

Antihelmintik Aktivite için Bir Model Organizma: *Caenorhabditis elegans* ve *Nigella sativa*

A model Organism for Antihelminthic Activity: Caenorhabditis elegans and Nigella sativa

© Necati Özpınar

Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Acil Yardım ve Afet Yönetimi Bölümü, Acil Yardım ve Afet Yönetimi Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

Cite this article as: Özpınar N. Antihelmintik Aktivite için Bir Model Organizma: *Caenorhabditis elegans* ve *Nigella sativa*. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(1):31-5.

Öz

Amaç: Çalışmamızda *Nigella sativa*'nın antihelmintik aktivitesi, bir model organizma olan *Caenorhabditis elegans*'lar (*C. elegans*) üzerinde test edilmiştir.

Yöntemler: Çalışma için N2 (yaban tip) *C. elegans* ve *Escherichia coli* OP50, Minnesota Üniversitesi Ceanorhabditis Genetik Merkezi'nden satın alındı. *C. elegans*'lar NGM (Nematode Growth Medium) katı kültür ortamında büyütüldü. Senkronizasyonu yapılarak erişkin nematotlar %1, %0,1, %0,01, %0,001, %0,0001'lik konsantrasyonlarda *Nigella sativa* tohum yağına maruz bırakıldı. Çalışmada, 18 gün boyunca, deney ve kontrol grubundaki bütün nematotlar ölüncüye kadar her gün canlı ve ölü nematotlar kaydedildi. Yutak pompalaması duran nematot ölü olarak kaydedildi.

Bulgular: Çalışma bulgularımız incelendiğinde %1'lik konsantrasyonda petrilereki bütün nematotların dördüncü gün sonunda öldüğü görüldü. Buna ilaveten %0,1'lik konsantrasyonda beşinci gün sonunda hiç canlı nematoda rastlanmazken, %0,01'lik konsantrasyonda ise 13'üncü gün sonunda petrilereki bütün nematotların öldüğü tespit edildi. Veriler istatistiksel olarak incelendiğinde %0,1, %0,01, %0,001'lik konsantrasyon grupları ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlıydı ($p < 0,05$).

Sonuç: Helmintlerin genellikle makroskopik boyutta olması ve birçoğunun kültürünün yapılarak laboratuvar ortamında üretilmemesi bilimsel çalışmalar için büyük bir engeldir. Bu çalışmada, antihelmintik aktivite çalışmalarında *C. elegans*'ın iyi bir model olabileceği ve *Nigella sativa*'nın antihelmintik etkisi gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Caenorhabditis elegans*, antihelmintik aktivite, *Nigella sativa*

ABSTRACT

Purpose: In our study, antihelminthic activity of *Nigella sativa* was tested on a model organism *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

Methods: N2 (wild type) *C. elegans* and *Escherichia coli* OP50 were purchased from the University of Minnesota, Ceanorhabditis Genetic Center for the study. *C. elegans* were grown in NGM (Nematode Growth Medium) solid culture medium. After synchronization, nematodes in adult form were exposed to *Nigella sativa* seed oil at concentrations of 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001% and 0.0001%. The study continued for 18 days until all nematodes in the experimental and control groups died. Alive and dead nematodes were recorded every day. The nematodes in which pharyngeal pumping stopped was recorded dead.

Result: According to our findings, all nematodes died at the end of the fourth day at a concentration of 1%. In addition, no alive nematode was observed at the end of the fifth day at concentration of 0.1%; whereas at the end of the 13th day all nematodes died at concentration of 0.01%. When the data were analyzed statistically, the difference between at concentrations of 0.1%, 0.01%, 0.001% and the control group was significant ($p < 0,05$).

