

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 آرتمیزینین و عصاره الکلی و آبی گندواش (*Artemisia annua*) روی ژنوتیپ T4 آکانتامبا در شرایط بروون تئی

تودان نیری چگنی^۱، فاطمه غفاری فر^{۲*}، فریبا خوش زبان^۳، عبدالحسین دلیمی اصل^۴

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- استاد یار، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۶، 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 آزادی از جمله آکانتامبا گروه بزرگی را تشکیل می‌دهند که در آب‌های شیرین، شور و تلخ، خاک مرطوب، گیاهان پوسیله 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 بروون تئی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، پس از تعیین ژنوتیپ انگل جدا شده از بیمار، از گیاه آرتمیزیا آنسووا عصاره‌های آبی و الکلی تهیه شد و غلظت‌های مختلف (۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) از عصاره‌ها و آرتمیزینین در سه زمان مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در شرایط بروون تئی آزمایش شد. زنده بودن انگل‌ها با روش‌های تریپان بلو، MTT و فلوراسیوتومتری ارزیابی شد.

نتایج: مطالعه حاضر نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره آرتمیزیا آنسووا فعالیت ضد آکانتاموبا بی دارد. در حضور ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره الکلی در محیط کشت پس از ۷۲ ساعت، ۳۰/۰۱ 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 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 قرنیه است [۵]. نشان داده شده است که بیش از ۸۰ درصد از افراد سالم دارای آتنی‌بادی آکانتاموبا هستند. بنابراین بیماری زایی آکانتاموبا نتیجه چندین فرآیند است که باید با هم رخ دهنده و وابسته به ظرفیت چسبندگی مخاطی و مهاجرت بافتی آن است [۶]. آکانتاموبا در مرحله تروفوزوئیتی (Trophozoite stage) به سلول‌های اپیتلیال قرنیه انسان منصل می‌شود. مطالعات اخیر نشان

آمیب با زندگی آزاد از جنس آکانتاموبا (*Acanthamoeba*) عامل ایجاد کننده انسفالیت آمیبی گرانولوماتوز (Granulomatous amoebic encephalitis)، بیماری کشنده سیستم اعصاب مرکزی و کراتیت آمیبی (Acanthamoeba keratitis)، بیماری تهدید کننده بینایی چشم‌هاست [۱-۴]. لزهای تماسی اصلی ترین ریسک فاکتور (عوامل خطرزا) در ایجاد کراتیت آمیبی است. عالیم شامل درد شدید چشم، ترس

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

[۱۸-۲۰]

داروی آرتمیزینین توسط دانشمندان چینی از یک گونه درمنه به نام آرتمیزیا آنوا (*Artemisia annua*) معرفی شد که در حال حاضر به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. آرتمیزینین یک سزکوئی ترپن لاكتون (Sesquiterpene lactone) است که تا به حال برای درمان بیش از ۱/۵ میلیون بیمار مبتلا به مalaria به ویژه مalaria با 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 به عنوان یک ماده ضد تب و ضد مalaria به کار می‌رود [۲۲، ۲۳]. آرتمیزینین علاوه بر آثار ضد مalaria با بر ضد سلول‌های سرطانی مختلف مثل لوسمی و سرطان کولون نیز مؤثر است [۲۴]. 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 هیدرولالکلی گیاه گندنا یا گندواش روی مرحله کیستی انگل ژیارديا لامبیا (*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 ژیارديا 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 ۵۲/۸۶۳۵ در جلسه کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس مورخ ۱۳۹۳/۱۲/۲ مطرح و به شرط اخذ رضایت آگاهانه و محترمانه بودن اطلاعات به تأیید رسیده است.

داده‌است که کیست‌ها بی‌اثر هستند [۷]. وقتی شکل تروفوزوئیتی آکانتاموبا به اپتیلیوم 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 به عنوان مانع اصلی در برابر چسبندگی میکروبی عمل می‌کند [۹]. مطالعات نشان داده است که آکانتامبا باعث تحریک مسیر کمپلمان آلتراتیو (Alternative complement pathway) می‌شود که مستقل از فعالیت آتنی بادی 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 غالب 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 سینین ۲۳ تا ۷۷ 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 سالم نباشد. به‌منظور درمان بیماری کراتیت آکانتاموبائی 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 آرتمیزینین (Artemisinin) جدا شد و ساختار شیمیایی آن تشریح شد. آرتمیزینین توسط یک حلal با نقطه جوش پایین مانند دی‌تی‌بل اتر جدا شد. این ماده در ساختمان رشته‌ای غده مانند برگ‌ها، ساقه‌ها و گل آذین وجود دارد و در سرتاسر گیاه پخش می‌شود

دقیقه دو بار سانتریفوج شد. تعداد تروفوزوئیت‌ها با تریپان بلو (Trypan blue) و شمارش مستقیم تروفوزوئیت روی لام نوبار تعیین شد. غلظت نهایی 15×10^4 تروفوزوئیت در میلی‌لیتر بود و تروفوزوئیت‌ها سریع در آزمایش استفاده شدند [۳۲].

