة بنبات البردقوش الموضحة في الشكل (4-10) وجود اختلافات نسبية في قابلية القتل الخلوي تحت تأثير المستخلصات الثلاث للنبات المعني ، ومن الجدير بالذكر ان حفر مجموعة السيطرة السالبة تمت زراعتها بأستخدام (معلق خلوي للطفيلي + media) فقط .

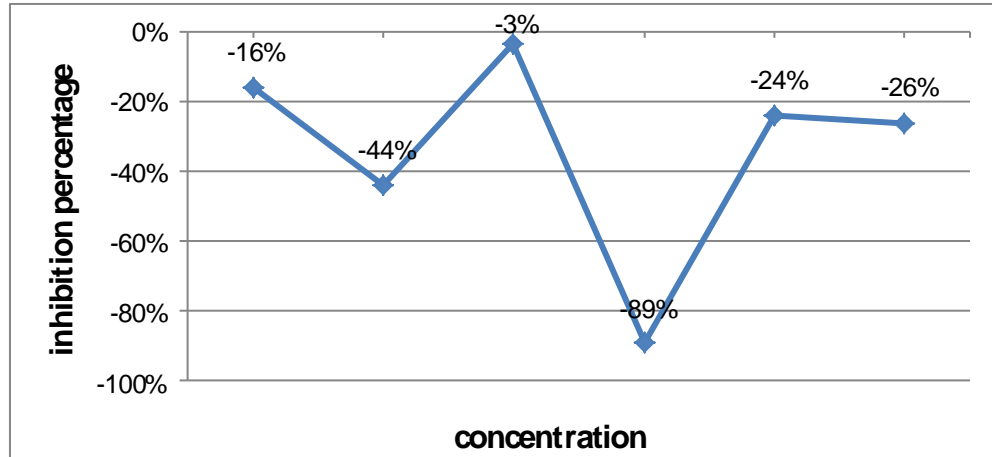
في حين احتوت الحفر المتبقية للصفحة ذاتها والتي تمت زراعتها على معلق خلوي ووسط زرعي مضاف اليها تركيز معين من التراكيز المختلفة لأطياف المادة الدوائية الثلاث المتمثلة بمستخلصات نبات البردقوش (مستخلص مائي ، ومستحلب نباتي ، زيت عطري خام) وكل مادة تختلف بتراكيزها المستخدمة في الأختبار اللوني MTT assay ، وايضاً أتبع الخطوات ذاتها التي تم اتباعها في اختبار السمية الخلوية الخاص بنبات الميرمية ، ولذلك تم حساب النسبة المئوية لصلاحية الخلايا تحت تأثير التركيز المعين للنوع الدوائي المعين لنبات البردقوش ، وقياس التأثيرات السمية للتركيز المختلفة لمستخلصات النبات المذكور في قابلية تثبيط نمو الخلايا الطفيلية، تم استخدام معادلة نسبة التثبيط التي ورد ذكرها في الفقرة (4-4) .

اشارت النتائج الموضحة في الجدول (7-4) الخاصة بأختبار السمية الخلوية للمستخلص المائي (المسحوق) لنبات البردقوش ، بأن هذا الطيف الدوائي ليس له تأثيراً مثبتاً لنمو امامية السوط الطفيلية ، تحت تأثير المعاملة بالتركيز الستة لنبات المذكور والتي كانت $200 - 100 - 50 - 25 - 12.5 - 6.25 \mu\text{g/ml}$ والتي تم تحضيرها مسبقاً وبالخطوات عينها التي حضرت بها تراكيز المستخلص المائي لنبات الميرمية في جزء المواد وطرائق العمل ، نتائج نسب التثبيط جرت بالمقارنة مع نسبة تثبيط مجموعة السيطرة السالبة Control-N.

جدول (7-4) تأثير السمية الخلوية للمستخلص المائي لنبات البردقوش على حيوية امامية السوط للطفيلي الأحشائي

النسبة المئوية للتثبيط %	Mean \pm SD	تراكيز المستخلص المائي لنبات البردقوش ($\mu\text{g/ml}$)
-26	Null	200
-24	0,0225 \pm 0,0458	100
-89	0,0115 \pm 0.0236	50
-44	0.0145 \pm 0.0298	25
-3	0,005 \pm 0.010	12.5
-16	0.011 \pm 0.023	6.25
0	0,152 \pm 0. 311	Control
$(\chi^2) = 9.210^{**}$	1.7997*	LSD value
إذ تمثل * $p \leq 0.05$ ، بينما تمثل ** مستوى احتمالية $p \leq 0.01$		

جرى استخدام معادلة نسبة التثبيط المئوية لقياس مدى قابلية تراكيز المستخلص المائي لنبات البردقوش على تثبيط نمو امامية السوط الطفيلية لطفيلي ، ومن خلال ذلك تم الحصول على النسب المئوية السالبة الموضحة في الشكل (4-11) ادناه :



الشكل (4-11) النسب المئوية السالبة لقابلية التثبيط الخلوي تحت تأثير التراكيز الستة للمستخلص المائي لنبات البردقوش

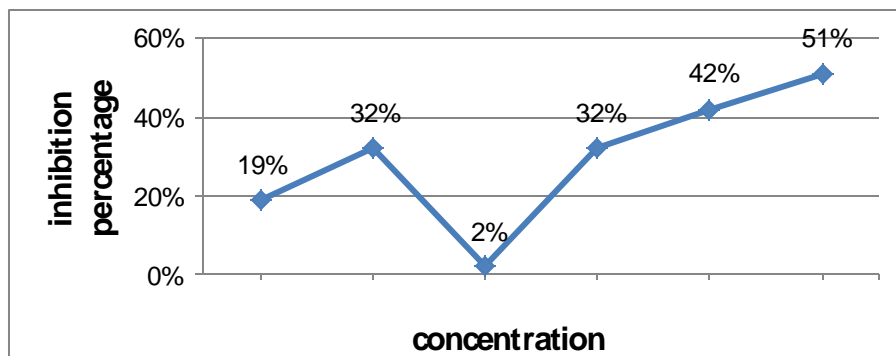
يتضح من نتائج جدول (4-7) الخاص بالنسب المئوية التثبيطية تحت تأثير المستخلص المائي لنبات البردقوش بأن التراكيز قيد الدراسة للنبات ذاته لا تمتلك القابلية على تثبيط النمو الخلوي لأمامية السوط الطفيلية وهذا ما اتفق مع دراسة مقارنة عن تأثير المستخلص المائي لنبات البردقوش على حيائية نوع من الحيوانات الإبتدائية (Kozłowska *et al.*, 2010) ، ولتفسير النتائج التي جاءت في الدراسة الحالية يمكننا القول بأن الخلية الطفيلية لربما تحتاج الى تراكيز أعلى من تلك التي أستخدمت في الدراسة الحالية لكي تُظهر نشاطاً تثبيطياً ، وقد يعود السبب الى التركيب الكيميائي للمستخلص النباتي وما يحتويه من مركبات تسببت برودة فعل من قبل غشاء الخلية الطفيلية وبالتالي منعت دخول المادة العلاجية الى داخل الخلية الطفيلية ومن ثم حالت دون تحللها فيما رجح ان تكون الخلية الطفيلية تحتاج مدة إجراء فحص السمية الخلوية أكثر من 24 ساعة لغرض الحصول على نتائج تثبيطية مرضية ، وهذا ما اتفقت معه دراسة مقارنة (Méabed *et al.* (2018) إذ أكد الباحث بأن الخلايا الطفيلية أظهرت نسبة قتل بعد انقضاء 72 ساعة .

