Assessing Toxicity of The Alcoholic Extract of "*Myrtus communis L.*" leaves on The Human Lymphocytes

Dr. Nahla Ibrahim*

(Received 7 / 9 / 2021. Accepted 22 / 11 / 2021)

□ ABSTRACT □

This study aimed to test the toxicity of the alcoholic extract of *Myrtus communis* L. leaves by studying the effect of different concentrations of the extract on cell division, programmed cell death and Cell Cycle in human lymphocytes. Human lymphocytes werecultured by whole blood culture method, and the alcoholic extract of *Myrtus communis* L. leaves was added to (five different concentrations 2 10, 25, 50 and 100 µg/ml), then the effect of the above-mentioned concentrations on the rate of lymphocyte division and programmed death rate and on the different stages of the Cell Cycle was studied.The results showed that the extract with its different concentrations helped in the division of lymphocytes cells, the percentage of dividing cells increased, and the concentrations of 2 and 100 µg/ml were the most inducing lymphocytes to divide.The alcoholic extract of *Myrtus communis* L. leaves did not affect the different phases of the Cell Cycle, so there were no significant differences between the control and the different concentrations of the extract. In addition, the extract did not cause cells to entering into programmed cell death significantly, there were no significant differences between the control and the different concentrations of the extract, and the concentrations of 25 and 50 µg/ml were the most effective in entering cells into programmed cell death. *Myrtus communis* L. is safe to use and non-toxic.

Keys word: *Myrtus communis* L.,programmed cell death, Cell Cycle, toxicity, Lymphocytes, cell division.

* **Professor in Biology at the Faculty of science-Tischreen University- Lattakia- Syria**
D.alya-n@hotmail.com

اختبار سمية المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس الشائع "*Myrtus communis L.*" على الخلايا اللمفاوية البشرية

د. نهلة إبراهيم *

(تاريخ الإيداع 7 / 9 / 2021. قبل للنشر في 22 / 11 / 2021)

□ ملخّص □

هدفت هذه الدراسة الى اختبار سمية المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس من خلال دراسة تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص في الانقسام الخلوي والموت الخلوي المبرمج والدارة الخلوية في الخلايا اللمفاوية البشرية،تم استنبات اللمفاويات البشرية بطريقة زراعة الدم الكامل وتمت إضافة المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس بخمسة تراكيز مختلفة 2،10،25،50،100 ميكروغرام/مل ثم تمت دراسة تأثير التراكيز السابقة الذكر على نسبة انقسام اللمفاويات ونسبة الموت الخلوي المبرمج وعلى المراحل المختلفة من الدارة الخلوية، أظهرت النتائج أن المستخلص بتراكيزه المختلفة ساعد على انقسام الخلايا اللمفاوية فقد زادت النسبة المئوية للخلايا المنقسمة وكان التركيزان2 و100 ميكروغرام/مل الأكثر تحريضاً للخلايا اللمفاوية على الانقسام. لم يؤثر المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس على الأطوار المختلفة من الدارة الخلوية فلم يكن هناك فروق معنوية بين الشاهد والتراكيز المختلفة من المستخلص، بالإضافة لذلك لم يسبب المستخلص دخول الخلايا في موت خلوي مبرمج بشكل كبير فلم يكن هناك فروق معنوية بين الشاهد والتراكيز المختلفة من المستخلص وكان التركيزان 25 و50 ميكروغرام /مل الأكثر تأثيراً في دخول الخلايا في موت خلوي مبرمج ومنه نستنتج أن المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس آمن للاستخدام وغير سام .

الكلمات المفتاحية: الآس الشائع–الموت الخلوي المبرمج –الدارة الخلوية –السمية –خلايا لمفاوية– الانقسام الخلوي.

* أستاذ مساعد – قسم علم الحياة الحيوانية – كلية العلوم–جامعة تشرين – اللاذقية–سورية D.alya–n@hotmail.com

مقدمة

الآس الشائع هو نبات عطري، ينتمي إلى الفصيلة الآسية Myrtaceae يتواجد كشجيرات دائمة الخضرة يصل ارتفاعها إلى أكثر من مترين. استمد الآس الشائع *Myrtus communis L* اسمه العلمي من الاسم الفارسي له (Salimi –Beni *et al.*,2017) ويعرف الآس بأسماء أخرى مثل حمبلاس ومرسين وريحان، وتضم الفصيلة Myrtaceae التي ينتمي إليها الآس حوالي 145 جنساً تقريباً وأكثر من 5500 نوعاً (Snow *et al.*,2001). يضم الجنس Myrtus 16 نوعاً من النباتات الزهرية (Twaij *et al.*,1988; Romani *et al.*,1999) الشكل (1).

التصنيف العلمي لنبات الريحان أو الآس *Myrtus communis L*.

الاسم العربي	آس بري
الاسم اللاتيني	*Myrtus communis L.*
جنس الآس	*Myrtus*
الفصيلة الآسية	Myrtaceae
رتبة الآسيات	Myrtales
صف ذات الفلقتين	Dicotyledoneae
صف مغلفات البذور	Angiospermae

أوراق الآس عنقودية الترتيب صغيرة بيضوية أو رمحية، متداخلة، ملساء براقة، جلدية وذات رائحة عطرية فواحة مميزة، الأزهار بيضاء عطرة مفردة في محور الورقة، الكأس حويصلي صغير، الثمار بسيطة لينة مجسمة، ويميز

C B A

الشكل (1): صور نبات الآس:A) أزهار نبات الآس، B) ثمار آس بنفسجية داكنة، C) ثمار آس بيضاء.

مورفولوجيا بين نوعين من الآس على أساس لون الثمار البنفسجية الداكنة أو البيضاء واللون الداكن هو الأوسع انتشاراً، ولكن الأنواع البيضاء تزرع بشكل أكبر، لأنها تنتج ثماراً أكبر حجماً من نظيراتها البرية (Klein *et al.*,2000). البذور بيضاء ذات غطاء سميك، تنتج الأوراق والأزهار واللحاء زيتاً معروفاً باسم ماء الملائكة يتميز برائحة عطرية منعشة، يتكاثر الآس بالعقل والبذور، الأجزاء المستخدمة منه هي الأوراق والبذور والأزهار والجذور (Salimi –Beni *et al.*,2017).

ينمو وينتشر الآس بغزارة من الشمال الغربي إلى شرق البحر المتوسط، وكذلك مناطق بحر إيجة (Baytop 1997 *et al.*,) ويعد الموطن الأصلي للآس جنوب أوروبا وشمال أفريقيا وغرب آسيا وقد انتشرت زراعته حتى أمريكا الجنوبية وشمال غرب الهيمالايا وأستراليا. ويزرع الآس في الحدائق، وخاصة في منطقة شمال غرب الهند، بسبب رائحة أزهاره المميزة (Nadkarni,1989).