آماده کردن کیست‌ها

آکاتاموبا روی پلیت‌های کشت آگار غیر مغذی در ۲۶ درجه سانتی گراد همراه با اشريشیا کلی کشت داده شد. بعد از سه هفته کیست‌ها در پلیت‌ها با محلول سالین استریل دوبار شسته و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه دو بار سانتریفوج شد. تعداد کیست‌ها با تریپان بلو و شمارش مستقیم کیست روی لام نوبار تعیین شد. غلظت نهایی 15×10^4 کیست در میلی‌لیتر بود و تروفوزوئیت‌ها سریع در آزمایش استفاده شدند [۳۲].

آماده کردن عصاره

عصاره الكلی 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 $80\text{--}80$ بود، دریافت شد. ابتدا مقدار ۵۰ گرم از گیاه کاملاً خرد و در یک بشر $1000\text{--}1000$ سی سی متقل شد و مقدار 500 میلی‌لیتر اتانول $87\text{--}85$ 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 به مدت ۴ 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 سانتریفوج محلول روی لوله‌ها به یک بشر دیگر متقل شد و سریعاً در دستگاه تبخیر گذاشته شد تا الكل اضافی از محلول خارج شود [۳۳]. عصاره با قیمانده به مقدار 25 میلی‌لیتر یا کمتر در لوله‌های فالکون 50 میلی‌لیتری ریخته و در فریزر 70 درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس لوله‌ها از فریزر خارج و به

گونه آکاتاموبا

گونه آکاتاموبا مورد استفاده در این مطالعه از یک بیمار مبتلا به کراتیت آکاتاموبایی به دست آمد. تشخیص کراتیت آکاتاموبایی 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 آکاتامبایی کراتیتی و غیر کراتیتی در ایران و سراسر جهان است [۳۰-۳۷]. بیش از 90 درصد از موارد کراتیت آکاتاموبایی 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. آکاتاموبا همچنین می‌تواند در شرایط بدلون باکتری (اگزنیک: Axenic) در یک محیط کشت غنی شده اصلاح شده (پیتون، عصاره مخمر، گلوکز و مواد معدنی) حاوی آنتی‌بیوتیک [پنی‌سیلین (Penicillin)، استرپتومایسین (Streptomycin)] رشد کند. عموماً آمیب‌ها تک هسته‌ای هستند ولی زمانی که آکاتاموباهای 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 $1/5$ درصد (Non nutrient agar: NNA) استفاده شد. نمونه روی محیط کشت آگار غیر مغذی به همراه باکتری اشريشیا 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 تروفوزوئیت‌ها

آکاتاموبا روی پلیت‌های کشت آگار غیر مغذی در ۲۶ درجه سانتی گراد همراه با اشريشیا کلی کشت داده شد. بعد از $96\text{--}72$ ساعت تروفوزوئیت‌ها در پلیت‌ها با محلول سالین استریل دوبار شسته و با سرعت 1500 دور در دقیقه به مدت ۵

پژوهش‌های آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵

تأثیر آرتمیزینین و عصاره گندواش (*Artemisia annua*) بر ژنوتیپ T4 آکانتامبا در شرایط بروونتنی

۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون تروفوزوئیت/کیست حاوی تعداد $10^4 \times 10^4$ 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 ۱۰، ۵، ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، به طور جداگانه به میکروتیپ‌های حاوی انگل اضافه شد. سپس میکروتیپ‌ها 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 ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت بررسی شد. تمامی آزمایشات شامل یک کترل منفی (سوسپانسیون تروفوزوئیت یا کیست و آب مقطر استریل حاوی DMSO ۱ درصد) و یک کترل مثبت (آرتمیزینین با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) بودند، که آرتمیزینین با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در آزمایش استفاده شد. آرتمیزینین به عنوان کترل 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 به کار برده شد.

