Archive of SID

Original Article

Effect of Aqueous Extract of Peganum harmala on Acanthamoeba In Vitro

Tooran Nayeri Chegeni[1], Fatemeh Ghaffarifar[1*], Fariba Khoshzaban[2], Abdolhossein Dalimi Asl[1]

[1]Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[2]Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.

[*]Corresponding Author:
Fatemeh Ghaffarifar;
Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Email: ghafarif@modares.ac.ir

Received: 29 Sep, 2017

Accepted: 15 Nov, 2017

Abstract

Background and Objectives: Many plant extracts have antiparasitic properties and even some of them are effective for *in vivo* treatment. One of the medicinal plants is *Peganum harmala*, which can grow from 30 to 100 cm. The aim of the present study was to determine the effect of aqueous extract of *Peganum harmala* on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba in vitro*.

Methods: In this experimental study, a sample from a patient with amoebic keratitis, was cultured with *Escherichia coli* bacterium in non-nutrient agar medium (NNA) 1.5%. Then, the aqueous extract of *Peganum harmala* was prepared. The extract was affected on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* at three times (24, 48, and 72h) in various concentrations (1.25, 2.5, 5, and 10mg/ml). The percentage of live parasites, was evaluated using homocytometer lamel, MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], and flow cytometry method. The data were analyzed using one-way ANOVA, one sample Kolmogorov-Smirnov test, and repeated measures test The significance level was considered to be $p<0.05$.

Results: The extract showed dose- and time-dependent activity on trophozoites and cysts. In the presence of 10 mg/ml aqueous extract in culture medium, 32.47% of the trophozoites and 50.15% of the cysts, were alive after 72 hours.

Conclusion: Our study indicated that the aqueous extract of the *Peganum harmala*, has anti-*Acanthamoeba* activity. Therefore, it is recommended that the effect of *Peganum harmala* extract be studied in animal models.

Keywords: *Acanthamoeba; Peganum harmala*; *In vitro* techniques.

www.SID.ir

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دوازدهم، شماره ششم، شهریور ۹۷
صفحه ۲۰ الی ۲۸
Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تأثیر عصاره آبی اسپند بر آکانتامبا در شرایط برون‌تنی

توران نیری‌چگنی[۱]، فاطمه غفاری‌فر[۱]*، فریبا خوش‌زبان[۲]، عبدالحسین دلیمی‌اصل[۱]

چکیده

زمینه و هدف: بسیاری از عصاره‌های گیاهی، خواص ضدانگلی دارند و حتی بعضی برای درمان در *in vivo* مؤثرند. یکی از گیاهان دارویی، اسپند (*Peganum harmala*) است که می‌تواند از ۱۰۰-۳۰ سانتی‌متر رشد کند. هدف مطالعه حاضر تعیین اثر عصاره آبی اسپند بر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در شرایط برون‌تنی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، یک نمونه از بیمار با کراتیت آمیبی در محیط کشت آگار غیرمغذی ۱/۵٪ (Non Nutrient Agar, NNA) همراه با باکتری *اشرشیاکلی* کشت داده شد. سپس عصاره آبی اسپند تهیه گردید. عصاره در سه زمان (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) در غلظت‌های مختلف (۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا اثر داده شد. درصد انگل‌های زنده با استفاده از لام هموسیتومتر، آزمون MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] و فلوسایتومتری ارزیابی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های واریانس یک‌طرفه، آزمون کولموگروف- اسمیرنوف یک‌نمونه‌ای و اندازه‌گیری‌های تکراری تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: عصاره، فعالیت ضدآمیبی وابسته به دوز و زمان روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌ها را نشان داد. در حضور ۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر عصاره در محیط کشت پس از ۷۲ ساعت، ۳۲/۴۷٪ از تروفوزوئیت‌ها و ۵۰/۱۵٪ از کیست‌ها زنده بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد عصاره آبی اسپند، فعالیت ضدآکانتاموبایی دارد؛ بنابراین مطالعه روی حیوانات آزمایشگاهی جهت تأثیر عصاره پیشنهاد می‌گردد.

کلید واژه‌ها: آکانتاموبا؛ اسپند؛ شرایط آزمایشگاهی.

[۱]گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت‌مدرس، تهران، ایران.