Conclusion: The fact that helminths are usually macroscopic in size and most of them cannot be produced in the laboratory by culturing is a major obstacle for scientific studies. Our study has shown that *C. elegans* can be a good model in studies of antihelminthic activity and that *Nigella sativa* has an anthelmintic effect.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, antihelminthic activity, *Nigella sativa*



Received/Geliş Tarihi: 10.01.2020 Accepted/Kabul Tarihi: 04.03.2020

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Necati Özpınar, Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Acil Yardım ve Afet Yönetimi Bölümü, Acil Yardım ve Afet Yönetimi Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

Tel/Phone: +90 537 620 77 26 **E-Posta/E-mail:** necatizpınar@gmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-7317-885X

GİRİŞ

Helmintiasis, özellikle gelişmekte olan ülkelerde oldukça yaygın, birçoğu zoonoz, önemli paraziter hastalıklardandır. Helminth enfeksiyonları, gelişme çağlarında fiziksel büyüme ve entelektüel gelişim geriliğinin en önemli nedenlerinden biridir (1). Bununla birlikte, eğitim, ekonomik kayıp ve halk sağlığı önemine rağmen, tıp ve uluslararası sağlık kuruluşları tarafından büyük ölçüde ihmal edilmektedir (1). Yapılan çalışmalar helmint enfeksiyonlarının, infekte çocukların okul performansı ve ülke geleceğindeki etkilerinden söz etmektedir (2). Bunun yanı sıra entelektüel gelişim açısından bu enfeksiyonların biliş ve eğitim başarısı üzerine zararlı bir etkisi olabileceği de bildirilmiştir (2-4). Bunların sonucunda insanların antihelmintik ilaçlara yönelmesi direnç gelişiminin de sebeplerinden olmuştur (5,6).

Son yıllarda bitkisel kökenli ilaçların kullanımı her geçen gün artmaktadır. Birçok bitki çeşitli hastalıklarda tedavi aracı olarak kullanılmakta ve sentetik ilaçları aratmayacak etkiler görülmektedir. Özellikle ilacına direnç geliştiren patojenlerin eradikasyonunda bitkilerden elde edilen ürünler, geleneksel tedavi metodu olarak eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. Tıbbi bitkilerin antihelmintik aktiviteleriyle ilgili çalışmalar oldukça azdır. Bunun sebeplerinden biri de helmintlerin birçoğunun laboratuvar ortamında kültürünün yapılamamasıdır. Bundan dolayı genellikle bu gibi çalışmalarda rat ya da fare gibi laboratuvar hayvanları, model olarak tercih edilmektedir. Ancak bilinmektedir ki hayvan çalışmaları, fazla iş gücü gerektirmesi, çalışma alanı sıkıntısı ve pahalı olması gibi birçok problemlere beraberinde getirmektedir.

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*), şubesi; *Nematoda*, sınıfı; *Secernentea*, takımı; *Rhabditida*, ailesi; *Rhabditidae*, cinsi; *Caenorhabditis*, türü; *Caenorhabditis elegans* olan, iplik kurdu olarak da adlandırılan bir nematodtur (Şekil 1). Erişkin bir kurtçuğun boyu bir milimetre civarındadır, bu nedenle incelemek için stereo mikroskop kullanılır. Büyüme ve üreme için nemli bir çevre, oda sıcaklığı, atmosferik oksijen ve besin olarak da bakteriyeye ihtiyaç duyar. Laboratuvar da bakım ve üretimi çok kolaydır. Erişkinleri bir mm boyunda olduğu için laboratuvar da çok az yer kaplar, rutin uygulamalar için petri kapları ve bir mikroskop yeterlidir. Erkek ve hermafrodit olmak üzere iki cinstir. Hermafrodit sperm ve yumurta üretir ve kendi kendini döller. Erkek sadece sperm üretir ve döllenmek için hermafrodite ihtiyaç duyar. Hermafroditin kendi kendine döllenmesi sonucu yine hermafrodit oluşurken, spontan olarak yaklaşık 1:1000 olasılıkla X kromozom ayrılması sonucu erkek oluşabilir.



