تأثير المستخلصات المائية لنباتي الدفلى *Nerium oleander* والسبحبح *Melia azedarach* على محتوى الاحماض النووية في طفيليات المشعرات المهبلية *Trichomonas vaginalis* خارج الجسم الحي ♦

رنا سهيل عبد الله وحسين إسماعيل آرتين
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل

ABSTRACT

This study was conducted to elucidate the effect of aqueous leaf extract of *Nerium oleander* and fruit extract of *Melia azedarach* on nucleic acids content and activity of some enzymes in *Trichomonas vaginalis* which growth in Diamond's medium tryptone, yeast and maltose (TYM) media.

Results indicated that the exposure of *T. vaginalis* to IC50 concentration of *N. oleander* leaves and *M. azedarach* fruits extracts showed asignificant decrease in DNA content by 31.5% and 38.2%, respectively, while the RNA content decreased by 28.3% and 50.7%, respectively. Furthermore the total nucleic acids content decreased by 27.9% and 48.1% , respectively, compared with the untreated trichomonads with plant extracts after 72 hours of growth.

The results of this study also indicated that *T. vaginalis* treated with *N. oleander* leaves and *M. azedarach* fruits extracts showed inhibed in the activity of thymidine phosphorylase enzyme at rate 32.7% and 69.2% respectively compared with untreated trichomonads with plant extracts after 72 hours of growth.

From the results of this study, it is obvious that the above mentioned extracts possess an inhibitory effect on nucleic acids and on the activity of the enzyme Thymidine phosphorylase.

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4-5 أيلول 2007

الملخص

تناولت هذه الدراسة بيان تاثير مستخلصات المائية لاوراق نبات الدفلى *Nerium oleander* وثمار نبات السبحبح *Melia azedarach* على محتوى الاحماض النووية وبعض الانزيمات في المشعرات المهبلية *Trichomonas vaginalis* النامية في وسط دايموند (TYM).

اظهرت النتائج أن معاملة طفيليات المشعرات المهبلية بتركيز IC50 من مستخلصات أوراق الدفلى وثمار السبحبح أدى الى حدوث إنخفاض معنوي في كمية الـ DNA بنسبة 31.5% و38.2%، على التوالي، وإنخفاض معنوي في كمية الـ RNA بنسبة 28.3% و50.7%، على التوالي، أما كمية الاحماض النووية الكلية فقد إنخفضت بنسبة 27.9% و48.1%، على التوالي، مقارنة مع السيطرة بعد 72 ساعة من النمو .

كما بينت هذه الدراسة أن الطفيليات المعاملة بتركيز IC50 من مستخلصات أوراق الدفلى وثمار السبحبح أظهرت تثبيطاً في فعالية أنزيم الثايميدين فوسفوريليز Thymidine phosphorylase (TP) بنسبة 32.7% و 69.2%، على التوالي، مقارنة بالسيطرة بعد مرور 72 ساعة من النمو.

يتضح من نتائج الدراسة الحالية وجود تاثير تثبيطي للمستخلصات المائية لنباتي الدفلى والسبحبح على محتوى الاحماض النووية وعلى فعالية انزيم ثايمدين فسفوروليز.

المقدمة

طفيليات المشعرات المهبلية *Trichomonas vaginalis* إبتدائيات مسوطة تسبب التهاب القناة البولية التناسلية Urogenital tract لكلا الجنسين. ونظراً لأحتواء سطح خلية المشعرة Trichomonad cell على البروتينات والبروتينات السكرية فانها تلعب دوراً مهماً في الالتصاق Adhesion بالخلايا الطلائية والتي بدورها تعد خطوة ضرورية في إمراضية الطفيلي (1). وتكون إصابة الذكور عادة بدون أعراض سريرية Asymptomatic وقد تسبب إلتهاب البروستات Prostatitis وإلتهاب الأحليل Urethritis مع وجود أو عدم وجود إفرازات قيحية Purulent secretions وتسبب أيضا إلتهاب البربخ Epididymitis وكذلك تصيب الخصى Testes (2) .

