Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2018; 20(129): 74-82

Evaluation of Anti-amoebic Activity of *Peganum harmala* Ethanolic Extract on Acanthamoeba *In vitro*

Tooran Nayeri Chegeni[1], Fatemeh Ghaffarifar[2*], Fariba Khoshzaban[3], Abdolhosein Dalimi Asl[2]

1. MSc., Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.

Received: 10 Sep 2017, Accepted: 14 Jan 2018

Abstract

Background: Acanthamoeba is an opportunistic protozoan pathogen that is known to infect the cornea to produce eye keratitis and the central nervous system to produce lethal granulomatous encephalitis. The overall aim of the present study was to determine the anti-amoebic potential of natural compound *Peganum harmala* against the trophozoites and cysts of Acanthamoeba *in vitro*.

Materials and Methods: In this experimental study, a clinical isolate of Acanthamoeba was cultured and genotyped. The ethanolic extract of *Peganum harmala* was prepared. The trophozoites and cysts were collected by washing in page's saline. Various concentrations (1.25, 2.5, 5, and 10 mg/ml) of the ethanolic extract and polyhexanide 0.02% drop as positive control were tested at three different times (24, 48 and 72 h) on trophozoites and cysts of Acanthamoeba *in vitro*. The viability of trophozoites or cysts was tested by eozin method, MTT, and flowcytometry analysis.

Results: The results revealed that alcoholic extract had remarkable inhibitory effect on the proliferation of Acanthamoeba cysts as compared to non-treated control, and the inhibition was time and dose dependent. In the presence of 10 mg/ml ethanolic extract in medium culture after 72 h, no viable trophozoites were determined and 21.10% cysts of Acanthamoeba were viable. Percentage of trophozoites and cysts viability after adding polyhexanide 0.02% drop in medium culture after 72 hours was 0% and 23.71%, respectively.

Conclusion: Ethanolic extracts of *Peganum harmala* could be considered a new natural compound against the Acanthamoeba trophozoites and cysts. Further works are required to evaluate the exact effect of this extract on Acanthamoeba agents in animal models.

Keywords: *Acanthamoeba*, Cyst, Ethanolic extract, *Peganum harmala*, Trophozoite

*Corresponding Author:
Address: Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
Email: ghafarif@modares.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:20 +0430 on Sunday April 8th 2018
Archive of SID
www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره ۱۲ (شماره پیاپی ۱۲۹)، اسفند ۱۳۹۶، ۸۲-۷۴

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:20 +0430 on Sunday April 8th 2018

ارزیابی فعالیت ضدآمیبی عصاره الکلی اسپند (Peganum harmala) روی آکانتاموبا در شرایط برون‌تنی

توران نیری چگنی[۱]، فاطمه غفاری فر[۲*]، فریبا خوش زبان[۳]، عبدالحسین دلیمی اصل[۲]

۱. کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲. استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۳.استادیار، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۱۹، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: آکانتاموبا یک تک یاخته فرصت طلب بیماری‌زاست که با آلوده کردن قرنیه و ایجاد کراتیت چشم و سیستم اعصاب مرکزی و ایجاد انسفالیت گرانولوماتوز کشنده شناخته شده است. هدف کلی مطالعه حاضر، تعیین پتانسیل ضدآمیبی ترکیب طبیعی اسپند در مقابل تروفوزوئیت ها و کیست های آکانتاموبا در شرایط برون‌تنی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، یک ایزوله بالینی آکانتاموبا کشت و ژنوتایپ شد. عصاره اتانولی اسپند تهیه گردید. تروفوزوئیت‌ها وکیست ها با شستشو در محلول سالین جمع آوری شدند. غلظت‌های مختلف (۱/۲۵ ، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر) از عصاره و قطره پلی هگزانايد ۰/۰۲ درصد به عنوان کنترل مثبت در سه زمان مختلف (۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت) روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در شرایط برون‌تنی آزمایش شد. زنده ماندن تروفوزوئیت‌ها وکیست‌ها با روش ائوزین، MTT و فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که عصاره الکلی اثر مهاری قابل توجهی بر روی تکثیر تروفوزوئیت‌ها وکیست های آکانتاموبا نسبت به گروه شاهد بدون درمان داشته و مهارکنندگی وابسته به دوز و زمان بود. در حضور۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر عصاره الکلی در محیط کشت پس از ۷۲ ساعت، هیچ تروفوزوئیتی زنده نبود و ۲۱/۱۰ درصد ازکیست‌ها زنده بودند. درصد زنده ماندن تروفوزوئیت ها و کیست ها بعد از اضافه کردن قطره پلی هگزانايد ۰/۰۲ درصد به محیط کشت پس از ۷۲ ساعت به ترتیب صفر و ۲۳/۷۱ درصد بود.