تم تحديد التركيب الكيميائي للزيت العطري للآس من قبل عدد من الباحثين (Bradesi *et al.*,1997; Ozek *et al.*,2000; Koukos *et al.*,2001; Snow *et al.*,2000).

وتشمل المركبات التي تم الكشف عنها في زيوت الآس كل من: E-2-hexenal و Z-3-hexenol و hexanol و tricyclene و α-thujene و α-pinene و sabinene و β-pinene و myrcene و δ-3-carene و α-terpinene ، linalool، terpinolene، E-oxide، E-β-ocimene، 8-cineole، limonene، p-cymene، nerol ، cis-carveol، myrtenol، α-terpineol، p-cymene-8-ol، borneol، terpinene-4-ol، α- terpinyl acetate، myrtenyl acetate، eugenol، Bornyl acetate، linalylacetate، geraniol allo-، α-humulene، c-caryophyllene، methyl eugenol، nerl acetate، geranyl acetate camphene و caryophyllene oxide and، germacrene-D، aromadendrene (Salimi-Beni *et al.*,2017) .

تعد ال monoterpenes المركبات الرئيسة المسؤولة عن نكهة ورائحة زيت الآس الشائع (Gardeli *et al.*, 2008) وتعتبر مركبات myricetin و quercetin و catechin ومشتقاتها من مركبات الفلافونويدات التي تم العثور عليها حتى الآن في أوراق وسيقان الآس الشائع (Aleksic and Knezevic, 2014;Asgarpanah and Ariamanesh, 2015).

استخدم الآس منذ العصور القديمة في الصناعات الغذائية، كما أنه يضاف إلى بعض الأغذية لإعطاء نكهة مميزة بصفته أحد التوابل، إذ يدخل على سبيل المثال في المركبات المكونة للعلكة (Akin *et al.*,2010) وعلى الرغم من الرائحة اللطيفة لم يستخدم الآس كتوابل على نطاق واسع بسبب مرارته وقد اقتصر استخدامه في الطهي على بعض المناطق مثل إيطاليا (Gortzi *et al.*, 2008; Cannas *et al.*,2013)وعادة ما تستخدم ثمار الآس وأوراقه في الخلطات الصناعية للمشروبات الكحولية الحلوة (Chalchat *et al.*,1998;Messaoud *et al.*,2012) وقد استخدمت الأوراق العطرة على نطاق واسع في صناعات العطور ومستحضرات التجميل، ولا سيما في البرتغال (Clark,1996) وتركيا (Baytop,1999).

استخدم نبات الآس الشائع *M. communis* في الممارسات الطبية لسنوات عديدة وأظهر تأثيرات علاجية مهمة إذ يمتلك النبات خواص مسكنة للألم (Twaij and -El Jalil,2009)، وتحتوي الأوراق على مواد مطهرة Antiseptic ومضادة للالتهابات (Akalu *et al.*,2007)، ومواد مضادة للأكسدة Antioxidant(Gortzi *et al.*,2008)، مضادة للاكتئاب وعامل خافض سكر الدم، ويستخدم تقليديا كعامل مطهر (Elfellah *et al.*,1984) وفي الطب الشعبي بشكل عام يستخدم منقوع الأوراق والثمار لعلاج آلام المعدة، وسوء التكيف، والسعال، والإمساك، وضعف الشهية، ويستخدم خارجيا لشفاء الجروح (Serce *et al.*,2010)، ويعتبر Myricetin مادة خاصة بالفصيلة الآسية Myrtaceae

(Haron *et al.*,1992)، والتي تظهر خصائص مضادة للجراثيم antibacterial، وللفيروسات antiviral،

وللأكسدة antioxidant، والالتهاب anti-inflammatory، والتحسس antiallergic، وللتخثر anticoagulant، وللأورام (Aleksic and Knezevic,2014)antitumor، وقد أظهرت الدراسات أيضاً أنه مضاد للأكسدة أقوى بكثير من الفيتامينات التقليدية (Miean and Mohamed,2001)،وقد ارتبطت الخصائص العلاجية والشفاء بمحتوى الزيوت الطيارة من المركبات الفينولية phenolic compounds والتي يمكن تقسيمها إلى أحماض الفينول phenolic acids، والفلافونويد flavonoids والتانينات tannins التي لها تأثير قوي مضاد للأكسدة (Romani *et al.*, 1999; Balasundram *et al.*, 2006; Gardeli *et al.*,2008; Yoshimura *et al.*,2008; Pereira *et al.*,2012; Aleksic and Knezevic,2014).

يعد البوليفينول Polyphenols أحد أهم المستقلبات الثانوية الموجودة في مستخلصات أوراق نبات الآس الشائع (Tumen *et al.*,2012*M. communis L*) وقد ثبت أنها تحمي عملية التمثيل الغذائي للخلايا المعرضة لدرجات حرارة عالية والتعرض الزائد للأشعة فوق البنفسجية (Romani *et al.*,2004)UV-B.

وفقا ل Hayder *et al* (2008)، هناك ما يقرب من 4000 بنية معروفة لمركبات البوليفينول (Mansouri *et al.*,2001; Amensour *et al.*,2009)، ذات القدرة على تحييد الجذور الحرة والحد من آثارها الضارة على جسم الإنسان (Wannes *et al.*,2010;Goncalves *et al.*,2013; Aleksic and Knezevic,2014;Asgarpanah and Ariamanesh,2015; Bouaziz *et al.*,2015) ويعتمد نشاطها المضاد للأكسدة على عدد وموضع هيدروكسيل الفينول phenolic hydroxyls في جوانب الحلقات العطرية (Aleksic and Knezevic, 2014)، كما يقوم البولي فينول بتثبيط ضرر الجذور الحرة على الدهون والبروتينات (Mirzaee and Najafian ,2015) ويمنع التأكسد الضار ويقي من الآثار السامة للجذور الحرة ويخفض من قدرتها ويحولها إلى منتجات أكثر استقراراً من خلال منح الإلكترونات (Bouaziz *et al.*,2015) والهيدروجين للجذور الحرة التفاعلية Kanoun *et al.*,2014).

وقد اهتمت معظم الدراسات بالأثر المضاد للأكسدة لمستخلصات نبات الأس ضد تحريض مركبات كيميائية مختلفة للإجهاد التأكسدي وبخاصة في البكتريا وقد أشارت إحدى الدراسات (Ines *et al.*,2012) إلى أن مركب (O-di-galloylquinic acid 3,5-DGQA) المنقى من الزيت العطري للأس يقي من السمية الوراثية المحرضة بـ H_2O_2 في السلالات الخلوية البشرية، حيث أظهرت نتائجهم أنDGQA يزيد نشاط كل من عائلة الأنزيمات المضادة للأكسدة وأنزيمات ترميم الـ DNA، وبناءاً عليه استنتج الباحثون أن DGQA قادر على وقاية الخلايا من الإجهاد التأكسدي.