[۲]گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
فاطمه غفاری‌فر؛ گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت‌مدرس، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
ghafarif@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۷

تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۲۴

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Nayeri Chegeni T, Ghaffarifar F, Khoshzaban F, Dalimi Asl AB. Effect of aqueous extract of *Peganum harmala* on Acanthamoeba *in vitro*. Qom Univ Med Sci J 2018;12(6):20-28. [Full Text in Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

آکانتاموبا (Acanthamoeba)، در محیط‌های مختلف (آب، خاک، هوا) و در سرتاسر کره زمین یافت می‌شود. کیست‌های این آمیب در مقابل خشکی مقاوم بوده و شانس تلقیح این کیست‌ها در سطوح مخاطی زیاد است. آکانتاموبا می‌تواند عامل عفونت مزمن سیستم اعصاب مرکزی به‌نام انسفالیت آمیبی گرانولوماتوز (Granulomatous amoebic encephalitis) و عفونت خطرناک چشمی به‌نام کراتیت آکانتاموبایی (Acanthamoeba keratitis) باشد. از دیگر عفونت‌های ایجادشده به‌وسیله آکانتاموبا می‌توان به عفونت گرانولومای مزمن پوست و سایر بافت‌ها، تهاجم به استخوان و متعاقباً استئومیلیت اشاره کرد.

آمیب‌ها به‌وسیله جریان خون و عمدتاً از طریق دستگاه تنفسی تحتانی یا زخم‌های پوستی یا مخاطی به مغز می‌رسند. این بیماری غالباً مزمن و دارای یک سیر طولانی بوده که عمدتاً در افراد ناتوان یا دچار ضعف ایمنی دیده می‌شود و درمقابل، کراتیت افراد سالم را نیز درگیر می‌کند. افزایش شدید موارد بیماری از سال ۱۹۸۵، به استفاده از لنزهای تماسی، به‌ویژه لنزهای نرم مرتبط دانسته شده است (۲،۱). آکانتاموبا می‌تواند طیف گسترده‌ای از اسمولاریته، دما، شوری و PH را تحمل کند؛ بنابراین قادر است در آب مقطر، کشت بافت و مایعات بدن پستانداران زنده بماند (۳).

تاکنون هیچ عامل شیمیایی به‌عنوان تنها درمان مؤثر علیه کراتیت آکانتاموبایی شرح داده نشده است. فاکتورهای زیادی، ازجمله طیف وسیعی از ویرولانس در ایزوله‌های مختلف باعث می‌گردد تا ایجاد رابطه بین فعالیت *in vitro* و *in vivo* غیرممکن شود (۴). در حال حاضر، بیگوانیدهایی نظیر پلی‌هگزا متیلین بیگوانید، از منابع موضعی مؤثر علیه تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا شناخته شده‌اند (۶،۵)، که در غلظت‌های پایین نیز مؤثرند (۰/۰۲٪)، اما برای سلول‌های قرنیه انسان سمّی هستند (۷). داروی کلروهگزیدین علیه هر دو شکل آمیب مؤثر بوده و در حداقل غلظت برای سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه سمّی نیست (۹،۸،۵). اثرهای جانبی داروهای شیمیایی، الزامات زیست‌محیطی و گرایش به‌سوی فرآورده‌های طبیعی سبب شده است تا به‌ویژه در دهه اخیر، استفاده از گیاهان دارویی درکشورهای پیشرفته افزایش یابد (۱۱،۱۰). از گیاه اسپند در طب سنتی به‌عنوان ماده‌ای خواب‌آور، تعریق‌آور، ضدانگل، قائده‌آور، سقط‌کننده جنین، ضدسرطان، ضدباکتری، محرک سیستم عصبی و بازدارنده آنزیم مونوآمینواکسیداز استفاده می‌شود (۱۳،۱۲). ترکیبات آلکالوئیدی دانه اسپند، روند تولید نوروترانسیمترهای دوپامین و سروتونین را به‌صورت وابسته به دوز تحریک می‌کنند (۱۵،۱۴).

