

***In vitro* Amoebicidal Effect of *Chaerophyllum macropodium* Extract on *Acanthamoeba* Genotype T4**

Tooran Nayeri¹, Farahnaz Bineshian², Fariba Khoshzaban³, Abdolhossein Dalimi Asl⁴, Mohammad Saaid Dayer⁵, Fatemeh Ghaffarifar⁶

1. PhD Student in Medical Parasitology, Student Research Committee, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5766-0120

2. Assistant Professor, Department of Parasitology & Mycology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5472-7470

3. Assistant Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Shahed University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2738-0552

4. Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5591-5513

5. Assistant Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5189-871X

6. Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran., (Corresponding Author), Tel: +98 21 828 84553, E-mail: ghaffarifar@modares.ac.ir, ORCID ID: 0000-0003-0891-8214

ABSTRACT

Background and Aim: *Acanthamoeba* is an opportunistic pathogen that may cause fatal granulomatous encephalitis and ocular keratitis in humans and animals. Increasing number of contact lens wearers can lead to increased frequency of amoebic keratitis and due to lack of effective drugs treatment of this disease is difficult. This study aimed to investigate the effect of ethanolic extract of *Chaerophyllum macropodium* on *Acanthamoeba* genotype T4.

Materials and Methods: In this experimental study, samples taken from the patients with keratitis were cultured on 1.5% non-nutrient agar medium. Different concentrations of the ethanolic extract (1.25, 2.5, 5, 10 mg/ml) were tested three times (24, 48, and 72 h) on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba in vitro*. The number of live and dead parasites were counted by using trypan blue staining and neobar lam. Also, the percentage of cysts apoptosis was assessed by flow cytometry.

Results: In the presence of 10 mg/ml ethanolic extract in the culture medium, the percentages of live trophozoites after 24, 48, and 72 h were 53.6, 15.11, and 0 percent, respectively. In the case of cysts, after 24, 48, and 72 h, 65.31, 43.31, and 0 percent of the cysts were alive, respectively. The results of flow cytometry showed that the apoptosis rate was 0.09% in the sample treated with extract after 72 h.

Conclusion: Ethanolic extract of *Chirophyllum macropodium* can be a promising candidate for the development of anti-*Acanthamoeba* drugs due to its high toxic effects on the cysts. However, since the crude extract of *Chaerophyllum macropodium* was used in this study, further investigations are needed to find the effective fractions of the plant and determine their mechanisms of action. It can also be tested *in vivo* or even against other parasites.

Keywords: *Acanthamoeba*, Keratitis, Ethanolic extract, *Chaerophyllum macropodium*, *In vitro*

Received: Jan 3, 2020

Accepted: Jan 16, 2021

How to cite the article: Tooran Nayeri, Farahnaz Bineshian, Fariba Khoshzaban, Abdolhossein Dalimi Asl, Mohammad Saaid Dayer, Fatemeh Ghaffarifar. *In vitro* Amoebicidal Effect of *Chaerophyllum macropodium* Extract on *Acanthamoeba* Genotype T4. SJKU 2022;26(7):23-33.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

فعالیت ضد آمیبی عصاره چایروفیلموم (*Chaerophyllum macropodum*) روی ژنوتیپ T4

آکانتاموبا در شرایط برون تنی

توران نیری^۱، فرحناز بینشیان^۲، فریبا خوش‌زبان^۲، عبدالحسین دلیمی‌اصل^۲، محمد سعید دایر^۳، فاطمه غفاری‌فر^۴

۱. دانشجوی دکتری تخصصی انگل‌شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۵۷۶۶-۰۱۲۰

۲. استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۵۴۷۲-۷۴۷۰

۳. استادیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۲۷۳۸-۰۵۵۲

۴. استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۵۵۹۱-۵۵۱۳

۵. استادیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۵۱۸۹-۸۷۱X

۶. استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. (مؤلف مسئول)، تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۵۵۳، پست الکترونیک:

ghafarifi@modares.ac.ir، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۰۸۹۱-۸۲۱۴

