

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

Tooran Nayeri Chegeni¹, Fatemeh Ghaffarifar^{2*}, Fariba Khoshzaban³,
Abdolhosein Dalimi Asl²

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: ghafarifar@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

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

توران نیری چگنی^۱، فاطمه غفاری فر^{۲*}، فریبا خوش زبان^۳، عبدالحسین دلیمی اصل^۲

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

پذیرش مقاله: ۹۵/۰۹/۰۷

دریافت مقاله: ۹۵/۰۳/۰۹

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 آرتیمیزیا آنووا عصاره‌های آبی و الکلی تهیه شد و غلظت‌های مختلف (۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) از عصاره‌ها و آرتیمیزینین در سه زمان مختلف (۲۴، ۴۸ 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 آرتیمیزیا آنووا فعالیت ضد آکانتاموبایی دارد. در حضور ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره الکلی در محیط کشت پس از ۷۲ ساعت، ۳۰/۵۱ درصد تروفوزوئیت‌ها و ۹۱/۴۰ درصد از کیست‌ها زنده بودند. همچنین در حضور ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره آبی گندواش در محیط کشت، پس از ۷۲ ساعت ۵۸/۲۵ درصد و ۸۱/۵۳ درصد به ترتیب 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

از نور و التهاب حلقوی شکل قرنيه 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 [۶]. آکانتاموبا در مرحله تروفوزوئیتی (Trophozoite stage) به سلول‌های اپیتلیال قرنيه انسان متصل می‌شود. مطالعات اخیر نشان

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 [۱-۴]. لنزهای تماسی اصلی‌ترین ریسک فاکتور (عوامل خطرزا) در ایجاد کراتیت آمیبی است. علائم شامل درد شدید چشم، ترس

[۲۰-۱۸].

داروی آرتیمیزینین توسط دانشمندان چینی از یک گونه درمنه به نام آرتیمیزیا آنوا (*Artemisia annua*) معرفی شد که در حال حاضر به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. آرتیمیزینین یک سزکوئی ترپن لاکتون (Sesquiterpene lactone) است که تا به حال برای درمان بیش از ۱/۵ میلیون بیمار مبتلا به مالاریا به ویژه مالاریای مغزی استفاده شده است [۲۱]. آرتیمیزیا 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 به عنوان یک ماده ضد تب و ضد مالاریا به کار می‌رود [۲۲، ۲۳]. آرتیمیزینین علاوه بر آثار ضد مالاریایی بر ضد سلول‌های سرطانی مختلف مثل لوسمی و سرطان کولون نیز مؤثر است [۲۴]. تحقیقات نشان می‌دهد که آرتیمیزینین 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 ژیا ردیا لامبلیا (*Giardia lamblia*) در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده و نتایج حاصل نشان داده که این عصاره می‌تواند به عنوان یک ترکیب مؤثر برای از بین بردن کیست‌های انگل ژیا ردیا استفاده شود [۲۶]. در این مطالعه با توجه به ویژگی‌هایی که عنوان شد، تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی و الکلی گیاه گندواش روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در شرایط آزمایشگاهی در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تعیین شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه طی نامه‌ای به شماره ۵۲۵/۸۶۳۵ 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.

داده‌است که کیست‌ها بی‌اثر هستند [۷]. وقتی شکل تروفوزوئیتی آکانتاموبا به اپیتلیوم قرنيه می‌چسبد، آن‌ها پروتئازهای مختلفی را تولید می‌کنند که حمله به قرنيه را تسهیل می‌کند در نتیجه انگل واسطه سیتولیز قرنيه است [۸]. IgA ترشحی که ایمنوگلوبین اصلی در اشک است به عنوان 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 [۱۱-۱۴]. کراتیت آکانتاموبایی در هر دو جنس زن و مرد و بین سنین ۲۳ تا ۶۷ ثبت شده است [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. به منظور درمان بیماری کراتیت آکانتاموبایی مطالعات زیادی صورت گرفته است و محققان داروهای مختلفی را در این زمینه آزموده‌اند [۱۶، 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 آرتیمیزینین (*Artemisinin*) جدا شد و ساختار شیمیایی آن تشریح شد. آرتیمیزینین 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

