Archive of SID

Original Article

The Effects of Artemisinin and Aqueous and Alcoholic Extracts of *Artemisia annua* on *Acanthamoeba* Genotype T4 In Vitro

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

1- M.Sc., 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 of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: ghafarif@modares.ac.ir

Received: 29/May/2016, Accepted: 27/Nov/2016

Abstract

Objective: Free-living amoebae, including Acanthamoeba constitute a large group of amoebae that live in fresh water, salty and bitter, moist soil, carious plants, and some on the stool. They are medically important agents. It is a medically important agent. The aim of the present study is to determine the effects of aqueous and alcoholic extracts of *Artemisia annua* on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* in vitro.

Methods: In this experimental research, after genotyping the clinical isolate, we prepared the aqueous and alcoholic extracts of *Artemisia annua*. Various concentrations (1.25, 2.5, 5, and 10 mg/ml) of the aqueous and alcoholic extracts of this plant as well as artemisinin were tested at three different times (24, 48 and 72 h) on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* in vitro. We evaluated viability of the parasite by trypan blue, MTT, and flow cytometry analyses.

Results: We observed the anti-acanthamoeba activity of different concentrations of the *Artemisia* extract. In the presence of 10 mg/ml alcoholic extract in medium culture after 72 h, we observed that 30.51% trophozoites and 91.40% cysts of *Acanthamoeba* were viable. However, in the presence of 10 mg/ml aqueous extract of *Artemisia annua*, only 58.25% trophozoites and 81.53% cysts were alive in the in medium culture after 72 h.

Conclusion: Aqueous and alcoholic extracts of *Artemisia annua* had dose- and time-dependent anti-acanthamoeba activity.

Keywords: Trophozoite, Cyst, *Acanthamoeba*, *Artemisia annua*, In vitro

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.2, Pages: 75-87

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله اصیل

تأثیر آرتمیزینین و عصاره الکلی و آبی گندواش (*Artemisia annua*) روی ژنوتیپ T4 آکانتامبا در شرایط برون تنی

توران نیری چگنی[1]، فاطمه غفاری فر[2*]، فریبا خوش زبان[3]، عبدالحسین دلیمی اصل[2]

۱- دانش آموخته 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

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی
Email: ghafarif@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۵/۰۳/۰۹ پذیرش مقاله: ۹۵/۰۹/۰۷

چکیده

هدف: آمیب‌های آزادزی از جمله آکانتامبا گروه بزرگی را تشکیل می‌دهند که در آب‌های شیرین، شور و تلخ، خاک مرطوب، گیاهان پوسیده و برخی روی مدفوع زندگی می‌کنند و از لحاظ پزشکی اهمیت دارند. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر عصاره الکلی و آبی گیاه گندواش روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در شرایط برون تنی انجام شد.
مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، پس از تعیین ژنوتیپ انگل جدا شده از بیمار، از گیاه آرتمیزیا آنووا عصاره‌های آبی و الکلی تهیه شد و غلظت‌های مختلف (۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از عصاره‌ها و آرتیمزینین در سه زمان مختلف (۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در شرایط برون تنی آزمایش شد. زنده بودن انگل‌ها با روش‌های تریپان بلو، MTT و فلوسایتومتری ارزیابی شد.
نتایج: مطالعه حاضر نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره آرتمیزیا آنووا فعالیت ضد آکانتاموبایی دارد. در حضور ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی در محیط کشت پس از ۷۲ ساعت، ۳۰/۵۱ درصد تروفوزوئیت‌ها و ۹۱/٤۰ درصد از کیست‌ها زنده بودند. همچنین در حضور ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی گندواش در محیط کشت، پس از ۷۲ ساعت ۵۸/۲۵ درصد و ۸۱/۵۳ درصد به‌ترتیب از تروفوزوئیت‌ها و کیست‌ها زنده بودند.
نتیجه‌گیری: عصاره‌های آبی و الکلی گیاه گندواش یک فعالیت ضدآمیبی وابسته به دوز و زمان را بر آکانتاموبا دارد.

کلیدواژگان: تروفوزوئیت، کیست، آکانتاموبا، عصاره الکلی، شرایط آزمایشگاهی

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵، صفحات: ۷۵-۸۷

مقدمه

آمیب با زندگی آزاد از جنس آکانتاموبا (*Acanthamoeba*) عامل ایجادکننده انسفالیت آمیبی گرانولوماتوز (Granulomatous amoebic encephalitis)، بیماری کشنده سیستم اعصاب مرکزی و کراتیت آمیبی (Acanthamoeba keratitis)، بیماری تهدید کننده بینایی چشم‌هاست [۱-٤]. لنزهای تماسی اصلی‌ترین ریسک فاکتور (عوامل خطرزا) در ایجاد کراتیت آمیبی است. علایم شامل درد شدید چشم، ترس از نور و التهاب حلقوی شکل قرنیه است [۵]. نشان داده شده است که بیش از ۸۰ درصد از افراد سالم دارای آنتی‌بادی آکانتاموبا هستند. بنابراین بیماری‌زایی آکانتاموبا نتیجه چندین فرآیند است که باید با هم رخ دهند و وابسته به ظرفیت چسبندگی مخاطی و مهاجرت بافتی آن است [٦]. آکانتاموبا در مرحله تروفوزوئیتی (Trophozoite stage) به سلول‌های اپیتلیال قرنیه انسان متصل می‌شود. مطالعات اخیر نشان