Şekil 1. *C. elegans* mikroskopik görünümü (40x)

Erkek spermiyle döllenme sonucu ise erkek ve hermafrodit eşit oranda oluşur. Erişkin bir hermafrodit yaşamı boyunca yaklaşık 300 yumurta bırakabilir (7,8).

C. elegans'lardaki yutak ve omurgalıdaki kalbin ortolog olabileceğini düşündüren teoriler vardır. Bunlardan ilki hem omurgalı kalbi hem de *C. elegans* yutağı çift çekirdekli kas hücrelerine sahiptir ve lümenleri boyunca materyalleri taşırlar. Her iki organ da organizmanın yaşamının sürekliliği için devamlı pompalama yaparlar. İkincisi ise, her iki organında benzer uyarı ileti sistemi vardır. Kasılmalar bir gap junction ile senkronize edilir ve bunlar kas hücrelerine bitişiktir. Nöronal uyarı yokluğunda da kasılmalar devam edebilir (9,10). Bu sebeple yutak pompalamasını kaybetmiş *C. elegans* ölü olarak kabul edilir.

Çalışmamızda *Nigella sativa* (çörek otu)'nın antihelmintik aktivitesinin, bir model organizma olan *C. elegans*'lar üzerinde test edilmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Nigella sativa Tohum Yağı'nın Eldesi

Nigella sativa tohumları Sivas'ta satışa sunulan beş farklı satıcıdan eşit miktarda alındı, yıkanıp kurutulduktan sonra öğütüldü. Öğütülen tohumdan 100 gr tartılarak soxhlet cihazında petroleum ether (Sigma 77399) ile sekiz saat 40-60 °C'de ekstraksiyona tabi tutuldu (11). Elde edilen ekstrakt evaporatöre alınarak petroleum ether tamamen uçuruldu.

C. elegans Temini

Çalışma için N2 (yaban tip) *C. elegans* ve *Escherichia coli* OP50, Minnesota Üniversitesi *Caenorhabditis* Genetik Merkezi (USA)'nden satın alındı.

C. elegans Kültür İşlemleri

Deneysel katı kültür ortamı kullanıldı. Bu amaçla standart Nematode Growth Medium (NGM) olarak adlandırılan NGM agar ortamı hazırlandı.

Luria Broth Hazırlanması

BactoTryptone (5 g), Yeast Extract (2,5 g), NaCl (5 g), 1 M Tris (5 mL) tartılarak 500 mL deiyonize suda eritildi. 125 °C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra soğutuldu.

Escherichia coli OP50 Suşunun Hazırlanması

Hazırlanan Luria Broth içine *Escherichia coli* OP50 suşundan ekilerek 37 °C'de 24 saat bekletildi.

Nematot Growth Media (NCM) hazırlanması:

NaCl (3 g), Peptone (2,5 g), Agar (20 g) hassas terazide tartımları yapılarak 1 L deiyonize su içerisinde eritildi. 125 °C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 55 °C'ye kadar soğutuldu. Daha önceden hazırlanan ve 0,2 µm gözenekli filtrelerden süzülen 1 mL 1 M CaCl₂, 1 mL 5 mg/mL kolesterol, 1 mL 1M MgSO₄ ve 25 mL 1 M KPO₄ (pH:6) besiyerine eklenerek homojenizasyonu sağlandı. Medium pH: 6'ya ayarlandı. Çalışma için içinde etken madde bulundurulmuş NGM'ler hazırlanana kadar 55 °C'de bekletildi.

C. elegans'ların üretilmesi ve pasajlanması için hazırlanan NGM'den, altı mm çapındaki petrilere 10 mL aktararak oda ısısında katılaşana kadar bekletildi. Üzerine üretilen *E. coli* OP50 suşundan 200 µL eklenerek kuruması bekledi. Petrilere *C. elegans*'lar pasajlanarak çoğaltıldı.