گونه آکانتاموبا

گونه آکانتاموبا مورد استفاده در این مطالعه از یک بیمار مبتلا به کراتیت آکانتاموبایی به دست 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 شایع ترین عامل عفونت آکانتاموبایی 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 پلیت های آگار غیر مغذی پوشیده شده با باکتری ها، برای جداسازی هر دو آمیب نمونه های بالینی و زیست محیطی توصیه می شود. آکانتاموبا همچنین می تواند در شرایط بدون باکتری (اگزینیک: Axenic) در یک محیط کشت غنی شده اصلاح شده (پیتون، عصاره مخمر، گلوکز و مواد معدنی) حاوی آنتی بیوتیک [پنی سیلین (Penicillin)، استرپتومایسین (Streptomycin)] رشد کند. عموماً آمیب ها تک هسته ای هستند ولی زمانی که آکانتاموباها در محیط کشت هستند، عموماً چند هسته ای 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 اشیریشیا کلی، به عنوان منبع غذایی، کشت و در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. تشخیص میکروسکوپی با PCR تأیید شد. به وسیله BLAST search نشان داده شد که این جدایه متعلق به ژنوتایپ T4 است.

آماده کردن تروفوزوئیت ها

آکانتاموبا روی پلیت های کشت آگار غیر مغذی در ۲۶ درجه سانتی گراد همراه با اشیریشیا کلی کشت داده شد. بعد از ۷۲-۹۶ ساعت تروفوزوئیت ها در پلیت ها با محلول سالین استریل دوبار شسته و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵

دقیقه دو بار سانتریفوژ شد. تعداد تروفوزوئیت ها با تریپان بلو (Trypan blue) و شمارش مستقیم تروفوزوئیت روی لام نئوبار تعیین شد. غلظت نهایی $10^4 \times 15$ تروفوزوئیت در میلی لیتر بود و تروفوزوئیت ها سریع در آزمایش استفاده شدند [۳۲].

آماده کردن کیست ها

آکانتاموبا روی پلیت های کشت آگار غیر مغذی در ۲۶ درجه سانتی گراد همراه با اشیریشیا کلی کشت داده شد. بعد از سه هفته کیست ها در پلیت ها با محلول سالین استریل دوبار شسته و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه دو بار سانتریفوژ شد. تعداد کیست ها با تریپان بلو و شمارش مستقیم کیست روی لام نئوبار تعیین شد. غلظت نهایی $10^4 \times 15$ کیست در میلی لیتر بود و تروفوزوئیت ها سریع در آزمایش استفاده شدند [۳۲].

آماده کردن عصاره

عصاره الکلی گندواش

گیاه گندواش از گیاهان بومی استان مازندران است در فصل بهار گیاه جمع آوری 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 سی سی منتقل شد و مقدار ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۵-۸۷ درصد ریخته شد و یک همزن مغناطیسی یا (Magnetic stirrer) درون آن قرار داده شد و روی آن با پارافیلیم پوشانیده شد. سپس بشر روی هیتز همزن مغناطیسی به مدت ۴-۶ ساعت قرار داده شد و بعد از آن به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. تمامی محلول به وسیله گاز استریل صاف شد. پس از سانتریفوژ محلول روی لوله ها 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 میلی لیتر یا کمتر در لوله های فالكون ۵۰ میلی لیتری ریخته و در فریزر ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس لوله ها از فریزر خارج و به

تأثیر آرتیمیزینین و عصاره گندواش (*Artemisia annua*) بر ژنوتیپ T4 آکانتامبا در شرایط برون تنی

۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون تروفوزوئیت/کیست حاوی تعداد $10^4 \times 15$ انگل آکانتاموبا اضافه شد. کیست و تروفوزوئیت هر دو از محیط آگار غیر مغذی به دست آمده است. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آبی یا الکلی گندواش در غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، به طور جداگانه به میکروتیوپ‌های حاوی انگل اضافه شد. سپس میکروتیوپ‌ها در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. تمامی آزمایش‌ها به صورت ۳ بار تکرار انجام گرفت. تأثیر عصاره‌ها بر تروفوزوئیت/کیست انگل آکانتاموبا در سه زمان ۲۴، ۴۸ 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 (آرتیمیزینین با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) بودند، که آرتیمیزینین با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در آزمایش استفاده شد. آرتیمیزینین به عنوان کنترل مثبت و فقط برای مقایسه تأثیر داروی شیمیایی آرتیمیزینین با عصاره گیاه گندواش که ماده مؤثر آن آرتیمیزینین است، استفاده شد و چون در دوزهای پایین تر داروی شیمیایی آرتیمیزینین تأثیر کمی بر کیست داشت این دوز به کار برده شد.