www.SID.ir

Archive of SID

داده‌است که کیست‌ها بی‌اثر هستند [۷]. وقتی شکل تروفوزوئیتی آکانتاموبا به اپیتلیوم قرنیه می‌چسبد، آن‌ها پروتئازهای مختلفی را تولید می‌کنند که حمله به قرنیه را تسهیل می‌کند در نتیجه انگل واسطه سیتولیز قرنیه است [۸]. IgA ترشحی که ایمنوگلوبین اصلی در اشک است به‌عنوان مانع اصلی در برابر چسبندگی میکروبی عمل می‌کند [۹]. مطالعات نشان داده است که آکانتامبا باعث تحریک مسیر کمپلمان آلترناتیو (Alternative complement pathway) می‌شود که مستقل از فعالیت آنتی‌بادی است. ماکروفاژها در مهار آکانتامبا نقش مهمی دارد [۱۰]. در سال‌های اخیر بروز عفونت‌های ناشی از آکانتاموبا افزایش قابل توجهی نشان داده است. این پدیده اغلب به علت افزایش تعداد استفاده کنندگان از لنزهای تماسی، آگاهی و تشخیص بهتر است [۱۴-۱۱]. کراتیت آکانتاموبایی در هر دو جنس زن و مرد و بین سنین ۲۳ تا ٦٧ ثبت شده‌است [۱۵].

نکته مهم درمورد بیماری کراتیت ناشی از آکانتاموبا، شناخت دارو یا ترکیب دارویی مناسب برای درمان بیماری است، طوری که برگونه‌های مختلف مؤثر باشد و برای بافت‌های چشمی نیز سمی نباشد. به‌منظور درمان بیماری کراتیت آکانتاموبائی مطالعات زیادی صورت گرفته است و محققان داروهای مختلفی را در این زمینه آزموده‌اند [۱٦،۱۷]. در برخی موارد هم از داروهای ترکیبی استفاده کرده‌اند. در سال‌های اخیر گرایش عمومی به استفاده از داروهای گیاهی افزایش یافته است که علت آن اثبات آثار مخرب و جانبی داروهای شیمیایی از یک طرف و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی که کره زمین را تهدید می‌کند از طرف دیگر است؛ همچنین بسیار کم هزینه‌تر از صنایع دارویی شیمیایی هستند. در سال ۱۹۷۲ ماده مؤثر و فعال این گیاه یعنی آرتمیزینین (Artemisinin) جدا شد و ساختار شیمیایی آن تشریح شد. آرتمیزینین توسط یک حلال با نقطه جوش پایین مانند دی اتیل اتر جدا شد. این ماده در ساختمان رشته‌ای غده مانند برگ‌ها، ساقه‌ها و گل آذین وجود دارد و در سرتاسر گیاه پخش می‌شود [۲۰-۱۸].

داروی آرتمیزینین توسط دانشمندان چینی از یک گونه درمنه به‌نام آرتمیزیا آنووا (*Artemisia annua*) معرفی شد که در حال حاضر به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. آرتمیزینین یک سزکوئی ترپن لاکتون (Sesquiterpene lactone) است که تا به‌حال برای درمان بیش از ۱/۵ میلیون بیمار مبتلا به مالاریا به‌ویژه مالاریای مغزی استفاده شده است [۲۱]. آرتمیزیا آنوا یا گندواش در ایران به نام درمنه خزری معروف است و گیاهی است یک ساله و معطر که بومی آسیا و شرق اروپاست و در نواحی معتدل وجود دارد. در چین این گیاه به‌عنوان یک ماده ضد تب و ضد مالاریا به‌کار می‌رود [۲۲، ۲۳]. آرتمیزینین علاوه بر آثار ضد مالاریایی بر ضد سلول‌های سرطانی مختلف مثل لوسمی و سرطان کولون نیز مؤثر است [۲٤]. تحقیقات نشان می‌دهد که آرتمیزینین در شرایط آزمایشگاهی مانع از فعالیت ویروس‌های ایدز، هپاتیت B و C، هرپس ویروس نوع یک و ویروس EBR (Epstein Barr virus) می‌شود [۲۵].

تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا یا گندواش روی مرحله کیستی انگل ژیاردیا لامبلیا (*Giardia lamblia*) در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده و نتایج حاصل نشان داده که این عصاره می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب مؤثر برای از بین بردن کیست‌های انگل ژیاردیا استفاده شود [۲٦]. در این مطالعه با توجه به‌ویژگی‌هایی که عنوان شد، تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی و الکلی گیاه گندواش روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در شرایط آزمایشگاهی در سه زمان ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت تعیین شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه طی نامه‌ای به شماره ۸٦۳۵/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.

www.SID.ir

Archive of SID

گونه آکانتاموبا

گونه آکانتاموبا مورد استفاده در این مطالعه از یک بیمار مبتلا به کراتیت آکانتاموبایی به‌دست آمد. تشخیص کراتیت آکانتاموبایی براساس کشت و تعیین توالی صورت گرفت و براساس نتایج تعیین توالی ژنوتایپ نمونه T4 بود (BankIt1899920 seq5 KU877552). ژنوتایپ T4 شایع‌ترین عامل عفونت آکانتامبایی کراتیتی و غیر کراتیتی در ایران و سراسر جهان است [۲۷-۳۰]. بیش از ۹۰ درصد از موارد کراتیت آکانتاموبایی متعلق به این ژنوتایپ است [۱۳]. استفاده از پلیت‌های آگار غیر مغذی پوشیده شده با باکتری‌ها، برای جداسازی هر دو آمیب نمونه‌های بالینی و زیست محیطی توصیه می‌شود. آکانتاموبا همچنین می‌تواند در شرایط بدون باکتری (اگزنیک: Axenic) در یک محیط کشت غنی شدهٔ اصلاح شده (پپتون، عصاره مخمر، گلوکز و مواد معدنی) حاوی آنتی‌بیوتیک [پنی‌سیلین (Penicillin)، استرپتومایسین (Streptomycin)] رشد کند. عموماً آمیب‌ها تک هسته‌ای هستند ولی زمانی که آکانتاموباها در محیط کشت هستند، عموماً چند هسته‌ای هم ممکن است مشاهده شوند. تکثیر این انگل هم از طریق تقسیم دوتایی است [۳۱].