أهمية البحث وأهدافه

نظراً للتركيب الكيميائي الشديد الأهمية والمركبات الفعالة ذات التأثيرات العلاجية الهامة التي يحتويها نبات الآس الشائع وأيضاً نظراً للاستخدام الواسع للنبات في علاج العديد من الأمراض والاضطرابات وفوائده المختلفة في التخفيف من أعراض بعض الأمراض والمساعدة في علاج العديد منها كان الهدف من هذا البحث التأكد من سلامة مستخلص أوراق نبات الآس للاستخدام البشري والتحري في مدى سميته وذلك من خلال دراسة تأثير تراكيز مختلفة منه على الانقسام الخلوي والمراحل المختلفة من الدارة الخلوية بالإضافة إلى التأثير على دخول الخلايا في عملية موت خلوي مبرمج على خلايا ذات حساسية عالية مثل الخلايا اللمفاوية البشرية.

طرائق البحث ومواده

1.المواد والأدوات والأجهزة:

1.1. المواد:

استخدم في هذا البحث مواد كيميائية وبيولوجية وأوساط عالية النقاوة. يظهر الجدول (1) قائمة بالمواد الكيميائية والبيولوجية المستعملة في إنجاز هذا البحث.

الجدول(1): قائمة بالمواد الكيميائية والبيولوجية المستعملة، مع اسمها الكيميائي ومصدرها التجاري.

م.	المادة	الاسم الأجنبي	درجة النقاوة	المصدر التجاري
1	كحول ايتيلي	Ethanol	100%	Merck # 986
2	حمض خل ثلجي	Acetic Acid	100%	Merck # 56
3	ملون غيمزا	Giemsa L	–	Merck # 9204
4	كلوريد الصوديوم NaCl	Sodium Chloride		ProlaBo
5	سائل غمد التدفق.	Flour Cytometer		شركة BD
6	ملون بروبيديوم أيودايد	Propidium Iodide		
7	وسط زرع صنعي كامل	Chromosome medium B		
8	سيتوشالازين–ب	cytoshalsin–B		
9	الانكسين–5	Annexin V		
10	بنسيلين	Penicillin		
11	ستربتومايسين	Streptomycin		
12	مصل عجل حديث الولادة	Newborn Calf Serum		
13	كلوريد البوتاسيوم	Potassium chloride		

2.1. الأدوات والأجهزة:

الجدول (2) قائمة بالأدوات والأجهزة المستعملة مع الطراز والمصدر التجاري.

م.	الأداة أو الجهاز	الاسم الأجنبي	الطراز	المصدر التجاري
	خيمة زرع عقيمة	Laminar Flow		
1	جهاز القياس الخلوي بالتدفق المزود بليزرين: - 15–mW, 488–	Flow Cytometer	BD FACSCalibur	BD biosciences USA

			nm, argon–ion laser 635–nm, red– - diode laser وبفلاتر بصرية ومكاشيف تفلور عدد 5، بالاضافة لكواشف التبعثر الأمامي والجانبي	
2	مجهر مع نظام تضاد الأطوار مع نظام تصوير رقمى	Reasearch Microscope with phase Contrast system and digital Camera	Olympus	Japan
3	حاضنة	Incubator		
4	مثفلة مبردة متعددة السرعات.	Swing bucket centrifuge	Eppendorf	Hamburg, Germany
5	ميزان الكتروني رقمي (0,0001 غ)	Digital Balance		
6	هزاز أنابيب مخبرية	Shaker		
7	أنابيب جمع الدم بالتخلية تحوي على K_3EDTA أو K_2EDTA أو هبارين الليثيوم كمانع تجلط.			من شركة BD
8	أنابيب من البولي– استرين معقمة أحادية الاستعمال قياس 12×75 ملم.			من شركة BD (#352058).
9	أنابيب تثقيل معقمة من البولي–ايسترين سعة 15 مل.			
10	حوامل أنابيب.			
11	ممصات آلية متفاوتة السعة مع رؤوس موافقة معقمة تغطي المجال 50–1000 مكرومتر.		Eppendorf	Hamburg, Germany
12	حمام مائي مضبوطة درجة الحرارة عند الدرجة 37°م.			

13	ممص لشفط المحاليل.		Eppendorf	Hamburg, Germany
14	مجمدة (−80°م).		Operon	Korea
15	براد عادي		الحافظ	سورية

3.1.المحاليل المستخدمة:

1) محلول الأنكسين –V الموسوم بـ FITC (FITC–Annexin V)، من شركة BD (#51–65874X) يخزن عند درجة حرارة 4°م.

2) محلول البروبيديوم ايوديد PI، من شركة BD (#51–66211E)، يخزن عند درجة حرارة 4°م.

3) محلول موقي ارتباط الأنكسين–V، ويتكون من:

HEPES	0.1مول/لتر
NaCl	1.4مول/لتر
$CaCl_2$	25ملي مول/لتر

ضبطت درجة الحموضة PH المحلول عند الدرجة pH 7.4 بماءات الصوديوم. يمكن الحصول على هذا المحلول مركزاً من شركة BD (#51–66121E) وعند استعماله يمدد بالماء المقطر بنسبة (10:1)، يخزن عند درجة حرارة 4°م.

4) المحلول الموقي PBS ويتكون من:

NaCl	8غرام
KCl	0.2غرام
$Na_2HPO_4.7H_2O$	1.44غرام
KH_2PO_4	0.24غرام

حلت تلك المقادير في 800 مل ماء مقطر منزوع الشوارد ضبطت درجة pH إلى الدرجة pH 7.2 ، وتمم المحلول إلى 1 لتر ثم رشح عبر فلتر مساميته 0.22 مكرومتر، وخزن في البراد.

2. طرائق البحث:

تم إجراء البحث في هيئة الطاقة الذرية – دمشق.

1.2.تحضير المستخلص:

أضيف 500 مل من الكحول الإيتيلي بتركيز 70% إلى 50 غرام من أوراق نبات الآس المجففة في الظل بدرجة حرارة المخبر، ثم تم الاستخلاص مرتين في الكحول في كل مرة لمدة 24 ساعة على نفس الأوراق لمدة 48 ساعة، ثم أخذ المستخلص الناتج وتم تبخير الكحول منه بدرجة حرارة 41 مئوية لمدة 3 أيام، تم أخيراً الحصول على المستخلص النهائي ثم وضع في البراد بدرجة حرارة −20 إلى حين الاستخدام.