أما في الاناث فان هذه الطفيليات تستوطن المهبل وتسبب التهاب المهبل Vaginitis وعنق الرحم Cervix وقد تصيب الفرج Vulua كما قد تتواجد في الغدد الملحقة للمهبل كغدد باروثولين Partholin glands وغدد سكيني Skene glands (3).

ويعد الانسان المضيف الطبيعي لهذه الطفيليات التي تسبب داء المشعرات وهو من الأمراض المنتقلة جنسيا Sexually transmitted diseases (STDs) وتكون هذه الاصابة شائعة جداً في الولايات المتحدة الامريكية اذ بلغت الاحصائيات الحديثة كمعدل للامراض المنتقلة جنسيا 7.4 مليون حالة سنوياً (4).

إن المعلومات المتوفرة عن الكيمياء الحيوية للأبتدائيات الطفيلية قليلة ومبعثرة ، ويعود ذلك لأسباب عديدة من أهمها أن الأبتدائيات كائنات يصعب التعامل معها ولايمكن الحصول على كميات كبيرة غير ملوثة للعديد من أنواعها فضلاً عن أن عدداً من أنواعها لاتنمو خارج مضائفها وإن هذه العوامل لاتؤثر على دراسة العلاقة بين الطفيلي والمضيف فحسب ، وإنما تجعل البحوث على الأبتدائيات صعبة جداً ومازالت هناك حاجة لعدة دراسات حيوية لغرض كشف النقاب عن المسارات الحيوية وأسلوب عملها لذلك فان هذه الدراسات تزود المحاولات المستقبلية بمعلومات أساسية لإيجاد علاج دوائي جذري (5).

استخدم العديد من الباحثين المستخلصات النباتية للحد من نمو الطفيليات المرضية ومنها طفيليات المشعرات المهبلية ، فعلى سبيل المثال فقد استخدم الخان (6) المستخلصات المائية لنباتي الشفلح *Capparis spinosa* والحنظل *Citrulus colocythin* التي اظهرت فعالية تثبيطية في نمو طفيليات المشعرات المهبلية *Trichomonas vaginalis* وبلغ مقدار الجرعة النصف القاتلة لهما 1.5 ملغم/سم^3 ، 4.25 ملغم/سم^3 على التوالي . وفي دراسة اخرى قام بها كل من الحيالي ورحيمو (7) اللذان بينا التأثير التثبيطي لنباتات الآس *Myrtus communis* والبنفسج *Viola odorta* والجوز *Juglan regia* والختمية *Althaea rosea* في نمو طفيلي المشعرات المهبلية. فقد كان نبات البنفسج الاكثر فعالية ضد هذه الطفيليات. كما ان المستخلصات المائية لنباتي الثوم *Allium sativum* والنعناع *Mentha spicata* ثبطت نمو المشعرات المهبلية وبتراكيز (0.25 ، 0.5 ، 1)% ولكلا النباتين وكان التركيز 1% لنبات الثوم الذي ثبط الطفيليات وخلال فترة 24 ساعة من النمو أما نبات النعناع بعد 96 ساعة من النمو عند نفس التركيز (8).

لذلك تهدف الدراسة الحالية الى البحث عن مزيد من النباتات والتي يمكن أن يكون لها تأثير تثبيطي ضد طفيليات المشعرات المهبلية خارج الجسم الحي وقد شملت هذه الدراسة بيان تأثير المستخلصات المائية لأوراق نبات الدفلى *Nerium oleander* وثمار نبات السبحبح *Melia azedarach* على أيض الاحماض النووية لهذه الطفيليات خارج الجسم الحي لعلاج داء المشعرات ، على أمل إيجاد مثبطات نباتية جديدة تقضي على المشعرات المهبلية وتكافئ في فعاليتها عمل الأدوية الصيدلانية الكيميائية بأقل عدد من التأثيرات الجانبية .