اظهر المستحلب النباتي لنبات البردقوش قابلية اعلى لقتل الخلايا الطفيلية بأستخدام ستة تراكيز مختلفة تدرجت بنسبها ، حيث كانت كما يلي: 6.25 – 12.5 – 25 – 50 – 100 – 200 $\mu\text{l/ml}$ كما في جدول (4-8) الموضح أدناه :

جدول (8-4) النسب المئوية لتثبيط نمو امامية السوط الطفيلية تحت تأثير التراكيز الستة للمستحلب النباتي لنبات البردقوش

النسب المئوية التثبيطية للتراكيز %	Mean ± SD	تراكيز المستحلب النباتي (µl/ml)
51	0.0092 ± 0.0186	200
42	0.0133 ± 0.0272	100
32	0.0275 ± 0.0561	50
2	0.0417 ± 0.085	25
32	0.0158 ± 0.0323	12.5
19	0.0096 ± 0.0197	6.25
0	0.0152 ± 0.0311	Control
$(\chi^2) = 9.210^{**}$	0.9514*	LSD value
إذ تمثل * $p \leq 0.05$ ، بينما تمثل ** مستوى احتمالية $p \leq 0.01$		

يتبين من النتائج الواردة في الجدول أعلاه بأن أعلى تركيز والذي هو 200µl/ml قد أعطى أعلى نسبة مئوية لتثبيط نمو امامية السوط الطفيلية والتي بلغت 51 % ، بينما كان لتركيز 100µl/ml نسبة مئوية بمقدار 42 % ، في حين تساوى التركيزين 12.5µl/ml – 50 بنسب التثبيط للنمو الخلوي حيث اعطت نسبة مئوية بلغت 32 % ، وقد اظهرت التراكيز 6.25 µl/ml – 25 نسباً مئوية تثبيطية لنمو امامية السوط بلغت 19 % - 2 % على التوالي ، اقل فرق معنوي LSD عند مستوى احتمالية بقيمة $P \leq 0.05$ ، قيمة χ^2 عند مستوى احتمالية $P \leq 0.01$ ، نتائج نسب التثبيط جرت بالمقارنة مع نسبة تثبيط مجموعة السيطرة السالبة Control-N كما مبين في الشكل (4-12).



الشكل (4-12) النسب المئوية لقابلية التنشيط للنمو الخلوي تحت تأثير التراكيز الستة للمستحلب النباتي لنبات البردقوش *Origanum majorana*

يتبين مما ورد من نتائج ونسباً مئوية لتنشيط الخلايا الطفيلية تحت تأثير المستحلب النباتي لنبات البردقوش ، بأن المستحلب أظهر نشاطاً متفاوتاً لتنشيط النمو الخلوي لخلايا الطفيلي وهذا ما أتفقت معه دراسة (Kozłowska *et al.* 2010) ، في الدراسة الحالية أظهر المستحلب أعلى نسباً مئوية للتنشيط عند استخدامه بتراكيز عالية ، وقد يعود السبب إلى محتوى المستحلب من المركبات الفعالة التي تُظهر نشاطاً بايولوجياً ضد الكائنات وحيدة الخلية ، يتكون المستحلب من ماء وقطيرات من الزيت العطري الخام لنبات البردقوش مبعثرة ومنتشرة في الماء وبذلك تشكل نظاماً غروانياً فعالاً وهذا ما اتفقت معه دراسة مقارنة (Becerril *et al.* 2020) ، بالتالي يمكننا القول بأن فعالية المستحلب تعتمد على محتواه من المواد الفعالة .

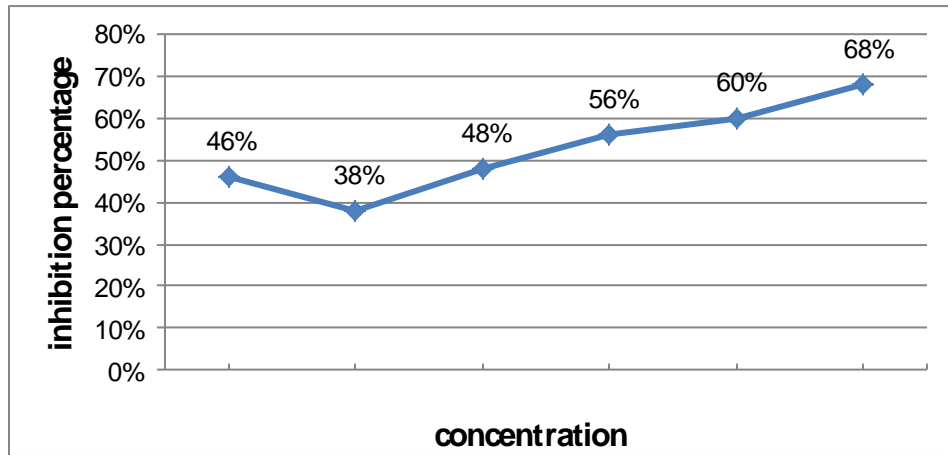
أظهرت نتائج عملية تثبيط نمو وحيوية امامية السوط الطفيلية للطفيلي الأحشائي تحت تأثير المعاملة بالتراكيز الستة للزيت العطري المتطاير لنبات البردقوش والتي كانت 1000 – 500 – 250 – 125 – 62.5 – 31.25 $\mu\text{l/ml}$ بالتدرج من الأعلى الى الأدنى وكما موضحة في جدول (4-9) أدناه :

الجدول (4-9) النسب المئوية لتنشيط نمو امامية السوط الطفيلية تحت تأثير التراكيز الستة للزيت الأساسي لنبات البردقوش

النسب المئوية لتنشيط النمو الخلوي الطفيلي %	Mean ± SD	تراكيز الزيت الأساسي لنبات البردقوش (µl/ml)
68	0.0065 ± 0,0132	1000
60	0.016 ± 0.032	500
56	0.0163 ± 0.033	250
48	0.0039 ± 0.008	125
38	0.0075 ± 0.0153	62.5
46	0.007 ± 0.0142	31.25
0	0.0152 ± 0.0311	Control
(χ^2) = 9.210**	0.0996*	LSD value
إذ تمثل * p ≤ 0.05 ، بينما تمثل ** مستوى احتمالية p ≤ 0.01		

جاءت النتائج موضحة بأن أعلى تركيز من الزيت العطري الخام والذي كان 1000µl/ml قد أعطى أعلى نسبة تنشيط للنمو الخلوي بقيمة مئوية بلغت 68 % ، بينما اظهر التركيز الثاني للزيت الأساسي والذي كان 500µl/ml نسبة مئوية تنشيطية بلغت 60 % ، اما التركيز 250µl/ml فقد اعطى نسبة بلغت 56 % وهي ثالث اعلى نسبة مئوية للقتل الخلوي لخلايا الطفيلي الأحشائي ، اما التركيز الرابع 125µl/ml فقد أظهرت قابلية اقل لتنشيط نمو وحيوية امامية السوط وذلك بنسبة مئوية بلغت 48 % ، في حين اعطى التركيزين الأخيرين 62.5 – 31.25µl/ml نسباً مئوية بلغت 46 % ، 38 % على التوالي ، قيمة اقل فرق معنوي LSD عند مستوى احتمالية P ≤ 0.05 ، قيمة χ^2 عند مستوى احتمالية P ≤ 0.01 ، علماً ان نتائج نسب التنشيط جرت بالمقارنة مع نسبة تنشيط مجموعة السيطرة السالبة Control-N