2.2.اعتيان الدم:

جمعنا 15 مل من الدم المحيطي البشري بشكل عقيم من وريد الساعد ل 5 متبرعين بالغين أصحاء وغير مدخنين بوساطة إبر خاصة وضمن أنابيب مفرغة من الهواء معقمة وتحوي على مانع التخثر هيبارين الليثيوم lithium heparin anticoagulant.

3.2.**استنبات الدم:**

1) استنبت الدم تحت شروط عقامة ضمن خيمة زراعة معقمة باستخدام أدوات وأوساط ملائمة في أنابيب سعة 15 مل من البولي بروبيلين لها قعر مخروطي، كل أنبوب يحوي على وسط زراعة مكون من 10 مل وسط زراعة (chromosome B) المضاف إليه الصادات الحيوية (بنسيلين بتركيز 100 وحدة/مل وستريبتومايسين بتركيز 100 ميكروغرام/مل)، و1 مل من مصل جنين العجل Fetal Calf Serum و50 ميكروليتر من محلول فيتوهيماغلوتينينphytohemagglutinin (محرض انقسامي للمفاويات التائية المساعدة، عبارة عن راصات دموية نباتية).

2) قسمت العينة الدموية لكل متبرع من المتبرعين الخمس إلى 6 مجموعات وتم الاستنبات بإضافة الدم والمستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس إلى الأنابيب على الشكل التالي:

- الأنبوب الأول 500 ميكروليتر دم.
- الأنبوب الثاني 500 ميكروليتر دم ومستخلص بتركيز 2 ميكروغرام /مل.
- الأنبوب الثالث 500 ميكروليتر دم ومستخلص بتركيز 10 ميكروغرام /مل.
- الأنبوب الرابع 500 ميكروليتر دم ومستخلص بتركيز 25 ميكروغرام /مل.
- الأنبوب الخامس 500 ميكروليتر دم ومستخلص بتركيز 50 ميكروغرام /مل.
- الأنبوب السادس 500 ميكروليتر دم ومستخلص بتركيز 100 ميكروغرام /مل.

3) استنبتت الدم بشكل عقيم تحت خيمة زرع ذات ضخ هوائي شاقولي، ثم حضنت الأنابيب لمدة 72 ساعة في الحاضنة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية وبجو من الهواء حاوٍ على 5% من. غازCO_2

4) أضيف السيتوشالازين–ب cytochalasin B بعد 44 ساعة من بداية الاستنبات (بتركيز نهائيμg/ml 4) ثم أعيدت المستنبتات إلى الحاضنة لتتمو لمدة 28 ساعة إضافية.

4.2. **تحضير الخلايا لقياس المنسب الانقسامي:**

1. ثفلت الخلايا بعد 72 من بدء الاستنبات لمدة 10 دقائق بسرعة 1500 دورة/دقيقة.
2. عولجت الخلايا بمحلول ملحي منخفض التوتر 0.05 M/ KCl وذلك من أجل حل كريات الدم الحمراء وانتباج الخلايا اللمفية مع الحرص على تجانس الخليط وذلك بوضع الأنبوب عند إضافة كلوريد البوتاسيوم على رجاجة أنابيب.
3. ثبتت الخلايا بمزيج 1:3 ميتانول/حمض الخل الثلجي، أضيف المثبت أثناء رج الخلايا وذلك لتحاشي تكون التكتلات ثم ثفلت الخلايا مرة أخرى في المثفلة بسرعة 2000 دورة /الدقيقة لمدة 8 دقائق.
4. تخلصنا من المحلول الطافي بعد التثفيل ثم غسلت الخلايا مرتين إضافيتين بالمثبت مع التثفيل بعد كل غسيل مع التخلص من المحلول الطافي في كل مرة.
5. رج معلق الخلايا برفق ثم أسقطت الخلايا على صفائح زجاجية نظيفة ورطبة ومبردة مسبقاً، وجففت بالهواء، ثم لونت بمحلول 5%من ملون غيمزا لمدة 10 دقائق.

6. درست نسبة الخلايا المنقسمة (الخلايا ثنائية النواة) في كل 1000 خلية ولكل متبرع باستخدام مجهر أبحاث بتكبير 600.

7. كررت عملية الاستنبات السابقة لكن بحضن الخلايا لمدة 48 ساعة وبدون إضافة السيتوشالازين لاستخدامها في دراسة الدارة الخلوية والموت الخلوي.

5.2.التحليل بتقانة التدفق الخلوي:

قيست التغيرات في العيوشية والموت الخلوي المبرمج وتوزع الدارة الخلوية في العينات المدروسة باستعمال تقانة التدفق الخلوي Flow Cytometry.

1.5.2. تحضير معلق خلايا الدم البيضاء:

أخذت الأنابيب التي تم استنباتها لمدة 48 ساعة وبدون إضافة السيتوشالازين، وأجريت عليها العمليات الآتية:

1) ثفلت الأنابيب بسرعة 2000 دورة /الدقيقة لمدة 5 دقائق طرح الطافي.

2) أضيف إلى كل أنبوب 14 مل من محلول حال لخلايا الدم الحمراء، وتم تقليب الأنبوب عدة مرات، ثم ثفلت الأنابيب بسرعة 2000 دورة /الدقيقة لمدة 5 دقائق وطرح الطافي.

3) أضيف 14 مل من المحلول الموقي PBS إلى كل أنبوب مع تقليب الأنابيب عدة مرات لغسل الخلايا ثم ثفلت الأنابيب بسرعة 2000 دورة /الدقيقة لمدة 5 دقائق وطرح الطافي.

4) علقت خلايا الدم البيضاء في 0.5 مل من محلول PBS.

2.5.2.تحضير العينات لقياس العيوشية والموت الخلوي المبرمج:

1) أخذ أنبوب سعة 6 مل وأضيف إليه 400 ميكروليتر من محلول بفر ربط الأنكسين-5.

2) أضيف إلى الأنبوب 5 ميكروليتر من GFP-Annexin-V (بتركيز 1ملغ/مل)، و5 ميكروليتر من محلول Propidium Iodide (بتركيز 1مكروغرام/مل)، ثم أضيف 100 ميكروليتر من معلق خلايا الدم البيضاء مع المزج بلطف بوساطة الممص، ثم حضن الأنبوب في مكان مظلم عند درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق. بالتوازي مع ذلك خصص لمجموعة العينات أنبوب أضيف إليه 100 ميكروليتر من معلق الخلايا بدون إضافةGFP-Annexin-V، ومحلول PI يستعمل كعينة ضابطة للتفلور الذاتي والنوعي.

3.5.2. تحضير العينات لتحليل الدارة الخلوية:

1) أخذ أنبوب سعة 6 مل، وأضيف إليه 400 ميكروليتر من محلول PI بتركيز (50 ميكروغرام/مل) بفر ستراتي سترات الصوديوم ثلاثية جزيئات الماء (0.1%)، RNase (0.02%) ، NP40 (0.37%).

