

Effects of *Zataria*, *Mentha Pulegium*, *Oregano* spp Essential Oil and Hydroalcoholic Extract of *Hypericum perforatum* on Cyst of *Acanthamoeba* spp In Vitro

Ali Arjmand Shabestary¹, Mahmoud Khaloei², Mohammad Arjomandzadegan³, Zahra Eslamirad⁴, Reza Ghasemikhah^{5*}

1. Assistant Professor, Department of Pediatrics, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2. Medicine Student, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3. Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

4. Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

5. Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 30 Aug 2017, Accepted: 16 Oct 2017

Abstract

Background: Resistance of *Acanthamoeba* cysts causes recurrence of the disease; so, the patient should be monitored regularly. The aim of the study was to examine the effect of a few herbal materials on *Acanthamoeba* cysts in vitro.

Materials and Methods: Essential oils (EOs) of *Zataria*, *Mint*, and *Oregano* were prepared by steam distillation. The EOs and *Hypericum perforatum* extract were prepared in three concentrations (0.6%, 1% and 10%). *Acanthamoeba* cysts in various time intervals (30, 60, 120, 180 and 1440 minutes) were exposed with plant extracts. Then, the viability of parasite was investigated by eosin 0.1%.

Results: Comparison of the parasite mortality rate between control and case groups showed that the mortality of *Acanthamoeba* cysts was higher in the case groups that exposed to herbal materials. At the equal concentration (10%) and time (24 h), the *Zataria* and *mint* EOs produced the highest (22%) and lowest (4%) mortality, respectively. The results showed the mortality rate of *Acanthamoeba* was time-dependent.

Conclusion: *Zataria* showed the most fatality effect against *Acanthamoeba* cysts. In this respect, clinical trial studies are suggested.

Keywords: *Acanthamoeba* cyst, Essential oil, *Hypericum perforatum*, *Mentha pulegium*, *Oregano*, *Zataria*

*Corresponding Author:

Address Departments of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Email: ghasemikhah@yahoo.com

بررسی اثر اسانس گیاهان آویشن، نعنا، پونه و عصاره هیدروالکلی گل راعی بر روی کیست انگل آکانتامبا در شرایط آزمایشگاهی

علی ارجمند شبستری^۱، محمود خالویی^۲، محمد ارجمندزادگان^۳، زهرا اسلامی راد^۴، رضا قاسمی خواه^{۵*}

۱. استادیار، گروه اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۳. دانشیار، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۴. دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۵. استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۱۸، تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت دارویی کیست های آکانتامبا باعث عود بیماری می شود، از این رو، بیماران باید مدت طولانی تحت درمان و مراقبت قرار گیرند. هدف این مطالعه بررسی اثر تعدادی از فرآورده های گیاهی روی کیست آکانتامبا در محیط برون تنی بود.

مواد و روش ها: اسانس های آویشن، نعنا و پونه با روش تقطیر با فشار بخار تهیه شدند. اسانس ها و عصاره آبی گل راعی در سه غلظت (۰/۶، ۱ و ۱۰ درصد) تهیه شد. کیست های آکانتامبا در بازه های زمانی مختلف (۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۱۴۴۰ دقیقه) در مواجهه با اسانس و عصاره های گیاهی قرار گرفتند و سپس زنده بودن یا مرده بودن کیست ها با رنگ اتوزین ۰/۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: مقایسه میزان مرگ و میر انگل بین گروه شاهد و تست نشان داد که مرگ و میر کیست های آکانتامبا در گروه تست که در معرض فرآورده گیاهی بودند، بیشتر بود. اسانس آویشن و نعنا در غلظت یکسان ۱۰ درصد و زمان ۲۴ ساعت، به ترتیب بیشترین (۲۲ درصد) و کمترین (۴ درصد) مرگ و میر را ایجاد کردند. نتایج نشان داد که میزان مرگ و میر آکانتامبا وابسته به زمان بوده است.

نتیجه گیری: اثبات گردید که اسانس آویشن بیشترین اثر کشندگی را روی کیست های آکانتامبا دارد. اجرای تحقیقات بالینی در این رابطه پیشنهاد می شود.