چکیده

زمینه و هدف: آکانتاموبا پاتوژن فرصت‌طلبی است که ممکن است باعث ایجاد آنسفالیت گرانولوماتوز کشنده و کراتیت چشمی در انسان‌ها و حیوانات شود. افزایش روزافزون استفاده‌کنندگان از لنزهای تماسی باعث فراوانی کراتیت آمیبی می‌شود که به دلیل فقدان داروهای مؤثر، درمان این بیماری دشوار است. هدف از این مطالعه بررسی عصاره اتانولی گیاه چایروفیلموم ماکروپودیوم روی ژنوتیپ T4 آکانتاموبا بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، نمونه گرفته شده از بیمار روی محیط آگار غیر مغذی کشت داده شد. غلظت‌های مختلف (۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) از عصاره اتانولی بر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبا در سه زمان (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) در شرایط برون تنی اثر داده شدند. تعداد انگل‌های زنده و مرده با رنگ آمیزی تریپان بلو و لام نئوبار محاسبه شدند. همچنین درصد آپوپتوز کیست‌ها با استفاده از فلوسایتومتری بررسی گردید.

یافته‌ها: در حضور ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی در محیط کشت درصد تروفوزوئیت‌های زنده بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب به ۵۳/۶، ۱۵/۱۱ و صفر درصد رسید. در حالی که در مورد کیست‌ها بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۶۵/۳۱، ۴۳/۳۱ و صفر درصد کیست‌ها زنده بودند. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که در نمونه تحت درمان با عصاره پس از ۷۲ ساعت میزان آپوپتوز ۰/۰۹ درصد بود.

نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی گیاه چایروفیلموم ماکروپودیوم با توجه به سمیت بالایی که برای کیست‌ها دارد، می‌تواند کاندید امیدوارکننده‌ای برای پیشرفت داروهای ضد آکانتاموبا باشد. از آنجایی که در این مطالعه از عصاره خام گیاه چایروفیلموم ماکروپودیوم استفاده شد، تحقیقات بیشتر جهت به دست آوردن مواد مؤثره گیاه و مکانیسم عمل آن ضروری است. همچنین، می‌توان آن را در شرایط درون تنی و یا حتی بر علیه سایر انگل‌ها آزمایش کرد.

کلمات کلیدی: آکانتاموبا، کراتیت، عصاره اتانولی، چایروفیلموم ماکروپودیوم، شرایط برون تنی

وصول مقاله: ۹۸/۱۱/۱۳ اصلاحیه نهایی: ۹۹/۱۱/۶ پذیرش: ۹۹/۱۱/۲۷

حرارت و اسمولاریته بالا، رشد در pH های مختلف، تبدیل فنوتایپی، مقاومت دارویی و فاکتورهای میزبان می باشند (۹). کموتراپی و درمان عفونت های *آکانتاموبایی* هنوز یک مشکل بزرگ است. داروهای درمانی رایج شامل بیگوانیدها همراه با دی آمیدین ها می باشند. درمان ترکیبی با پلی هگزامتیلن بیگوانید و پروپامیدین ایزتیونات از اثربخشی بالایی برخوردار است (۱۰)؛ اما بعضی از ژنوتایپ های *آکانتاموبا* به این داروها پاسخ مناسب نمی دهند و تنها نیمی از بیماران با استفاده از این داروها بهبود می یابند (۱۱). پلی هگزامتیلن بیگوانید (Polyhexametylen biguanide) در کمترین غلظت کیست کشی، اثر توکسیسته شدیدی روی کراتوسیت های انسان دارد. این داروها دارای اثر توکسیسته شدید بر روی سلول های چشم و اثر ضعیف بر کیست های *آکانتاموبا* می باشند (۱۲، ۱۳)؛ بنابراین یافتن ترکیب طبیعی با اثر کیست کشی و در عین حال غیرسمی بودن برای سلول های انسان جهت درمان بیماران مبتلا به کراتیت *آکانتاموبایی* دارای اهمیت ویژه ای است (۱۴). در سال های اخیر گرایش عمومی به استفاده از داروهای گیاهی افزایش یافته است که علت آن از یک سو اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی، ایجاد مقاومت دارویی، دوره درمان طولانی مدت و اثر متغیر داروهای شیمیایی علیه سویه های مختلف *آکانتاموبا* و از سوی دیگر کمتر بودن عوارض جانبی، پذیرش بهتر بیمار، استفاده نسل های گذشته و قیمت کمتر گیاهان دارویی می باشد (۱۵، ۱۶). چایروفیلوم (*Chaerophyllum macropodum*) گیاهی از خانواده آپیاسه (Apiaceae) از چندین گونه درختچه معطر تشکیل شده است، از این تعداد هشت گونه در ایران وجود دارد و به طور عمده در مناطق معتدل شمالی رشد می کنند. چایروفیلوم ماکروپودیوم یک گونه شناخته شده است که در بسیاری از مناطق جغرافیایی می روید و قسمت های هوایی آن به عنوان سبزی خوراکی و در تهیه غذا و پنی در ایران و ترکیه مورد استفاده قرار می گیرد (۱۷). در روغن به دست آمده از بخش های هوایی گیاه چایروفیلوم به عنوان یکی از این گیاهان دارویی که در ایران می روید، ۱۶ ترکیب شناسایی شده است