2) أضيف إلى الأنبوب 100 ميكروليتر من معلق خلايا الدم البيضاء وحضنت في مكان مظلم عند درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة.

2.6.التحليل الإحصائي:

تم في هذا العمل إظهار النتائج كمتوسطات ± الانحراف المعياري (mean±SD) كما قمنا بتحليل النتائج إحصائيا باستخدام برنامج (Excel 2003) مستخدمين اختبار T-Test (Two-Sample Assuming Equal Variances) وتستخدم هذه الطريقة بشكل عام لتقدير الفروق بين مجتمعين إحصائيين في حالة العينات الصغيرة (n<30)، وذلك لمعرفة الاختلافات بين المجتمعين، هل هي اختلافات معنوية وبمستوى ثقة 95 %. واعتمدت فيه قيمة P-Valueكقيمة إحصائية معنوية عندما تكون ($p\leq 0.05$)، أو غير معنوية عندما تكون ($p\leq 0.05$).

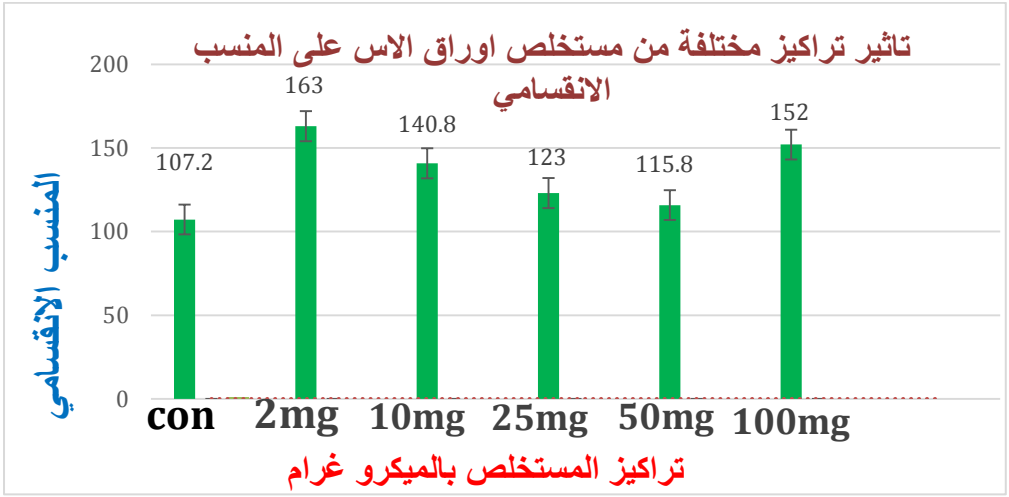
النتائج والمناقشة

1.نتائج المنسب الانقسامي:

عند تطبيق الخطوات الخاصة باستنبات الدم والمذكورة سابقاً في فقرة استنبات اللمفاويات تم الحصول على خلايا لمفاوية طبيعية وخلايا لمفاوية ثنائية النوى بأشكال واضحة وأعداد مناسبة للدراسة المجهرية، وقد تمت دراسة واحصاء عدد الخلايا اللمفاوية ثنائية النوى في كل 1000خلية لمفاوية لكل تركيز من التراكيز المستخدمة(2،10،25،50،100) ميكروغرام /مل لكل متبرع من المتبرعين الخمسة.

الجدول(3): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس على المنسب الانقسامي في الخلايا اللمفاوية البشرية

التراكيز / المتبرع	con	2mg	10mg	25mg	50mg	100mg
A	114	160	136	111	121	163
B	107	182	154	128	123	150
C	111	162	143	124	135	165
D	97	139	137	124	101	143
E	107	172	134	128	99	139
المجموع	107.2	163	140.8	123	115.8	152



الشكل (2): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس على المنسب الانقسامي في الخلايا اللمفاوية البشرية

ويبين كل من الجدول (3)والشكل (2) النسبة المئوية للخلايا المنقسمة لكل تركيز من التراكيز المستخدمة عند كل متبرع و المتوسط الحسابي لجميع المتبرعين، كما أن المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس سبب بجميع التراكيز المستخدمة زيادة في النسبة المئوية للخلايا المنقسمة حيث ساعد المستخلص على عملية الانقسام الخلوي في الخلايا اللمفاوية البشرية، مما يشير إلى أن المستخلص آمن وليس له تأثير سلبي أو سام على الخلايا الحية حقيقية النواة وهي

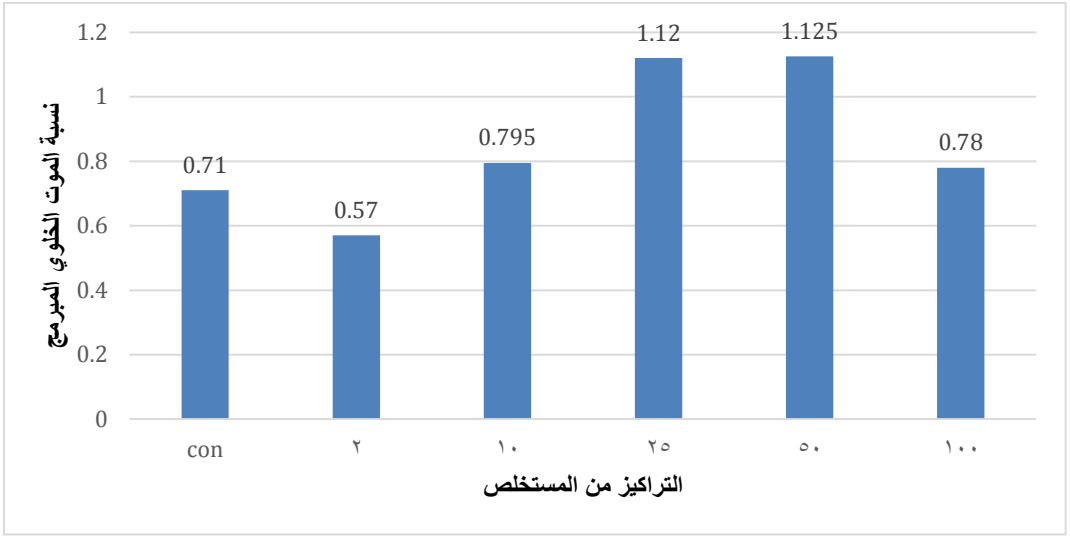
في دراستنا الخلايا اللمفاوية البشرية، حيث أن المستخلص لم يتسبب في إيقاف انقسام الخلايا بالإضافة إلى تحسين عملية الانقسام الخلوي.