Levchenko از اولین کسانی بود که اثر درمانی اسپند را بر تیلریوز گاوی ارزیابی کرد (۱۶). اثرات ضدانگلی عصاره اسپند بر روی سایر انگل‌ها نیز بررسی شده است. متولی‌حقی و همکاران، اثر عصاره الکلی اسپند بر روی پلاسمودیوم برگئی در موش سفید کوچک آزمایشگاهی و خوش‌زبان و همکاران، تأثیر پگانوم هارمالا را بر توکسوپلاسموزیس حاد، مورد بررسی قرار دادند (۱۸،۱۷). دیبا و همکاران در مطالعه خود به بررسی میزان مهارکنندگی عصاره الکلی دانه گیاه اسپند بر روی گونه‌های کاندیدا و آسپرژیلوس در شرایط آزمایشگاهی پرداختند (۱۹). در مطالعه‌ای دیگر فروزنده و همکاران با بررسی اثر ضدسرطانی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه اسپند بر روی سلول‌های کارسینومای اپی‌تلیال گردن رحم انسان نشان دادند عصاره اسپند با اثر وابسته به دوز و زمانبر سلول‌های سرطانی HeLa می‌تواند باعث مهار رشد این سلول‌ها شود (۲۰). در این پژوهش با توجه به ویژگی‌هایی که عنوان شد، اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی دانه اسپند بر روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در شرایط آزمایشگاهی در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی گردید.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، نمونه مورد استفاده از یک بیمار مبتلا به کراتیت آکانتاموبایی جدا و در محیط کشت NNA همراه با باکتری *اشرشیاکلی*، (به‌عنوان منبع تغذیه) کشت داده شد و در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردید. پس از استخراج DNA، تکثیر ژن 18**S** rRNA با استفاده از روش PCR انجام گرفت که نمونه مثبت بود و نتایج تعیین توالی و BLAST search نشان داد ژنوتایپ نمونه، T4 می‌باشد (BankIt1899920 seq5 KU877552)، این ژنوتایپ مسئول

www.SID.ir

Archive of SID

ایجاد بیش از ۹۰٪ از موارد کراتیت آکانتاموبایی است (۴). همانند مطالعات پیشین (۲۱)، آکانتاموبا روی پلیت‌های کشت NNA همراه با باکتری *اشرشیاکلی* در ۲۶ درجه سانتیگراد کشت داده شد. پلیت‌های حاوی تروفوزوئیت‌ها، بعد از مدت زمان ۹۶-۷۲ ساعت، با محلول سالین استریل دوبار شست‌وشو داده شدند، سپس با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، ۲ بار سانتریفوژ شدند. همچنین پلیت‌های حاوی کیست‌ها نیز ۳ هفته بعد، با محلول سالین استریل شست‌وشو داده شدند، سپس با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، ۲ بار سانتریفوژ شدند. تعداد تروفوزوئیت‌ها و کیست‌ها با تریپان‌بلو (Trypan blue) و شمارش مستقیم تروفوزوئیت بر روی لام نئوبار تعیین گردید. غلظت نهایی، ۱۵×۱۰^{۴} تروفوزوئیت یا کیست برمیلی‌لیتر بود و تروفوزوئیت‌ها و کیست‌ها بلافاصله در آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند (۲۲).

در این مطالعه، تحت نظارت کارشناس دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی، اسپند (با شماره هرباریومی ۱۱۷۹) خریداری شد. مقدار ۵۰ گرم از دانه اسپند آسیاب و در یک بِشر ریخته شد، بعد از افزودن ۲۰۰ میلی‌لیتر آب روی آن، ۶۰-۳۰ دقیقه روی حرارت بسیار ملایم قرار گرفت و پس از جوشیدن (بعد از ۵ دقیقه) به‌وسیله کاغذ صافی، صاف گردید. سپس مایع صاف‌شده در بن‌ماری ۷۰-۶۰ درجه سانتیگراد گذاشته شد تا حالت عسلی پیدا کند (۲۳). در ادامه، عصاره به‌دست‌آمده درون ظرف‌های مسطح بزرگ (جهت خشک‌شدن) ریخته شد و در انکوباتور قرار گرفت. در نهایت، عصاره خشک حاصل تا زمان استفاده، در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. در مرحله بعد، ۲۰ میلی‌گرم عصاره خشک در ۱۰ میکرولیتر DMSO حل و با آب مقطر به حجم ۱ میلی‌لیتر رسید و غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر از عصاره تهیه گردید.

تحت شرایط استریل و زیر هود، به هر میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون تروفوزوئیت یا کیست حاوی تعداد ۱۵×۱۰^{۴} انگل آکانتاموبا که از محیط NNA به دست آمده بود اضافه گردید، سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آبی اسپند در غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵ و ۲/۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر، به میکروتیوپ‌های حاوی انگل افزوده شد.

درادامه، میکروتیوپ‌ها به انکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد منتقل شدند و آزمایش‌ها به‌صورت ۳ بار تکرار صورت گرفت. تأثیر عصاره‌ها بر تروفوزوئیت یا کیست انگل آکانتاموبا در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی گردید. تمامی آزمایش‌ها شامل یک کنترل مثبت (انگل و قطره پلی‌هگزانايد ۰/۰۲٪) و یک کنترل منفی (سوسپانسیون تروفوزوئیت یا کیست و آب مقطر استریل حاوی DMSO ۱٪) بود. از قطره پلی‌هگزانايد ۰/۰۲٪ (به‌عنوان کنترل مثبت) تنها جهت مقایسه تأثیر داروی شیمیایی پلی‌هگزانايد ۰/۰۲٪ با عصاره آبی اسپند استفاده شد.