آکانتاموبا (*Acanthamoeba*) در محیط های مختلف (آب، خاک و هوا) در سراسر جهان گسترش یافته است. انگل در چرخه زندگی خود به دو شکل تروفوزوئیت و کیست دیده می شود. تروفوزوئیت متحرک است و در شرایط نامساعد محیطی از جمله کمبود مواد غذایی، اسمولاریته، دما و pH بالا یا پایین و تراکم زیاد سلول ها و داروها تبدیل به کیست می شود، پروسه ای که تحت عنوان آنکیسته شدن شناخته شده است. کیست فرم مقاوم تک یاخته محسوب می شود و تقریباً غیرفعال است (۱). این انگل باعث ایجاد کراتیت *آکانتاموبایی* در میزبانان با سیستم ایمنی سالم و عفونت کشنده سیستم اعصاب مرکزی بنام آنسفالیت آمیبی گرانولوماتوز در افراد دچار نقص سیستم ایمنی می شود (۲، ۳). آنسفالیت گرانولوماتوز *آکانتاموبایی* عفونت نادر، مزمن و پیشرونده سیستم اعصاب مرکزی بوده و غالباً منجر به مرگ می شود. عفونت مذکور به دلیل افزایش تعداد افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی، افزایش افراد تحت درمان با دوزهای بالای استروئیدها و گرم شدن کره زمین که می تواند منجر به افزایش حضور پاتوژن ها گردد، از اهمیت بالایی برخوردار است؛ بنابراین احتمال مواجهه میزبانان حساس با این آمیب افزایش می یابد (۴، ۵). کراتیت *آکانتاموبایی* عفونت مزمن قرنیه است که عوامل متعددی از جمله ضربه های وارد شده به قرنیه، تماس با آب آلوده و استفاده از لنزهای تماسی در ایجاد آن نقش دارند. لنزهای تماسی اصلی ترین ریسک فاکتور در ایجاد کراتیت آمیبی هستند (۶، ۷). علائم بیماری شامل درد شدید چشم، ترس از نور و التهاب حلقوی شکل قرنیه است که در صورت عدم تشخیص صحیح و درمان مناسب، منجر به نابینایی می گردد (۸). پاتوژن عفونت های *آکانتاموبایی* بسیار پیچیده است و فاکتورهای مرتبط با انگل و میزبان در آن دخیل هستند. فاکتورهایی که مستقیماً در بیماری زایی انگل نقش دارند شامل فاکتورهای وابسته به تماس (اتصال، فاگوسیتوز و آپوپتوز) و غیر وابسته به تماس (ترشح آنزیم ها) می باشند. فاکتورهایی که به صورت غیر مستقیم در بیماری زایی نقش دارند شامل مورفولوژی، تحمل درجه