C. elegans'ların Senkronizasyonu

Yaklaşık 10 adet erişkin *C. elegans* bakterisi içeren NGM petri kutusuna aktarıldı. Altı saat süreyle yumurtlama olduktan sonra erişkin *C. elegans*'lar petri kabından çıkarıldı. Bu yumurtalar senkronize olmuş yavruları oluşturdu. Bunlar üçüncü günün sonunda erişkin forma gelince çalışmada kullanıldı.

Antihelmintik Aktivitenin Belirlenmesi

Steril ve 200 mL hacimli beher içine 1 mL *Nigella sativa* tohum yağından koyuldu. Üzerine 99 mL daha önceden hazırlanan ve 55 °C'de sıvı halde bekletilen NGM'den eklenerek homojenize edildi. Nematotların yaşam süresi boyunca çoğalmalarını engellemek amacıyla besiyerine FUDR (33 µL, 150 mM FUDR/100 mL NGM) katıldı. Elde edilen mediyumdan 10'ar mL steril şartlar korunarak 6 mm çapındaki petrilere dağıtıldı ve oda ısısında katılaşmaları bekledi. Sonrasında üzerlerine *E. coli* OP50 suşundan 200 µL eklenerek kuruması bekledi.

Sonraki gruplar, %0,1, %0,01, %0,001, %0,0001'lik konsantrasyonlar şeklinde hazırlandı. Kontrol grubuna *Nigella sativa* tohum yağından eklenmedi.

Herbir konsantrasyondan 4 petri hazırlandı. Petrilere senkronizasyonu yapılmış ve erişkin *C. elegans*'dan 10'ar adet sterio mikroskop altında aktarıldı. Deney 18 gün sürdü ve deney gruplarındaki bütün nematotlar ölüncüye kadar her gün canlı ve ölü nematotlar kaydedildi. Çalışma 22 °C'de 3 kez tekrarlandı. Çalışmamızda yutak pompalama hareketlerini kaybetmiş olan *C. elegans*'lar ölü olarak kaydedildi.

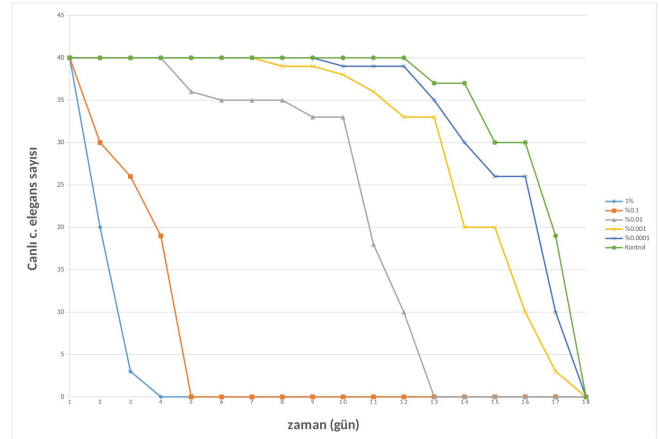
İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için One Way Anova testinin yanı sıra tukey testi kullanıldı. Bu amaçla SPSS 16.0

(SPSS, Chicago, IL, Amerika) istatistik programı kullanıldı ve %95 güven aralığında $p < 0,05$ değeri gruplar arası anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma bulgularımız incelendiğinde %1'lik konsantrasyonda petrilere bütün nematotların dördüncü gün sonunda öldüğü görüldü. Buna ilaveten %0,1'lik konsantrasyonda beşinci gün sonunda hiç canlı nematoda rastlanmazken, %0,01'lik konsantrasyonda ise 13'üncü gün sonunda petrilere bütün nematotların öldüğü tespit edildi (Şekil 2, Tablo 1). Veriler istatistiksel olarak incelendiğinde %0,1, %0,01, %0,001'lik konsantrasyon grupları ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli



Şekil 2. *Nigella sativa* tohum yağının *C. elegans*'lar üzerine antihelmintik etki grafiği