2.نتائج الموت الخلوي المبرمج:

تسبب بعض المواد الكيميائية الموجودة في بعض النباتات تأثيراً ساماً في بعض الأحيان ينتج عنه ضرراً للخلايا الحية، وقد يقود هذا الضرر إلى دخول الخلايا في عملية موت خلوي مبرمج إذا لم يتم إصلاح الأضرار المتسببة بهذه المواد.عند تطبيق الخطوات سابقة الذكر في استنبات لمفاويات الدم المحيطي ومن ثم معالجتها وتحضيرها لقياس نسبة الخلايا الداخلة في عملية الموت الخلوي المبرمج باستخدام تقانة القياس الخلوي بالتدفق، حيث قمنا بدراسة تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس (2،10،25،50،100)ميكروغرام /مل على النسبة المئوية لدخول الخلايا اللمفاوية البشرية في عملية الموت الخلوي المبرمج ظهرت لدينا النتائج المبينة في كل من الجدول(4)والشكل(3).

الجدول(4): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس على الموت الخلوي المبرمج في الخلايا اللمفاوية البشرية

التراكيز المرحلة	Con شاهد	2	10	25	50	100
(LATE APOPTOTIC)	0.18	0.59	0.4	0.63	1.29	1.17
LIVE CELLS	98.46	98.51	98.15	97.26	97.26	97.01
APOPTOTIC	1.24	0.55	1.19	1.61	0.96	0.39
(NECROTIC)	0.15	0.33	0.28	0.5	0.49	1.37
	con	2	10	25	50	100
(LATE APOPTOTIC)	0.18	0.59	0.4	0.63	1.29	1.17
APOPTOTIC	1.24	0.55	1.19	1.61	0.96	0.39
	0.71	0.57	0.795	1.12	1.125	0.78



الشكل (3): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس على الموت الخلوي المبرمج في الخلايا اللمفاوية البشرية

بينت النتائج التي توصلنا إليها أن المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس بالتركيز 2 ميكروغرام /مل سبب انخفاض في النسبة المئوية للخلايا الداخلة في عملية الموت الخلوي المبرمج بالمقارنة مع الشاهد غير المعالج بالمستخلص، بينما سبب المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس بالتراكيز المتبقية (100،50،25،10)ميكروغرام /مل زيادة ضئيلة وغير معنويةp>0.05 في نسبة الخلايا الداخلة في عملية الموت الخلوي المبرمج بالمقارنة مع الشاهد غير المعالج بالمستخلص وكانت أكبر نسبة لدخول الخلايا بعملية الموت الخلوي المبرمج هي عند التركيزين 25 و 50 ميكروغرام /مل، وعلى الرغم من ذلك فإن الزيادة في نسبة الموت الخلوي المبرمج صغيرة وليست ذات دلالة إحصائي مما يدل على أن المستخلص غير سام و مناسب للاستخدام كونه لا يملك تأثير سام واضح على الخلايا الحية وهي في دراستاهي الخلايا اللمفاوية البشرية، تتوافق هذه النتائج مع النتائج التي توصل إليها عدة باحثين ومنهم (Jagetia and Baliga,2002; Delbano *et al.*,2006;Davari *et al.*,2012; Lee *et al.*,2009) في دراساتهم هم حول تأثير مستخلص الشاي الأخضر واكليل الجبل والبرقوق الأسود والجنسنغ الأمريكي على الموت الخلوي المبرمج في الخلايا اللمفاوية البشرية.

3.نتائج الدارة الخلوية:

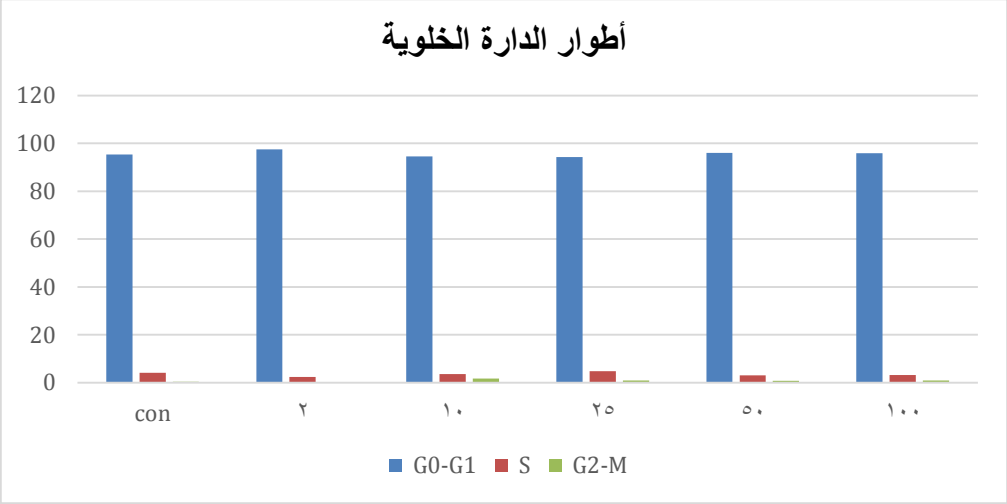
تعد نقاط فحص دورة الخلية مهمة تضمن التنفيذ السليم لأحداث الدارة الخلوية (Luk *et al.,* 2005)حيث تستجيب الخلايا حقيقية النوى لتأثير المركبات السامة بحدوث تأخيرات في كل من المرحلتين G1 و G2 من الدارة الخلوية ففي الحالة الأولى يفترض أن التأخير يسمح بإصلاح الأضرار المحدثة قبل التضاعف في الحمض النووي أما في الحالة الثانية يساعد التأخير في الإصلاح قبل عملية الانقسام الفتيلي مما يمنع انتشار الخلايا التالفة (Dulić*et al.,* 1994) وقد كان الهدف من دراسة تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس الشائع على الدارة الخلوية هو التحقق من سمية المستخلص المدروس وبعدة تراكيز.

بعد تطبيق الخطوات سابقة الذكر في استنبات اللمفاويات البشرية ومن ثم معالجتها وتحضيرها لدراسة أطوار الدارة الخلوية درسنا باستخدام تقانة القياس الخلوي بالتدفق تأثير المعالجة بتراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق

نبات الآس (100،50،25،10،2) ميكروغرام /مل على نسبة توزع الخلايا اللمفاوية البشرية على مختلف أطوار الدارة الخلوية في اللمفاويات البشرية المستنبتة في الزجاج ل 5 متبرعين اصحاء.