که بیشترین درصد (۹۷/۴ درصد) مربوط به مونوترپن ها است (۱۸). بر اساس مطالعات قبلی، این گیاه در آزمایش های ضد باکتریایی علیه برخی از باکتری ها (۱۹-۲۱)، پروماستیگوت های لیشمانیا (۱۷) و همچنین بر روی تریکوموناس و اژینالیس (۲۲) مؤثر بوده است؛ اما تاکنون خاصیت ضد آکانتاموبایی این گیاه مطالعه نشده است. با توجه به اینکه ژنوتایپ T4 شایع ترین عامل عفونت کراتیت آکانتاموبایی در ایران و جهان است و بیش از ۹۰ درصد از موارد کراتیت آکانتاموبایی متعلق به این ژنوتایپ است (۲۳، ۲۴). مطالعه حاضر برای اولین بار جهت ارزیابی فعالیت ضد آکانتاموبایی گیاه چایروفلوم ماکروپودیوم بر روی تروفوزوئیت ها و کیست های آکانتاموبا (ژنوتایپ T4) در شرایط برون تنی طراحی گردید.

مواد و روش ها

این مطالعه طی نامه ای 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.

جمع آوری نمونه و شناسایی مولکولی:

نمونه های ۳۵ بیمار (شامل نمونه های خراش قرنیه، اشک و لنز تماسی) مراجعه کننده به کلینیک چشم بینا آفرین-تهران بر روی محیط کشت آگار غیر مغذی به همراه باکتری /شرشیاکلی (*Escherichia. coli*) کشت داده شدند. پس از استخراج DNA با استفاده از پرایمرهای 5'-JDP1 (GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3') و 5'-JDP2 (TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA-3') (شرکت تکاپو زیست-ایران) قطعه ژنی ۴۶۱ جفت بازی 18S rRNA پس از ۳۵ سیکل با استفاده از روش PCR تکثیر یافت. پس از انجام الکتروفورز بر روی محصولات PCR و استخراج باندهای مشاهده شده توسط کیت استخراج از ژل (شرکت طبس مد-ایران)، نمونه ها برای تعیین توالی به شرکت پیشگام-ایران ارسال شد. پس از تعیین توالی با

استفاده از نرم افزار Sequencher و ابزار جست و جوی هم ترازی پایه (BLAST) سایت NCBI، همولوژی داده های به دست آمده با موارد ثبت شده در بانک ژن تعیین گردید (۲۵).

آماده کردن تروفوزوئیت ها و کیست ها:

۷۲-۹۶ ساعت بعد از کشت نمونه، تروفوزوئیت ها در پلیت ها با محلول سالین استریل دو بار شسته شدند و به مدت ۵ دقیقه در سرعت ۱۵۰۰rpm سانتریفیوژ گردیدند. در مورد کیست ها بعد از سه هفته، پلیت ها شسته شده و به مدت ۵ دقیقه در سرعت ۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ انجام شد (۲۶). تعداد تروفوزوئیت ها و کیست ها با تریپان بلو و شمارش مستقیم روی لام نتوبار تعیین گردید. غلظت نهایی $10^4 \times 15$ تروفوزوئیت یا کیست در میلی لیتر بود.

آماده کردن عصاره:

برگ های گیاه چایروفلوم ماکروپودیوم از رودبارک واقع در ۶۵ کیلومتری شمال شرقی مهدی شهر سمنان جمع آوری شد. گیاه توسط گیاه شناس باتجربه دانشگاه جامع علمی کاربردی سمنان تأیید شد. این گونه، گیاهی پایا و دو ساله، علفی سبز به ارتفاع ۴۵-۱۶۰ سانتیمتر، دارای ساقه منفرد، بلند، ایستاده، استوانه ای و در بخش فوقانی دارای انشعاب های دیهیمی است. برگ های پهن دراز، کرکینه پوش، متمایل به خاکستری و سفید، بسیار بریده و منقسم دارد. گل های آن سفید، گلبرگ های خارجی بزرگ و شعاعی و کم و بیش قلبی شکل، مجتمع در گل آذین چتری مرکب شامل پرتوهای بلند و چترک و فاقد پرتو مرکزی هستند. برگ های گیاه با آب شسته و به مدت یک هفته در سایه خشک شدند و سپس به قطعات کوچک خرد شدند. پودر برگ های گیاه جهت استفاده در کیسه های پلاستیکی نگهداری شدند. برای تهیه عصاره اتانولی برگ های گیاه ۵۰ گرم پودر با ۵۰۰ میلی لیتر اتیل استات، متانول و آب مقطر با نسبت (۶:۳:۱) به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شدند، سپس به مدت ۸ ساعت در دستگاه سوکسله قرار گرفتند. در نهایت عصاره در سرعت ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی با کاغذ

نمی‌کنند (۲۶). محاسبه درصد حیات به‌وسیله شمارش انگل‌های زنده و مرده با لام نئوبار با استفاده از فرمول زیر صورت گرفت.

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

فلوسایتمتری:

فلوسایتمتری بر خصوصیت پراکنده‌سازی نور توسط سلول‌های تحت آزمایش و نیز بر نشر فلورسانس از آن‌ها استوار است. انکسار نور در جهات مختلف اطلاعاتی در مورد اندازه، شکل و ساختار سلول‌ها را ارائه می‌دهد (۱۷). فقدان تقارن چربی غشا و ظهور فسفاتیدیل سرین در سطح سلول را می‌توان با استفاده از انکسین V متصل به فلوئوروکروم تشخیص داد. انکسین V پروتئینی است که به روشی وابسته به کلسیم به فسفولیپیدها متصل می‌شود؛ اما از آنجایی که بیان سطحی فسفاتیدیل سرین در طول نکروز سلول نیز رخ می‌دهد؛ بنابراین برای تمایز بین این دو پدیده آپوپتوز و نکروز، رنگ‌آمیزی هم‌زمان پروپیدیوم یداید برای نفوذ پذیری غشا انجام می‌شود. به منظور تشخیص نوع مرگ سلولی (آپوپتوز یا نکروز) کیست‌های تحت درمان با عصاره چایروفیوم ماکروپودیوم در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر با انکسین V (Annexin V) و پروپیدیوم یداید (Propidium iodide) مواجهه یافته و ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس میکروتیوب‌ها در سرعت ۳۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شده و طبق دستورالعمل کیت Bio vision به رسوب به دست آمده ۵۰۰µL از محلول Binding buffer اضافه شد. سپس ۵µL آنکسین و ۵µL پروپیدیوم یداید در شرایط تاریکی به نمونه‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه شدند. شدت رنگ آنکسین V و پروپیدیوم یداید جذب شده به سلول‌ها توسط دستگاه BD FACSCanto II Flow cytometer مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز آماری:

صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شد تا یک محلول شفاف و همگن حاصل شود. در مرحله بعد حلال‌ها در دمای اتاق تبخیر شدند.

تهیه رقت‌های مختلف از عصاره:

مقدار ۲۰ میلی گرم از عصاره خشک در آب مقطر حل شده و به حجم ۱ میلی لیتر رسید و غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره تهیه شد. هنگام تأثیر وقتی ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره چایروفیوم ماکروپودیوم به ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون تروفوزوئیت یا کیست اضافه می‌گردد، غلظت نهایی عصاره تأثیر داده شده نصف می‌شود (۲/۵، ۱/۲۵، ۱۰، ۵ میلی گرم بر میلی لیتر). تمامی آزمایش‌ها شامل یک کنترل منفی (سوسپانسیون تروفوزوئیت یا کیست و آب مقطر استریل) و یک کنترل مثبت (قطره پلی هگزانااید ۰/۰۲٪) بودند.