آثار عصاره روی انگل

پس از گذشت دوره زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از مجاورت انگل و غلظت‌های مختلف عصاره در ۳۰ درجه سانتی گراد، 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 رنگ آمیزی و به طور جداگانه در لام نتوبار شمارش شدند و تمام آزمون‌ها سه بار تکرار شد. (انگل زنده رنگ نمی گیرد ولی غیر زنده‌ها رنگ می گیرند)

محاسبه درصد حیات شمارش با لام نتوبار

$$100 \times \frac{\text{تعداد انگل زنده}}{\text{تعداد انگل زنده} + \text{تعداد انگل مرده}} = \text{درصد حیات}$$

دستگاه لیوفیلیزه منتقل شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه لیوفیلیزه قرار گرفت تا در نهایت عصاره خشک حاصل شد. عصاره خشک حاصل تا زمان استفاده در فریزر ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

عصاره آبی گندواش

ابتدا مقدار ۵۰ گرم از گیاه کاملاً خرد و در یک بشر ۱۰۰۰ سی سی منتقل شد و ۲۰۰ میلی لیتر آب روی آن ریخته و ۳۰-۶۰ 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 ۶۰-۷۰ درجه سانتی گراد تا حدی گذاشته شد که حالت عسلی پیدا کند [۳۴]. روش دیگر این است که مایع صاف شده به مقدار ۲۵ میلی لیتر یا کمتر در لوله‌های فالتکون ۵۰ میلی لیتری ریخته و در فریزر ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شود. سپس لوله‌ها را از فریزر خارج کرده و به دستگاه لیوفیلیزه منتقل شوند. لوله‌ها به مدت ۲۴ 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 سانتی گراد نگهداری شود.

تهیه رقت‌های مختلف از عصاره‌ها

مقدار ۲۰ میلی گرم عصاره از عصاره خشک در ۱۰ میکرولیتر DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) حل شد و با آب مقطر به حجم ۱ میلی لیتر رسید و غلظت‌های (۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) از عصاره تهیه شد. به دلیل عدم حلالیت کامل عصاره الکلی گندواش با غلظت‌های بیشتر از غلظت‌های بالاتر استفاده نشد.

تعیین فعالیت ضد آمیبی عصاره‌های گیاهی

در این مطالعه از میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی لیتری استفاده شد. تحت شرایط استریل و زیر هود، به هر میکروتیوپ مقدار

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 میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره تهیه شد و بعد از ۲۴، ۴۸ 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 (میلی گرم بر میلی لیتر)	درصد حیات (Mean±SD) ۲۴ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۴۸ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۷۲ ساعت
۱۰	۳/۸۵±۳۵/۵۵	۳/۹۲±۳۴/۱۸	۴/۵۴±۳۰/۵۱
۵	۹/۳۹±۵۹/۰۲	۴/۲۴±۴۸/۴۸	۳/۳۸±۳۶/۳۴
۲/۵	۷/۰۵±۶۳/۴۹	۴/۷۳±۵۶/۰۶	۴/۰۰±۴۸/۷۱
۱/۲۵	۹/۲۳±۷۷/۰۹	۲/۳۸±۶۸/۹۴	۴/۹۴±۶۶/۵۳
کنترل	۰±۱۰۰	۰±۱۰۰	۰±۱۰۰

اثر زمان بر کاهش تروفوزوئیت‌های زنده معنی دار است. با افزایش غلظت از ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر به ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر کاهش درصد زنده بودن تروفوزوئیت‌ها معنی دار نیست ($P \geq 0/05$)، اما در سایر غلظت‌ها، کاهش درصد زنده بودن با افزایش غلظت معنی دار است.

اثر زمان بر کاهش کیست‌های زنده معنی دار است. با افزایش غلظت از ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر به ۵ میلی گرم بر

میلی لیتر کاهش معنی داری در درصد زنده بودن کیست‌ها مشاهده نشد ($P \geq 0/05$)، اما در سایر غلظت‌ها، کاهش درصد زنده بودن با افزایش غلظت معنی دار است (جدول ۲).