الجدول(5): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس على أطوار الدارة الخلوية المختلفة في الخلايا اللمفاوية البشرية

اطوار الدارة الخلوية	con	2	10	25	50	100
G0–G1	95.43	97.57	94.61	94.3	96.02	95.84
S	416.00%	2.43	3.63	4.8	3.13	3.21
G2–M	0.41	0	1.76	0.9	0.84	0.95



الشكل (4): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس على أطوار الدارة الخلوية المختلفة في الخلايا اللمفاوية البشرية

ويظهر كل من الجدول(5) والشكل (4) تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس على الأطوار المختلفة من الدارة الخلوية حيث تبين أنه لا يوجد أي تأثير للمستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس وبجميع التراكيز المدروسة(100،50،25،10،2) ميكروغرام /مل على مراحل وأطوار الدارة الخلوية المختلفة بالمقارنة مع الشاهد غير المعالج بالمستخلص، مما يدل على أنه ليس هناك تأثير سلبي أو سام للمستخلص، فهو لم يتسبب بإيقاف الدارة الخلوية في اي طور من أطوارها مما يشير إلى سلامة وأمان المستخلص للاستخدام.

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات:

1. ساهم المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس الشائع بجميع التراكيز المدروسة في تنشيط الانقسام الخلوي ولم يكن له اي تأثير في إيقاف الانقسام الطبيعي للخلايا اللمفاوية البشرية مما يشير إلى انخفاض سمية المستخلص.

2.لم يتسبب المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس الشائع بجميع التراكيز المدروسة بزيادة كبيرة في نسبة الخلايا الداخلة بعملية الموت الخلوي المبرمج أو إيقاف أي طور من أطوار الدارة الخلوية مما يدل على انخفاض سمية المستخلص.

خاتمة:

تبين لدى دراسة تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الآس (2،10،25،50،100) ميكروغرام /مل على كل من المنسب الانقسامي للدارة الخلوية والموت الخلوي المبرمج أن المستخلص وبجميع التراكيز سابقة الذكر ليس له أي تأثير سام على الخلايا الحية حقيقية النوى المستخدمة في هذا البحث وهي الخلايا اللمفاوية البشرية مما يشير إلى إمكانية استخدام المستخلص كون سميته منخفضة جداً بشكل واسع وآمن طبياً لعلاج أو تخفيف أعراض العديد من الاضطرابات المرضية كون المستخلص ذو تأثيرات دوائية وطبية واسعة.

References

AKALU, N; ENDALE, A; ASRES, K. *Evaluation of antimicrobial activity of the essential oil of Myrtus communis L. and its formulation into gum paint.* Ethiopian Pharmaceutical Journal, Vol. 25 ,N°.1, 2017, 72-76.

AKIN, M; AKTUMSEK, A; NOSTRO, A. *Antibacterial activity and composition of the essential oils of Eucalyptus camaldulensis Dehn. And Myrtus communis L. growing in Northern Cyprus.* African Journal of Biotechnology, Vol.9 ,N°.4, 2010.

ALEKSIC, V; KNEZEVIC, P. *Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of Myrtus communis L*. Microbiological Research, Vol. 169 ,N°.4, 2014, 240-254.

AMENSOUR, M; SENDRA, E; ABRINI, J; BOUHDID, S; PÉREZ-ALVAREZ, J. A; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, JUANA. Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. Natural Product Communications, Vol.4, N°.6, 2009, 819 - 824.

ASGARPANAH, J; AREFEH, A. *Phytochemistry and pharmacological properties of Myrtus communis L*. Indian Journal of Traditional Knowledge (IJTK). Vol. 1 ,N°.1, 2015, 82-87.

BALASUNDRAM, N; SUNDRAM, K; SAMMAN, S. *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.* Food chemistry, Vol. 99 ,N°.1, 2006, 191-203.

BAYTOP, T. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü (A Dictionary of Vernacular Names of Wild Plants of Turkey). Publication of Turkish Language Society, Ankara, 1997.

BAYTOP, T. Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present) .in Turkish. 1999.

BOUAZIZ, A; ABDALLA, S; BAGHIANI, A; CHAREF, N;KHENNOUF,S; ABUZARGA, M . *Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of Myrtus communis L. growing in Algeria*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Vol. 5 ,N°.1, 2015, 19-28.

BRADESI, P; TOMI, F; CASANOVA, J; COSTA, J; BERNARDINI, A. F. *Chemical composition of myrtle leaf essential oil from Corsica (France).* Journal of essential oil Research, Vol. 9 ,N°.3, 1997, 283-288.

CANNAS, S; MOLICOTTI, P; RUGGERI, M; CUBEDDU, M; SANGUINETTI, M; MARONGIU, B; ZANETTI, S. *Antimycotic activity of Myrtus communis L. towards Candida spp. from clinical isolates.* The Journal of Infection in Developing Countries, Vol. 7,N°.03, 2013, 295-298.

CHALCHAT, J.C; GARRY, R. P G; MICHET, A. *Essential oils of myrtle (Myrtus communis L.) of the Mediterranean littoral*. Journal of essential oil Research, Vol.10, N°.6, 1998, 613-617.

CLARK, A. M. *Natural products as a resource for new drugs.* Pharmaceutical research, Vol.13, N°.8, 1996, 1133-1141.

DAVARI, H; HADDAD, F; MOGHIMI, A; RAHIMI, M. F; GHAVAMNASIRI, M. R. *Study of radioprotective effect of green tea against gamma irradiation using micronucleus assay on binucleated human lymphocytes.* Iranian journal of basic medical sciences, Vol.15,N°.5, 2012, 1026–1031.

DELBANO, M. J; CASTILLO, J; BENAVENTE-GARCÍA, O; LORENTE, J; MARTÍN-GIL, R; ACEVEDO, C; ALCARAZ, M. *Radioprotective− antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by γ-rays.* Journal of agricultural and food chemistry, Vol. 54 ,N°.6, 2006, 2064-2068.

DULIĆ, V; KAUFMANN, W. K; WILSON, S. J; TISTY, THEA. D; LEES, EMMA; HARPER, J. WADE; ELLEDGE, STEPHEN. J; REED, STEVEN. I. *p53- dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest.* Cell, Vol. 76 ,N°.6, 1994, 1013-1023.

ELFELLAH, M. S; AKHTER, M. H; KHAN, M. T. *Anti-hyperglycaemic effect of an extract of Myrtus communis in streptozotocin-induced diabetes in mice*. Journal of ethnopharmacology, Vol. 11 ,N°.3, 1984, 275-281.

GARDELI, C; VASSILIKI, P; ATHANASIOS, M; KIBOURIS, T; KOMAITIS, M. *Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts*. Food chemistry, Vol.107, N°.3 , 2008, 1120-1130.

GONÇALVES, S; GOMES, D; COSTA, P; ROMANO, A. *The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants*. Industrial Crops and Products, Vol. 43, 2013, 465-471.

GORTZI, O; LALAS, S; CHINOU, I; TSAKNIS, J. *Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of Myrtus communis extract before and after encapsulation in liposomes.* European food research and technology, Vol. 226,N°.3 , 2008, 583-590.