Tablo 1. *Nigella sativa* tohum yağının *C. elegans*'lar üzerine antihelmintik etkisi

Zaman (Gün)	Konsantrasyonlar					Kontrol
	1% (CNS)	%0,1 (CNS)	%0,01 (CNS)	%0,001 (CNS)	%0,0001 (CNS)	
1	40	40	40	40	40	40
2	20	30	40	40	40	40
3	3	26	40	40	40	40
4	0	19	40	40	40	40
5	0	0	36	40	40	40
6	0	0	35	40	40	40
7	0	0	35	40	40	40
8	0	0	35	39	40	40
9	0	0	33	39	40	40
10	0	0	33	38	39	40
11	0	0	18	36	39	40
12	0	0	10	33	39	40
13	0	0	0	33	35	37
14	0	0	0	20	30	37
15	0	0	0	20	26	30
16	0	0	0	10	26	30
17	0	0	0	3	10	19
18	0	0	0	0	0	0

CNS: Canlı nematot sayısı

olduğu görüldü ($p < 0,05$). Gruplar arası veriler incelendiğinde ise %0,1'lik konsantrasyon ile %0,01'lik konsantrasyon arasındaki fark önemsizken ($p > 0,05$) bu iki grubun diğer gruplar ile arasındaki fark önemli bulundu ($p < 0,05$).

TARTIŞMA

Çalışmamızda erişkin *C. elegans*'lar üzerine *Nigella sativa* tohum yağında %1 ve %0,1'lik konsantrasyonlarda antihelmintik etki tespit edilmiştir. Çalışmamızda bu etkinin yanı sıra apatojen bir nematod olan *C. elegans*'ların antihelmintik aktivitede bir model organizma olarak kullanılabilceği de gösterilmiştir.

Antihelmintik aktivite testlerinde *C. elegans*'ların model olarak kullanıldığı çalışmalar yeterli olmamakla birlikte literatürde mevcuttur. Yapılan bir çalışmada *Ocimum sanctum* uçucu yağının *C. elegans*'lar üzerinde antihelmintik etkileri NGM ortamında test edilmiş ve bitkinin güçlü bir antihelmintik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (12). Sudan'da yapılan bir çalışmada 14 bitki türünün su ekstraktlarının antihelmintik aktiviteleri araştırılmış ve model olarak *C. elegans*'lar kullanılmıştır. *Balanites aegyptiaca* ve *Sesbania sesban* türleri çalışmaya alınan bitkiler arasında en güçlü antihelmintik etkiye sahip bitkiler olarak gösterilmiştir (13). Kanada'da yapılan çalışmada 26000 adet kimyasal maddenin antihelmintik etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla patojen nematodların temsilcisi olarak *C. elegans*'lar kullanılmıştır. Çalışma sonucunda 14 yeni antihelmintik etkili kimyasal literatüre kazandırılmıştır (14). Bizim çalışmamızda da *C. elegans*'lar, gerek laboratuvar ortamında kolay üretilmesi, yer kaplamaması, çok fazla iş gücü gerektirmemesi gerekse apatojen olmasından dolayı enfeksiyon riskinin bulunmamasından ötürü güvenli çalışma ortamı sağlamasından dolayı model organizma olarak tercih edilmiştir.