آثار عصاره روی انگل

پس از گذشت دوره زمانی ۴۸، ۲۴ 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 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

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

دستگاه لیوفیلیزه متقل 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 متقل 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 ۷۰-۶۰ 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 فالکون 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 متقل 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 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 ضدآمیبی عصاره‌های گیاهی

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

نتایج

آکانتامویا غلظت‌های ۱/۲۵، ۵، ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد و بعد از ۴۸، ۷۲ ساعت از تأثیر عصاره الكلی گندواش بر تروفوزوئیت‌های آکانتامویا با استفاده از رنگ حیاتی تربیان بلو تعداد تروفوزوئیت‌های زنده در مقایسه با گروه کنترل شمارش شد (جدول ۱).

بررسی میزان اثر بخشی عصاره‌های گیاهی بر اساس شمارش تعداد انگل با استفاده از لام نئوبار برای ارزیابی تأثیر عصاره الكلی گندواش بر تروفوزوئیت‌های

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

غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	درصد حیات (Mean±SD) ساعت ۷۲	درصد حیات (Mean±SD) ساعت ۴۸	درصد حیات (Mean±SD) ساعت ۲۴	غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۱۰	۴/۵۴±۳۰/۵۱	۳/۹۲±۳۴/۱۸	۳/۸۵±۳۵/۵۵	۴/۵۴±۳۰/۵۱
۵	۳/۳۸±۳۶/۳۴	۴/۲۴±۴۸/۴۸	۹/۳۹±۵۹/۰۲	۳/۳۸±۳۶/۳۴
۲/۵	۴/۰۰±۴۸/۷۱	۴/۷۳±۵۶/۰۶	۷/۰۵±۶۳/۴۹	۴/۰۰±۴۸/۷۱
۱/۲۵	۴/۹۴±۶۷/۵۳	۲/۳۸±۶۷/۹۴	۹/۲۳±۷۷/۰۹	۴/۹۴±۶۷/۵۳
کنترل	۰±۱۰۰	۰±۱۰۰	۰±۱۰۰	۰±۱۰۰

میلی‌لیتر کاهش معنی‌داری در درصد زنده بودن کیست‌ها مشاهده نشد ($P=0/05$)، 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 ($P=0/05$) تعداد تروفوزوئیت‌های زنده آکانتامویا می‌شود (جدول ۳).

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 ($P=0/05$)، 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

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

غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	درصد حیات (Mean±SD) ساعت ۷۲	درصد حیات (Mean±SD) ساعت ۴۸	درصد حیات (Mean±SD) ساعت ۲۴	غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۱۰	۹۱/۴۰±۰/۴۳	۹۱/۰۷±۰/۳۶	۹۲/۶۶±۰/۳۱	۹۱/۴۰±۰/۴۳
۵	۹۲/۸۰±۰/۳۶	۹۲/۶۶±۰/۳۱	۹۷/۷۷±۳/۸۵	۹۲/۸۰±۰/۳۶
۲/۵	۹۲/۶۶±۰/۳۱	۹۳/۰۱±۰/۲۷	۹۷/۹۱±۳/۶۰	۹۲/۶۶±۰/۳۱
۱/۲۵	۹۵/۳۹±۳/۹۹	۹۷/۷۷±۳/۸۵	۱۰۰±۰	۹۵/۳۹±۳/۹۹
کنترل	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰

تأثیر آرتمیزینین و عصاره گندواش (*Artemisia annua*) بر ژنوتیپ T4 آکانتامبا در شرایط بروونتنی

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 ۲۴ ساعت (Mean±SD)	درصد حیات ۴۸ ساعت (Mean±SD)	درصد حیات ۷۲ ساعت (Mean±SD)
۱۰	۷۲/۶۹±۶/۷۶	۶۷/۰۶±۸/۷۹	۵۸/۲۵±۵/۵۵
۵	۸۱/۴۲±۳/۷۷	۷۵/۳۱±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

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.

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

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 ۲۴ ساعت (Mean±SD)	درصد حیات ۴۸ ساعت (Mean±SD)	درصد حیات ۷۲ ساعت (Mean±SD)
۱۰	۸۷/۰۲±۰/۵۴	۸۴/۰۷±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 آرتمیزینین؛ داده‌ها حاصل میانگین حداقل سه تکرار مستقل هستند.