واژگان کلیدی: کیست آکانتامبا، اسانس، آویشن، نعنا، پونه، عصاره گل راعی

*نویسنده مسئول: ایران، اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

Email: ghasemikhah@yahoo.com

مقدمه

آکانتامبا از خانواده آمیب‌های آزادزی و یکی از شایع‌ترین تک یاخته‌های موجود در طبیعت است، این انگل فرصت طلب از خاک، گرد و غبار، آب تازه، آب دریا، استخرهای شنا، یونیت دندان پزشکی، دستگاه‌های تهویه هوا و فضاهای بیمارستانی جدا شده است (۱).

در چرخه زندگی آکانتامبا دو شکل تروفوزوئیت و کیست وجود دارد، کیست‌ها به مواد کشنده مانند کلر و آنتی بیوتیک‌ها مقاومت نشان داده و طیف دمایی گسترده‌ای را تحمل می‌کنند در میان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این انگل می‌توان از آنسفالیت گرانولوماتوز آمیبی، گرانولوماتوز پوستی آکانتامبایی و کراتیت آمیبی مزمن نام برد، آکانتامبا می‌تواند مستقیماً بعد از تروما و تماس با آب آلوده و یا استفاده از لنزهای تماسی موجب آلوده شدن قرنیه شود، مطالعات سال‌های اخیر در نقاط مختلف ایران نشان داده که این انگل در نقاط مختلف کشور خصوصاً در آب‌ها وجود دارد. (۲، ۳) کراتیت آکانتامبایی با قرمزی و درد شدید چشم، آبریزش، التهاب قرنیه و ترس از نور همراه است. این نوع از کراتیت از نظر بالینی شبیه به کراتیت ویروسی و قارچی است، با توجه به شیوع استفاده از لنزهای تماسی، بروز کراتیت‌های آکانتامبایی به طور قابل توجهی در حال افزایش است، کراتیت‌های آکانتامبایی در کشور ما نیز شیوع دارد و عموماً در افراد ۱۵ تا ۲۵ سال دیده می‌شود (۱)، هم‌چنین کراتیت به دنبال ضربه به قرنیه و ایجاد خراش‌های کوچک و سپس وارد شدن آکانتامبا همراه آب، گرد و غبار و انگشتان آلوده نیز می‌تواند اتفاق افتد (۴، ۵)، در کراتیت‌های ناشی از آکانتامبا علیرغم درمان دارویی طولانی مدت ممکن است دارو درمانی با شکست مواجه گردد و به کراتوپلاستی و یا پیوند قرنیه نیاز شود.

در حال حاضر بهترین درمان دارویی کراتیت‌های آمیبی، استفاده از داروهای مختلف نظیر ناتامایسین، نئوسپورین، برونل و پروپامیدین ایزوتیونات همراه با

میکونازول است (۶). درمان ممکن است از یک ماه تا یک سال طول بکشد، پس از درمان نیز با توجه به مقاومت کیست‌ها بیمار باید مرتباً از نظر عود بیماری تحت نظر قرار گیرد. (۵)

در سال‌های اخیر، استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان، به واسطه اثرات جانبی کم یا هیچ آن‌ها رو به افزایش می‌باشد. از سوی دیگر، سازمان بهداشت جهانی به طور مکرر بر رویکرد جامع به طب سنتی و گیاهان دارویی به نیز ضرورت کاربرد علمی و اقتصادی آن تأکید دارد. این رویکرد یکی از مباحث مهم جهانی در چند دهه اخیر به ویژه در کشورهای در حال توسعه به شمار می‌آید (۷).

طبق گزارش‌های معتبر موجود در منابع علمی، ترکیبات متنوعی از گیاهان، ادویه‌ها، میوه‌ها، سبزیجات، برگ‌ها و پوست بعضی از درختان و گیاهان دارای خواص ضد میکروبی می‌باشند. یکی از این ترکیبات طبیعی، اسانس‌های گیاهی هستند که مطالعات فراوانی توسط محققین روی اثرات ضد میکروبی آن‌ها انجام گرفته است (۷).