المواد وطرائق العمل

الكائنات المستخدمة

تم الحصول على طفيليات المشعرات المهبلية من المريضات المراجعات لعدد من المستشفيات التابعة لمدينة الموصل فضلاً عن العيادات الاهلية لطبيبات في إختصاص النسائية والتوليد. جمعت العينات من النساء اللاتي يعانين من أعراض المرض كألتهاب المهبل Vaginitis والحكة Itching والحرقة Burning وبإستخدام مسبار طبي معقم Sterile speculum بدون مادة مطهرة أو مزلقَة Lubricant لتجنب التأثيرات التثبيطية للطفيليات. أخذت المسحات من جدران المهبل أومن القبو الخلفي لعنق الرحم Posterier fonrix of cervix بواسطة مسحة قطن معقمة والتي دورت قبل سحبها ثم غمست هذه المسحة في أنابيب أختبار معقمة حاوية على 2 سم^3 من المحلول الفسلجي (9).

الوسط المستخدم لتنمية الطفيليات

تمت تنمية طفيليات المشعرات المهبلية في وسط دايموند Diamond's medium Tryptone, yeast, maltose (TYM) (10) ، ولقحت الطفيليات بإضافة 1 سم^3 من المزرعة الموجبة بعمر 3 أيام أي خلال الطور اللوغاريتمي وبعدد أولي 1×10^5 خلية/سم^3 في العبوات البلاستيكية المعقمة الحاوية على 28 سم^3 من الوسط الزرعي الجديد المضاف اليه 1 سم^3 من مستخلص نبات الدفلى وبتركيز (IC50) 2 ملغم/ سم^3 ونبات السبحبح 1.75 ملغم/ سم^3 (11) وحضرت المستخلصات النباتية وهيأت التراكيز حسب طريقة Riose *et al* (12).

حساب عدد الطفيليات

تم حساب عدد المشعرات المهبلية في المزرعة كل (24-48-72) ساعة باستخدام شريحة عد كريات الدم الحمراء Heamocytometer من نوع Neubaeur ، وتم أخذ 0.9 سم^3 من المزرعة التي يراد حساب عدد الطفيليات فيها وأضيف اليها 0.1 سم^3 من محلول الفورمالين 40% أي ما يعادل قطرة واحدة لغرض تثبيت الطفيليات في أثناء العد وتمت عملية التعداد بإستخدام المجهر الضوئي تحت قوة تكبير 40x وبذلك تم الحصول على عدد المشعرات المهبلية لكل 1 سم^3 من المزرعة.

النباتات المستخدمة

نبات الدفلى	*Nerium oleander*
نبات السبحبح	*Melia azedarach*

تم إختبار الاوراق الفتية لنبات الدفلى ،والثمار غير الناضجة لنبات السبحبح (الثمار الغير الناضجة تكون غنية بالمركبات الفعالة) لإختبار تأثيرهما كلاً على حدا والمقارنة بين تلك التأثيرات على أيض طفيليات المشعرات المهبلية علماً أن النباتين جمعا في الفترة نفسها في شهر آب من عام 2004 . بعد أن جمعت الاجزاء النباتية المستخدمة في البحث ، أزيلت عنها الاتربة والاوساخ العالقة بها ومن ثم أجري لها تعقيم أولي بغمرها بمحلول القاصر المخفف بنسبة 1% لمدة دقيقة واحدة ، وبعد ذلك جففت طبيعياً Normal drying بعيداً عن ضوء الشمس لمدة 4-5 أيام وحفظت في مغلفات ورقية لحين إستخدامها في تحضير المستخلصات المائية .

تحضير مستخلص الخلايا

حصدت خلايا المشعرات المهبلية عند الطور اللوغاريتمي للنمو وعلقت الخلايا المترسبة التي تكون ذات لون مائل للابيض بمحلول الــ PBS وبعدد نهائي 1×10^7 خلية/سم^3 من الــ PBS ثم حطمت الخلايا باستخدام جهاز الترددات الفوق الصوتية. فصل الرائق عن الراسب بإستخدام جهاز النبذ المركزي الفوقي المبرد بسرعة 10000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق. وتم إهمال الراسب والاحتفاظ بالراشح في قناني محكمة السد في درجة حرارة منخفضة تصل إلى $-10\ C^{o}$ (11).

تقدير كمية الاحماض النووية الكلية

تم إستخلاص وقياس ما يحويه مستخلص المشعرات المعاملة وغير المعاملة بالمستخلصات المائية من الاحماض النووية لبيان مدى تأثير المستخلصات على كمية الاحماض النووية حسب طريقة Schneide (13)، وقدرت كمية الحامض النووي الدي اوكسي رايبوزي DNA حسب الطريقة الانفة الذكر بالاعتماد على كاشف الداي فينايل امين والحامض النووي الريبوزي RNA على الكاشف الاورسينول.