ترکیبات مورد آزمایش روی تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا و مقایسه آن‌ها	درصد حیات ۲۴ ساعت (Mean±SD)	درصد حیات ۴۸ ساعت (Mean±SD)	درصد حیات ۷۲ ساعت (Mean±SD)
تروفوزوئیت	۷۱/۴۲±۷/۱۴	۴۱/۴۶±۴/۲۴	۰/۰۰
کیست	۷۳/۱۱±۴/۳۴	۶۰/۹۸±۳/۶۰	۳۰/۰۳±۷/۷۹

محاسبه مقدار دز کشنه ۵۰ درصد (LD₅₀) برای Graphpad prism 5 عصاره الکلی گندواش ۷۲ ساعت بعد از تأثیر بر تروفوزوئیت‌ها ۲/۵۰۷ میلی گرم بر میلی لیتر است، در حالی که مقدار LD₅₀ عصاره آبی گندواش ۷۲ ساعت بعد از تأثیر بر تروفوزوئیت‌ها ۱۳/۴۲ میلی گرم بر میلی لیتر است (جدول ۶).

محاسبه مقدار دز کشنه ۵۰ درصد (LD₅₀) برای ترکیبات مورد آزمایش روی تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا و مقایسه آن‌ها مقدار LD₅₀ بعد از ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت با استفاده از نرمافزار

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

ترکیب	LD ₅₀ (میلی گرم/میلی لیتر)	ساعت ۲۴	ساعت ۴۸	ساعت ۷۲	زمان
گندواش الکلی	۵/۴۱۰	LD ₅₀ (میلی گرم/میلی لیتر)	LD ₅₀ (میلی گرم/میلی لیتر)	۲/۹۹۷	LD ₅₀ (میلی گرم/میلی لیتر)
گندواش آبی	۲۹/۲۷	۲۱/۴۲	۲/۹۹۷	۲/۹۹۷	۲/۹۹۷

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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است، در حالی که مقدار LD₅₀ عصاره آبی گندواش ۷۲ ساعت بعد از تأثیر بر کیست‌ها ۲۴/۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است (جدول ۷).

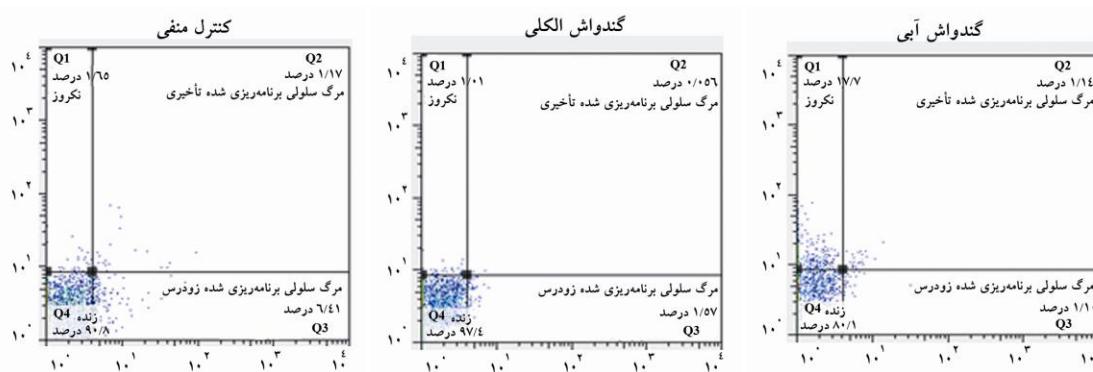
محاسبه مقدار LD₅₀ برای ترکیبات مورد آزمایش روی کیست‌های آکاتاموبا و مقایسه آن‌ها
مقدار LD₅₀ بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از

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

ترکیب	LD ₅₀ (میلی گرم/میلی لیتر)	ساعت ۲۴	ساعت ۴۸	ساعت ۷۲	زمان
گندواش الکلی	۱۰/۳/۹	LD ₅₀ (میلی گرم/میلی لیتر)	LD ₅₀ (میلی گرم/میلی لیتر)	۵۰/۳/۷	LD ₅₀ (میلی گرم/میلی لیتر)
گندواش آبی	۸۵/۷/۲	۴۳/۸/۷	۵۰/۳/۷	۲۸/۸/۰	۲۸/۸/۰

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 (۶/۶۲) 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.

نتایج فلوسایتومنتری
برای افتراق انگلی دچار نکروز و دچار مرگ برنامه‌ریزی شده آکاتاموبای 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



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

بحث

در صد رسید.