با توجه به اهمیت پاتوفیزیولوژیک آکانتامبا در بدن و ایجاد بیماری‌های مختلف پوستی، چشمی و مغزی و با توجه به اینکه گیاهان آویشن، نعنا، پونه و گل راعی دارای خواص ضد باکتریال، ضد قارچی و ضد انگلی می‌باشند (۸، ۹)، بر آن شدیم تا تحقیقی را پیرامون اثرات این گیاهان دارویی بر روی انگل آکانتامبا انجام دهیم.

مواد و روش‌ها

آماده سازی کیست‌های آکانتامبا

کیست‌های آکانتامبا از نمونه‌های بالینی که توسط چشم پزشک از فرد مشکوک به کراتیت آمیبی جهت کشت به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک فرستاده شده بود و پس از تایید، به عنوان استوک انگل آکانتامبا در آزمایشگاه گروه انگل‌شناسی نگهداری می‌شود، تهیه شد.

مرده را حساب کرده و در نهایت در صد مرگ و میر بر حسب زمان مواجهه محاسبه گردید. هم‌چنین لوله ی دارای سرم فیزیولوژی و حاوی کیست آکانتامبا به عنوان کنترل منفی و لوله دارای فرمالین ۱۰ درصد و حاوی کیست آکانتامبا به عنوان کنترل مثبت مورد مطالعه قرار گرفتند. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و نتایج از طریق نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تا زمان مواجهه ۳۰ دقیقه، میزان مرگ و میر کیست‌های آکانتامبا در مواجهه با هر سه غلظت از عصاره گل راعی و اسانس های آویشن، نعنا و پونه فقط ۱ درصد بود، پس از ۶۰ دقیقه میزان مرگ و میر کیست‌های انگل در مواجهه با عصاره و اسانس های مختلف تغییر نمود، به طوری که بیشترین میزان مرگ و میر کیست های آکانتامبا در لوله حاوی غلظت ۱۰ درصد از اسانس گیاه آویشن مشاهده گردید. تحلیل آماری نشان داد که میزان مرگ و میر ناشی از اسانس آویشن و گل راعی تفاوت معنی دار با گروه کنترل دارد ($p < 0/05$). بعد از اسانس آویشن، عصاره گل راعی بیشترین اثر کشندگی را بر روی کیست های آکانتامبا نشان داد (نمودارهای ۱ تا ۴، (شکل های ۱ و ۲).

برای نگه داری و تکثیر این انگل از محیط کشت آگار (مرک آلمان) غیر مغذی همراه با باکتری اشرشیا کلی کشته شده استفاده شد. انگل در این محیط کشت و در انکوباتور ۲۸ درجه در طی مدت ۱ تا ۲ هفته تکثیر یافت. در زمان آزمایش کیست ها از سطح محیط کشت برداشته شده و به لوله‌های استریل منتقل شدند. سوسپانسیون‌های انگلی ۹ تا ۱۰ هزار کیست در هر میلی لیتر برای آزمایشات استفاده شد. میزان مرگ و میر اولیه کیست‌ها با استفاده از محلول ۰/۱ درصد ائوزین روی لام و توسط میکروسکوپ نوری تعیین شد (۱۰).