نتیجه‌گیری: عصاره الکلی اسپند می تواند به عنوان یک ترکیب طبیعی جدید در برابر تروفوزوئیت‌ها و کیست های آکانتاموبا در نظر گرفته شود و تحقیقات بیشتر برای ارزیابی اثر دقیق این عصاره بر عوامل آکانتاموبایی در مدل های حیوانی لازم است.

واژگان کلیدی: آکانتاموبا،کیست، عصاره اتانولی، اسپند، تروفوزوئیت

***نویسنده مسئول:** ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

Email: ghafarif@modares.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:20 +0430 on Sunday April 8th 2018

مقدمه

آکانتاموباها، آمیب‌های آزادزی فرصت طلب و بیماری‌زا برای انسان‌ها و حیوانات هستند. چرخه زندگی آن‌ها شامل دو مرحله است: فرم تروفوزوئیت که در چشمه‌های آب گرم، آب آشامیدنی، آب معدنی، یونیت‌های دندانپزشکی، واحدهای دیالیز، مایعات لنزهای تماسی و کشت‌های بافت آلوده یافت می‌شود (۱). فرم کیست آکانتاموبا در برابر طیف وسیعی از دما، pH و عوامل ضدمیکروبی بسیار مقاوم است (۲). این آمیب‌ها، عامل ایجاد کننده دو بیماری شدید در انسان هستند: یکی کراتیت آمیبی که عفونت جدی قرنیه است و می‌تواند به سمت نابینایی پیشرفت کند و معمولاً در استفاده کنندگان از لنزهای تماسی گزارش شده است و دیگری انسفالیت آمیبی گرانولوماتوز مرگبار که اغلب افراد مبتلا به اختلالات ایمنی را تحت تأثیر قرار می دهد (۳). آکانتاموبا ممکن است بیماری های دیگری مانند زخم‌های پوستی، آبسه‌ها، آرتریت‌ها و یا رینوسینوزیت‌ها را نیز ایجاد نماید (۴).گونه های آکانتاموبا به مواد مختلفی از قبیل اپی تلیال سل، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، فیبرهای سلولزی و غیره می‌چسبند. آکانتاموبا به گلیکوپروتئین‌های حاوی مانوز سطوح اپی تلیال قرینه متصل می شود که این امر به واسطه پروتئین متصل شونده به مانوز(MBP) صورت می‌گیرد. در آکانتاموبا کولبرتسونی علاوه بر مانوز، گلوکز نیز می‌تواند در این اتصال نقش داشته باشد که این نتایج به دنبال استفاده از قندهای مختلف در محیط برون تنی و کاهش چسبندگی آمیب به سطوح سلولی به دست آمده است (۵، ۶). اولین مرحله در بیماری‌زایی آکانتاموبا چسبیدن به سطح سلول است (۷). آکانتاموبا پس از چسبیدن با ترشح پروتئاز باعث تخریب سلول‌های هدف می‌شود (۵). درمان‌های موفق با استفاده از ترکیبات ضدعفونی کننده کاتیونی (پلی هگزامتیلن بیگوانید، کلروهگزیدین) که عملکردهای غشایی، دیامیدین‌های معطر (پروپامیدین ایزوتیونات، هگزامیدین، پنتامیدین) که سنتز DNA و آمینوگلیکوزیدها (نئومایسین، پاروموماسین) که سنتز پروتئین را مهار می کنند و ایمیدازول‌ها (کلوتریمازول، کتوکونازول، فلوکونازول، میکونازول، ایتراکونازول) که باعث ایجاد بی ثباتی در دیواره سلولی و پلی ان می‌شوند، مانند آمفوتریسینB، گزارش شده است (۸). خواص ضد انگلی بسیاری از گروه های طبیعی جدید با اثر فوق العاده و انتخابی مانند آلکالوئیدهای مشتق از گیاه، ترپن‌ها و فنولیک‌ها شناسایی شده‌اند (۹). اسپند با نام علمی پگانوم هارمالا گیاهی علفی و پایا از خانواده زیگوفیلاسه است. این گیاه بومی مناطق خشک مدیترانه شرقی تا شمال هند می‌باشد (۱۰). آلکالوئیدها ترکیبات فعال اسپند هستند که شامل بتاکاربولین‌ها (هارمالین و هارمین) و مشتقات کینازولینی (وسی سین و وسی سینون) می باشند. بتاکاربولین ها بیش از ۶۰ درصد آلکالوئیدهای موجود در دانه را تشکیل می دهند (۱۱، ۱۲). اثرات ضد کرمی این عصاره (۱۳)، هم‌چنین اثرات ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی اسپند بر روی سلول‌های کارسینومای اپی تلیال گردن رحم انسان (۱۴) و نیز اثرات ضد مالاریایی آن بر پلاسمودیوم فالسی پاروم و مقایسه آن با کلروکین در شرایط برون‌تنی (۱۵) توسط سایر محققین در ایران بررسی شده است. بعضی مطالعات به ارزیابی تأثیر ممانعت‌کنندگی عصاره گیاهان مختلف روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا پرداخته‌اند؛ از جمله اکین پلات و همکاران، فعالیت ضد آمیبی عصاره متانولی آویشن (۱۶) و چهار گونه سیر (۱۷) و مالاتیالی اثرات ضدآمیبی چهار گونه شوید (۱۸) را درمقابل کیست‌ها و تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا ارزیابی کردند.