قياس فعالية أنزيم الثايميدين فوسفوريليز

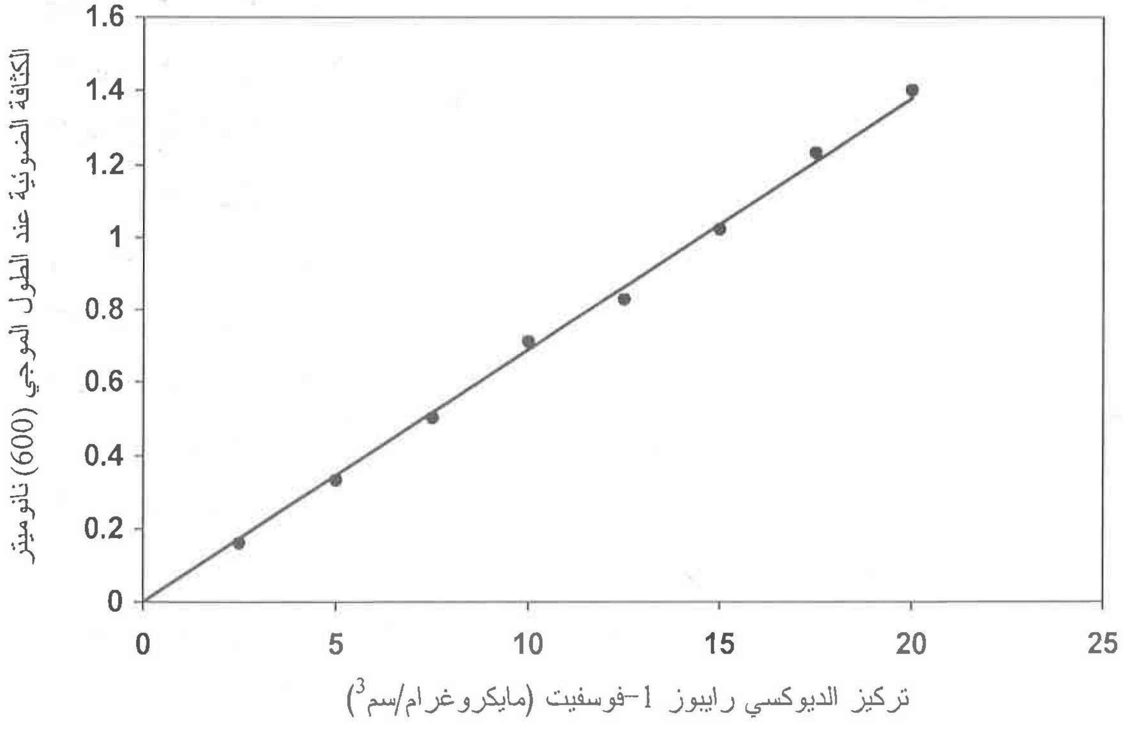
قدّرت فعالية أنزيم TP بالاعتماد على قياس أحد نواتج التفاعل وهو سكر الديوكسي رايبوز1- فوسفيت ، باستخدام طريقة الامين ثنائي الفينول (14) .

يتكون خليط التفاعل الموجود في المحلول المنظم(ملي مولار10 buffer Tris – HCL) ذو دالة حامضية 7.2 من ثايميدين 10 ملي مولار، وفوسفيت لاعضوي KH2PO4 10 ملي مولار، ومادة EDTA أثيلين ثنائي الامين ثلاثي حامض الخليك 1 ملي مولار مع كمية محددة من المستخلص الخام وبحجم نهائي 3 سم^3 في معظم التجارب ، كان حجم محلول التفاعل هو 1.4 - 1.6 سم^3 مضافاً اليه 0.4 - 0.6 سم^3 من المستخلص وحضن خليط