Nigella sativa'nın nematodlara, tenyalara, kancalı kurtlara karşı esansiyel yağları üzerine yapılan antelmintik çalışmalar sonucu, nematodlara ve tenyalara karşı oldukça etkili bir aktivite gösterdiği gösterilmiştir (15). Yapılan bir çalışma sestot enfeksiyonu olan çocukların *Nigella sativa* tohumları ile tedavi edilebildiği bilgisi verilmiştir. Çalışmada *Nigella sativa* tohumları satın alınıp kurutulularak toz haline getirilmiştir. Nematot ve sestot enfeksiyonundan muzdarip altı çocuk kontrol grubu olarak tedavi edilmezken deney grubu olarak gruplanan çocuklar 20, 30 ve 40 mg/kg dozunda *Nigella sativa* oral yolla uygulanmış ve 3, 7 ve 15'inci günlerde 1 gr dışkı örneğindeki parazit yumurtaları kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda *Nigella sativa*'nın sestot enfeksiyonunu önemli bir şekilde azalttığı görülmüştür (16). Yine *Nigella sativa* tohumlarının antihelmintik amaçlı geleneksel tıpta kullanıldığına dair araştırmalar literatürde mevcuttur (17). Başka bir çalışmada *Hymenolepis nana* ile doğal olarak enfekte 28 isviçre albino faresi 3 gruba ayrılmıştır. Birinci grup kontrol grubu olarak tedavi edilmezken diğer iki gruba 2,5 mL/kg ve 5 mL/kg dozlarında *Nigella sativa* tohum yağı oral yolla verilmiştir. Gruplar incelendiğinde, 5 mL/kg dozunda *Nigella sativa* tohum yağı verilen grubun 14 gün sonunda tam olarak iyileştiği, bunun yanı sıra diğer grubun 21 gün sonra tam olarak iyileştiği bildirilmiştir (18). Yapılan başka bir çalışmada *Trichinella spiralis* ile enfekte ratlarda *Nigella sativa*'nın proflaktik ve terapötik etkisi araştırılmıştır. Çalışmada enfeksiyondan sonra 7'inci ve 20'inci günlerde bağırsakta yetişkin solucan sayısı, enfeksiyondan sonraki 60. günde kaslarda larva sayımı, parazitin üreme kapasitesi test edilmiş, *Trichinella spiralis* larvalarına karşı antikörlerin oluşumu ELISA

ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda iki hafta boyunca 5 mL/kg dozda oral yolla uygulanan *Nigella sativa* tedavisinin *Trichinella spiralis*'e karşı güçlü bir proflaktik ve terapötik etkisinin bulunduğunu bildirmişlerdir (19).

Nigella sativa'nın kimyasal bileşimi hakkında yapılan çalışmalar, bitki ekstraktının birçok organik bileşiği içerdiğini göstermektedir. Tohum ekstraktının bir GC-MS analizi, bunun sekiz yağ asidi ve 32 uçucu terpenin bir karışımı olduğunu göstermiştir. Analiz sonucu thymoquinone (30%-48%), thymohydroquinone, dithymoquinone, p-cymene (7%-15%), carvacrol (6%-12%), 4-terpineol (2%-7%), t-anethol (1%-4%), sesquiterpene longifolene (1%-8%) oranlarında tanımlanmıştır ve *Nigella sativa*'nın tıbbi etkilerinin bu bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (20-22).

Bizim çalışmamızda da *Nigella sativa* tohumlarının literatüre uyumlu bir şekilde antihelmintik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu veriler özellikle ilacına direnç geliştiren türlerin tedavisini açısından oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra çalışma bulgularımızın literatürdeki *in vivo* çalışmalarla uyumlu olması, *C. elegans*'ların bu gibi çalışmalarda model olarak kullanılmasının güvenilirliğini de göstermektedir.

SONUÇ

Yapılan antihelmintik çalışmaların birçoğu laboratuvar hayvanlarının parazitlerle enfekte edilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Laboratuvar hayvanlarıyla yapılan çalışmalar gerek iş gücü gerekse çalışma alanı açısından oldukça güçtür. Helmintlerin genellikle makroskopik boyutta olması ve birçoğunun kültürünün yapılarak laboratuvar ortamında üretilmemesi bilimsel çalışmalar için büyük bir engeldir. Bu çalışmada antihelmintik aktivite çalışmalarında *C. elegans*'ın iyi bir model olabileceği ve *Nigella sativa*'nın antihelmintik etkisi gösterilmiştir.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma Etik Kurul onayı gerektirmemektedir.