هم‌چنین در ایران اثر ضد آکانتاموبایی گندواش (۱۹) بر روی کیست‌ها و تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا بررسی شده است.

با توجه به مطالب مذکور و اثرات ضد انگلی دانه اسپند، در مطالعه حاضر سعی شده است اثر عصاره الکلی دانه اسپند بر آکانتاموبا در شرایط برون‌تنی بررسی شود.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:20 +0430 on Sunday April 8th 2018

مواد و روش‌ها

این مطالعه طی نامه ای به شماره ۸۶۳۵/د۵۲ در جلسه کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس مورخ ۱۳۹۳/۱۲/۲ مطرح و به شرط اخذ رضایت آگاهانه و محرمانه بودن اطلاعات به تأیید رسیده است.

گونه آکانتاموبا

گونه آکانتاموبا مورد استفاده در این مطالعه از یک بیمار مبتلا به کراتیت آکانتاموبایی جدا شده و نمونه بر روی محیط کشت آگار غیر مغذی به همراه باکتری اشرشیاکلی کشت و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. تشخیص میکروسکوپی با PCR تأیید شد. به وسیله BLAST search و براساس نتایج تعیین توالی ژنوتایپ نمونه T4 بود (BankIt1899920 seq5 KU877552).

آماده کردن تروفوزوئیت ها و کیست ها

آکانتاموبا در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد همراه با باکتری اشرشیاکلی روی پلیت‌های NNA کشت داده شد. تروفوزوئیت ها بعد از ۷۲ تا ۹۶ ساعت و کیست ها سه هفته بعد با شست و شوی پلیت‌ها با محلول سالین استریل جمع آوری شدند (طرز تهیه سالین: ۰/۱۲ گرم NaCl ، ۰/۰۴ گرم MgSo4، ۰/۰۴ گرم Cacl2، ۰/۱۴۲ گرم Na2HPo4 و KH2Po4 را در یک لیتر آب مقطر ریخته و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با اتوکلاو استریل شد) و بعد تروفوزوئیت ها با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه و کیست ها با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه دو بار سانتریفیوژ شدند. غلظت نهایی ۱۵×۱۰^{۴} تروفوزوئیت یا کیست در میلی لیتر بود که با ائوزین و شمارش مستقیم تروفوزوئیت و کیست روی لام نئوبار تعیین شد (۱۸).