التفاعل بعد ذلك بدرجة 37 ْم ثم أخذ 0.4 سم^3 من المزيج وعلى فترات منتظمة وأضيف له 1 سم^3 من حامض البيروكلوريك 0.5N Perchlorie acid PCA في حمام ثلجي ، وبعد الفصل بجهاز النبذ المركزي المنضدي بسرعة 1000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق وأخذ 1 سم^3 من الرائق وأضيف له 2 سم^3 من كاشف الامين ثنائي الفينول (حضر كاشف الامين ثنائي الفينول بإذابة 3 غم من الكاشف في المحلول المكون من 200 سم^3 من حامض الخليك الثلجي ، و3 سم^3 من حامض الكبريتيك المركز، و1 سم^3 من المحلول المائي الاستيايل الديهايد 0.2% V:V ثم ترك المزيج في الظلام لمدة 12 ساعة في درجة حرارة الغرفة ، وبعد إكتمال التفاعل حددت الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 600 نانوميتر .

– فوسفيت الناتج ، بالمقارنة مع المنحني القياسي 1تم حساب تركيز الديوكسي رايبوز لهذه المادة كما في الشكل (1) .

الشكل (1) المنحني القياسي لتقدير كمية الديوكسي رايبوز 1–فوسفيت .



النتائج والمناقشة

تأثير مستخلصات أوراق الدفلى وثمار السبحبح على محتوى الأحماض النووية الكلية

يشير الجدول 1 الى ان تركيز الـ IC50 من مستخلص أوراق الدفلى وثمار السبحبح أدى إلى انخفاض في كمية الـ DNA والـ RNA وكمية الأحماض النووية الكلية للمشعرات المعاملة مقارنة بالمشعرات غير المعاملة (السيطرة) خلال 72 ساعة من النمو بمقدار 31.5% و28.3% و27.9% ، على التوالي ، عند استخدام مستخلص الدفلى و38.2% و50.7% و48.1% ، على التوالي ، عند استخدام مستخلص السبحبح ، وقد أظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $p < 0.05$ بين كمية الأحماض النووية الكلية للمشعرات المعاملة وغير المعاملة (السيطرة) .

الجدول 1 تأثير تراكيز الـ IC50 لمستخلصات اوراق الدفلى *N. oleander* وثمار السبحبح *M. azedarach* على كمية الاحماض النووية الكلية لطفيليات المشعرات المهبلية *T. vaginalis* عند الطور اللوغاريتمي 72 ساعة.

المعاملة	تركيز (IC50) ملغم/سم^3	كمية الـ DNA (مايكروغرام/سم^3) المعدل* ± الانحراف القياسي	النسبة المئوية للتغير		كمية الـRNA (مايكروغرام/سم^3) المعدل* ± الانحراف القياسي	النسبة المئوية للتغير		كمية الاحماض النووية الكلية (مايكروغرام/سم^3) المعدل* ± الانحراف القياسي	النسبة المئوية للتغير	
			الزيادة	النقصان		الزيادة	النقصان		الزيادة	النقصان
السيطرة	---	3 ± 34 a	---	---	4 ± 128.3 a	---	---	1.2 ± 162.3 a	---	---
أوراق الدفلى	2	1.5 ± 23.3 b	---	31.5	7.2 ± 92 b	---	28.3	10.1 ± 117 b	---	27.9
ثمار السبحبح	1.75	2 ± 21 b	---	38.2	6.1 ± 63.3 c	---	50.7	7.6 ± 84.3 c	---	48.1

*الرقم يمثل المعدل لثلاثة مكررات ± الانحراف القياسي .

الحروف الانكليزية المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية اما الحروف المتشابهة والمشتركة فتدل على عدم وجود فروقات معنوية بحسب اختبار دنكن عند مستوى معنوية $P<0.05$.