انگل و غلظت‌های مختلف عصاره در ۳۰ درجه سانتیگراد در مجاورت هم قرار داده شدند و پس از طی دوره زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۲۰ میکرولیتر از محلول آزمایش با همان حجم از محلول تریپان‌بلو مخلوط و در دمای اتاق به مدت ۳ دقیقه انکوبه شد و شمارش با لام نئوبار صورت گرفت (پس از رنگ‌آمیزی، انگل‌های زنده فاقد رنگ بوده، ولی غیرزنده‌ها رنگ می‌گیرند.)

داده‌های حاصل از تأثیر عصاره‌ها بر انگل، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸، آزمون مقایسه سه یا چند گروه وابسته (اندازه‌گیری‌های تکراری یا Repeated Measures)، همچنین آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (جهت تعیین درصد معنی‌داری)، آزمون کولموگروف- اسمیرنوف یک‌نمونه‌ای (برای بررسی فرض نرمال بودن متغیرهای مورد مطالعه) تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

برای بررسی اثربخشی عصاره آبی اسپند بر تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا، غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر از عصاره تهیه و بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تأثیر عصاره آبی اسپند بر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا، با استفاده از رنگ حیاتی تریپان‌بلو، تعداد تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های زنده در مقایسه با گروه کنترل شمارش شدند. تعداد تروفوزوئیت‌های زنده آکانتاموبا در غلظت ۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر و زمان ۷۲ ساعت به ۳۲/۴۷٪ رسید، اما در غلظت ۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، تعداد تروفوزوئیت‌های زنده آکانتاموبا به ترتیب

www.SID.ir

Archive of SID

۴۳/۷۸ و ۳۶/۲۱٪ بود. اثر افزایش زمان و غلظت عصاره آبی اسپند بر کاهش تروفوزوئیت‌های زنده آکانتاموبا، معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۵$) بود. درصد کیست‌های زنده بعد از ۲۴ ساعت در بالاترین غلظت عصاره (غلظت ۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) به ۶۷/۴۵٪ و بعد از ۴۸ ساعت به ۶۴/۳۴٪ و بعد از ۷۲ ساعت به ۵۰/۱۵٪ رسید.

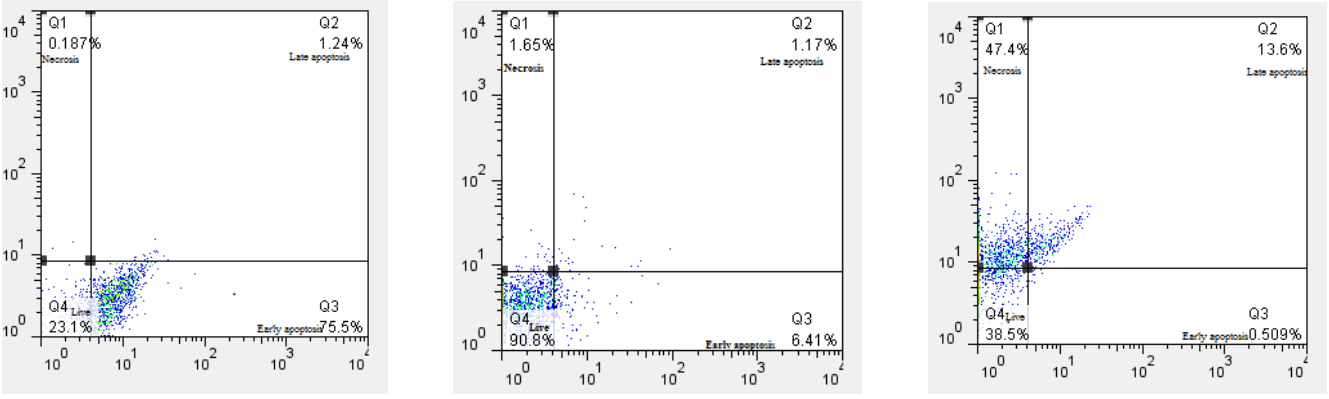
کاهش کیست‌های زنده آکانتاموبا با افزایش زمان و غلظت عصاره آبی اسپند، معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۵$) بود. درصد تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های زنده آکانتاموبا، ۷۲ ساعت بعد از تأثیر قطره پلی‌هگزانايد ۰/۰۱٪ به ترتیب به صفر و ۲۳/۷۱٪ رسید. از MTT جهت تأیید نتایج استفاده گردید که نتایج حاصل از MTT نیز داده‌های فوق را تأیید کرد (جدول).