HAYDER, N; BOUHLEL, I; SKANDRANI, I; KADRI, M; STEIMAN, R; GUIRAUD, P;MARIOTTE, A. M;GHEDIRA, K ;DIJOUX-FRANCA,M. G ;CHEKIR-GHEDIRA, L. *In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from Myrtus communis: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray.* Toxicology in vitro, Vol. 22,N°.3, 2008, 567-581.

INES, S; INES, B; WISSEM, B; MOHAMED, B. S; NAWEL, H; DIJOUX-FRANCA, M. G; LEÏLA, C. G. *In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of 3, 5-O-di-galloylquinic acid extracted from Myrtus communis leaves and modulation of cell gene expression by H2O2.* Journal of Applied Toxicology, Vol. 32,N°.5, 2012, 333-341.

JAGETIA, G. C ; BALIGA, M. S. *Syzygium cumini (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study.* Toxicology letters, Vol. 132 ,N°.1, 2002, 19-25.

KANOUN, K; BELYAGOUBI-BENHAMMOU, N; GHEMBAZA, N; BEKKARA, F. A. *Comparative studies on antioxidant activities of extracts from the leaf stem and berry of Myrtus communis L*. International Food Research Journal, Vol. 21,N°. 5, 2014, 1957-1962.

KLEIN, J. D; COHEN, S; HEBBE, Y. *Seasonal variation in rooting ability of myrtle (Myrtus communis L.) cuttings*. Scientia Horticulturae, Vol.83 ,N°.1, 2000, 71-76.

KOUKOS, P. K; PAPADOPOULOU, K. I; PAPAGIANNOPOULOS, A. D; PATIAKA, D. T. *Chemicals from Greek forestry Biomass: Constituents of the leaf Oil of Myrtus communis L. Grown in Greece.* Journal of Essential Oil Research, Vol. 13 ,N°.4, 2001, 245-246.

LEE, T. K; O'BRIEN, K. F; WANG, W; SHENG, C; WANG, T; JOHNKE, R. M; ALLISON, R. R. *American ginseng modifies 137Cs-induced DNA damage and oxidative stress in human lymphocytes*. The open nuclear medicine journal, Vol. 1 ,N°.1, 2009, 1-8.

LUK, S. C. W; SIU, S. W. F; LAI, C. K; WU, Y. J; PANG, S. F. *Cell cycle arrest by a natural product via G2/M checkpoint.* International journal of medical sciences, Vol.2 ,N°.2, 2005, 64.

MANSOURI, S; FOROUMADI, A; GHANEIE, T; NAJAR, A. G. *Antibacterial activity of the crude extracts and fractionated constituents of Myrtus communis*. Pharmaceutical biology, Vol. 39 ,N°.5 ,2001, 399-401.

MESSAOUD, C; LAABIDI, A; BOUSSAID, M. *Myrtus communis L. infusions: the effect of infusion time on phytochemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities*. Journal of food science, Vol. 77 ,N°.9 , 2012, 941-947.

MIEAN, K. H AND MOHAMED, S. *Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants*. Journal of agricultural and food chemistry, Vol. 49, N°.6 , 2001, 3106-3112.

MIRZAEE, R AND NAJAFIAN, S.. *The Seasonal Variation of Polyphenolic Compounds and Antioxidant activity of Myrtus communis L*. in Iran. International Journal of Farming and Allied Sciences,Vol. 4 ,N°.3 , 2015, 226-231.

NADKARNI, K. M. *Indian Materia Medica, 3rd Edn, Popular Prakashan Pvt*. Ltd., Bombay,Vol. 1, 1989, 838.

ÖZEK, T; DEMIRCI, B; BASER, K. H. C. *Chemical composition of Turkish myrtle oil.* Journal of Essential Oil Research, Vol.12 ,N°.5 , 2000, 541-544.

PEREIRA, P; CEBOLA, M. J; BERNARDO-GIL, M. G. *Comparison of antioxidant activity in extracts of Myrtus communis L. obtained by SFE vs. solvent extraction.* Journal of Environmental Science and Engineering. A, Vol.1 ,N°. 1, 2012, 115-120.

ROMANI, A; COINU, R; CARTA, S; PINELLI, P; GALARDI, C; VINCIERI, F. F; FRANCONI, F. *Evaluation of antioxidant effect of different extracts of Myrtus communis L.* Free radical research, Vol.38 ,N°.1 , 2004, 97-103.

ROMANI, A; PINELLI, P; MULINACCI, N; VINCIERI, F. F; TATTINI, M. *Identification and quantitation of polyphenols in leaves ofMyrtus communis L.* Chromatographia, Vol.49,N°. 1-2, 1999, 17-20.

SALIMI- BENI, A; KOCHEKI, S; MEHRZAD, K; MASOUMIAS, A; KHAJEHSHARIFI, H. *Phytochemical and Biological Studies of Some Myrtus (Myrtus communis L.) Populations of South West Region of Zagros (Iran*). Nat Prod Chem Res, Vol. 5 ,N°. 290, 2017, 2329-6836.

SERCE, S; ERCISLI, S; SENGUL, M; GUNDUZ, K; ORHAN, E. *Antioxidant activities and fatty acid composition of wild grown myrtle (Myrtus communis L.) fruits*. Pharmacognosy magazine, Vol. 6 ,N°.21, 2010, 9–12.

SNOW, N; GUYMER, G. P. *Revision of Australian species of Uromyrtus (Myrtaceae) and two new combinations for New Caledonia*. Systematic Botany, Vol. 26 ,N°.4, 2001, 733-742.

TUMEN, I; SENOL, F. S; ORHAN, I. E. *Inhibitory potential of the leaves and berries of Myrtus communis L. (myrtle) against enzymes linked to neurodegenerative diseases and their antioxidant actions.* International journal of food sciences and nutrition, Vol. 63 ,N°.4 , 2012, 387-392.

TWAIJ, H AND EL-JALIL, H. A. *Evaluation of Narcotic (Opioid like) analgesic activities of medicinal plants*. Eur J Sci Res, Vol. 33, 2009, 179-182.

TWAIJ, H. A. A AND ALI, S. *Pharmacological, phytochemical and antimicrobial studies on Myrtus communis. Part 2: Glycaemic and antimicrobial studies.* Journal of Biological Science Research, Vol. 19 ,N°.1,1988, 41-52.

WANNES, W. A; MHAMDI, B; SRITI, J; JEMIA, M. B; OUCHIKH, O; HAMDAOUI, G; MARZOUK, B;CHOUK, M. E. *Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (Myrtus communis var.* italica L.) leaf stem and flower. Food and chemical toxicology, Vol. 48 ,N°.5 ,2010, 1362-1370.

YOSHIMURA, M; AMAKURA, Y; TOKUHARA, M; YOSHIDA, T. *Polyphenolic compounds isolated from the leaves of Myrtus communis.* Journal of natural medicines, Vol. 62 ,N°.3 ,2008, 366-368.