در این تحقیق از محیط کشت آگار غیر مغذی ۱/۵ درصد (Non nutrient agar: NNA) استفاده شد. نمونه روی محیط کشت آگار غیر مغذی به همراه باکتری اشریشیا کلی، به‌عنوان منبع غذایی، کشت و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. تشخیص میکروسکوپی با PCR تأیید شد. به‌وسیله BLAST search نشان داده شد که این جدایه متعلق به ژنوتایپ T4 است.

آماده کردن تروفوزوئیت‌ها

آکانتاموبا روی پلیت‌های کشت آگار غیر مغذی در ۲۶ درجه سانتی‌گراد همراه با اشریشیا کلی کشت داده شد. بعد از ۷۲-۹۶ ساعت تروفوزوئیت‌ها در پلیت‌ها با محلول سالین استریل دوبار شسته و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه دو بار سانتریفوژ شد. تعداد تروفوزوئیت‌ها با تریپان بلو (Trypan blue) و شمارش مستقیم تروفوزوئیت روی لام نئوبار تعیین شد. غلظت نهایی ۱۵×۱۰^{۴} تروفوزوئیت در میلی‌لیتر بود و تروفوزوئیت‌ها سریع در آزمایش استفاده شدند [۳۲].

آماده کردن کیست‌ها

آکانتاموبا روی پلیت‌های کشت آگار غیر مغذی در ۲۶ درجه سانتی‌گراد همراه با اشریشیا کلی کشت داده شد. بعد از سه هفته کیست‌ها در پلیت‌ها با محلول سالین استریل دوبار شسته و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه دو بار سانتریفوژ شد. تعداد کیست‌ها با تریپان بلو و شمارش مستقیم کیست روی لام نئوبار تعیین شد. غلظت نهایی ۱۵×۱۰^{۴} کیست در میلی‌لیتر بود و تروفوزوئیت‌ها سریع در آزمایش استفاده شدند [۳۲].

آماده کردن عصاره

عصاره الکلی گندواش

گیاه گندواش از گیاهان بومی استان مازندران است در فصل بهار گیاه جمع‌آوری شد و سپس خشک شده و زیر نظر کارشناس هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی تأیید و کد هرباریومی آن که ۸۰۸۰ بود، دریافت شد. ابتدا مقدار ۵۰ گرم از گیاه کاملاً خرد و در یک بشر ۱۰۰۰ سی‌سی منتقل شد و مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۵-۸۷ درصد ریخته شد و یک همزن مغناطیسی یا (Magnetic stirrer) درون آن قرار داده شد و روی آن با پارافیلم پوشانیده شد. سپس بشر روی هیتر همزن مغناطیسی به‌مدت ٤-٦ ساعت قرار داده شد و بعد از آن به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. تمامی محلول به‌وسیله گاز استریل صاف شد. پس از سانتریفوژ محلول روی لوله‌ها به یک بشر دیگر منتقل شد و سریعاً در دستگاه تبخیر گذاشته شد تا الکل اضافی از محلول خارج شود [۳۳]. عصاره باقیمانده به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر یا کمتر در لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و در فریزر ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس لوله‌ها از فریزر خارج و به

www.SID.ir

Archive of SID

دستگاه لیوفیلیزه منتقل شد. لوله‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در دستگاه لیوفیلیزه قرار گرفت تا در نهایت عصاره خشک حاصل شد. عصاره خشک حاصل تا زمان استفاده در فریزر۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

عصاره آبی گندواش

ابتدا مقدار ۵۰ گرم از گیاه کاملاً خرد و در یک بشر ۱۰۰۰ سی‌سی منتقل شد و ۲۰۰ میلی‌لیتر آب روی آن ریخته و ۳۰-٦۰ دقیقه روی حرارت بسیار ملایم گذاشته شد و پس از جوشیدن از روی شعله برداشته شد و بعد از ۵ دقیقه با کاغذ صافی، صاف شد. بعد مایع صاف شده در بن ماری ٦۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد تا حدی گذاشته شد که حالت عسلی پیدا کند [۳٤]. روش دیگر این است که مایع صاف شده به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر یا کمتر در لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و در فریزر۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شود. سپس لوله‌ها را از فریزر خارج کرده و به دستگاه لیوفیلیزه منتقل شوند. لوله‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در دستگاه لیوفیلیزه قرار داده شوند تا در نهایت عصاره خشک حاصل شود. عصاره خشک حاصل باید تا زمان استفاده در فریزر ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود.

تهیه رقت‌های مختلف از عصاره‌ها

مقدار۲۰ میلی‌گرم عصاره از عصاره خشک در ۱۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) حل شد و با آب مقطر به حجم ۱ میلی‌لیتر رسید و غلظت‌های (۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از عصاره تهیه شد. به‌دلیل عدم حلالیت کامل عصاره الکلی گندواش با غلظت‌های بیشتر از غلظت‌های بالاتر استفاده نشد.