در صد 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 در ۹۱/۸۷ درصد و بعد از ۷۲ ساعت به ۹۱/۴۰ درصد رسید در حالی که در صد 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 ۸۷/۰۲ درصد و بعد از ۴۸ ساعت در ۸۴/۹۷ درصد و بعد از ۷۲ ساعت به ۸۱/۵۳ درصد رسید.

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ توسط دیگری و همکاران فعالیت ضدآمیبی عصاره استخراج شده از پاستیناکا آرمینیا (*Inula oculus*) و زنجیل شامی (*Pastinaca armenea*) 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 ۲۲ 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 چوچاق (*Eryngium planum*) در برابر آکانتاموبا کاستلانی (*Acanthamoeba castellanii*) ارزیابی شد. عناصر اتانولی از برگ‌های پایه‌ای و ریشه‌ها استخراج شد. تقریباً همه بخش‌ها فعالیت ضدآمیبی را بسته 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 اشر عصاره آکانتوسپروم اوسترال (*Acanthospermum australe*) روی تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا پلی‌فاگا (*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 عموماً 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 عالیم 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 در صد 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 در صد کشندگی و تأثیر گیاهی در از بین بردن تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا به نحو معنی داری بهویژه در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر افزایش می‌یابد.

در صد 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 در صد رسید در حالی که در صد 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

مرحله کیستی انگل ژیاردیا لامبیا (*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 موثر برای از بین بردن کیست‌های انگل ژیاردیا استفاده شد [۲۳].

در مطالعه‌ای آبرت و همکاران در سال ۲۰۱۲ عصاره اتانولی گیاه آرتیمیزیا آنوفرا را بر انگل *Heterobranchus 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 می‌توان گندواش را که در از بین بردن تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در شرایط آزمایشگاهی در غلظت‌های ۱/۲۵، ۵/۲۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر در زمان‌های 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 انگل‌شناسی پزشکی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی این دانشگاه به انجام رسیله است. بدین وسیله، از کلیه همکاران محترم گروه و معاونت پژوهشی دانشگاه و دانشکده تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

داد که غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی کافی است تا ۱۰۰ درصد تروفوزوئیت‌های آکانتاموبا پلی‌فاگا در ۲۴ ساعت از بین برود [۴۰].

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ توسط نیتسی 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 مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ توسط محمدی و همکاران، ۶۱ نمونه آب به طور تصادفی از میادین و استخر پارک‌های 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 نمونه‌های آب مورد آزمایش شده ۶ نمونه در ۳۷ درجه سانتی گراد مثبت بودند [۴۲]. 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 اکثربت 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 شبیله (*Trigonella Foenum Graecum*) به عنوان داروی ضد آکانتاموبا معرفی شده‌است و آثار ضد آکانتاموبایی خوبی را نشان داده است [۴۳].

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

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, 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.

تأثیر آرتمیزینین و عصاره گندوаш (Artemisia annua) بر ژنوتیپ T4 آکانتامبا در شرایط برونتنی

- [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 pathobiology of *Acanthamoeba*. *Pathobiology Research*, Vol. 19 (2016-2017), No. 2
- [13] Penland RL, Wilhelmus KR. Comparison of axenic and monoxenic media for isolation of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors* 2012; 5: 6.
- [14] 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.
- [15] Panjwani N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Ocul Surf* 2010; 8(2): 70-9.
- [16] Mahgoub MA. *Acanthamoeba* Keratitis. *Parasitologists United Journal* 2010; 3(1,2): 9-18.
- [17] Schuster FL, Visvesvara GS. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat* 2004; 7(1): 41-51.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Sharif M, Ziae H, Azadbakht M, Daryani A, Ebadattalb A, Rostami M. Effect of methanolic extract of *Artemisia aucheri* and *Camellia sinensis* on *Leishmania major* (in vitro). *Turk J Med Sci* 2006; 36(6): 365-9.
- [21] 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, Ziae 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, Maghsoud 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] Maghsoud 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 *Pseudomonas aeruginosa*. *JMP* 2007; 1(supple 3): 10-18.

تأثیر آرتمیزینین و عصاره کندوаш (Artemisia annua) بر ژنوتیپ T4 آکانتامبا در شرایط برونتنی

- (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 amoebicidal activity of *Eryngium planum* extracts. *Acta Pol Pharm* 2013; 70(6): 1027-34.
- [40] Castro LC, Sauter IP, Ethur EM, Kauffmann C, Dallagnol 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, Haghghi 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.