بأستخدام برنامج الأكلسل Excel Word 2010 ، ومعادلة نسبة التثبيط المئوية تم حساب النسب المئوية للقتل الخلوي لأمامية السوط الطفيلية للطفيلي الأحشائي وكما موضح في الشكل (4-13) ادناه :



الشكل (4-13) النسب المئوية لقابلية التثبيط للنمو الخلوي تحت تأثير التراكيز الستة للزيت الأساسي المتطاير لنبات البردقوش

تفسيراً لما ورد من نتائج في جدول (4-9) يُلاحظ بأن الزيت العطري لنبات البردقوش أثبت فعاليته في تثبيط نمو خلايا أمامية السوط الطفيلية، وهذا ما اتفق مع دراسة مقارنة (Kozłowska *et al.* (2010) إذ أكد الباحث بأن الزيت العطري المستخلص من نبات البردقوش يمتلك نشاطاً بايولوجياً لقتل الخلايا الطفيلية، وفي دراسة (Silva & Domingues. (2017 أشار فيها الباحث الى نشاط الزيت العطري المضاد للحيوانات الأبتدائية، إذ أكد بأن هذه الفعالية للزيت ناتجة بشكل أساسي عن تركيبها الكاره للماء الذي يمكنها من الانقسام بداخل الطبقة الدهنية لأغشية الخلايا الطفيلية والمائتوكونديريا ، مما يزيد من نفاذيتها وبالتالي يؤدي الى تسرب المادة الفعالة الى داخل التركيب الخلوي متسببة بتحلل الخلايا وموتها ، وبالحديث عن أعلى نسبة مئوية لتثبيط النمو الخلوي يتبين بأن التركيز الأعلى للزيت المتطاير كان قد أعطى اعلى نسبة تثبيطية، وقد رجح ان يعود السبب الى محتوى الزيت العطري المتطاير من المركبات الفعالة، إذ يُعد من مضادات الأكسدة القوية المتضمنة مركبات الفينول بما في ذلك الفلافونويد والأحماض الفينولية والمركبات المتطايرة التي تكون ذات فعالية قوية على جدران الكائنات أحادية الخلية، وهذا ما اتفقت معه الدراسة (El-Ghorab *et al.* (2004).

جرى عمل مقارنة لقياس الفعالية التثبيطية للنباتين (الميرمية، والبردقوش) على القتل الخلوي للخلايا الطفيلية الحشوية باستخدام برنامج التحليل الإحصائي SAS 2012. Statistical Analysis System، قيمة اقل فرق معنوي $P \leq 0.05$ LSD، وعند مستوى احتمالية $P \leq 01$ ، والجدول أدناه يوضح نتائج المقارنة بين المادتين الدوائيتين اللتين تمت المعاملة بهما لكل طيف دوائي من النبات الواحد.

جدول (4 - 10) تأثير مستخلصات الميرمية والبردقوش على نسبة تثبيط الخلايا الطفيلية

نوع المستخلص	نسبة التثبيط لنبات الميرمية	نسبة التثبيط لنبات البردقوش
مستخلص مائي	0.310	1.750
مستحلب	0.850	0.584
زيت طيار	0.507	0.393
LSD	0.2356	0.3551
مستوى المعنوية	0.05	0.05

الفصل السادس
الإستنتاجات و التوصيات
Conclusions
and
Recommendations

الاستنتاجات Conclusions :

- 1 - إمكانية استخدام المستخلصات النباتية للنباتين قيد الدراسة لاسيما الزيوت الطيارة كعلاج بديل لمضادات اللشمانيا الحشوية بدليل التأثير التثبيطي لهما على نمو وايض الطور امامية السوط للطفيلي .
- 2 - لم يُظهر المستخلص المائي لنبات البردقوش أي نشاطا فعالا في مكافحة اللشمانيا الحشوية بالتراكيز قيد الدراسة الحالية .
- 3- من خلال فحص السمية الخلوية بالطور امامي السوط للطفيلي تحت تأثير المعاملة بالمستخلصات النباتية والزيوت الخام لنباتي الميرمية والبردقوش تبين ان النباتين يمتلكان الفعالية التثبيطية المضادة لنمو الخلايا الطفيلية وبنسب متفاوتة .
- 4 - نبات الميرمية بشكل عام يمتلك القدرة الأعلى لتثبيط النمو الخلوي للخلايا الطفيلية خارج جسم الكائن الحي *in vitro*.

التوصيات : Recommendations

- 1- الكشف المبكر للأصابة باللشمانيا الحشوية ، قد تمكن الأطباء المختصين من السيطرة على العدوى وبالتالي الحد من انتشاره والمحافظة على سلامة المواطنين .
- 2- استخدام المكونات النشطة بيولوجياً لنبات الميرمية والبردقوش لمكافحة نمو خلايا الطفيلي بطوره الأمامي السوط خارج جسم الكائن الحي .
- 3- دراسة تأثير المستخلصات النباتية لنبات الميرمية على غشاء الخلية الطفيلية لمعرفة العوامل المؤدية الى موت خلايا الطفيلي إذ يمكن أن يشكل هذا المسار وسيلة جيدة لإنتاج علاجاً فعالاً ضد داء اللشمانيا الحشوية في المستقبل البعيد .
- 4- اختبار تأثير الزيوت العطرية الخام للنباتين قيد الدراسة الحالية على الأنواع الأخرى للطفيلي على سبيل المثال اللشمانيا المدارية *L.tropica* ، أو اللشمانيا الكبرى *L.major* .
- 5- فحص التأثير السمي للزيوت الخام المتطايرة لنباتي الميرمية والبردقوش داخل جسم الكائن الحي باستخدام حيوانات مختبرية مثل الجرذان أو الأرانب .

المصادر

References

- Abdullah, M. S. & Alqaisi, A. Q. I. (2022). Evaluating the *in vitro* anti-Leishmanial activity of essential oil extracted from *Cymbopogon Citratus* against *Leishmania Donovanii*. *Iraqi Journal of Science*, 1453–1463.
- Abe, Y.; Sasaki, H.; Osaki, T.; Kamiya, K.; Kawano, R.; Miki, N. & Takeuchi, S. (2012). Rapid and accurate IC50 determination using logarithmic concentration generator. *16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS*, 956–958.
- Abubakar, I. I.; Tillmann, T.; & Banerjee, A. (2015). Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 385(9963), 117–171.
- Abuzaid, A. A., Aldahan, M. A., Al Helal, M. A., Assiri, A. M., & Alzahrani, M. H. (2020). Visceral leishmaniasis in Saudi Arabia: From hundreds of cases to zero. *Acta Tropica*, 212, 105707.
- Adams, M., Gmünder, F., & Hamburger, M. (2007). Plants traditionally used in age related brain disorders—A survey of ethnobotanical literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(3), 363–381
- Afonso, A. F., Pereira, O. R., Fernandes, Â., Calhelha, R. C., Silva, A. M. S., Ferreira, I. C. F. R., & Cardoso, S. M. (2019). Phytochemical composition and bioactive effects of *Salvia africana*, *Salvia officinalis* 'Icterina' and *Salvia mexicana* aqueous extracts. *Molecules*, 24(23), 4323 - 4327.
- Al-Ani, Z. R., Al-Hamwandi, A. M. H., Al-Ma'aeni, A. A. S., & Al-Ta'aie, M. K. (2012). Kala-azar in Al-Anbar Governorate, Western Iraq. *Anb Med J*, 10(1), 41–49.
- Al-Hayali, S. K., Salman, A. M., & Al-Janabi, A. H. (2021). High sensitivity balloon-like interferometric optical fiber humidity sensor based on tuning

gold nanoparticles coating thickness. *Measurement*, 170, 108703.