تعیین فعالیت ضدآمیبی عصاره‌های گیاهی

در این مطالعه از میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استفاده شد. تحت شرایط استریل و زیر هود، به هر میکروتیوپ مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون تروفوزوئیت/کیست حاوی تعداد ۱۵×۱۰^{٤} انگل آکانتاموبا اضافه شد. کیست و تروفوزوئیت هر دو از محیط آگار غیر مغذی به‌دست آمده است. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آبی یا الکلی گندواش در غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به‌طور جداگانه به میکروتیوپ‌های حاوی انگل اضافه شد. سپس میکروتیوپ‌ها در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. تمامی آزمایش‌ها به‌صورت ۳ بار تکرار انجام گرفت. تأثیر عصاره‌ها بر تروفوزوئیت/کیست انگل آکانتاموبا در سه زمان ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد. تمامی آزمایشات شامل یک کنترل منفی (سوسپانسیون تروفوزوئیت یا کیست و آب مقطر استریل حاوی DMSO ۱ درصد) و یک کنترل مثبت (آرتمیزینین با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بودند، که آرتمیزینین با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در آزمایش استفاده شد. آرتمیزینین به‌عنوان کنترل مثبت و فقط برای مقایسه تأثیر داروی شیمیایی آرتمیزینین با عصاره گیاه گندواش که ماده مؤثر آن آرتمیزینین است، استفاده شد و چون در دوزهای پایین‌تر داروی شیمیایی آرتمیزینین تأثیر کمی بر کیست داشت این دوز به‌کار برده شد.

آثار عصاره روی انگل

پس از گذشت دوره زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت از مجاورت انگل و غلظت‌های مختلف عصاره در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ میکرولیتر از محلول آزمایش با همان حجم از محلول تریپان بلو مخلوط شد، نمونه‌ها در دمای اتاق ۳ دقیقه انکوبه شد و سپس تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های زنده و غیر زنده رنگ‌آمیزی و به‌طور جداگانه در لام نئوبار شمارش شدند و تمام آزمون‌ها سه بار تکرار شد. (انگل زنده رنگ نمی‌گیرد ولی غیر زنده‌ها رنگ می‌گیرند)

محاسبه درصد حیات شمارش با لام نئوبار

$$\text{درصد حیات} = \frac{\text{تعداد انگل زنده}}{\text{تعداد انگل مرده+تعداد انگل زنده}} \times ۱۰۰$$

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

بررسی میزان اثر بخشی عصاره‌های گیاهی بر اساس شمارش تعداد انگل با استفاده از لام نئوبار

برای ارزیابی تأثیر عصاره الکلی گندواش بر تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد و بعد از ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت از تأثیر عصاره الکلی گندواش بر تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا با استفاده از رنگ حیاتی تریپان بلو تعداد تروفوزوئیت‌های زنده در مقایسه با گروه کنترل شمارش شد (جدول ۱).

جدول ۱ درصد زنده ماندن تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گندواش؛ داده‌ها حاصل میانگین حداقل سه تکرار مستقل هستند.

غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	درصد حیات (Mean±SD) ۲٤ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ٤۸ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۷۲ ساعت
۱۰	۳/۸۵±۳۵/۵۵	۳/۹۲±۳٤/۱۸	٤/۵٤±۳۰/۵۱
۵	۹/۳۹±۵۹/۰۲	٤/۲٤±٤۸/٤۸	۳/۳۸±۳٦/۳٤
۲/۵	۷/۰۵±٦۳/٤۹	٤/۷۳±۵٦/۰٦	٤/۰۰±٤۸/۷۱
۱/۲۵	۹/۲۳±۷۷/۰۹	۲/۳۸±٦۸/۹٤	٤/۹٤±٦٦/۵۳
کنترل	۰±۱۰۰	۰±۱۰۰	۰±۱۰۰

اثر زمان بر کاهش تروفوزوئیت‌های زنده معنی‌دار است. با افزایش غلظت از ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاهش درصد زنده بودن تروفوزوئیت‌ها معنی‌دار نیست (P=>۰/۰۵)، اما در سایر غلظت‌ها، کاهش درصد زنده بودن با افزایش غلظت معنی‌دار است.

اثر زمان بر کاهش کیست‌های زنده معنی‌دار است. با افزایش غلظت از ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاهش معنی‌داری در درصد زنده بودن کیست‌ها مشاهده نشد (P=>۰/۰۵)، اما در سایر غلظت‌ها، کاهش درصد زنده بودن با افزایش غلظت معنی‌دار است (جدول ۲).

افزایش زمان و غلظت عصاره آبی گندواش باعث کاهش معنی‌دار (P<=۰/۰۵) تعداد تروفوزوئیت‌های زنده آکانتاموبا می‌شود (جدول ۳).

جدول ۲ درصد زنده ماندن کیست‌های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گندواش؛ داده‌ها حاصل میانگین حداقل سه تکرار مستقل هستند.

غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	درصد حیات (Mean±SD) ۲٤ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ٤۸ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۷۲ ساعت
۱۰	۹۲/٦٦±۰/۳۱	۹۱/۸۷±۰/۳٦	۹۱/٤۰±۰/٤۳
۵	۹۷/۷۷±۳/۸۵	۹۲/٦٦±۰/۳۱	۹۲/۸۰±۰/۳٦
۲/۵	۹۷/۹۱±۳/٦۰	۹۳/۰۱±۰/۲۷	۹۲/٦٦±۰/۳۱
۱/۲۵	۱۰۰±۰	۹۷/۷۷±۳/۸۵	۹۵/۳۹±۳/۹۹
کنترل	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳ درصد زنده ماندن تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گندواش؛ داده‌ها حاصل میانگین حداقل سه تکرار مستقل هستند.

غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	درصد حیات (Mean±SD) ۲٤ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ٤٨ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۷۲ ساعت
۱۰	۷۲/٦۹±٦/۷٦	٦۷/۰٦±۸/۷۹	۵۸/۲۵±۵/۵۵
۵	۸۱/٤۲±۳/۷۷	۷۵/٦۳±۳/۷٤	۷۰/۳۱±۸/٤۷
۲/۵	۸٤/۵٤±۲/۸۸	۸۳/٦٤±٤/٤۲	۷۳/۷٤±۷/۳۰
۱/۲۵	۹۸/۱٤±۳/۲۱	۹۳/۸۷±٦/۲۵	۹۱/۳۱±۷/٦۲
کنترل	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰

اثر زمان بر کاهش کیست‌های زنده معنی‌دار نیست. با افزایش غلظت از ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاهش درصد زنده بودن کیست‌ها معنی‌دار نیست (P=>۰/۰۵)، اما در سایر غلظت‌ها، کاهش درصد زنده بودن با افزایش غلظت معنی‌دار است (جدول ٤).