جاءت نتيجة الانخفاض في كمية الأحماض النووية مشابهة لما أشار إليه النعمان والجلبي (15) من ان المستخلصات المائية والكحولية لأوراق الزعتر *Thymus vulgaris* وفصوص الثوم *A. sativum* وبذور الحبة السوداء *Nigella sativa* وأوراق الآس *M.*

communis أدت الى إنخفاض في كمية الـ DNA والـ RNA في عدد من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام، فضلاً عن ما جاء به الخان (16) الذي أشار إلى ان استخدام مستخلصي الشفلح والحنظل لهما تأثيرا متفاوتا في نسبة التثبيط عند تركيز الـ IC50 على كمية الأحماض النووية الكلية إذ بلغت 26.5% و 36.4% على التوالي وكانت نسبة التثبيط لمستخلص الشفلح على الـ DNA 13.1% والـ RNA 31.8% مقارنة بـ 20% للـ DNA و43.2% للـ RNA لمستخلص الحنظل لطفيليات اللشمانيا الجلدية *L. major* ، ومتفقة مع التأثير المضاد لدواء الكلوروبرمازين على كمية الـ DNA والـ RNA والأحماض النووية الكلية لأمامية السوط لطفيليات اللشمانيا عند تركيز الـ IC50 بعد 96 ساعة من النمو فبلغت نسبة التثبيط 38% و53% و49% على التوالي لأمامية السوط للشمانيا الجلدية ، أما فيما يخص أمامية السوط للشمانيا الاحشائية فقد بلغت نسبة التثبيط 36% و43% و41% ، على التوالي (17)، ومطابقة أيضاً لما أشارت إليه الجبوري (18) من أن لنباتي الدفلى والسبحبح تأثيراً مثبطاً على كمية الأحماض النووية الكلية لطفيليات اللشمانيا الاستوائية المستزرعة خارج الجسم الحي . وقد يعود هذا التأثير إلى المركبات الفعالة ونوعها ونسبها والتي ربما تعمل في التأثير على تركيب الأحماض النووية أو التأثير على الأنزيمات التي تساعد في صنع الأحماض النووية أو قد يعزى إلى تأثير المستخلصات النباتية على مادة الكروماتين (19) . وقد يعزى هذا التأثير أيضا إلى تثبيط أنزيماتRNA polymerase، DNA التي لها القدرة على التفاعل مع الـ RNA الذي يعمل على نقل الأحماض الأمينية في أثناء صنع البروتين ومن ثم توقيف هذه العملية (20). قد يكون تأثير المستخلصات النباتية على الأنوية مباشرة ، كما أشار Mittra *et al* (21) الى ان المركب الفلافونويدي الفعال Leuteolin يعمل على إزالة حبيبات الأنوية عند استخدامه بتركيز 12.5 مايكرومول/سم^3 لطفيليات *L. donovani* كما أنه يعمل على استطالة التركيب الدائري لمعقد DNA –الجسم الحركي (Kinetoplast-DNA) ومن ثم تثبيط صنع الأحماض النووية . ويتفق مع ما جاء به ، Marr *et al.* (20) من أن للمركبات القلويدية المعزولة من نبات شجر الحرير القدرة على تثبيط الحامض النووي الديوكسي رايبوري عن طريق تفاعله مع الـ DNA ، ويعتقد ان الفعالية التثبيطية لهذه المركبات ناتجة عن قدرتها على كسر الروابط التساهمية لمتعدد الينوكليوتيدات وكذلك وجد بأن لهذه المادة القدرة على التفاعل مع الحامض النووي الرايبوزي الناقل tRNA.

تأثير مستخلصات أوراق الدفلى وثمارالسبحبح على فعالية أنزيم الثايميدين فوسفوريليز

قدرت فعالية أنزيم الـ Thymidine phosphorylase TP في مستخلص المشعرات المعاملة بتركيز الـ IC50 من مستخلصات أوراق الدفلى وثمار السبحبح وقورنت بالمشعرات غير المعاملة (السيطرة) ، ويوضح الجدول 2 أن لمستخلص الدفلى والسبحبح تأثيراً تثبيطياً في فعالية أنزيم الـ TP بمقدار 32.7% لمستخلص الدفلى و69.2% لمستخلص السبحبح مقارنة مع السيطرة خلال 72 ساعة من النمو ، كما بينت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال ($p < 0.05$) بين فعالية الأنزيم للمشعرات المعاملة والمشعرات غير المعاملة .