تعیین فعالیت ضد آمیبی عصاره گیاهی:

در این مطالعه از میکروتیوب‌های ۱،۵ میلی لیتری استفاده شد. زمانی که تعداد تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آمیب در هر میلی لیتر به ۱۵×۱۰^۴ می‌رسید، در کنار شعله مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون تروفوزوئیت یا کیست به هر میکروتیوب اضافه می‌گردید. سپس مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره چایروفیوم ماکروپودیوم در غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر، به‌طور جداگانه به میکروتیوب‌های حاوی انگل اضافه شده و میکروتیوب‌ها در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. بعد از ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تعداد انگل زنده و مرده موجود در هر میکروتیوب به کمک لام نئوبار شمارش گردید و تمامی این مراحل ۳ بار تکرار شدند. اثرات عصاره روی انگل:

برای شمارش انگل، ۲۰ میکرو لیتر سوسپانسیون تروفوزوئیتی یا کیستی همراه شده با عصاره را با ۲۰ میکرو لیتر رنگ حیاتی تریپان بلو (۰/۴ درصد) مخلوط نموده تا در مشاهده‌ی میکروسکوپی، انگل زنده و مرده از یکدیگر تفکیک شوند. در انگل‌های مرده رنگ به یاخته نفوذ کرده و بدین ترتیب انگل‌ها به رنگ آبی دیده می‌شوند. در حالی که انگل‌های فعال، زنده و متحرک رنگ تریپان بلو را به خود جذب

آنالیز داده‌های حاصل از تأثیر عصاره بر انگل با استفاده از آزمون مقایسه سه یا چند گروه وابسته (اندازه‌گیری‌های تکراری یا repeated measures) و همچنین آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) صورت گرفت تا درصد معنی‌داری مشخص گردد. از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف یک نمونه‌ای برای بررسی فرض نرمال بودن متغیرهای مورد بررسی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS ویراست ۱۸ استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. همچنین داده‌های فلوسایتومتری با استفاده از نرم‌افزار FlowJo تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

از مجموع ۳۵ نمونه، ۸ نمونه کشت مثبت داشتند که پس از مقایسه توالی‌های به دست آمده با ژنوتایپ‌های ثبت شده در بانک ژن و همچنین ترسیم درخت فیلوژنی مشخص شد که هر ۸ نمونه متعلق به ژنوتایپ T4 یعنی بیماری زاترین ژنوتایپ هستند؛ بنابراین در مطالعه تجربی حاضر، یکی از ۸ نمونه *آکانتاموبا* (BankIt1899920 seq5 KU877552) جهت ارزیابی اثرات ضد *آکانتاموبایی* عصاره چایروفیوم ماکروپودیوم مورد استفاده قرار گرفت.

برای ارزیابی تأثیر عصاره اتانولی گیاه چایروفیوم ماکروپودیوم بر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های *آکانتاموبا* غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره تهیه شده و بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تأثیر عصاره با استفاده از رنگ حیاتی تریپان بلو تعداد تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های زنده در مقایسه با گروه کنترل شمارش گردید. تأثیر عصاره اتانولی گیاه چایروفیوم ماکروپودیوم در شرایط آزمایشگاهی پس از مجاورت با غلظت‌های مختلف عصاره در جدول ۱ نشان داد که درصد تروفوزوئیت‌های زنده بعد از ۲۴ ساعت در بالاترین غلظت عصاره یعنی ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ۵۳/۶ درصد و بعد از ۴۸ ساعت به ۱۵/۱۱ درصد رسید و در ۷۲ ساعت هیچ تروفوزوئیت زنده ای وجود نداشت. در مورد کیست‌ها در همین غلظت بعد از ۲۴ ساعت ۶۵/۳۱ درصد و بعد از ۴۸ ساعت ۴۳/۳۱ درصد زنده بودند؛ اما بعد از ۷۲ ساعت هیچ کیست زنده‌ای وجود نداشت. در صورتی که در گروه کنترل منفی (سوسپانسیون تروفوزوئیت یا کیست و آب مقطر استریل) پس از ۷۲ ساعت ۱۰۰ درصد تروفوزوئیت‌ها و کیست‌ها زنده بودند.