Al-Hussaini, R. M. A., Al-Tufaili, R. N., & Hussein, R. A. (2017). Molecular Study of Pediatric Visceral Leishmaniasis in Mid-Euphrates Area, Iraq. *Inter. J. Sci. Engineer. Res*, 8(8), 148–152.

Al-Shamahy, H. A. (1998). Seroprevalence of kala-azar among humans and dogs in Yemen. *Annals of Saudi Medicine*, 18(1), 66–68.

Alam, M. S., Ghosh, D., Khan, M. G. M., Islam, M. F., Mondal, D., Itoh, M., Islam, M. N., & Haque, R. (2011). Survey of domestic cattle for anti-*Leishmania* antibodies and *Leishmania* DNA in a visceral leishmaniasis endemic area of Bangladesh. *BMC Veterinary Research*, 7(1), 1–7.

Albuquerque, P. L. M. M., Silva Júnior, G. B. da, Freire, C. C. F., Oliveira, S. B. de C., Almeida, D. M., Silva, H. F. da, Cavalcante, M. do S., & Sousa, A. de Q. (2009). Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 26, 330–333.

Alexander, J. (1978). Unusual axonemal doublet arrangements in the flagellum of *Leishmania* amastigotes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(4), 345–347.

Alkaisi, S. J. H., Najim, W. A. S., Alqaisi, L. J. H., & Jawad, R. T. (2015). Validity of dipstick rapid test in the diagnosis of visceral leishmaniasis in two hospitals in Baghdad city during two years (0-0). *Middle East Journal of Family Medicine*, 7(10), 4.

Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M. den, & Team, W. H. O. L. C. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*, 7(5), e35671.

- Alvar, J., Yactayo, S., & Bern, C. (2006). Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, 22(12), 552–557.
- Andrade, M. A., Azevedo, C. dos S., Motta, F. N., Santos, M. L. dos, Silva, C. L., Santana, J. M. de, & Bastos, I. (2016). Essential oils: *in vitro* activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1–8.
- Ashford, R. W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1269–1281.
- Badiee, P., Nasirzadeh, A. R., & Motaffaf, M. (2012). Comparison of *Salvia officinalis* L. essential oil and antifungal agents against *candida* species. *J. Pharm. Technol. Drug Res*, 1(7).
- Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M., Cubria, J. C., & Ordóñez, D. (1998). The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology: The Vascular System*, 30(4), 435–443.
- Banuls, A.-L., Hide, M., & Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 64, 1–458.
- Bay, A., Aktekin, E. H., Ekşi, F., & Özcan, M. (2018). Kala-Azar ve lösemi: Nadir birliktelik. *Türk Pediatri Arşivi*, 53(1), 45–47
- Becerril, R., Nerín, C., & Silva, F. (2020). Encapsulation systems antimicrobial food packaging components: An update. *Molecules*, 25(5), 1134.
- Berman, J. D. (1988). Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(3), 560–586.

- Berman, J. D., Badaro, R., Thakur, C. P., Wasunna, K. M., Behbehani, K., Davidson, R., Kuzoe, F., Pang, L., Weerasuriya, K., & Bryceson, A. D. (1998). Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*, 76(1), 25.
- Bhatia, S., & Goli, D. (2016). *Leishmaniasis: Biology, Control and New Approaches for Its Treatment*. Apple Academic Press.
- Boelaert, M., Bhattacharya, S., Chappuis, F., El Safi, S. H., Hailu, A., Mondal, D., Rijal, S., Sundar, S., Wasunna, M., & Peeling, R. W. (2007). Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), S31–S39.
- Boité, M. C., Mauricio, I. L., Miles, M. A., & Cupolillo, E. (2012). New insight on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania* (Viannia) parasites based on multilocus sequence analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), e1888.
- Bora, D. (1999). Epidemiology of visceral leishmaniasis in India. *National Medical Journal of India*, 12, 62–68.
- Bouyahya, A., Chamkhi, I., Benali, T., Guaouguaou, F.-E., Balahbib, A., El Omari, N., Taha, D., Belmehdi, O., Ghokhan, Z., & El Menyiy, N. (2021). Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of *Origanum majorana* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113318.

- Capek, P., & Hříbalová, V. (2004). Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. possessing immunomodulatory activity. *Phytochemistry*, 65(13), 1983–1992.
- Cassiday, L. (2014). Emulsions: making oil and water mix. *International News on Fats, Oils and Related Materials*, 25(4), 200–208.
- Cavalcante, Í. J. M., & Vale, M. R. (2014). Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Ceará in the period 2007 to 2011. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 17, 911–924.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J., & Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), 873–882.
- Collin, S., Davidson, R., Ritmeijer, K., Keus, K., Melaku, Y., Kipngetich, S., & Davies, C. (2004). Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clinical Infectious Diseases*, 38(5), 612–619.
- Committee, E. (2010). *Control of the Leishmaniases. WHO Technical Report Series 949*. World Health Organization Geneva, Switzerland.
- Cota, G. F., de Sousa, M. R., de Freitas Nogueira, B. M., Gomes, L. I., Oliveira, E., Assis, T. S. M., de Mendonça, A. L. P., Pinto, B. F., Saliba, J. W., & Rabello, A. (2013). Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(3), 561-570.
- Craft, J. D., Satyal, P., & Setzer, W. N. (2017). The chemotaxonomy of common sage (*Salvia officinalis*) based on the volatile constituents.

Medicines, 4(3), 44- 47.

- Croft, S. L., & Coombs, G. H. (2003). Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, 19(11), 502–508.
- Cunningham, D. D. (1885). On the presence of peculiar organisms in the tissue culture of a specimen of Delhi boil. *Scientific Memoirs by Medical Officers of the Army of India*, 1, 21–31.
- Andrea, L. A. Z., Camargo-Neves, V. L. F., Sampaio, S. M. P., Kronka, S. N., & Sartor, I. F. (2009). American visceral leishmaniasis: disease control strategies in dracen microregion in alta paulista, SP, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 15(2), 305–324.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2576–2581.2576–2581.
- Dagley, M. J., Saunders, E. C., Simpson, K. J., & McConville, M. J. (2015). High-content assay for measuring intracellular growth of *Leishmania* in human macrophages. *Assay and Drug Development Technologies*, 13(7), 389–401.
- de Paiva-Cavalcanti, M., de Morais, R. C. S., Pessoa-e-Silva, R., Trajano-Silva, L. A. M., Goncalves-de-Albuquerque, S. da C., Tavares, D. de H. C., Brelaz-de-Castro, M. C. A., & Pereira, V. R. A. (2015). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools.