افزایش زمان و غلظت عصاره آبی گندواش باعث کاهش معنی دار ($P \leq 0/05$) 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 (میلی گرم بر میلی لیتر)	درصد حیات (Mean±SD) ۲۴ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۴۸ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۷۲ ساعت
۱۰	۹۲/۶۶±۰/۳۱	۹۱/۸۷±۰/۳۶	۹۱/۴۰±۰/۴۳
۵	۹۷/۷۷±۳/۸۵	۹۲/۶۶±۰/۳۱	۹۲/۸۰±۰/۳۶
۲/۵	۹۷/۹۱±۳/۶۰	۹۳/۰۱±۰/۲۷	۹۲/۶۶±۰/۳۱
۱/۲۵	۱۰۰±۰	۹۷/۷۷±۳/۸۵	۹۵/۳۹±۳/۹۹
کنترل	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰

تأثیر آرتیمیزینین و عصاره گندواش (*Artemisia annua*) بر ژنوتیپ T4 آکانتامبا در شرایط برون‌تنی

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

غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)	درصد حیات (Mean±SD) ۲۴ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۴۸ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۷۲ ساعت
۱۰	۷۲/۶۹±۶/۷۶	۶۷/۰۶±۸/۷۹	۵۸/۲۵±۵/۵۵
۵	۸۱/۴۲±۳/۷۷	۷۵/۶۳±۳/۷۴	۷۰/۳۱±۸/۴۷
۲/۵	۸۴/۵۴±۲/۸۸	۸۳/۶۴±۴/۴۲	۷۳/۷۴±۷/۳۰
۱/۲۵	۹۸/۱۴±۳/۲۱	۹۳/۸۷±۶/۲۵	۹۱/۳۱±۷/۶۲
کنترل	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰

اثر زمان بر کاهش کیست‌های زنده معنی‌دار نیست. با افزایش غلظت از ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر به ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر کاهش درصد زنده بودن کیست‌ها معنی‌دار نیست ($P>0.05$)، اما در سایر غلظت‌ها، کاهش درصد زنده بودن با افزایش غلظت معنی‌دار است (جدول ۴). درصد تروفوزوئیت‌های زنده ۷۲ ساعت بعد از تأثیر

آرتیمیزینین به صفر درصد رسید. درصد کیست‌های زنده ۷۲ ساعت بعد از تأثیر آرتیمیزینین 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 ۴ درصد زنده ماندن کیست‌های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گندواش؛ داده‌ها حاصل میانگین حداقل سه تکرار مستقل هستند.

غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)	درصد حیات (Mean±SD) ۲۴ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۴۸ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۷۲ ساعت
۱۰	۸۶/۰۲±۰/۵۴	۸۴/۹۷±۰/۶۳	۸۱/۵۳±۲/۶۶
۵	۹۵/۳۹±۳/۹۹	۹۲/۴۸±۰/۳۱	۹۱/۸۷±۰/۳۶
۲/۵	۹۶/۰۷±۷/۷۹	۹۵/۳۹±۳/۹۹	۹۲/۴۸±۰/۳۱
۱/۲۵	۱۰۰±۰	۹۸/۰۳±۳/۴۵	۹۷/۷۷±۳/۸۵
کنترل	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰

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

	درصد حیات (Mean±SD) ۲۴ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۴۸ ساعت	درصد حیات (Mean±SD) ۷۲ ساعت
تروفوزوئیت	۷۱/۴۲±۷/۱۴	۴۱/۴۶±۴/۲۴	۰/۰۰
کیست	۷۶/۱۱±۴/۳۴	۶۰/۹۸±۳/۶۰	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 ۲۴، ۴۸ 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 میلی گرم بر میلی لیتر است، در حالی که مقدار LD_{50} عصاره آبی گندواش ۷۲ ساعت بعد از تأثیر بر تروفوزوئیت‌ها ۱۳/۴۲ میلی گرم بر میلی لیتر است (جدول ۶).

جدول ۶ میزان LD₅₀ عصاره آبی و الکلی گندواش روی تروفوزوئیت‌ها بعد از ۴۸، ۷۲ و ۲۴ ساعت

ترکیب	زمان		
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
گندواش الکلی	LD ₅₀ (میلی گرم/ میلی لیتر) ۵/۴۱۰	LD ₅₀ (میلی گرم/ میلی لیتر) ۳/۹۹۷	LD ₅₀ (میلی گرم/ میلی لیتر) ۲/۵۰۷
گندواش آبی	۲۹/۳۷	۲۱/۴۲	۱۳/۴۲

محاسبه مقدار LD₅₀ برای ترکیبات مورد آزمایش روی کیست‌های آکانتاموبا و مقایسه آن‌ها

مقدار LD₅₀ بعد از ۴۸، ۷۲ و ۲۴ ساعت با استفاده از

نرم‌افزار Graphpad prism 5 محاسبه شد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که مقدار LD₅₀ عصاره الکلی گندواش ۷۲ ساعت بعد از تأثیر بر کیست‌ها ۲۸/۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر است، در حالی که مقدار LD₅₀ عصاره آبی گندواش ۷۲ ساعت بعد از تأثیر بر کیست‌ها ۲۴/۷۰ میلی گرم بر میلی لیتر است (جدول ۷).