درصد تروفوزوئیت‌های زنده ۷۲ ساعت بعد از تأثیر آرتمیزینین به صفر درصد رسید. درصد کیست‌های زنده ۷۲ ساعت بعد از تأثیر آرتمیزینین به ۳۰/۰۳ درصد رسید (جدول ۵).

برای تأیید نتایج از MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] استفاده شد که نتایج حاصل از MTT هم داده‌های فوق را تأیید کرد.

جدول ٤ درصد زنده ماندن کیست‌های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گندواش؛ داده‌ها حاصل میانگین حداقل سه تکرار مستقل هستند.

غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	درصد حیات (Mean±SD) ۲٤ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ٤٨ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۷۲ ساعت
۱۰	۸٦/۰۲±۰/۵٤	۸٤/۹۷±۰/٦۳	۸۱/۵۳±۲/٦٦
۵	۹۵/۳۹±۳/۹۹	۹۲/٤۸±۰/۳۱	۹۱/۸۷±۰/۳٦
۲/۵	۹٦/۰۷±۷/۷۹	۹۵/۳۹±۳/۹۹	۹۲/٤۸±۰/۳۱
۱/۲۵	۱۰۰±۰	۹۸/۰۳±۳/٤۵	۹۷/۷۷±۳/۸۵
کنترل	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰

جدول ۵ محاسبه درصد حیات تروفوزوئیت‌ها و کیست‌ها پس از تأثیر آرتمیزینین؛ داده‌ها حاصل میانگین حداقل سه تکرار مستقل هستند.

	درصد حیات(Mean±SD) ۲٤ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ٤٨ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۷۲ ساعت
تروفوزوئیت	۷۱/٤۲±۷/۱٤	٤۱/٤٦±٤/۲٤	۰/۰۰
کیست	۷٦/۱۱±٤/۳٤	٦۰/۹۸±۳/٦۰	۳۰/۰۳±۷/۷۹

محاسبه مقدار دز کشنده ۵۰ درصد (LD_{50}) برای ترکیبات مورد آزمایش روی تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا و مقایسه آن‌ها

مقدار LD_{50} بعد از ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism 5 محاسبه شد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که مقدار LD_{50} عصاره الکلی گندواش ۷۲ ساعت بعد از تأثیر بر تروفوزوئیت‌ها ۲/۵۰۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است، در حالی‌که مقدار LD_{50} عصاره آبی گندواش ۷۲ ساعت بعد از تأثیر بر تروفوزوئیت‌ها ۱۳/٤۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است (جدول ٦).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٦ میزان LD_{50} عصاره آبی و الکلی گندواش روی تروفوزوئیت‌ها بعد از ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت

ترکیب	زمان		
	٢٤ ساعت	٤٨ ساعت	٧٢ ساعت
	LD_{50} (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	LD_{50} (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	LD_{50} (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)
گندواش الکلی	٥/٤١٠	٣/٩٩٧	٢/٥٠٧
گندواش آبی	٢٩/٢٧	٢١/٤٢	١٣/٤٢

محاسبه مقدار LD_{50} برای ترکیبات مورد آزمایش روی کیست‌های آکانتاموبا و مقایسه آن‌ها

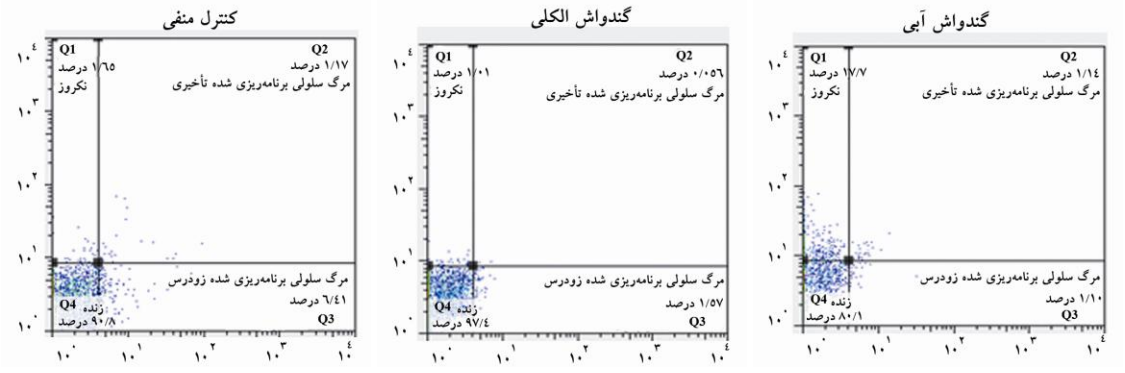
مقدار LD_{50} بعد از ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism 5 محاسبه شد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که مقدار LD_{50} عصاره الکلی گندواش ٧٢ ساعت بعد از تأثیر بر کیست‌ها ٢٨/٨٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است، در حالی‌که مقدار LD_{50} عصاره آبی گندواش ٧٢ ساعت بعد از تأثیر بر کیست‌ها ٢٤/٧٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است (جدول ٧).