Cell & Bioscience, 5(1), 1–10.

De Ruiter, C. M., Van Der Veer, C., Leeflang, M. M. G., Deborggraeve, S., Lucas, C., & Adams, E. R. (2014). Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(9), 3147–3155.

Debrabant, A., Joshi, M. B., Pimenta, P. F. P., & Dwyer, D. M. (2004). Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. *International Journal for Parasitology*, 34(2), 205–217.

Desjeux, P. (1996). Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, 14(5), 417–423.

Dondji, B., Duhlińska, D. D., & Same-Ekobo, A. (2000). Species composition of the phlebotomine sandfly fauna (Diptera: Phlebotominae) in Mokolo region, Northern Cameroon. *International Journal of Tropical Insect Science*, 20(3), 221–226.

Donovan, C. (1994). On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903.

Dostálová, A., & Volf, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, 5(1), 1–12.

Edrissian, G. H., Rokni, M. B., Mohebbali, M., Nateghpour, M., Mowlavi, G., & Bahadori, M. (2016). *History of medical parasitology and parasitic infections in Iran*.

El-Ghorab, A. H., Mansour, A. F., & El-massry, K. F. (2004). Effect of extraction methods on the chemical composition and antioxidant activity of Egyptian marjoram (*Majorana hortensis* Moench). *Flavour and Fragrance*

Journal, 19(1), 54–61.

Elmahallawy, E. K., Martínez, A. S., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Mari, J. M. N., & Fernández, J. G. (2014). Diagnosis of leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(08), 961–972.

Elnaiem, D. A., Elnahas, A. M., & Aboud, M. A. (1999). Protective efficacy of lambda-cyhalothrin-impregnated bednets against *Phlebotomus orientalis*, the vector of visceral leishmaniasis in Sudan. *Medical and Veterinary Entomology*, 13(3), 310–314.

Europe, C. of. (1997). Methods of pharmacognosy. *European Pharmacopoeia*, 3, 121–122.

Ezzeddine, N. B. H.-B., Abdelkefi, M. M., Aissa, R. Ben, & Chaabouni, M. M. (2001). Antibacterial screening of *Origanum majorana* L. oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 13(4), 295–297.

Feliciangeli, M. D., Rodriguez, N., De Guglielmo, Z., & Rodriguez, A. (1999). The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. Vectors and parasites. *Parasite*, 6(2), 113–120.

Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(6), 494–504.

Fleisher, A., & Sneer, N. (1982). Oregano spices and *Origanum* chemotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(5), 441–446.

Fukutani, K. F., Figueiredo, V., Celes, F. S., Cristal, J. R., Barral, A., Barral-Netto, M., & de Oliveira, C. I. (2014). Serological survey of *Leishmania*

infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 1–8.

Garcia, C. S. C., Menti, C., Lambert, A. P. F., Barcellos, T., Moura, S., Calloni, C., Branco, C. S., Salvador, M., Roesch-Ely, M., & Henriques, J. A. P. (2016). Pharmacological perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): antioxidant, and antitumor in mammalian cells. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 88, 281–292.

Georgiadou, S. P., Makaritsis, K. P., & Dalekos, G. N. (2015). Leishmaniasis revisited: current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of Translational Internal Medicine*, 3(2), 43–50.

Ghorbani, A., & Esmailizadeh, M. (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(4), 433–440.

Grela, E., Kozłowska, J., & Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. *Acta Histochemica*, 120(4), 303–311.

Hakkour, M., Hmamouch, A., Mahmoud El Alem, M., Bouyahya, A., Balahbib, A., El Khazraji, A., Fellah, H., Sadak, A., & Sebti, F. (2020). Risk factors associated with leishmaniasis in the most affected provinces by *leishmania infantum* in Morocco. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2020.

Harhay, M. O., Olliaro, P. L., Costa, D. L., & Costa, C. H. N. (2011). Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology*, 27(9), 403–409.

Hatam, G. R., Hosseini, S. M. H., & Ardehali, S. (1997). Dermotropic isolates of *Leishmania infantum* in Iran. *Transactions of the Royal Society of*

Tropical Medicine and Hygiene, 91(4), 440.

Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.-Y., Mohammed, H., & Hamdi, M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3), 242–251.

Hernández-Pérez, M., López-García, R. E., Rabanal, R. M., Darías, V., & Arias, A. (1994). Antimicrobial activity of *Visnea mocanera* leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 41(1–2), 115–119.

Hernández-Saavedra, D., Pérez-Ramírez, I. F., Ramos-Gómez, M., Mendoza-Díaz, S., Loarca-Pina, G., & Reynoso-Camacho, R. (2016). Phytochemical characterization and effect of *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum*, and *Salvia officinalis* infusions on obesity-associated cardiovascular risk. *Medicinal Chemistry Research*, 25(1), 163–172.

Herwaldt, B. L., & Magill, A. J. (2013). Leishmaniasis, visceral. *CDC Health Information for International Travel 2014: The Yellow Book*, 224.

Hojjat, H. (2015). *Interaction Between Peroxin 14 and Peroxin 5 in Leishmania donovani: A Pivotal Step in Glycosomal Biogenesis*. McGill University (Canada).

Horwitz, W.; Chichilo, P. & Reynolds, H. (1970). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*.

Hotez, P. J.; Molyneux, D. H.; Fenwick, A.; Ottesen, E.; Ehrlich Sachs, S. & Sachs, J. D. (2006). Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria: a comprehensive pro-poor health policy and strategy for the developing

world. *PLoS Medicine*, 3(5), e102.

Iqbal, J., Hira, P. R., Saroj, G., Philip, R., Al-Ali, F., Madda, P. J., & Sher, A. (2002). Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 475–479.

Jun, W. J., Han, B. K., Yu, K. W., Kim, M. S., Chang, I. S., Kim, H. Y., & Cho, H. Y. (2001). Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. *Food Chemistry*, 75(4), 439–444.

Kalter, D. C. (1994). Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis. *Dermatologic Clinics*, 12(1), 37–50.

Kaye, P. M., Svensson, M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., Zubairi, S., & Engwerda, C. R. (2004). The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunological Reviews*, 201(1), 239–253.

Kevric, I.; Cappel, M. A.; & Keeling, J. H. (2015). New world and old world *Leishmania* infections: a practical review. *Dermatologic Clinics*, 33(3), 579–593.

Khalil, R. & Li, Z.-G. (2011). Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. *African Journal of Biotechnology*, 10(42), 8397–8402.

Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, 4(1), 1–24.

Kongkaew, W.; Siriarayaporn, P.; Leelayoova, S.; Supparatpinyo, K.; Areechokchai, D.; Duang-ngern, P.; Chanachai, K.; Sukmee, T.; Samung, Y. & Sridurongkathum, P. (2007). Autochthonous visceral leishmaniasis: a report of a second case in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical*

Medicine and Public Health, 38(1), 8.

Kozłowska, M., Laudy, A. E., Starościak, B. J., Napiórkowski, A., Chomicz, L., & Kazimierczuk, Z. (2010). Antimicrobial and antiprotozoal effect of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 9(4), 133–141.