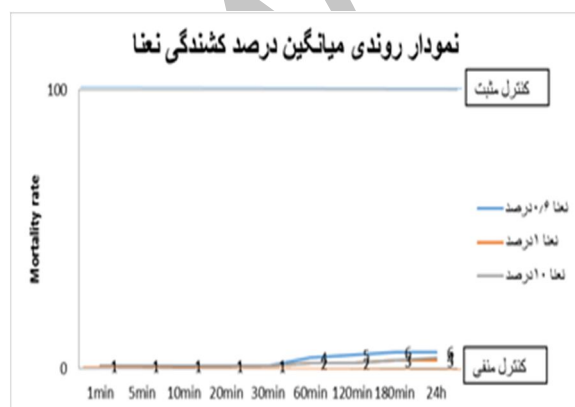
تهیه عصاره و اسانس‌های گیاهی

گیاهان به صورت تازه از گلخانه گیاهان دارویی تهیه و در هرباریوم دانشگاه اراک تایید گردید. عصاره گیری از گل راعی با استفاده از دستگاه رفلاکس به روش تقطیر انجام شد، برای این کار، ۱۰۰ گرم پودر گیاه راعی در ۵۰۰ میلی لیتر آب ریخته شد و به مدت ۶ ساعت در بن ماری با دمای ۸۰ درجه قرار داده شد، عصاره به دست آمده صاف شده و از آن در آزمایشات استفاده گردید. اسانس گیاهان آویشن، نعنا و پونه با دستگاه کلونجر و طبق دستورالعمل تهیه گردید. عصاره و اسانس گیاهان در سه غلظت ۰/۶، ۱ و ۱۰ درصد تهیه و در آزمایشات استفاده شد.

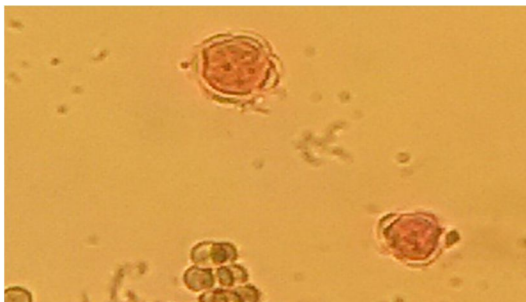
مواجهه کیست آکانتامبا با عصاره و اسانس‌های

گیاهی

۵۰ میکرولیتر از غلظت های متفاوت اسانس های گیاهان آویشن، نعنا، پونه و عصاره ی گل راعی در لوله های اپندروف ریخته و هم حجم آن از سوسپانسیون حاوی کیست های آکانتامبا به این لوله ها اضافه گردید. مدت زمان مواجهه کیست های آکانتامبا با اسانس ها و عصاره گیاهان ۱، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۱۴۴۰ دقیقه بود، در پایان هر یک از این زمان‌ها، میزان مرگ و میر کیست‌ها با استفاده از محلول ۰/۱ درصد ائوزین و توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد. به این ترتیب که در میان یکصد کیست شمارش شده تعداد کیست‌های



نمودار ۱: درصد مرگ کیست های آکانتامبا در غلظت‌های متفاوت اسانس نعنا در بازه‌های زمانی متفاوت



شکل ۱: کیست‌های کشته شده آکانتامبا

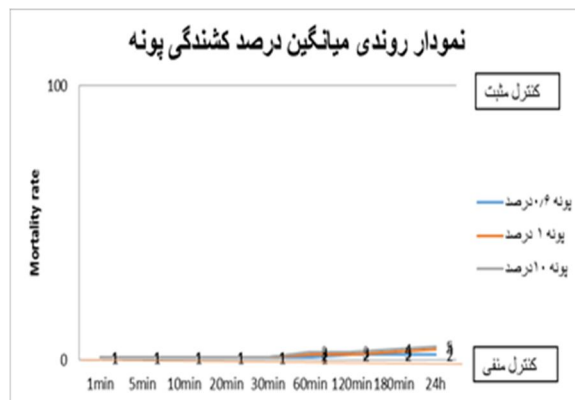


شکل ۲: کیست زنده آکانتامبا در گروه کنترل

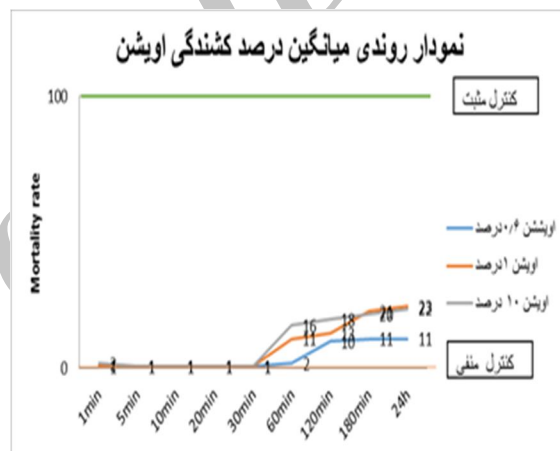
بحث

در نقاط مختلف دنیا استفاده از داروهای سنتی در درمان برخی از بیماری‌ها رایج است. بیشتر داروهای سنتی مواد مشتق از گیاهان هستند که به صورت اسانس و عصاره از گیاه استخراج شده و برای درمان استفاده می‌شوند. در هنگام تهیه این داروهای سنتی اصول بهداشتی، مواد موثره و دوز مصرف آن مورد توجه قرار نمی‌گیرد. از این رو، مطالعاتی که در جهت شناخت مزایا و معایب، شناسایی مواد موثره و دوز مصرف داروهای گیاهی انجام می‌شود کمک زیادی به علم پزشکی مدرن خواهد نمود (۱۱).