جدول ٧ میزان LD_{50} عصاره آبی و الکلی گندواش روی کیست‌ها بعد از ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت

ترکیب	زمان		
	٢٤ساعت	٤٨ساعت	٧٢ ساعت
	LD_{50} (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	LD_{50} (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	LD_{50} (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)
گندواش الکلی	١٠٣/٩	٥٠/٣٧	٢٨/٨٠
گندواش آبی	٨٥/٧٢	٤٣/٨٧	٢٤/٧٠

نتایج فلوسایتومتری

برای افتراق انگل دچار نکروز و دچار مرگ برنامه‌ریزی شده آکانتاموبای مواجه شده با دوزهای مختلف عصاره آبی و الکلی گندواش از روش رنگ‌آمیزی آنکسین V (Annexin-V) استفاده شد. در گروه کنترل درصد سلول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده پس از ٧٢ ساعت (٧/٥٨ درصد) بود. در نمونه تحت درمان با گندواش الکلی ٧٢ ساعت پس از درمان کمترین میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (١/٦٢درصد) نشان داده شد و در نمونه تحت درمان با گندواش آبی ٧٢ ساعت پس از درمان میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (٢/٢٤درصد) بود.



شکل ١ آنالیز فلوسایتومتری کیست‌های آکانتاموبا نمونه‌ها: کنترل منفی (بدون حضور دارو)، عصاره آبی و الکلی گندواش

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

کراتیت آکانتاموبایی عفونت قرنیه با روندی مزمن است که به‌وسیله چندین گونه آکانتاموبا ایجاد می‌شود. عفونت به‌وسیله تماس مستقیم قرنیه با آمیب، به‌علت ترومای کوچک ایجاد شده در روی قرنیه، تماس با آب آلوده یا استفاده از لنزهای تماسی که آلوده شده‌اند اتفاق می‌افتد [۳۵]. این بیماری معمولاً طی چند هفته یا چند ماه با درد شدید قرنیه و تورم که مشخصه آن است، پیشرفت می‌کند و اگر به درستی درمان نشود می‌تواند منجر به از بین رفتن بینایی وکوری بیمار شود [۳٦]. تشخیص زود هنگام و درمان مناسب برای نتیجه مطلوب در این عفونت ضروری است و پزشکان لازم است از تاریخ استفاده لنزهای تماسی یا سایر علایم مشکوک به کراتیت آگاه باشند [۳۷]. در مطالعه حاضر تأثیر غلظت‌های متفاوت عصاره الکلی و آبی گیاه گندواش در محیط آزمایشگاهی بررسی شد. براساس نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی و آبی گیاه گندواش روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در شرایط آزمایشگاهی با افزایش غلظت گیاه در زمان معین میانگین درصد کشندگی روی تروفوزوئیت‌ها افزایش می یابد. از طرفی در این تحقیق با افزایش زمان مجاورت عصاره الکلی و آبی گیاه گندواش در هر یک از غلظت‌ها درصد کشندگی و تأثیر گیاهی در از بین بردن تروفوزوئیت‌ها و کیست های آکانتاموبا به نحو معنی‌داری به‌ویژه در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش می‌یابد.

درصد زنده ماندن تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گندواش بعد از ۲٤ ساعت در بالاترین غلظت عصاره یعنی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۳۵/۵۵ درصد و بعد از ٤۸ ساعت به ۳٤/۱۸ درصد و بعد از ۷۲ ساعت به ۳۰/۵۱ درصد رسید در حالی‌که درصد زنده ماندن تروفوزوئیت های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گندواش بعد از ۲٤ ساعت در بالاترین غلظت عصاره یعنی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۷۲/٦۹ درصد و بعد از ٤۸ ساعت به ٦۷/۰٦ درصد و بعد از ۷۲ ساعت به ۵۸/۲۵ درصد رسید.

درصد زنده ماندن کیست‌های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گندواش بعد از ۲٤ ساعت در بالاترین غلظت عصاره یعنی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۹۲/٦٦ درصد و بعد از ٤۸ ساعت ۹۱/۸۷ درصد و بعد از ۷۲ ساعت به ۹۱/٤۰ درصد رسید در حالی‌که درصد زنده ماندن کیست‌های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گندواش بعد از ۲٤ ساعت در بالاترین غلظت عصاره یعنی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۸٦/۰۲ درصد و بعد از ٤۸ ساعت۸٤/۹۷ درصد و بعد از ۷۲ ساعت به ۸۱/۵۳ درصد رسید.

در مطالعه‌ای درسال ۲۰۱۲ توسط دیگرلی و همکاران فعالیت ضدآمیبی عصاره استخراج شده از پاستیناکا آرمینیا (*Pastinaca armenea*) و زنجبیل شامی (*Inula ocolus Christi*) ارزیابی شد که اینولا قوی‌ترین اثر ضدآمیبی را روی کیست‌ها و تروفوزوئیت‌ها نشان داد. در حضور ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان ۲٤ ساعت تروفوزوئیت زنده‌ای مشاهده نشد، علاوه بر این در حضور ۱٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اینولا هیچ تروفوزوئیت زنده‌ای در ۷۲ ساعت دیده نشد. تأثیر اینولا روی کیست ها متوسط بود، در حضور ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره فقط ۲۵/۳ از کیست‌ها کشته شده بودند [۳۸].

در مطالعه‌ای در سال۲۰۱۳ توسط دردا و همکاران فعالیت ضدآمیبی عصاره الکلی زولنگ یا چوچاق (*Erynigium planum*) در برابر آکانتاموبا کاستلانی (*Acanthamoeba castellanii*) ارزیابی شد. عناصر اتانولی از برگ‌های پایه‌ای و ریشه ها استخراج شد. تقریباً همه بخش‌ها فعالیت ضدآمیبی وابسته به دوز و زمان را روی تروفوزوئیت‌ها داشتند. بخش اسید فنولیک از ریشه‌ها در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فعالیت ضدآمیبی روی تروفوزوئیت‌ها را نشان داد [۳۹].