Kumar, A. (2013). *Leishmania and leishmaniasis*, 1-978.

Lainson, R.; Shaw, J. J.; Souza, A. A. A.; Silveira, F. T.; & Falqueto, A. (1992). Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae), the sandfly vector of *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 87(3), 437–439.

Länger, R.; Mechtler, C.; & Jurenitsch, J. (1996). Composition of the essential oils of commercial samples of *Salvia officinalis* L. and *S. fruticosa* Miller: A comparison of oils obtained by extraction and steam distillation. *Phytochemical Analysis*, 7(6), 289–293.

Lukeš, J.; Mauricio, I. L.; Schönian, G.; Dujardin, J.-C.; Soteriadou, K.; Dedet, J.-P.; Kuhls, K.; Tintaya, K. W. Q.; Jirků, M. & Chocholová, E. (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(22), 9375–9380.

Mahajan, R. C.; & Mohan, K. (1996). Epidemiology of visceral leishmaniasis and its control. *Parasitology for the 21st Century*. Oxon, UK: Cab International, 41–49.

Majeed, B.; Sobel, J.; Nawar, A.; Badri, S.; & Muslim, H. (2013). The persisting burden of visceral leishmaniasis in Iraq: data of the National Surveillance System, 1990–2009. *Epidemiology & Infection*, 141(2), 443–446.

- Malla, N., & Mahajan, R. C. (2006). Pathophysiology of visceral leishmaniasis- some recent concepts. *Indian Journal of Medical Research*, 123(3), 267.
- Mans, D. R.; Kent, A. D.; Hu, R. & Schallig, H. (2017). Epidemiological, biological and clinical aspects of leishmaniasis with special emphasis on Busi Yasi in Suriname. *Journal of Clinical and Experimental Dermatology Research*, 8(02), 388.
- Manson-Bahr, P. E. C. (1996). Old World leishmaniasis. *The Wellcome Trust Illustrated History of Tropical Diseases.*, 206–217.
- Martins, N.; Barros, L.; Santos-Buelga, C.; Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 170, 378–385.
- Méabed, E. M. H., El-Sayed, N. M., Abou-Sreya, A. I. B., & Roby, M. H. H. (2018). Chemical analysis of aqueous extracts of *Origanum majorana* and *Foeniculum vulgare* and their efficacy on *Blastocystis* spp. cysts. *Phytomedicine*, 43, 158–163.
- Meerlo, J. Van, Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer cell culture* (pp. 237–245). Springer.
- World Health Organization . Meeting, E. C. on the C. of the L., & Organization, W. H. (2010). *Control of the Leishmaniases: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010* (Issue 949). World Health Organization.
- Miao, R., Wang, Z., Guo, Q., Wen, Y., Liao, Q., Zhu, Y., Shu, M., & Wan, C. (2017). Clinical and Epidemiologic Features of Visceral Leishmaniasis in

Children in Southwestern China. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(1), 9–12.

Millán, J.; Ferroglio, E.; & Solano-Gallego, L. (2014). Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitology Research*, 113(6), 2005–2014.

Minowada, J.; Ohnuma, T.; & Moore, G. E. (1972). Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *Journal of the National Cancer Institute*, 49(3), 891–895.

Miura, K.; Kikuzaki, H.; & Nakatani, N. (2001). Apianane terpenoids from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 58(8), 1171–1175.

Mniouil, M.; Fellah, H.; Amarir, F.; Et-Touys, A.; Bekhti, K.; Adlaoui, E. B.; Bakri, Y.; Nhammi, H.; Sadak, A.; & Sebti, F. (2017). Epidemiological characteristics of visceral leishmaniasis in Morocco (1990–2014): an update. *Acta Tropica*, 170, 169–177.

Mohebbali, M. (2013). Visceral leishmaniasis in Iran: review of the epidemiological and clinical features. *Iranian Journal of Parasitology*, 8(3), 348.

Organisation mondiale de la Santé, O., & Organization, W. H. (2016). Index, Volume 91, 2016, Nos. 1–52. *Weekly Epidemiological Record= Relevé Épidémiologique Hebdomadaire*, 91(51/52), 601–604.

Moody, A. H., & Chiodini, P. L. (2000). Methods for the detection of blood parasites. *Clinical & Laboratory Haematology*, 22(4), 189–201.

Moore, E. M., & Lockwood, D. N. (2010). Treatment of visceral leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 151.

- Moreno, G., Rioux, J. A., Lanotte, G., Pratlong, F., & Serres, E. (1986). Le complexe *Leishmania donovani* s.l Analyse enzymatique et traitement numérique. Individualisation du complexe *Leishmania infantum*. Corollaires biogéographiques et phylétiques. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveau Monde. *Leishmania: Taxonomie Phylogenese*, 105–118.
- Morsy, T. A.; Rifaat, M. M.; & al Dakhil, M. A. (1995). The seasonal and daily activities of *Phlebotomus papatasi* in Riyadh, Saudi Arabia. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 25(3), 699–711.
- Mosala , F. (2019). Étude prospective sur les parasites gastro-intestinaux des ovins et la santé publique à Abuzi. *Revue Marocaine Des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 7(2).
- Motazedian, M.; Fakhar, M.; Motazedian, M. H., Hatam, G.; & Mikaeili, F. (2008). A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60(2), 151–154.
- Mottram, J. (2008). Protocols for handling and working with *Leishmania* species. Mottram Laboratory, 2–31.
- Müller-Wille, S.; & Reeds, K. (2007). A translation of Carl Linnaeus's introduction to *Genera plantarum* (1737). *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 38(3), 563–572.
- Murray, H. W. (2002). Kala-azar—progress against a neglected disease. In *New England Journal of Medicine*(1793–1794). Mass Medical Soc.
- Murray, H. W.; Berman, J. D.; Davies, C. R.; & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, 366(9496), 1561–1577.

- Myles, O., Wortmann, G. W., Cummings, J. F., Barthel, R. V., Patel, S., Crum-Cianflone, N. F., Negin, N. S., Weina, P. J., Ockenhouse, C. F., & Joyce, D. J. (2007). Visceral leishmaniasis: clinical observations in 4 US army soldiers deployed to Afghanistan or Iraq, 2002-2004. *Archives of Internal Medicine*, 167(17), 1899–1901.
- Naufal Spir, P. R., Prestes-Carneiro, L. E., Fonseca, E. S., Dayse, A., Giuffrida, R., & D’Andrea, L. A. Z. (2017). Clinical characteristics and spatial distribution of visceral leishmaniasis in children in São Paulo state: an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. *Pathogens and Global Health*, 111(2), 91–97.
- Noyes, H. A., Reyburn, H., Bailey, J. W., & Smith, D. (1998). A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(10), 2877–2881.
- World. H. Organization (1984). *The leishmaniases: report of a WHO expert committee [meeting held in Geneva from 10 to 16 November 1982]*. World Health Organization.
- World. H. Organization (2008). *The global burden of disease: 2004 update*. World Health Organization.
- Paiva, V. C. F., & Careta, F. P. (2019). Comparison of the growth of promastigotes cellular lineages of *Leishmania amazonensis* by the sequential adaptation of Schneider’s insect for RPMI 1640 medium culture. *Scientific Electronic Archives*, 12(6), 62–68.
- Paniker, C. K. J. (2007). *Textbook of medical parasitology*. (Issue Ed. 6). Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.