وأشارت النتائج الى ان فعالية انزيم الـ TP تاثرت سلبياً بالمستخلصات النباتية المستخدمة وقد يعزو هذا التاثير الى ان المركبات الفعالة الموجودة في المستخلصين اثرت على عملية صنع الاحماض النووية وتثبيط فعالية أنزيم الـ TP ، او من خلال تكوين مناظرات نيوكليوتيدية مع هذا الانزيم، وتتفق هذه النتيجة مع ما جاء به Al-chalabi *et al.*, (22) من ان استخدام الاللوبيو رانول والفورماسين (B) اديا الى تثبيط مسار الاسترداد في المصورات واللشمانيا.

الجدول 2: تأثير تركيز الـ (IC50) لمستخلصات اوراق الدفلى *N. oleander* وثمار السبحبح *M. azedarach* على فعالية انزيم (TP) لطفيليات المشعرات المهبلية *T. vaginalis* عند الطور اللوغاريتمي 72 ساعة .

المعاملة	تركيز IC50 ملغم/سم^3	الفعالية الانزيمية نانومول/دقيقة/ملغم المعدل*+الانحراف القياسي	النسبة المئوية للتغير	
			الزيادة	النقصان
السيطرة	---	0.92 ± 15.6 a	---	---
أوراق الدفلى	2	0.92 ± 10.5 b	---	32.7
ثمار السبحبح	1.75	0.45 ± 4.8 c	---	69.2

*الرقم يمثل المعدل لثلاثة مكررات ± الانحراف القياسي .

الحروف الانكليزية المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية مقارنة بالسيطرة بحسب اختبار دنكن عند مستوى معنوية $P \leq 0.05$.

المصادر

1- Petrin, D., Dalgaty, K., Bhatt, R. and Garber, G. Clin. Microbiol. Rev., 11: 300-317. (1998).

2- Krieger, J.N. Sexually Transmitted Diseases, 22: 83-87. (1995).

3- Cupta, P.K. and Frost, J.K. Gynecol. Parasitol., 12: 274-290. (1990).

4- Weinstock, H., Berman, S. and Cates, W. American youth incidence and pervalence estimates, 2000. Perspect. Sex. Reprod. Heal., 6: 6-10. (2004).

5- Al-Chalabi, K.A. Bio chemistry of parasitic protozoa. Mosul University Press (1982).

6- AL-Khan, H.I. Raf. J. Scie. 13(1):83-90.(2002)

7- AL-Hayali, M.G. and Rahemo, Z.I. Raf .J. Scie. 14(2) : 140-150.(2001).

8- Kharofa, W.A. Raf. J. Scie. 13(1):1-6.(2002)

9- Gwendolyn, L. "Practical medical microbiology". 4th ed.,Chlamydia. Mackie and McCarituey. pp. 621-630. (1996).

10- Diamond, L. S. J. Parasitol., 43: 488-490. (1957).

11- AL-Juwary, R.S. Msc thesis. College of Science University of Mosul. (2006).

12- Riose, J.L., Recio, M.C. and Villar., A. J. Ethnopharm., 21: 139-152. (1987).

13- Schneider, W.C. "Methods in enzymology. Vol. 11, Academic Press, New York. (1957).

14- Burton, K. Biochem. J., 63: 315-323. (1956).

15- AL-Noman. A.U. and AL-Chalabi, K.A.J.AL-Rafidi. Scie. 12(4) :38 – 53.(2001).

16- AL-Khan, H.I. Ph.D. College of Science. University of Mosul .(2001) (In Arabic).

17- AL-Hayali, H.L. Msc. thesis College of Science. University of Mosul.(2000). (In Arabic).

18- AL-Juboree, S.A., Msc thesis. College of Science. University of Mosul (2005). (In Arabic).

19- Greer, M. Antimicrob. Agen. Chemother., 47(6): 1895-1901. (2003).

20- Marr, W., Tan, G. T., Grodell, G.A. and Pezzutuo, J.M. J. Nat. Prod., 54(6): 1531-1542. (1991).

21- Mittra, B., Saha, A., Chowdhury, A.R., Pal, C., Mandal, S., Mukhopadhyay, S., Bandyopadhyay, S. and Majumder, H.K. Mol. Med., 6(6): 527-541. (2000).

22- Al-Chalabi, K.A.; Annaz, R.M. and Sarraj, I.S. Basrah J. Sci., 13(1): 19-26. (1995).