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ توسط کاسترو و همکاران اثر عصاره آکانتوسپرموم اوسترال (*Acanthospermum austral*) روی تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا پلی‌فاگا (*Acanthamoeba polyphaga*) در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد. نتایج نشان

www.SID.ir

Archive of SID

داد که غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی کافی است تا ۱۰۰ درصد تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا پلی‌فاگا در ۲٤ ساعت از بین برود [٤٠].

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ توسط نیتی و همکاران، ۵۰ نمونه از منابع آب استان گیلان از جمله منابع طبیعی و مصنوعی جمع‌آوری شدند و PCR و تعیین توالی با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن صورت گرفت [٤١].

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ توسط محمودی و همکاران، ٦١ نمونه آب به‌طور تصادفی از میادین و استخر پارک‌های ۱۳ منطقه در مشهد جمع‌آوری شد. و در نهایت در ۱۵ نمونه، آمیب با زندگی آزاد در دمای اتاق رشد کرد و در کل نمونه‌های آب مورد آزمایش شده ٦ نمونه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مثبت بودند [٤٢].

در مطالعه‌ای توسط مقصود و همکاران، ۱۳ نمونه بالینی کراتیت و ۱۲ نمونه محیطی از ایران تعیین توالی شدند. از میان ۱۳ نمونه بالینی ۸ نمونه متعلق به ژنوتایپ T4 و دو نمونه متعلق به T3 و سه نمونه متعلق به T2 بود. در مقابل اکثریت نمونه‌های محیطی آزمایش شده(۷ نمونه) متعلق به ژنوتایپ T2 و بعد از آن چهار نمونه متعلق به ژنوتایپ T4 بود [۲۹].

در ایران نیز شنبلیله (*Trigonella Foenum Graecum*) به‌عنوان داروی ضد آکانتاموبا معرفی شده‌است و آثار ضد آکانتاموبایی خوبی را نشان داده‌است [٤٣].

در مطالعه‌ای توسط رحیمی اسبویی و همکاران در سال ۱۳۹۱، تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا یا گندواش روی مرحله کیستی انگل ژیاردیا لامبلیا (*Giardia lamblia*) در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مدت ۲٤ ساعت به‌عنوان یک ترکیب مؤثر برای از بین بردن کیست‌های انگل ژیاردیا استفاده شد [۲۳].

در مطالعه‌ای آلبرت و همکاران در سال ۲۰۱۲ عصاره اتانولی گیاه آرتمیزیا آنووا را بر انگل Heterobranchuslongifilis اثر دادند. عصاره با غلظت ۸۵ میلی‌گرم بر لیتر در۹۰ دقیقه انگل را به‌طور کامل از بین برد [٤٤].

بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این تحقیقات می‌توان گندواش را که در از بین بردن تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در شرایط آزمایشگاهی در غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت مؤثراست برای استفاده درمانی و تحقیقات بعدی در حیوانات آزمایشگاهی توصیه نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله به‌عنوان بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی پزشکی مصوب دانشکدهٔ علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی این دانشگاه به انجام رسیده است. بدین‌وسیله، از کلیه همکاران محترم گروه و معاونت پژوهشی دانشگاه و دانشکده تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

[1] Culbertson CG. Pathogenic Acanthamoeba (Hartmanella). Am J Clin Pathol 1961; 35: 195-202.

[2] Jones DB, Visvesvara GS, Robinson NM. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acenthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. Trans Ophthalmol Soc U K 1975; 95(2): 221-32.

[3] Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathol 1997; 7(1): 583-98.

[4] Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. Amoebic infection of the eye. Lancet 1974; 2(7896): 1537-40.

www.SID.ir

Archive of SID

[5] Penland RL, Wilhelmus KR. Comparison of axenic and monoxenic media for isolation of *Acanthamoeba*. J Clin Microbiol 1997; 35(4): 915-22.

[6] Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. Pathol Biol (Paris) 2012; 60(6): 399-405.

[7] Garate M, Marchant J, Cubillos I, Cao Z, Khan NA, Panjwani N. In vitro pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006; 47(3): 1056-62.

[8] Illingworth CD, Cook SD, Karabatsas CH, Easty DL. *Acanthamoeba* keratitis: risk factors and outcome. Br J Ophthalmol 1995; 79(12): 1078-82.

[9] Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Piñero JE, Valladares B. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? Trends Parasitol 2013; 29(4): 181-7.

[10] Walochnik J, Sommer K, Obwaller A, Haller-Schober EM, Aspöck H. Characterisation and differentiation of pathogenic and non-pathogenic *Acanthamoeba* strains by their protein and antigen profiles. Parasitol Res 2004; 92(4): 289-98.

[11] Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 50(1): 1-26.

[12] Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasit Vectors 2012; 5: 6.

[13] Astorga B, Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, Alarcón V, Moreno J, González AC, Navarrete E, Piñero JE, Valladares B. *Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: genotypes isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile. J Eukaryot Microbiol 2011; 58(6): 542-4.

[14] Panjwani N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. Ocul Surf 2010; 8(2): 70-9.

[15] Mahgoub MA. *Acanthamoeba* Keratitis. Parasitologists United Journal 2010; 3(1,2): 9-18.

[16] Schuster FL, Visvesvara GS. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. Drug Resist Updat 2004; 7(1): 41-51.

[17] Gatti S, Cevini C, Bruno A, Penso G, Rama P, Scaglia M. In vitro effectiveness of povidone-iodine on *Acanthamoeba* isolates from human cornea. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42(9): 2232-4.

[18] Derda M, Hadaś E, Cholewiński M, Skrzypczak Ł, Grzondziel A, Wojtkowiak-Giera A. *Artemisia annua L.* as a plant with potential use in the treatment of acanthamoebiasis. Parasitol Res 2016; 115(4): 1635-9.