آماده کردن عصاره الکلی اسپند

دانه اسپند با کد هرباریومی ۱۱۷۹ زیر نظر کارشناس هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی از عطاری معتبر خریداری شد. عصاره گیری به روش خیساندن و با حلال اتانول انجام شد. مقدار ۱۰۰ گرم از دانه اسپند آسیاب شده، درون ظروف عصاره‌گیری منتقل و به میزان چهار برابر وزن گیاه، اتانول ۸۵ تا ۸۷ درصد اضافه شده و مدت ۴ تا ۶ ساعت روی هیتر همزن مغناطیسی قرار داده شده و سپس به مدت سه روز در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. سپس محلول به دست آمده توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف شده و درون بن ماری ۶۰ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای تبخیر حلال قرار داده شد. عمل تغلیظ تا رسیدن به حدود پنج درصد مقدار اولیه عصاره ادامه یافت (۲۰، ۲۱). پس از اتمام عصاره‌گیری، عصاره باقیمانده به مقدار ۲۵ میلی لیتر یا کمتر در لوله‌های فالکونه ۵۰ میلی لیتری ریخته و در فریزر۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس لوله‌ها از فریزر خارج و به دستگاه لیوفیلیزه منتقل گردیدند. لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه لیوفیلیزه قرار گرفتند تا در نهایت عصاره خشک حاصل شد. عصاره خشک حاصل تا زمان استفاده در فریزر۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تأثیر عصاره گیاهی برروی انگل

در این مطالعه، غلظت‌های ۲/۵، ۵ ، ۱۰ و ۲۰ میلی-گرم بر میلی لیتر از عصاره تهیه شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی اسپند در غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر، به طور جداگانه به میکروتیوپ‌های حاوی تعداد ۱۵×۱۰^{۴} تروفوزوئیت یا کیست آکانتاموبا اضافه گردید (که در این‌جا غلظت عصاره پس از اضافه شدن به محیط به ۱/۲۵ ، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر تبدیل می-شود) و در نهایت تأثیر غلظت های مختلف از گیاه بر حیات تروفوزوئیت و کیست در سه زمان ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی آزمایشات به صورت ۳ بار تکرار انجام گرفت. تمامی آزمایشات شامل یک کنترل منفی (سوسپانسیون تروفوزوئیت یا کیست و آب مقطر استریل حاوی DMSO ۱ درصد) و یک کنترل مثبت (انگل و قطره پلی هگزانايد ۰/۰۲ درصد) بودند که قطره پلی هگزانايد با غلظت ۰/۰۱ درصد استفاده شد. برای تعیین درصد حیات

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:20 +0430 on Sunday April 8th 2018

تروفوزوئیت ها و کیست ها از روش رنگ‌آمیزی حیاتی انگل با ائوزین ۱ درصد استفاده شد. اطلاعات حاصل از مطالعه ثبت و با کنترل منفی و کنترل مثبت مقایسه شد. دلیل استفاده از قطره پلی هگزانايد ۰/۰۲ درصد به عنوان کنترل مثبت فقط جهت مقایسه تأثیر داروی شیمیایی پلی هگزانايد ۰/۰۲ درصد با عصاره الکلی اسپند می باشد.

تحلیل آماری

تحلیل داده‌های حاصل از تأثیر عصاره بر انگل با استفاده از آزمون مقایسه سه یا چند گروه وابسته (اندازه گیری‌های تکراری) و هم‌چنین آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (آنووا) صورت گرفت تا درصد معنی‌داری مشخص گردد. از آزمون کولموگوروف- اسمیرنوف یک نمونه‌ای برای بررسی فرض نرمال بودن متغیرهای مورد بررسی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی میزان تأثیر عصاره الکلی اسپند بر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا بر اساس شمارش تعداد انگل با استفاده از لام نئوبار

برای بررسی اثر بخشی عصاره الکلی اسپند بر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا، غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد و بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تأثیر عصاره بر تروفوزوئیت‌ها و کیست های آکانتاموبا با استفاده از رنگ حیاتی ائوزین، تعداد تروفوزوئیت‌ها و کیست های زنده در مقایسه با گروه کنترل شمارش گردید. در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر و زمان ۷۲ ساعت تعداد تروفوزوئیت‌های زنده آکانتاموبا به صفر درصد رسید، اما در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد تروفوزوئیت‌های زنده آکانتاموبا به ترتیب ۳۰/۹۴ و ۲۵/۸۰ درصد بودند. اثر افزایش زمان و غلظت عصاره الکلی اسپند بر کاهش تروفوزوئیت های زنده آکانتاموبا معنادار ($p \leq ۰/۰۵$) بود. درصد کیست‌های زنده بعد از ۲۴ ساعت در بالاترین غلظت عصاره یعنی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر به ۳۸/۸۸ درصد و بعد از ۴۸ ساعت به ۳۳/۳۳ درصد و بعد از ۷۲ ساعت به ۲۱/۱۰ درصد رسید. کاهش کیست های زنده آکانتاموبا با افزایش زمان و غلظت عصاره الکلی اسپند معنادار ($p \leq ۰/۰۵$) بود. درصد تروفوزوئیت‌ها و کیست های زنده آکانتاموبا ۷۲ ساعت بعد از تأثیر قطره پلی هگزانايد ۰/۰۲ درصد به ترتیب به صفر و ۲۳/۷۱ درصد رسید. از MTT جهت تأیید نتایج استفاده شد که نتایج حاصل از MTT هم داده‌های فوق را تأیید کردند (جدول ۱).