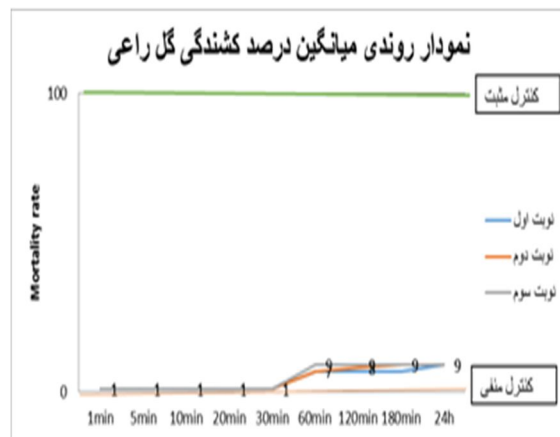
انگل آکانتامبا تک یاخته ای آزادی است که به وفور در آب و خاک مناطق مختلف ایران شناسایی شده است (۱۲). این انگل فرصت طلب در صورت تهاجم و استقرار در چشم استفاده‌کنندگان از لنزهای تماسی موجب کراتیت آکانتامبایی و در صورت تهاجم به سیستم اعصاب مرکزی خصوصاً در افراد دچار نقص ایمنی، منجر به انسفالیت های



نمودار ۲: درصد مرگ کیست‌های آکانتامبا در غلظت‌های متفاوت اسانس پونه در بازه‌های زمانی متفاوت



نمودار ۳: درصد مرگ کیست‌های آکانتامبا در غلظت‌های متفاوت اسانس آویشن در بازه‌های زمانی متفاوت



نمودار ۴: درصد مرگ کیست‌های آکانتامبا در غلظت‌های متفاوت عصاره آگل راعی در بازه‌های زمانی متفاوت

روی این انگل بود (۱۷). همچنین در سال ۲۰۱۷ قازوانی و همکاران اثر ضد آمیبی اسانس و ترکیبات مریم گلی بر روی آکانتامبا را بررسی نموده و اثر کشندگی آن بر روی آمیب مذکور را تایید نمودند (۱۸). در سال ۲۰۱۷ ساعدی و همکاران اثر اسانس آویشن تونسی و عصاره مواد آلی مشتق از آن را بر روی آکانتامبا بررسی نمودند که نتایج آنان نشان داد که اسانس این نوع آویشن اثر ضد آکانتامبایی بیشتری نسبت به عصاره و ترکیبات آلی آن دارد (۱۹). مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعه ما نشان داد که غلظت ۲/۷۳ میکروگرم بر میلی لیتر از اسانس آویشن تونسی در طول زمان مواجهه (۹۶ ساعت) موجب مرگ ۵۰ درصد از انگل های آکانتامبا شده است. در مقایسه غلظت های ۱ و ۱۰ درصد از اسانس آویشن در مطالعه ما در طی ۲۴ ساعت (۱۴۴۰ دقیقه) موجب مرگ ۲۳ درصد از انگل های آکانتامبا در محیط برون تنی گردیده اند.

در مطالعه کنونی بیشترین مرگ و میر ناشی از اسانس ۱۰ درصد گیاه آویشن بود که تفاوت معنی دار با گروه کنترل داشت ($p < 0/05$). آویشن گیاهی دارای مواد فنلیک نظیر تیمول و کاروکرول است، این مواد دارای خاصیت ضد باکتریایی و قارچی هستند، همچنین تیمول دارای اثرات آنتی اکسیدانی نیز هست (۲۰). عصاره گل راعی پس از آویشن بیشترین خاصیت کشندگی را دارد که این خاصیت ناشی از ترکیبات و مواد شیمیایی این گیاه مانند مشتقات آنتراکینونی (نفترودیانترون ها)، فلاونوئیدها، فلوروگلوکوسینول ها، تانن ها، برخی از فنل ها، روغنهای فرار، هیپرفورین و هیپریسین می باشد، به طوری که خاصیت ضد باکتری، ضد ویروسی و ضد التهابی هیپریسین تایید شده است و بنابراین می توان انتظار داشت که یکی از علل مرگ کیست های آکانتامبا هیپریسین موجود در عصاره گل راعی باشد (۲۱).