جدول: درصد زنده ماندن تروفوزوتیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا پس از تأثیر قطره پلی‌هگزانايد و غلظت‌های مختلف عصاره آبی اسپند

دوز	تأثیر روی	زمان آزمایش ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت		
۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر	تروفوزوئیت	۴۳/۷۸±۸/۸۰	۳۶/۲۱±۹/۴۲	۳۲/۴۷±۶/۸۳
	کیست	۶۷/۴۵±۳/۶۳	۶۴/۳۵±۰/۰۹	۵۰/۱۵±۸/۹۹
۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر	تروفوزوئیت	۵۶/۹۸±۶/۳۲	۵۵/۸۹±۳/۵۵	۴۹/۰۴±۸/۶۰
	کیست	۷۸/۵۶±۶/۹۶	۷۰/۸۷±۶/۳۳	۶۳/۹۳±۰/۱۷
۲,۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر	تروفوزوئیت	۸۲/۲۱±۷/۶۹	۷۹/۰۴±۷/۲۹	۷۱/۱۰±۷/۷۰
	کیست	۸۶/۵۲±۶/۹۶	۸۶/۱۸±۶/۴۳	۶۹/۸۳±۷/۶۵
۱,۲۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر	تروفوزوئیت	۹۷/۷۷±۳/۸۵	۹۲/۸۵±۷/۱۴	۷۸/۸۸±۷/۶۲
	کیست	۱۰۰±۰	۹۷/۷۷±۳/۸۵	۷۴/۵۲±۲/۰۷
کنترل مثبت (قطره پلی‌هگزانايد)	تروفوزوئیت	۶۹/۰۴±۴/۱۲	۳۵/۶۷±۶/۲۰	۰/۰۰
	کیست	۷۹/۵۲±۰/۸۲	۵۲/۳۷±۵/۳۰	۲۳/۷۱±۲/۶۷
کنترل منفی	تروفوزوئیت	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰
	کیست	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰

داده‌ها حاصل میانگین حداقل سه تکرار مستقل می‌باشند.

مقدار LD_{50}، بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از نرم‌افزار پریسم نسخه ۵ (Graphpad prism 5) محاسبه گردید. براساس نتایج حاصله، مقدار LD_{50} عصاره آبی اسپند، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تأثیر بر تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا به ترتیب ۸/۶۳۵ و ۷/۹۷۸ و ۶/۱۸۷ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود؛ درحالی‌که مقدار LD_{50} عصاره آبی اسپند، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تأثیر بر کیست‌های آکانتاموبا به ترتیب ۲۰/۹۶، ۱۳/۱۹ و ۷/۷۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر به‌دست آمد.



نتایج فلوسایتومتری | اسپند آبی کنترل منفی | قطره پلی‌هگزانايد

شکل: آنالیز فلوسایتومتری کیست‌های آکانتاموبا.
نمونه‌ها: کنترل منفی (بدون حضور دارو)، عصاره آبی اسپند و کنترل مثبت (قطره پلی‌هگزانايد ۰/۰۱٪).

www.SID.ir

Archive of SID

برای افتراق انگل دچار نکروز و آپوپتوز آکانتاموبای مواجه با دوزهای مختلف عصاره آبی اسپند، از روش رنگ‌آمیزی آنکسین V (Annexin-V) استفاده گردید. در گروه کنترل منفی پس از ۷۲ ساعت، درصد سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی، ۷/۵۸٪ بود و در نمونه تحت درمان با اسپند آبی (۷۲ ساعت پس از درمان)، میزان مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی، ۱۴/۱۰٪ نشان داده شد. در نمونه‌های تحت درمان با قطره پلی‌هگزانايد، بیشترین میزان آپوپتوز اولیه و تأخیری، ۷۶/۷۴٪ (۷۲ ساعت پس از درمان) نشان داده شد.