جدول۱.درصد زنده ماندن تروفوزوئیت ها وکیست‌های آکانتاموبا پس از تأثیر قطره پلی هگزانايد و غلظت‌های مختلف عصاره الکلی اسپند. داده‌ها حاصل میانگین حداقل سه تکرار مستقل می‌باشند.

دوز	تأثیر روی	زمان آزمایش ۲٤ ساعت	٤٨ ساعت	۷۲ ساعت
۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر	تروفوزوئیت	۳۰/۹٤±٦/۸٦	۲٥/۸۰±٥/٤۳	۰۰/۰۰
	کیست	۳۸/۸۸±۹/٦۲	۳۳/۳۳±٦/۷۳	۲۱/۱۰±۷/٦۲
٥ میلی گرم بر میلی لیتر	تروفوزوئیت	٥٤/۳۳±۷/۹۳	۳٦/٦٦±٦/٦٦	۳۱/۳۹±۹/۹٥
	کیست	٥٤/۷٦±۸/۲٤	٤٥/۷۱±۹/۸۹	۳٦/۰۱±۹/۰۹
۲/٥ میلی گرم بر میلی لیتر	تروفوزوئیت	٦۳/۳٦±۷/۳۱	٥٦/۸۲±۳/۳٤	٤۹/۹۹±۳/۳۳
	کیست	۷۷/۷۷±۷/٦۹	۷۰/۱۰±۷/۷۰	٦۷/۷۰±۸/٤۱
۱/۲٥میلی گرم بر میلی لیتر	تروفوزوئیت	۸۰/٥۳ ±۹/۸۰	۷۷/۳۰±۳/٥۱	٦۲/۲۱±۷/٦۹
	کیست	۸۲/۰٦±۹/۹۲	۷۸/۸۸±۳/۸٥	۷۰/۳۱±۷/۰۱
کنترل مثبت (قطره پلی هگزانايد)	تروفوزوئیت	٦۹/۰٤±٤/۱۲	۳٥/٦۷±٦/۲۰	۰۰/۰۰
	کیست	۷۹/٥۲±۰/۸۲	٥۲/۳۷±٥/۳۰	۲۳/۷۱±۲/٦۷
کنترل منفی	تروفوزوئیت	۱۰۰±۰۰	۱۰۰±۰۰	۱۰۰±۰۰
	کیست	۱۰۰±۰۰	۱۰۰±۰۰	۱۰۰±۰۰

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:20 +0430 on Sunday April 8th 2018

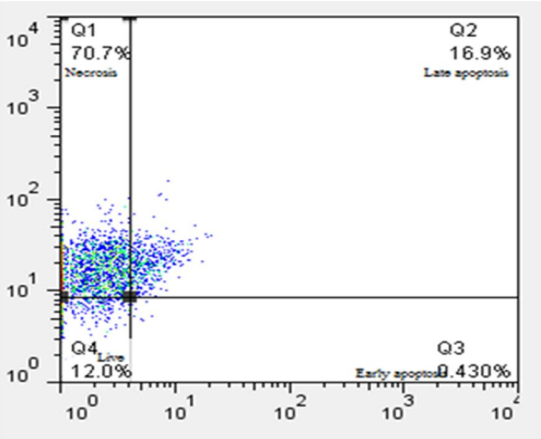
محاسبه مقدار دوز کشنده ۵۰ درصد (LD50) عصاره الکلی اسپند بر روی کیست های آکانتاموبا

مقدار LD50 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از نرم‌افزار پریسم ۵ (Graphpad prism 5) محاسبه گردید. نتایج حاصل نشان می‌دهد که مقدار LD50 عصاره الکلی اسپند بر روی تروفوزوئیت ها در ۲۴ ساعت ۵/۰۹۵ و در ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز به ترتیب ۳/۶۲۱ و ۲/۳۰۳ میلی‌گرم بر میلی لیتر می‌باشد.