نتیجه گیری

در این مطالعه تفاوت معنی داری در میزان مرگ و میر انگل در دو گروه تحت تاثیر اسانس نعنا و پونه مشاهده

کشده خواهد گردید (۱). داروهای کنونی که در درمان کراتیت و انسفالیت آکانتامبایی استفاده می شود، کاملاً موثر نبوده به همین دلیل تحقیق برای یافتن داروهای مناسب تر ادامه دارد (۱۳). در مطالعه ی برون تنی کنونی، اثر اسانس سه گیاهان آویشن، نعنا و پونه و نیز اثر عصاره هیدروالکلی گل راعی بر میزان مرگ و میر انگل آکانتامبا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج موید آن بود که مواد مذکور میزان مرگ و میر کیست آکانتامبا را افزایش می دهد. اثر این مواد وابسته به غلظت ماده و زمان مواجهه انگل با آن بوده ولی اثر کشندگی هیچیک از اسانس ها و عصاره مورد مطالعه کامل نبوده به طوری که منجر به مرگ همه انگلها پس از ۲۴ ساعت (۱۴۴۰ دقیقه) مواجهه نگردیدند.

برخی از محققان در ایران به بررسی اثر ترکیبات گیاه آویشن، نعنا و پونه بر روی انگل ها پرداختند. در مطالعه ای در سال ۱۳۸۲ توسط آزادبخت و همکاران، اثر آویشن بر انگل تریکوموناس واژینالیس در محیط کشت بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره این گیاه مانع رشد و تکثیر انگل تریکوموناس در محیط کشت گردیده و در غلظت های زیاد این عصاره طول زمان تاثیر این عصاره کوتاهتر است (۱۴). در مطالعه ی دیگری در سال ۱۳۸۸ توسط براتی و همکاران اثر عصاره آویشن بر روی انگل لیثمانیا در محیط برون تنی بررسی گردید و اثر مهار کنندگی عصاره آویشن بر پروماستیگوت های انگل لیثمانیا تایید گردید (۱۵).

در مطالعه ای در سال ۱۳۹۲ توسط یوسفی و همکاران اثر عصاره هیدروالکلی نعنا بر روی تریکوموناس واژینالیس در محیط برون تنی بررسی شد. نتایج این مطالعه موید اثر مهار کنندگی این عصاره بر روی رشد تریکوموناس در محیط کشت بود (۱۶).

در مطالعه ای در سال ۲۰۱۶ سانتوز و همکاران فعالیت ضد آمیبی اسانس گیاه به لیمو و برخی از ترکیبات آن را بر روی تروفوزوئیت های آمیب آکانتامبا بررسی نمودند. نتایج آنان موید اثر ضد آمیبی اسانس و ترکیبات به لیمو بر