بحث

کراتیت آکانتامبایی، بیماری تخریب‌کننده بافت استرومای قرنیه بوده که متعاقب استفاده از لنزهای تماسی نرم رخ می‌دهد. در سال‌های اخیر، روش‌های درمانی مختلفی مورد ارزیابی قرار گرفته است، اما هیچ‌کدام در معالجه بالینی و پارازیتولوژیکی تأثیر پایداری نداشته است. یک فاکتور مهم در درمان بیماری، کشت و تشخیص سریع سویه‌های آکانتامبا، همچنین بررسی و سنجش عوامل ضدانگلی می‌باشد. این روش پزشک را برای برنامه‌ریزی، به‌منظور دست‌یابی به بهترین نتایج یاری می‌کند (۲۴). محققین معتقدند عامل ضدآمیبی علیه گونه‌های آکانتاموبا زمانی دارای ارزش بالینی است که باعث تخریب هر دو مرحله تروفوزئیتی و کیستی آمیب شود. نتایج تمام آزمایش‌های داروشناسی بر روی انگل، نشان می‌دهد فرم تروفوزئیتی انگل بسیار حساس‌تر از فرم کیستی آن می‌باشد (۲۶،۲۵).

در مطالعه حاضر تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی اسپند بر روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در محیط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت که براساس نتایج حاصل، درصد کشندگی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌ها با افزایش غلظت و افزایش زمان مجاورت عصاره در زمان معین افزایش یافت.

درصد زنده‌ماندن تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی اسپند در بالاترین غلظت عصاره (۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) بعد از ۷۲ ساعت به ترتیب به ۳۲/۴۷ و ۵۰/۱۵٪ رسید. طبق نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان گفت عصاره آبی اسپند دارای یک فعالیت ضدآمیبی وابسته به دوز و زمان بر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا بوده که داده‌های حاصل از مطالعات دیگر نیز این نتایج را تأیید می‌کنند.

در مطالعه‌ای توسط My Chu و همکاران، فعالیت ضدآمیبی ۱۰۰ عصاره گیاهی قطبی و ۱۰۰ عصاره گیاهی غیرقطبی به‌دست‌آمده از جنوب آسیا در شرایط آزمایشگاهی در مقابل سه گونه از آکانتاموبا (*کاستلانی*، *کولبرتسونی* و *پلی‌فاگا*) ارزیابی شد که از این میان، ۴ عصاره نیلوفر پیچ (*Ipomoea sp*)، زنجبیل معطر (*Kaempferia galanga Canaga odorata* و Gastrochilus *panduratum*، برای هر سه گونه آکانتاموبا ضدآمیب بودند. عصاره‌ها برای *آکانتاموبا پلی‌فاگالیتیک*، *آکانتاموبا کاستلانی* و *کولبرتسونی* دارای خاصیت مهارکنندگی رشد بودند (۲۷). در مطالعه‌ای توسط Polat و همکاران، فعالیت ضدآمیبی عصاره متانولی آویشن (*Thymus sipyleus subsp*) درمقابل *آکانتاموبا کاستلانی* مورد ارزیابی قرار گرفت که اثر عصاره قطبی در غلظت‌های ۳۲-۱ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر روی تکثیر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های *آکانتاموبا کاستلانی* در شرایط آزمایشگاهی سنجش شد و مشخص گردید از بخش قطبی عصاره متانولی می‌توان به‌عنوان یک عامل طبیعی برای درمان عفونت‌های آکانتاموبایی استفاده کرد (۲۸).

در مطالعه‌ای دیگر، Polat و همکاران با بررسی فعالیت ضدآمیبی عصاره چهار گونه سیر (*Allium sp*) با غلظت‌های ۳۲-۱ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر روی *آکانتاموبا کاستلانی* نشان دادند *A.scrodoprosum* اثر ضدآمیبی قابل‌توجهی روی *آکانتاموبا کاستلانی* دارد، درحالی‌که بقیه غیرفعال هستند (۲۹).

Malatiali و همکاران نیز در مطالعه خود با ارزیابی فعالیت ضدآمیبی عصاره‌های متانولی چهار گونه شوید (*Peucedanum caucasicum*، *P.palimbioides*، *P.chryseum*، *P.longibracteolatum*) در شرایط آزمایشگاهی بر روی کیست‌ها و تروفوزوئیت‌های *آکانتاموبا کاستلانی* نشان دادند در میان عصاره‌های آزمایش‌شده، *P. longibracteolatum* قوی‌ترین اثر را دارد و در غلظت ۳۲ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر، تروفوزوئیت‌ها و کیست‌ها بین ۲۴ و ۷۲ ساعت از بین می‌روند که عصاره در غلظت ۱۶ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر درمقابل تروفوزوئیت‌ها، نتایج مشابهی داشت (۲۲).

www.SID.ir

Archive of SID

در همه این مطالعات، عصاره‌ها یک فعالیت ضدآمیبی وابسته به دوز و زمان را بر روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا داشته‌اند.