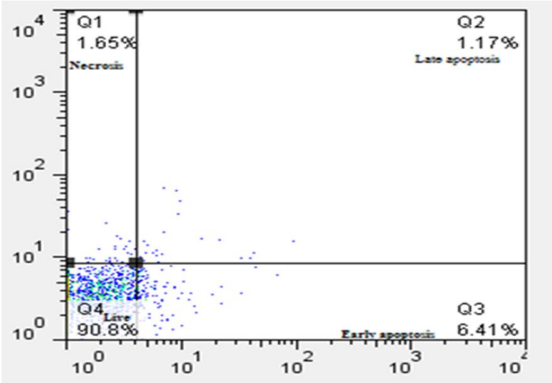
مقدار LD50 عصاره الکلی اسپند بر روی کیست ها در ۲۴ ساعت ۵/۷۸۴ و در ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۳/۸۱۳ و ۲/۳۷۷ میلی‌گرم بر میلی لیتر می باشد که نشان دهنده این است که اسپند الکلی اثر کشندگی قوی بر روی کیست های آکانتاموبا دارد.

نتایج فلوسایتومتری

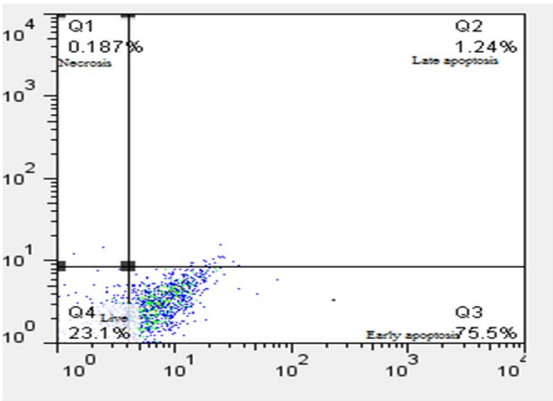
درگروه کنترل درصد سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی پس از ۷۲ ساعت، ۷/۵۸ درصد بود. در نمونه‌های تحت درمان با قطره پلی هگزانايد بیشترین میزان آپوپتوز اولیه و تأخیری (۷۶/۷۴ درصد)، ۷۲ ساعت پس از درمان نشان داده شد. در کیست‌های تحت درمان با اسپند الکلی، میزان آپوپتوز اولیه و تاخیری۷۲ ساعت پس از درمان ۱۷/۳۳، درصد بود (شکل ۱).



کنترل منفی



عصاره اسپند



قطره پلی هگزانايد

شکل ۱. آنالیز فلوسایتومتری کیست های آکانتاموبا. نمونه‌ها: کنترل منفی(بدون حضور دارو) ، عصاره الکلی اسپند و کنترل مثبت (قطره پلی هگزانايد ۰/۰۲ درصد).

بحث

درمطالعه حاضر تأثیر غلظت‌های متفاوت عصاره الکلی اسپند بر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج حاصل با افزایش غلظت عصاره در زمان معین و هم‌چنین با افزایش زمان مجاورت عصاره با تروفوزوئیت‌ها و کیست ها، درصد کشندگی تروفوزوئیت‌ها و کیست ها افزایش می‌یابد. در نهایت، ۷۲ ساعت پس از تأثیر عصاره الکلی اسپند بر روی تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا هیچ تروفوزوئیت زنده‌ای وجود نداشت و LD50 آن پس از ۷۲ ساعت برای تروفوزوئیت‌ها ۲/۳۰۳ میلی‌گرم بر میلی لیتر بود. هم‌چنین ۷۲ ساعت پس از تأثیر عصاره الکلی اسپند بر کیست های آکانتاموبا ۲۱/۱۰

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:20 +0430 on Sunday April 8th 2018

درصد از کیست ها زنده بودند و LD50 پس از ۷۲ ساعت برای کیست‌ها ۲/۳۷۷ میلی‌گرم بر میلی لیتر بود. نتایج آزمون MTT برای درصد انگل‌های زنده در حضورعصاره، پس از ۷۲ ساعت تأیید می‌کند که اسپند الکلی اثر کشندگی قوی بر روی تروفوزوئیت ها و کیست‌های آکانتاموبا دارد.