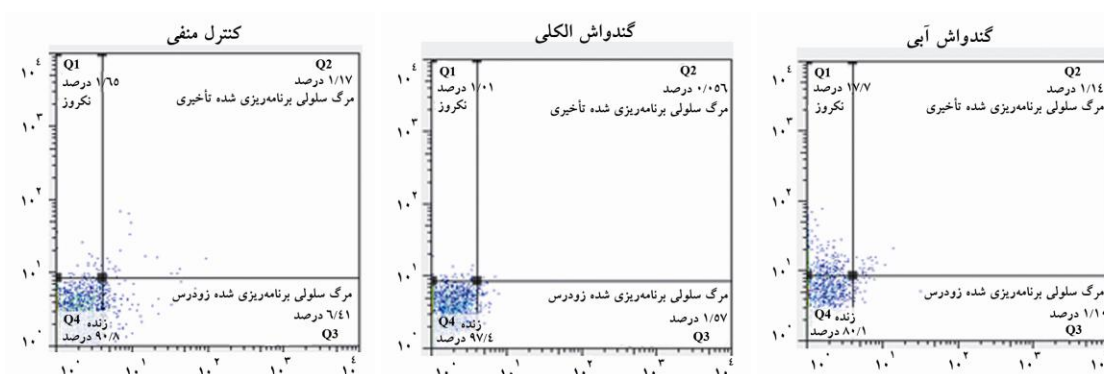
جدول ۷ میزان LD₅₀ عصاره آبی و الکلی گندواش روی کیست‌ها بعد از ۴۸، ۷۲ و ۲۴ ساعت

ترکیب	زمان		
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
گندواش الکلی	LD ₅₀ (میلی گرم/ میلی لیتر) ۱۰۳/۹	LD ₅₀ (میلی گرم/ میلی لیتر) ۵۰/۳۷	LD ₅₀ (میلی گرم/ میلی لیتر) ۲۸/۸۰
گندواش آبی	۸۵/۷۲	۴۳/۸۷	۲۴/۷۰

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 ۷۲ ساعت (۷/۵۸ درصد) بود. در نمونه تحت درمان با گندواش الکلی ۷۲ ساعت پس از درمان کمترین میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (۱/۶۲ درصد) نشان داده شد و در نمونه تحت درمان با گندواش آبی ۷۲ ساعت پس از درمان میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (۲/۲۴ درصد) بود.



شکل ۱ آنالیز فلوسایتومتری کیست‌های آکانتاموبا نمونه‌ها: کنترل منفی (بدون حضور دارو)، عصاره آبی و الکلی گندواش

درصد رسید.

درصد زنده ماندن کیست‌های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گندواش بعد از ۲۴ ساعت در بالاترین غلظت عصاره یعنی ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ۹۲/۶۶ درصد و بعد از ۴۸ ساعت ۹۱/۸۷ درصد و بعد از ۷۲ ساعت به ۹۱/۴۰ درصد رسید در حالی که درصد زنده ماندن کیست‌های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گندواش بعد از ۲۴ ساعت در بالاترین غلظت عصاره یعنی ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ۸۶/۰۲ درصد و بعد از ۴۸ ساعت ۸۴/۹۷ درصد و بعد از ۷۲ ساعت به ۸۱/۵۳ درصد رسید.

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ توسط دیگرلی و همکاران فعالیت ضدآمیبی عصاره استخراج شده از پاستیناکا آرمینیا (*Pastinaca armenea*) و زنجبیل شامی (*Inula oculus Christi*) ارزیابی شد که اینولا قوی‌ترین اثر ضدآمیبی را روی کیست‌ها و تروفوزوئیت‌ها نشان داد. در حضور ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر در زمان ۲۴ ساعت تروفوزوئیت زنده‌ای مشاهده نشد، علاوه بر این در حضور ۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر از اینولا هیچ تروفوزوئیت زنده‌ای در ۷۲ ساعت دیده نشد. تأثیر اینولا روی کیست‌ها متوسط بود، در حضور ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره فقط ۲۵/۳ از کیست‌ها کشته شده بودند [۳۸].