در یک پژوهش با بررسی تأثیر عصاره الکلی و آبی گیاه گندواش بر روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در شرایط برون‌تنی، مشخص گردید عصاره‌های آبی و الکلی گیاه گندواش یک فعالیت ضدآمیبی وابسته به دوز و زمان را بر آکانتاموبا دارند (۲۱). شربت‌خوری و همکاران در مطالعه‌ای با بررسی اثر عصاره الکلی دانه اسپند بر *پلاسمودیوم فالسی‌پاروم* و مقایسه آن با کلروکین در شرایط *in vitro* عصاره اسپند در ۴ غلظت (۱۲/۵۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) بر روی انگل‌های جداشده از نمونه خون ۲۳ بیمار مبتلا با *پلاسمودیوم فالسی‌پاروم*، نشان دادند عصاره الکلی دانه اسپند می‌تواند تا حدود زیادی مانند داروی کلروکین مانع رشد انگل *پلاسمودیوم فالسی‌پاروم* شود (۳۰).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد عصاره آبی اسپند در غلظت‌های مختلف بر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا مؤثر است؛ لذا پیشنهاد می‌گردد مدل حیوانی و انسانی جهت تعیین اثر این گیاه بر روی رشد و تکثیر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا بررسی شود. همچنین تحقیقات و بررسی‌های بیشتری در زمینه ماده مؤثره گیاه اسپند صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی پزشکی در جلسه کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت‌مدرس (به شماره ۸۶۳۵/د۵۲ مورخ ۱۳۹۳/۱۲/۲) به تصویب رسیده است. بدین وسیله، از تمامی همکاران محترم گروه و معاونت پژوهشی دانشگاه و دانشکده، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References:

1. Saebi E. Parasitic diseases in Iran. Tehran: Aeezh Pub; 1998. p. 154. [Text in Persian]
2. John DT, Petri WA, Markell EK, Voge M. Markell and Voge's medical parasitology. 9th ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2006.
3. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, et al. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. Pathol Biol (Paris) 2012;60(6):399-405. PubMed
4. Astorga B, Lorenzo-Morales J, Martin-Navarro CM, Alarcon V, Moreno J, Gonzalez AC, et al. *Acanthamoeba* Belonging to T3, T4, and T11: Genotypes Isolated from Air-Conditioning Units in Santiago, Chile. J Eukaryot Microbiol 2011;58(6):542-4. PubMed
5. Lim N, Goh D, Bunce C, Xing W, Fraenkel G, Poole TR, et al. Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. Am J Ophthalmol 2008;145(1):130-5. PubMed
6. Martin-Navarro CM, Lorenzo-Morales J, Cabrera-Serra MG, Rancel F, Coronado-Alvarez NM, Pinero JE, et al. The potential pathogenicity of chlorhexidine-sensitive *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. J Med Microbiol 2008;57(Pt 11):1399-404. PubMed
7. Lee JE, Oum BS, Choi HY, Yu HS, Lee JS. Cysticidal effect on *Acanthamoeba* and toxicity on human keratocytes by polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. Cornea 2007;26(6):736-41. PubMed
8. Ferrari G, Matuska S, Rama P. Double-biguanide therapy for resistant *Acanthamoeba* keratitis. Case Rep Ophthalmol 2011;2(3):338-42. PubMed

www.SID.ir

Archive of SID

9. Itahashi M, Higaki S, Fukuda M, Mishima H, Shimomura Y. Utility of real-time polymerase chain reaction in diagnosing and treating *Acanthamoeba* keratitis. Cornea 2011;30(11):1233-7. PubMed

10. Farzaneh M, Ghorbani-Ghouzhdi H, Ghorbani M, Hadian J. Composition and antifungal activity of essential oil of *Artemisia sieberi Bess.* on soil-borne phytopathogens. Pak J Biol Sci 2006;9(10):1979-82. Link

11. Lai F, Wissing SA, Müller RH, Fadda AM. *Artemisia arborescens L* essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. AAPS Pharm Sci Tech 2006;7(1):E10. PubMed

12. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Pub; 1994.