در مطالعه‌ای در سال ۱۳۸۷ توسط خوش زبان و همکاران، اثر پگانوم هارمالا بر توکسوپلاسموزیس حاد در مدل موشی بررسی شد.

نتایج نشان داد که عصاره پگانوم هارمالا باعث بقای بیشتر حیوانات آلوده به توکسوپلاسما شده و میزان بروز این انگل در برخی بافت‌های حیوان مهار می‌شود. تاکی زوئیت‌ها در کبد و مغز موش‌های دریافت کننده عصاره مشاهده نشدند، اما در طحال این موش ها به تعداد کم ملاحظه شدند (۲۲).

دیبا و همکاران در سال ۱۳۸۸ به بررسی میزان مهارکنندگی عصاره الکلی دانه گیاه اسپند بر روی گونه‌های کاندیدا و آسپرژیلوس در شرایط آزمایشگاهی پرداختند. بر اساس یافته های این مطالعه، بیشترین اثر مهارکنندگی رشد بر روی گونه های کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا گلابراتا و کمترین آن بر روی گونه کاندیدا آلبیکانس تعیین شد (۲۳).

مطالعاتی نیز در زمینه ارزیابی اثر عصاره‌های گیاهی بر روی انگل آکانتاموبا صورت گرفته است. برای نمونه در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۸ توسط اکین پلات و همکاران، اثر بخشی غیر قطبی عصاره متانولی سیر روی رشد کیست‌ها و تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا کاستلانی در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد و بخش غیر قطبی عصاره متانولی سیر رشد تروفوزوئیت‌ها و کیست‌ها را مهار کرد (۲۴).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ توسط رونکرونچای و همکاران فعالیت ضدآمیبی چندین بخش از عصاره متانولی Pouzolzia indica بر روی کیست‌های آکانتاموبا در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد و عصاره متانولی روی کیست آکانتاموبا اثر cysticidal داشت (۲۵).

در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۰ توسط رونکرونچای و همکاران، فعالیت ضدآمیبی عصاره‌های متانولی Pouzolzia indica و Virkon در مقابل کیست-های آکانتاموبا مقایسه شد. هر دو عامل منجر به آسیب ساختاری مشابه در کیست‌های آکانتاموبا شدند، کیست‌ها به وسیله جزء ۳ عصاره متانولی Pouzolzia در غلظت‌های ۱ به ۸ کشته شدند و به وسیله محلول Virkon در غلظت ۰/۲۵ درصد تا ۲۴ ساعت کشته شدند (۲۶).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ توسط اکیل و همکاران، خواص ضدآکانتاموبایی ریزوراترول (موجود در انگور و شراب قرمز) و دی متوکسی کرکیومن تعیین شد. از این دو ترکیب، ریزوراترول به خاطر سمیت انتخابی روی آکانتاموبا کاستلانی برای بررسی بیشتر جالب است. این دو ترکیب اثرات ضدآمیبی چشمگیری را به ترتیب به میزان ۲۳ و ۲۵ درصد نشان می‌دهند (۲۷).

نتیجه‌گیری

از آن‌جایی که عصاره الکلی اسپند بر روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در شرایط برون‌تنی مؤثر بود، این مطالعه ضرورت استفاده از گیاهان را جهت استفاده از خواص دارویی آن‌ها مورد تأکید داد و تحقیقات بیشتر برای ارزیابی این عصاره بر انگل آکانتاموبا در مدل های حیوانی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله به عنوان بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس می باشد.

بدین‌وسیله، از کلیه همکاران محترم گروه و معاونت پژوهشی دانشگاه و دانشکده تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:20 +0430 on Sunday April 8th 2018

منابع

1.Lorenzo-Morales J, Martin-Navarro CM, Lopez-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Pinero JE, Valladares B. Acanthamoeba keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? Trends Parasitol. 2013;29(4):181-7.

2.Arnalich-Montiel F, Jaumandreu L, Leal M, Valladares B, Lorenzo-Morales J. Scleral and intraocular amoebic dissemination in acanthamoeba keratitis. Cornea. 2013;32(12):1625-7.

3.Rezeaian M, Farnia S, Niyyati M, Rahimi F. Amoebic keratitis in Iran (1997-2007). Iran J Parasitol. 2007;2(3):1-6.