Hasta Onayı: Çalışmada hasta denek bulunmamaktadır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu tarafından değerlendirilmiştir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için herhangi bir finansal destek almamışlardır.

KAYNAKLAR

- Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *The Lancet*. 2006;367:1521-32.
- Drake L, Bundy D. Multiple helminth infections in children: impact and control. *Parasitology*. 2001;122:73-81.
- Gatti S, Lopes R, Cevini C, Ijaoba B, Bruno A, Bernuzzi A, et al. Intestinal parasitic infections in an institution for the mentally retarded. *Annals of Tropical Medicine Parasitology*. 2000;94:453-60.
- Tappeh KH, Mohammadzadeh H, Rahim RN, Barazesh A, Khashaveh S, Taherkhani H. Prevalence of intestinal parasitic infections among mentally disabled children and adults of Urmia, Iran. *Iranian journal of parasitology*. 2010;5:60-64.
- Kaminsky R, Ducray P, Jung M, Clover R, Rufener L, Bouvier J, et al. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*. 2008;452:176-180.

6. Smout MJ, Kotze AC, McCarthy JS, Loukas A. A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4:e885.
7. Sudama G. There are Observable Metabolic Signature Patterns in *C. elegans*: Specifically for Different Life Stages Grown with and without the Added Antioxidants Vitamin C and Vitamin E? 2008.
8. Friberg J. The control of growth and metabolism in *Caenorhabditis elegans*. Umeå centrum för molekylär patogener (UCMP) (Faculty of Medicine). 2006.
9. Okkema PG, Ha E, Haun C, Chen W, Fire A. The *Caenorhabditis elegans* NK-2 homeobox gene *ceh-22* activates pharyngeal muscle gene expression in combination with *pha-1* and is required for normal pharyngeal development. *Development*. 1997;124:3965-73.
10. Mango SE. The *C. elegans* pharynx: a model for organogenesis. *WormBook: The Online Review of C elegans Biology* [Internet]. WormBook; 2007.
11. Helrich K. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Arlington, VA: USA; 1990.
12. Asha M, Prashanth D, Murali B, Padmaja R, Amit A. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. *Fitoterapia*. 2001;72:669-70.
13. Ibrahim A. Anthelmintic activity of some Sudanese medicinal plants. *Phytotherapy Research*. 1992;6:155-7.
14. Mathew MD, Mathew ND, Miller A, Simpson M, Au V, Garland S, et al. Using *C. elegans* forward and reverse genetics to identify new compounds with anthelmintic activity. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10:e0005058.
15. Akhtar MS, Iqbal Z, Khan M, Lateef M. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo-Pakistan subcontinent. *Small Ruminant Research*. 2000;38:99-107.
16. Akhtar MS, Riffat S. Field trial of *Saussurea lappa* roots against nematodes and *Nigella sativa* seeds against cestodes in children. *J Pak Med Assoc*. 1991;41:185-7.
17. Tariq M. *Nigella sativa* seeds: folklore treatment in modern day medicine. *Saudi journal of gastroenterology*. 2008;14:105-6.
18. Al-Megrin WA. Efficacy of black seeds oil (*Nigella sativa*) against *Hymenolepis nana* in infected mice. *European Journal of Medicinal Plants*. 2016;13:1-7.
19. Abu NEE. Effect of *Nigella sativa* and *Allium cepa* oils on *Trichinella spiralis* in experimentally infected rats. *Journal of the Egyptian society of parasitology*. 2005;35:511-23.
20. Khan MA, Afzal M. Chemical composition of *Nigella sativa* Linn: part 2 recent advances. *Inflammopharmacology*. 2016;24:67-79.
21. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2013;3:337-52.
22. Neela M, Rahul V, Usha S. A Review on Anthelmintic Potential of Herbs Mentioned in Siddha Medicine. *Journal of Medical Science and Clinical Research*. 2017;2:17432-6.