[19] Sharif M, Ziaei H, Azadbakht M, Daryani A, Ebadattalb A, Rostami M. Effeet of methanolic extract of *Artemisia auchori* and *Camellia sinansis* on Leishmania major (in vitro). Turk J Med Sci 2006; 36(6): 365-9.

[20] Blanke CH, Naisabha GB, Balema MB, Mbaruku GM, Heide L, Müller MS. Herba *Artemisiae annuae* tea preparation compared to sulfadoxine-pyrimethamine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in adults: a

www.SID.ir

Archive of SID

randomized double-blind clinical trial. Trop Doct 2008; 38(2): 113-6.

[21] Evans WC. Trease and Evans pharmacognosy. Translated by Afsharipour S. Esfahan: Esfahan University of Medical Sciences, 2007; p: 410-35.

[22] Jun-li H, Hong W, He-chun Y, Yan L, Zhen-qiu L, Yi Z, Yan-sheng Z, Fang Y, Guo-feng L. High efficiency of genetic transformation and regeneration of *Artemisia annua* L. via *Agrobacterium tumefaciens* - mediated procedure. Plant Science 2005; 168: 73-80.

[23] Kim Y. Wyslouzil B, Weathers P. A comparative study of mist and bubble column reactors in the in vitro production of artemisinin. Plant Cell Rep 2001; 20(5): 451-5.

[24] Baldi A, Dixit VK. Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension cultures of *Artemisia annua*. Bioresour Technol 2008; 99(11): 4609-14.

[25] Efferth T, Romero MR, Wolf DG, Stamminger T, Marin JJ, Marschall M. The antiviral activities of artemisinin and artesunate. Clin Infect Dis 2008; 47(6): 804-11.

[26] Rahimi-Esboei B, Gholami SH, Azadbakht M, Ziaei H. Effect of Hydroalcholic extract of *Artemisia annua* on cysts of Giardia lamblia in Invitro. J Mazandaran Univ Med Sci 2012; 22(90): 71-80. (Persian).

[27] Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Mohebali M, Maghsood AH, Motevalli-Haghi A, Martín-Navarro CM, Farnia S, Valladares B, Rezaeian M. Genotyping of *Acanthamoeba* isolates from clinical and environmental specimens in Iran. Exp Parasitol 2009; 121(3): 242-5.

[28] Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelly DJ, Fuerst PA. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 1689-93.

[29] Maghsood AH, Sissons J, Rezaian M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. J Med Microbiol 2005; 54(Pt 8): 755-9.

[30] Rahdar M, Niyyati M, Salehi M, Feghhi M, Makvandi M, Pourmehdi M, Farnia S. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from environmental sources in Ahvaz city, Khuzestan province, southern Iran. Iran J Parasitol 2012; 7(4): 22-6.

[31] Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin Microbiol Rev 2002; 15(3): 342-54.

[32] 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.

[33] Samsamshriat H. Extraction and extraction of medicinal plants and methods for their identification. Tehran: Tehran Pub; 1993.

[34] Abbasi N, Azizi Jalilian F, Abdi M, Saifmanesh M. A comparative study of the antimicrobial effect of *Scrophularia striata* boiss. Extract and selective antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Pesudomonas aeroginosa*. JMP 2007; 1(supple 3): 10-18.

www.SID.ir

Archive of SID

(Persian).

[35] Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev 2003; 16(2): 273-307.

[36] Szénási Z, Endo T, Yagita K, Nagy E. Isolation, identification and increasing importance of 'free-living' amoebae causing human disease. J Med Microbiol 1998; 47(1): 5-16.

[37] Hammersmith KM. Diagnosis and management of *Acanthamoeba* keratitis. Curr Opin Ophthalmol 2006; 17(4): 327-31.

[38] Degerli S, Berk S, Malatyali E, Tepe B. Screening of the in vitro amoebicidal activities of *Pastinaca armenea* (Fisch. & C.A.Mey.) and *Inula oculus-christi* (L.) on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. Parasitol Res 2012; 110(2): 565-70.

[39] Derda M, Thiem B, Budzianowski J, Wojt WJ, Wojtkowiak-Giera A. The evaluation of the amebicidal activity of *Eryngium planum* extracts. Acta Pol Pharm 2013; 70(6): 1027-34.

[40] Castro LC, Sauter IP, Ethur EM, Kauffmann C, Dall'agnol R, Souza J, Cibulski SP, Muniz AW, Weidlich L, Lohmann, PM, Roehe PM, Germani JC, Rott MB, Vand Der Sand ST. In vitro effect of *Acanthospermum australe* (Asteraceae) extracts on *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. Rev Bras Plantas Med 2013; 15(4): 589-94.

[41] Niyyati M, Nazar M, Lasjerdi Z, Haghighi A, Nazemalhosseini-Mojarad E. Reporting of T4 genotype of *Acanthamoeba* isolates in recreational water sources of Gilan province, northern Iran. Novel Biomed 2015; 3(1): 20-4.

[42] Mahmoudi MR, Berenji F, Fata A, Najafzadeh MJ, Asadian A, Salehi M. Morphological characterization of potentially pathogenic thermophilic amoebae isolated from surface water in Mashhad, Iran. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(4): e25944.

[43] Dodangeh S, Niyyati M, Kamalinejad M. Anti-*Acanthamoeba* activities of chloroformic fractions of *Trigonella Foenum* graecum (seed) and their cytotoxity on mice macrophage cell. Novel Biomed 2015; 3(4): 182-8.

[44] Ekanem AP, Brisibe EA. Effects of ethanol extract of *Artemisia annua L.* against monogenean parasites of *Heterobranchus longifilis*. Parasitol Res 2010; 106(5): 1135-9.

www.SID.ir