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ توسط دردا و همکاران فعالیت ضدآمیبی عصاره الکلی زولنگ یا چوپاق (*Eryngium planum*) در برابر آکانتاموبا کاستلانی (*Acanthamoeba castellanii*) ارزیابی شد. عناصر اتانولی از برگ‌های پایه‌ای و ریشه‌ها استخراج شد. تقریباً همه بخش‌ها فعالیت ضدآمیبی وابسته به دوز و زمان را روی تروفوزوئیت‌ها داشتند. بخش اسید فنولیک از ریشه‌ها در غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر 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 پلی فاگا (*Acanthamoeba polyphaga*) در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد. نتایج نشان

کراتیت آکانتاموبایی عفونت قرنیه با روندی مزمن است که به وسیله چندین گونه آکانتاموبا ایجاد می‌شود. عفونت به وسیله تماس مستقیم قرنیه با آمیب، به علت 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 و کوری بیمار شود [۳۶]. 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 می‌یابد. 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 کیست‌های آکانتاموبا به نحو معنی‌داری به‌ویژه در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر افزایش می‌یابد.

درصد زنده ماندن تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گندواش بعد از ۲۴ ساعت در بالاترین غلظت عصاره یعنی ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ۳۵/۵۵ درصد و بعد از ۴۸ ساعت به ۳۴/۱۸ درصد و بعد از ۷۲ ساعت به ۳۰/۵۱ درصد رسید در حالی که درصد زنده ماندن تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گندواش بعد از ۲۴ ساعت در بالاترین غلظت عصاره یعنی ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ۷۲/۶۹ درصد و بعد از ۴۸ ساعت به ۶۷/۰۶ درصد و بعد از ۷۲ ساعت به ۵۸/۲۵

داد که غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی کافی است تا ۱۰۰ درصد تروفوزوئیت های آکانتاموبیا پلی فاگا در ۲۴ ساعت از بین برود [۴۰].

در مطالعه ای در سال ۲۰۱۵ توسط نیتی و همکاران، ۵۰ نمونه از منابع آب استان گیلان از جمله منابع طبیعی و مصنوعی جمع آوری شدند و PCR و تعیین توالی با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن صورت گرفت [۴۱].

در مطالعه ای در سال ۲۰۱۵ توسط محمودی و همکاران، ۶۱ نمونه آب به طور تصادفی از میادین و استخر پارک های ۱۳ منطقه در مشهد جمع آوری شد. و در نهایت در ۱۵ نمونه، آمیب با زندگی آزاد در دمای اتاق رشد کرد و در کل نمونه های آب مورد آزمایش شده ۶ نمونه در ۳۷ درجه سانتی گراد مثبت بودند [۴۲].

در مطالعه ای 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 نمونه های 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*) به عنوان داروی ضد آکانتاموبیا معرفی شده است و آثار ضد آکانتاموبیایی خوبی را نشان داده است [۴۳].

در مطالعه ای توسط رحیمی اسبویی و همکاران در سال ۱۳۹۱، تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا یا گندواش روی

مرحله کیستی انگل ژیا ردیا لامبلیا (*Giardia lamblia*) در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر در مدت ۲۴ ساعت به عنوان یک ترکیب مؤثر برای از بین بردن کیست های انگل ژیا ردیا استفاده شد [۲۳].

در مطالعه ای آلبرت و همکاران در سال ۲۰۱۲ عصاره اتانولی گیاه آرتمیزیا آنووا را بر انگل *Heterobranhus longifilis* اثر دادند. عصاره با غلظت ۸۵ میلی گرم بر لیتر در ۹۰ دقیقه انگل را به طور کامل از بین برد [۴۴].

بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این تحقیقات می توان گندواش را که در از بین بردن تروفوزوئیت ها و کیست های آکانتاموبیا در شرایط آزمایشگاهی در غلظت های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مؤثر است برای استفاده درمانی و تحقیقات بعدی در حیوانات آزمایشگاهی توصیه نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله به عنوان بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی این دانشگاه به انجام رسیده است. بدین وسیله، از کلیه همکاران محترم گروه و معاونت پژوهشی دانشگاه و دانشکده تشکر و قدردانی به عمل می آید.

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 *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1975; 95(2): 221-32.
- [3] Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoid 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.

- [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, Amalich-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. Effect of methanolic extract of *Artemisia auchori* and *Camellia sinensis* 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

- 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 Hydroalcoholic 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, Mohebal 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] Samsamshariat 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 *Pseudomonas aeruginosa*. JMP 2007; 1(supple 3): 10-18.

- (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 cytotoxicity 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.