9. Dadgar T, Ghaemi E, Bazoori M, Asmar M, Mazandarani M, et al. Antibacterial effects of 20 species of Medicinal plants against *Staphylococcus aureus* resistant and sensitive to methicillin. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*. 2007; 9(1): 55-62.
10. Init I, Lau YL, Arin Fadzlan A, Foad AI, Neilson RS, Nissapatorn V. Detection of free living amoebae, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia, *Trop Biomed* 2010; 27: 566-577.
11. Ukponmwan CU, Momoh N. Incidence and complications of traditional eye medications in Nigeria in a teaching hospital. *Middle East Afr j of ophthalmol*, 2010 Oct; 17(4):315-9, PubMed PMID: 21180431, Pubmed Central PMCID: PMC2991448, Epub 2010/12/25.
12. Niyyati M, Rezaeian M. Current Status of *Acanthamoeba* in Iran: A Narrative Review Article. *Iran J Parasitol*. 2015 Apr-Jun;10(2):157-63.
13. Malatyali E, Tepe B, Degerli S, Berk S. In vitro amoebicidal activities of *Satureja cuneifolia* and *Melissa officinalis* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Parasitol Res*. 2012 2012 Jan; 110(6):2175-80.
14. Azadbakht M, Ziaei H, Abdollahi F, Shabankhani B. Effect of Essential Oil of *Artemisia* *Artemisia*, *Shirazi Thyme* and *Case on Trichomonas Vaginalis*. *Medicinal Plants*. 2003; 8:35-40.
15. Barati M, Sharif A, Shariffar F. Antiallomorphic effects of extracts of *Zataria multiflora*, *Peganum* and *Myrtus* were extracted by colorimetric method. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*. 2009; 17(1): 32-41.
16. Yosefi M, Taghipour S, Arefkhan N, Rahimian N, Davoodian A, et al. The effect of hydroalcoholic extract of mint and *Salvia officinalis* on *Trichomonas vaginalis* *In vitro*. *Journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2013; 31(240): 811-818.
17. Santos IGdA, Scher R, Rott MB, Menezes LR, Vilaça Costa E, I de Holanda Cavalcanti SC, et al. Amebicidal activity of the essential oils of

نگردید. نتایج مطالعه کنونی نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف اسانس آویشن و عصاره گل راعی از پتانسیل دارویی نسبتاً مناسبی برای مرگ کیست‌های آمیب آکانتامبا برخوردار هستند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایان نامه آقای محمود خالویی با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1394.324 است. بدین وسیله از معاونت و کارکنان محترم تحقیقات و اطلاع رسانی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

1. Rezaian M, Hoshyar H. Review of the free-living amoebae and their medical importance. *Journal of Medical Council of Islamic Republic of Iran*. 2011;29(1):69-83.
2. Rezaian M, Bagheri F, Farnia S, Babai Z. Isolation of pathogenic amoeba (*Naegleria* and *Acanthamoeba*) from water sources and margin soils of rivers and lakes in Kazerun, *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research*. 2003; 1(3):41-8.
3. Badirzadeh A, Niyyati M, Babaei Z, Amini H, Badirzadeh H, Rezaeian M. Isolation of free-living amoebae from sarein hot springs in Ardebil province, Iran. *Iran J Parasitol*. 2011; 6(2):1-8.
4. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp, as Agents of Disease in Humans, *Clin Microb Rev*. 2003; 16(2):273-307.
5. Ahmed Khan N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections, *Microbial Pathogenesis*. 2003; 34(6):277-85.
6. Schuster FL, Visvesvara GS. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat*. 2004; 7(1):41-51.
7. Zargari A. *Medicinal plants*, Tehran: University Publications of Tehran. 1990; 4: 28-38.
8. Reynolds IEF, Martindale the extra pharmacopoeia, 31th ed, London: Royal pharmaceutical society, 1996: 1059-69.

Lippia spp. (Verbenaceae) against *Acanthamoeba* polyphaga trophozoites. Parasitol. Res. 2016; 115(2):535-40.

18. Ghazouani N, Sifaoui I, Bachrouch O, Abderrabba M, J EP, Lorenzo-Morales J. Essential oil composition and anti *Acanthamoeba* studies of *Teucrium ramosissimum*. Exp Parasitol. 2017 Sep 12. PubMed PMID: 28916455. Epub 2017/09/17. eng.

19. Saudi S, Sifaoui I, Chammem N, Reyes-Battle M, Lopez-Arencibia A, Pacheco-Fernandez I, et al. Anti-*Acanthamoeba* activity of

Tunisian *Thymus capitatus* essential oil and organic extracts. Exp Parasitol. 2017 Sep 12. PubMed PMID: 28916454. Epub 2017/09/17. eng.

20. Reynolds IEF, Martindale the extra pharmacopoeia, 31th ed, London: Royal pharmaceutical society, 1996: 1059-69.

21. Southwell IA, Bourke CA. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). Phytochemistry. 2001 Mar; 56(5):437-41.

Archive of SID