13. Mahmoudian M, Jalipour H, Dardashti PS. Toxicity of *Peganum harmala*: Review and a case report. Iranian J Pharmacol Ther 2002;1(1):1-4. Link

14. Abdel-Fattah A-FM, Matsumoto K, Gammaz HA-K, Watanabe H. Hypothermic effect of harmala alkaloid in rats: involvement of serotonergic mechanism. Pharmacol Biochem Behav 1995;52(2):421-6. PubMed

15. Adell A, Biggs T, Myers R. Action of harman (1-methyl-β-carboline) on the brain: Body temperature and in vivo efflux of 5-HT from hippocampus of the rat. Neuropharmacol 1996;35(8):1101-7.Link

16. Levchenko F. Comparative study of 3 chemotherapeutic preparations against natural theileriasis in cattle. Trudy Nauchno Issledovatel'skogo Veterinarnogo Instituta Tadzhikskoi SSR 1978;8:117-9.

17. Motevalli-Haghi A, Nateghpour M, Edrisian GH, Souri E, Satvat M. Evaluation of the effectiveness of ethanolic extract of *Peganum harmala l.* against *Plasmodium bergheiin* comparison with chloroquine in sourian mice using invivo tests. J Sch Public Health Instit Public Health Res 2003;2(1):47-51. [Full Text in Persian] Link

18. Khoshzaban F GF, Sharafi M, Khorshivand Z. Effects of *Peganum harmala* in a mouse model of acute toxoplasmosis. Daneshvar Med 2008;15(75):27-36. [Full Text in Persian] Link

19. Diba K, Shoar MG, Sharbatkhori M, Khorshivand Z. Anti fungal activity of alcoholic extract of *Peganum harmala* seeds. J Med Plant Res 2011;5(23):5550-4. [Full Text in Persian] Link

20. Forouzandeh F, Salimi S, Naghsh N, Zamani N, Jahani S. Evaluation of anti-cancer effect of *Peganum harmala* L. hydroalcholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line. J Shahrekord Univ Med Sci 2014;16(4):1-8. [Full Text in Persian] Link

21. Nayeri Chegeni T, Ghaffarifar F, Khoshzaban F, Dalimi Asl. The effects of artemisinin and aqueous and alcoholic extracts of *Artemisia annua* on *Acanthamoeba* genotype T4 in Vitro. Modares J Med Sci 2016;19(2):75-87. [Full Text in Persian] Link

22. Malatyali E, Tepe B, Degerli S, Berk S, Akpulat HA. In vitro amoebicidal activity of four *Peucedanum* species on *Acanthamoeba* castellanii cysts and trophozoites. Parasitol Res 2012;110(1):167-74. PubMed

23. Abbasi N, Azizi Jalilian F, Abdi M, Saifmanesh MA. Comparative study of the antimicrobial effect of Scrophularia striata boiss. Extract and selective antibiotics against *Staphylococcus* aureus and *Pesudomonas aeroginosa*. J Med Plants 2007;1(21):8-10. [Full Text in Persian] Link

24. Hirst LW, Green WR, Merz W, Kaufmann C, Visvesvara G, Jensen A, et al. Management of *Acanthamoeba* keratitis: A case report and review of the literature. Ophthalmology 1984;91(9):1105-11. PubMed

25. Schuster FL, Visvesvara GS. Opportunistic amoebae: Challenges in prophylaxis and treatment. Drug Resist Updat 2004;7(1):41-51. PubMed

26. Slater CA, Sickel JZ, Visvesvara GS, Pabico RC, Gaspari AA. Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. N Engl J Med 1994;331(2):85-7. PubMed

27. Chu DM, Miles H, Toney D, Ngyuen C, Marciano-Cabral F. Amebicidal activity of plant extracts from Southeast Asia on *Acanthamoeba* spp. Parasitol Res 1998;84(9):746-52. PubMed

www.SID.ir

Archive of SID

28. Polat ZA, Tepe B, Vural A. In vitro effectiveness of *Thymus sipyleus subsp*. sipyleus var. sipyleus on *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential on corneal cells. Parasitol Res 2007;101(6):1551-5. PubMed

29. Polat ZA, Vural A, Tepe B, Cetin A. In vitro amoebicidal activity of four *Allium* species on *Acanthamoeba* castellanii and their cytotoxic potentials on corneal cells. Parasitol Res 2007;101(2):397-402. PubMed

30. Sharbatkhori M, Nateghpur M, Edrisian Gh, Sori E, Moheb Ali M, Akbarzadeh K, et al. Cidal activity of *Peganum harmala* on *Plasmodium falciparum* and comparing with Chloroquine in vitro. J Urmia Med Sci Univ 2007;17(2):101-8. [Full Text in Persian] Link

www.SID.ir