- Pedro, D. F. N., Ramos, A. A., Lima, C. F., Baltazar, F., & Pereira-Wilson, C. (2016). Colon cancer chemoprevention by sage tea drinking: decreased DNA damage and cell proliferation. *Phytotherapy Research*, 30(2), 298–305.
- Perry, E. K., Pickering, A. T., Wang, W. W., Houghton, P. J., & Perry, N. S. L. (1999). Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(5), 527–534.
- Petrela, R., Kuneshka, L., Foto, E., Zavalani, F., & Gradoni, L. (2010). Pediatric visceral leishmaniasis in Albania: a retrospective analysis of 1,210 consecutive hospitalized patients (1995–2009). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(9), e814.
- Pimple, B. P., Patel, A. N., Kadam, P. V, & Patil, M. J. (2012). Microscopic evaluation and physicochemical analysis of *Origanum majorana* Linn leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, S897–S903.
- Poinar Jr, G., & Poinar, R. (2004). *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist*, 155(3), 305–310.
- Postigo, J. A. R. (2010). Leishmaniasis in the world health organization eastern mediterranean region. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, S62–S65.
- Prakash Singh, O., Singh, B., Chakravarty, J., & Sundar, S. (2016). Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. *Infectious Diseases of Poverty*, 5(02), 1–15.
- Pund, S., & Joshi, A. (2017). Nanoarchitectures for neglected tropical protozoal diseases: challenges and state of the art. *Nano-and Microscale Drug Delivery Systems*, 439–480.

- Kumar, RA Bumb, N. A. (2007). Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Bikaner, India: parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(5), 896–901.
- Rahi, A. A., Ali, M. A., Valian, H. K., Mohebbali, M., & Khamesipour, A. (2013). Seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis in Iraq. *Sch. J. App. Med. Sci*, 1(6), 985–989.
- Raina, A. P.; & Negi, K. S. (2012). Essential oil composition of *Origanum majorana* and *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* growing in India. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(6), 1015–1017.
- Raouf, G. F. A.; & Mohamed, A. W. L. (2020). Exploring the antiparasitic activity OF medicinal plants. *Pharmaceutical Research*, 5(4), 67–71.
- Rassam, M. B.; & Al-Mudhaffar, S. A. (1979). The primary isolation of *Leishmania donovani* from Iraq on different culture media. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 73(4), 345–347.
- Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance*, 15(10), 19505.
- Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, 58, 227–250.
- Ready, P. D. (2014). *Epidemiology of visceral leishmaniasis*. *Clin Epidemiol* 6: 147–154.
- Rebollar-Téllez, E. A., Tun-Ku, E., Manrique-Saide, P. C., & Andrade-Narvaez, F. J. (2005). Relative abundances of sandfly species (Diptera: Phlebotominae) in two villages in the same area of Campeche, in southern Mexico. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 99(2), 193–201.

- Rios, J. L., Recio, M. C., & Villar, A. (1987). Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. *Journal of Ethnopharmacology*, 21(2), 139–152.
- Rittig, M. G., & Bogdan, C. (2000). Leishmania–host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology Today*, 16(7), 292–297.
- Rodríguez, N.; Guzman, B.; Rodas, A.; Takiff, H.; Bloom, B. R. & Convit, J. (1994). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(9), 2246–2252.
- Rogers, ME.; Chance, ML. and Ates, P. (2002) . T. role of, The, promastigote secretory gel in the origin and transmission of, *Lutzomyia*, infective stage of *L. mexicana* by the sandfly, & Longipalpis. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124(5), 495–507.
- Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania species* in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), 251–262.
- Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Delfino, S., Cardile, V.,

- Rosselli, S.; & Bruno, M. (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 42–47.
- Sacks, D., & Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 453–483.
- Sakkas, H., Gartzonika, C., & Levidiotou, S. (2016). Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Journal of Vector Borne Diseases*, 53(1), 8.
- Sakru, N., Korkmaz, M., Ozbel, Y., Ertabaklar, H., Sengul, M., & Ozensoy Toz, S. (2007). Investigation of asymptomatic visceral leishmaniasis cases using western blot in an endemic area in Turkey. *The New Microbiologica*, 30(1), 13.
- Salam, N., Al-Shaqha, W. M., & Azzi, A. (2014). Leishmaniasis in the Middle East: incidence and epidemiology. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10), e3208.
- Salotra, P., Sreenivas, G., Pogue, G. P., Lee, N., Nakhasi, H. L., Ramesh, V., & Negi, N. S. (2001). Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(3), 849–854.
- Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2021). Leishmaniasis: where are we and where are we heading? *Parasitology Research*, 120(5), 1541–1554.
- Savoia, D. (2015). Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(06), 588–596.

- Schnur, L. F. (1989). On the clinical manifestations and parasites of old world leishmaniasis and *Leishmania tropica* causing visceral leishmaniasis. In *Leishmaniasis* (pp. 939–943). Springer.
- Schönian, G., Mauricio, I., & Cupolillo, E. (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*?. *Trends in parasitology*, 26(10), 466-469.
- Schuster, F. L., & Sullivan, J. J. (2002). Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 374–389.
- Serakta, M., Djerrou, Z., Mansour-Djaalab, H., Kahlouche-Riachi, F., Hamimed, S., Trifa, W., Belkhiri, A., Edikra, N., & Pacha, Y. H. (2013). Antileishmanial activity of some plants growing in Algeria: *Juglans regia*, *Lawsonia inermis* and *Salvia officinalis*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(3), 427–430.
- Silva, F., & Domingues, F. C. (2017). Antimicrobial activity of coriander oil and its effectiveness as food preservative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(1), 35–47.
- Singh, S. (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, 123(3), 311.
- Singh, S., Dey, A., & Sivakumar, R. (2005). Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 251–265.
- Singh, S. K., Bimal, S., Narayan, S., Jee, C., Bimal, D., Das, P., & Bimal, R. (2011). *Leishmania donovani*: assessment of leishmanicidal effects of herbal extracts obtained from plants in the visceral leishmaniasis endemic area of Bihar, India. *Experimental Parasitology*, 127(2), 552–558.
- Singla, P., & Vasudeva, N. (2014). Pharmacognostical and quality control

parameters of *Origanum majorana* Linn. *Stem and Root. World J Pharm Pharm Sci*, 3(6), 1428–1437.

Sivaramakrishnaiah, K., & Ramanatham, R. (1967). Studies on the effect of climate on leishmaniasis in India. *Indian Journal of Medical Research*, 55(11), 1159–1172.

Srividya, G., Kulshrestha, A., Singh, R., & Salotra, P. (2012). Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitology Research*, 110(3), 1065–1078.

Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 10(1), 1–10.

Sundar, S., More, D. K., Singh, M. K., Singh, V. P., Sharma, S., Makharia, A., Kumar, P. C. K., & Murray, H. W. (2000). Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clinical Infectious Diseases*, 31(4), 1104–1107.

Sundar, S., & Rai, M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 9(5), 951–958.

Sundar, S., & Singh, A. (2016). Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(3–4), 98–109.

Sundar, S., & Singh, B. (2018). Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 22(6), 467–486.

Sundar S, R. M. L. diagnosis of visceral leishmaniasis. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 9(5), 951–958.