جدول ۱. درصد حیات تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های *آکانتاموبا* پس از تأثیر قطره پلی هگزاناید و غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی چایروفیوم ماکروپودیوم

دوز (میلی گرم بر میلی لیتر)	تأثیر روی	زمان آزمایش		
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۱۰	تروفوزوئیت	۵۳/۶±۲/۱	۱۵/۱۱±۴/۲۲	۰/۰۰
	کیست	۶۵/۳۱±۲/۲	۴۳/۳۱±۱/۱۵	۰/۰۰
۵	تروفوزوئیت	۵۹/۱۲±۳/۶	۳۲/۱۱±۲/۰۲	۰/۰۰
	کیست	۷۶/۱۹±۲/۰۴	۵۳/۱۴±۶/۰۴	۲۹/۱۷±۱/۶۸
۲،۵	تروفوزوئیت	۷۱/۲۵±۴/۳۰	۳۹/۱۲±۲/۱۳	۳۲/۳۸±۳/۲۲
	کیست	۷۸/۶۷±۶/۴۸	۷۰/۳۵±۱/۲۳	۴۸/۱۰±۱/۴
۱،۲۵	تروفوزوئیت	۱۰۰±۰	۷۹/۴۰±۱/۳	۵۷/۳۸±۳/۲۲
	کیست	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰

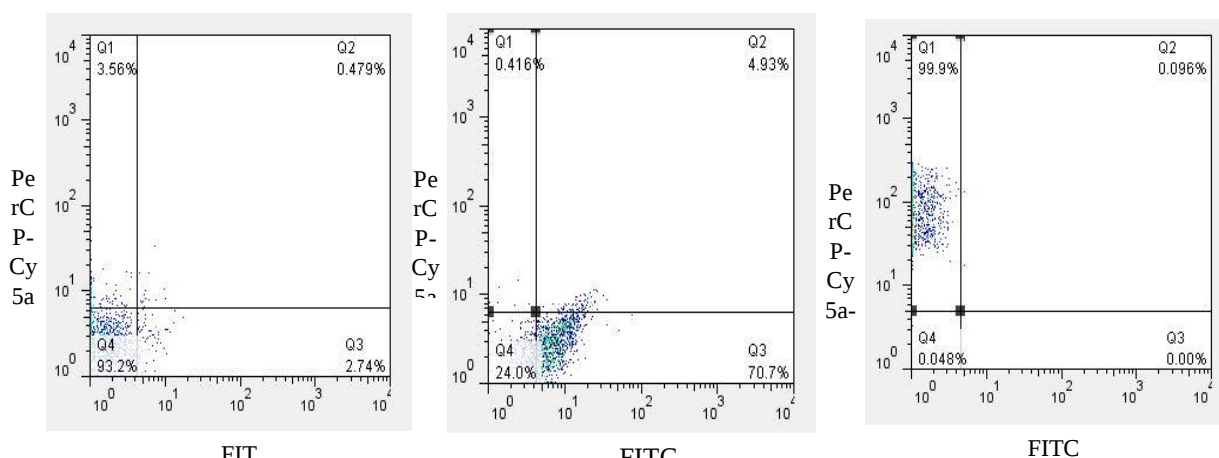
کنترل مثبت	تروفوزوئیت	$69/04 \pm 4/12$	$35/67 \pm 6/20$	۰/۰۰
کیست		$79/52 \pm 0/82$	$52/37 \pm 5/30$	$23/71 \pm 2/67$
کنترل منفی	تروفوزوئیت	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
کیست		100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0

در این مطالعه، اثر غلظت بر کاهش تروفوزوئیت ها و کیست های زنده معنی دار بود. آنالیز واریانس داده ها نشان داد که در هر ۴ غلظت عصاره اتانولی گیاه چایروفیوم ماکروپودیوم، مقایسه درصد حیات انگل با گروه شاهد دارای اختلاف معنی دار ($P \leq 0.05$) است. همچنین، اثر زمان بر کاهش تروفوزوئیت ها و کیست های زنده معنی دار بود. نکته جالب آن که درصد حیات تروفوزوئیت ها در بالاترین غلظت عصاره یعنی ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی داری نداشت، به نظر می آید عصاره در طی زمان ۴۸ ساعت، ماکزیمم تأثیر خود را بر تروفوزوئیت می گذارد. درصد تروفوزوئیت ها و کیست های زنده آکانتاموبا ۷۲

ساعت بعد از تأثیر قطره پلی هگزاناید ۰/۰۲ درصد بعنوان کنترل مثبت به ترتیب به صفر و ۲۳/۷۱ درصد رسید.