4.Lorenzo-Morales J, Marciano-Cabral F, Lindo JF, Visvesvara GS, Maciver SK. Pathogenicity of amoebae. Academic Press; 2010.

5.Cao Z, Jefferson DM, Panjwani N. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of Acanthamoeba. J Biol Chem. 1998;273(25):15838-45.

6.Kennett MJ, Hook RR, Franklin CL, Riley LK. Acanthamoeba castellanii: characterization of an adhesin molecule. Exp Parasitol. 1999;92(3):161-9.

7.Weekers PH, Wijen JP, Lomans BP, Vogels GD. Axenic mass cultivation of the free-living soil amoeba, Acanthamoeba castellanii in a laboratory fermentor. Antonie van Leeuwenhoek. 1996;69(4):317-22.

8.Illingworth CD, Cook SD. Acanthamoeba keratitis. Survey of ophthalmology. 1998;42(6):493-508.

9.Kayser O, Kiderlen A, Croft S. Natural products as antiparasitic drugs. Parasitol Res. 2003;90(2):S55-S62.

10.Berrougui H, Martín-Cordero C, Khalil A, Hmamouchi M, Ettaib A, Marhuenda E, et al. Vasorelaxant effects of harmine and harmaline extracted from Peganum harmala L. seed's in isolated rat aorta. Pharmacol Res. 2006;54(2):150-7.

11.Loub W, Farnsworth N, Soejarto D, Quinn M. NAPRALERT: computer handling of natural product research data. J Chem Inf Comput Sci. 1985;25(2):99-103.

12. Glasby J. Encyclopedia of the alkaloids. 1978:658-61.

13.Mahdavi M MJ. Sculexicidal effects of alcoholic extract of Peganum harmala on Hidatid protosculex. J Med School 2002;60(3):215-26.

14.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.

15.Sharbatkori M, Nateghpur M, Edrisian G. Cidal activity of Peganum harmala on Plasmodium falciparum and comparing with Chloroquine in vitro. J Urmia Med Sci Univ. 2007;7(2):101-8.

16.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.

17.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.

18.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;110(6):2175-80.

19.Nayeri Chegeni T, Ghaffarifar F, Khoshzaban F, Dalimi Asl A. The Effects of Artemisinin and Aqueous and Alcoholic Extracts of Artemisia annua on Acanthamoeba Genotype T4 In Vitro. Modares J Med Sci Pathol 2016;19(2):75-87.

20.Salehi Surmaghi H. Medicinal plants and phytotherapy. Tehran, Iran: Donyaee Taghazie. 2006:55-8.

21.Samsam-Shariat S. Qualitative and quantitative evaluation of the active constituents and control methods for medical plants. Isfahan: Mani Publications. 1992:23-30.

22. Ghaffarifar F GF, Sharafi M, Ghasemi niko S. Effects of Peganum harmala in a mouse model of acute toxoplasmosis. Bimonthly Medical Journal Shahed University 2008;15(75).

Archive of SID

www.SID.ir

23. Diba K, Shoar MG, Shabatkhori M, Khorshivand Z. Anti fungal activity of alcoholic extract of Peganum harmala seeds. Journal of Medicinal Plant Research. 2011;5(23):5550-4.
24.Polat ZA, Vural A, Ozan F, Tepe B, Özcelik S, Cetin A. In vitro evaluation of the amoebicidal activity of garlic (Allium sativum) extract on Acanthamoeba castellanii and its cytotoxic potential on corneal cells. J Ocul Pharmacol Ther. 2008;24(1):8-14.
25.Roongruangchai K, Kummalue T, Sookkua T, Roongruangchai J. Several fractions of pouzolzia indica methanolic extract were lethal to the acanthamoeba cyst: in vitro study. 2009.
26.Roongruangchai K, Kummalue T, Sookkua T, Roongruangchai J. Comparison of Pouzolzia indica methanolic extract and Virkon® against cysts of Acanthamoeba spp. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010;41(4):776.
27.Aqeel Y, Iqbal J, Siddiqui R, Gilani AH, Khan NA. Anti-Acanthamoebic properties of resveratrol and demethoxycurcumin. Exp Parasitol. 2012; 132(4):519-23.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:20 +0430 on Sunday April 8th 2018

Archive of SID

www.SID.ir