Suttinont, P., Thammanichanont, C., & Chantarakul, N. (1987). Visceral

leishmaniasis: a case report. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 18(1), 103–106.

Sylvester, P. W. (2011). Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. In *Drug Design and Discovery* (pp. 157–168). Springer.

Tariku, Y., Hymete, A., Hailu, A., & Rohloff, J. (2010). Essential-oil composition, antileishmanial, and toxicity study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja punctata* ssp. *punctata* from Ethiopia. *Chemistry & Biodiversity*, 7(4), 1009–1018.

Thakur, C. P., Singh, R. K., Hassan, S. M., Kumar, R., Narain, S., & Kumar, A. (1999). Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(3), 319–323.

Thisyakorn, U.; Jongwutiwes, S.; Vanichsetakul, P. & Lertsapcharoen, P. (1999). Visceral leishmaniasis: the first indigenous case report in Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(1), 23–24.

Ultee, A., Bennik, M. H. J.; & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561–1568.

Vannier-Santos, M. A., Martiny, A., & Souza, W. de. (2002). Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4), 297–318.

Vasudeva, N. (2015). *Origanum majorana L.-Phyto-pharmacological review.*

Veličković, D. T., Randelović, N. V, Ristić, M. S., Veličković, A. S., & Šmelcerović, A. A. (2003). Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis L.* *Journal of the Serbian Chemical Society*, 68(1), 17–24.

- Volf, P., Hajmova, M., Sadlova, J., & Votypka, J. (2004). Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International Journal for Parasitology*, 34(11), 1221–1227.
- Wang, M., Kikuzaki, H., Zhu, N., Sang, S., Nakatani, N., & Ho, C.-T. (2000). Isolation and structural elucidation of two new glycosides from sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 235–238.
- Wichtl, M. (2004). Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis. (Issue Ed. 3). Medpharm GmbH Scientific Publishers.
- Yaseen, F. T., & Ali, H. Z. (2016). Using of Species-Specific Primers for Molecular Diagnosis of in Vitro Promastigotes of *Leishmania donovani*. *Iraqi Journal of Science*, 57(2A), 824–829.
- Youssef, A., Harfouch, R., El Zein, S., Alshehabi, Z., Shaaban, R., & Kanj, S. S. (2019). Visceral and cutaneous Leishmaniasis in a City in Syria and the effects of the Syrian conflict. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(1), 108.
- Zare, H. (2019). Effects of *salvia officinalis* extract on the breast cancer cell line. *SciMedicine Journal*, 1(1), 25–29.
- Zargari, A. (1997). *Medicinal plants*. Tehran University of Medical Sciences.
- Zijlstra, E. E., & El-Hassan, A. M. (2001). Leishmaniasis in Sudan. 3. Visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(Supplement_1), S27–S58.
- Zink, A. R., Spigelman, M., Schraut, B., Greenblatt, C. L., Nerlich, A. G., &

Donoghue, H. D. (2006). Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper nubia. *Emerging Infectious Diseases*, 12(10), 1616.

- . . Zhao SQ, Li Z, Zhang Q, et al. A. of epidemiologic features of vis ceral leishmaniasis in different age groups in C. from 2005 to 2012., 2012., C. J. I. D. 2014;32:492–495 A. of epidemiologic features of vis ceral leishmaniasis in different age groups in C. from 2005 to, 2012., C. J. I. D. 2014;32:492–495 A. of epidemiologic features of vis ceral leishmaniasis in different age groups in C. from 2005 to, & 2014;32:492–495, C. J. I. D. (2017). Clinical and Epidemiologic Features of Visceral Leishmaniasis in Children in Southwestern China. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(1), 9–12.

الملاحق

Appendixes

ملحق رقم /
قائمة بيانات المرضى

الإسم :

العمر:

الجنس :

مكان الإقامة :

تاريخ الجمع (أشهر الإصابة) :

الملاحظات :

Summary

Visceral leishmaniasis is one of the problems facing infected patients in general and children in particular. Therefore, this study included identifying the spread of visceral leishmaniasis. The survey study was conducted in the hospitals of Karbala governorate, which included Al-Hussein Medical Hospital, Al-Hindia Hospital, Al-Hussainiya Hospital, Ain Al-Tamr Hospital, Children's Specialist Hospital, Which was conducted for the period from January 2021 to June of the same year, and after diagnosing cases by specialized doctors and among 252 patients who underwent examination, it was confirmed that 17 of them had visceral leishmaniasis, distributed among the governorate's hospitals, and the current study reviewed the data of the age group and gender. The areas of spread according to the geographical area and the months of infection.

As the results proved that the highest rates of infection were in the months of, April and with percentages of 0.4% respectively, with an average general rate for the months of infection amounted to 3.52%, and that The highest injuries according to the geographical area were recorded in the Children's Specialized Hospital affiliated to the center sector of the Karbala governorate with a percentage of 8.24% with a general average rate of total injuries for the areas covered by the research 6.74%, and it was noted that the highest percentage of injuries according to the age factor amounted to 7.14% and this percentage It is for the age group limited between 9-5 years, and the results showed that male children were affected by the disease more than females, with an average general rate of 1.25%.

The cytotoxicity assay (MTT assay) was used to detect the effect of treatment with plant extracts and volatile oils of sage and marjoram on the life of the parasitic flagella Promastigots, First, 3 drug spectra were used for each plant, represented by aqueous extracts, a plant emulsion, in addition to the volatile essential oil. Second, a series of

dilutions was conducted to make six concentrations for each drug spectra of the plants under study, The concentrations of aqueous extracts are 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/ml}$, and the same concentrations were used for the plant emulsions, while the concentrations of the essential oils of the two plants were as follows 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 $\mu\text{l/ml}$.

The results of the cytotoxicity examination under the influence of treatment with plant extracts and essential oils of the two plants under study showed that the two highest concentrations of aqueous extract of sagebrush 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ had given the highest percentage of cellular growth inhibition with a value of 92%, 92.2%, While the aqueous extract of marjoram did not show any toxic effects on the parasitic cells, while the second concentration 100 $\mu\text{l/ml}$ of sage plant emulsion showed the highest inhibitory percentage amounted to 89%, and the first concentration of marjoram emulsion gave the highest percentage of inhibition that reached 52%, as for the essential oils of the two plants, the fifth concentration 62.5 $\mu\text{l/ml}$ of sagebrush oil gave the highest percentage 86%, while the first concentration of the essential oil of marjoram was 1000 $\mu\text{l/ml}$ The highest percentage was 68%.



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

**Study of the effect of aqueous extract, plant emulsion and
volatile oil of *Saliva officinalis* and *marjoram* on the life of the
visceral Leishmania parasite *Leishmania donovani***

in vitro

A thesis Submitted

**To the Council of the College of Education for Pure Sciences / University of Karbala, which is
part of the requirements for obtaining a master's degree in life sciences / zoology**

written by:

Hala Talib Abd Ali Al-Taie

**Bachelor's degree, College of Education for Pure Sciences / University of Karbala - Biology
2018**

Supervised by:

Ass. Prof.Dr. Hanan Zwair Mukhlif

second supervision:

Ass. Prof.Dr. Yaroub Mudar Al-Qazwini

Muharram / 1444 AH

August /2022 AD