نتایج فلوسایتومتری:

در گروه کنترل منفی درصد سلول های دچار آپوپتوز پس از ۷۲ ساعت ۳/۲۱ درصد بود. در نمونه تحت درمان با عصاره اتانولی چایروفیوم ماکروپودیوم پس از ۷۲ ساعت میزان آپوپتوز ۰/۰۹ درصد نشان داده شد و در نمونه کنترل مثبت ۷۲ ساعت پس از درمان میزان آپوپتوز ۷۵/۶۳ درصد بود. همچنین ۹۹/۹ درصد کیست ها بر اثر عصاره اتانولی چایروفیوم ماکروپودیوم دچار نکروز شدند و ۰/۰۴ درصد سلول ها زنده بودند. داده های حاصل از تجزیه و تحلیل نتایج فلوسایتومتری در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: آنالیز فلوسایتومتری کیست های آکانتاموبا. الف: ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی چایروفیوم ماکروپودیوم، ب: کنترل مثبت (قطره پلی هگزاناید ۰/۰۲)، پ: کنترل منفی (بدون دارو).

بحث

کراتیت آکانتاموبایی یکی از عوامل تهدیدکننده بینایی محسوب می شود. درمان رایج این بیماری استفاده از داروهای ترکیبی پروپامیدین ایزوتیونات و کلرگزیدین ۰/۰۲٪ است، از دیگر داروهای مورد استفاده در بیماری کراتیت آکانتاموبایی نئوماکسین و پلی میکسین B است (۱). گزارش های زیادی مبنی بر شیوع مقاومت کیست های

آکانتاموبا به پروپامیدین ایزوتیونات و کلرگزیدین، پژوهشگران را بر آن داشته تا به جستجوی داروهای جایگزین بپردازند (۱۱). گیاهان دارویی از گذشته به صورت گسترده در درمان بیماری ها مورد استفاده قرار می گرفتند. این استفاده گسترده می تواند به دلایل مختلفی مانند ارتباط فرهنگی بهتر میان بیمار و طبیب، ارزانی نسبی و دسترسی بهتر، سازگاری بیشتر با بدن انسان، عوارض حاد کمتر نسبت به داروی

شیمیایی و فراهم کردن زمینه تحقیقات علمی با سهولت بیشتر باشد (۲۷).

در مطالعه حاضر تأثیر غلظت‌های متفاوت عصاره اتانولی چایروفیوم ماکروپودیوم در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره (۵۳/۶ درصد تروفوزوئیت زنده بعد از ۲۴ ساعت، ۱۵/۱۱ درصد بعد از ۴۸ ساعت و صفر درصد بعد از ۷۲ ساعت در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) نشان داد که با افزایش غلظت عصاره در زمان معین درصد کشندگی بر روی تروفوزوئیت‌ها افزایش می‌یابد. همچنین در این تحقیق با افزایش زمان مجاورت عصاره اتانولی چایروفیوم ماکروپودیوم در هریک از غلظت‌ها درصد کشندگی عصاره در از بین بردن تروفوزوئیت‌های *آکانتاموبا* به نحو معنی داری افزایش می‌یابد. در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت، درصد حیات تروفوزوئیت‌ها تفاوت معنی داری نداشت یعنی عصاره در طی زمان ۴۸ ساعت نیز می‌تواند بر روی تروفوزوئیت‌ها مؤثر واقع شود.

نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره بر روی کیست‌های *آکانتاموبا* (۶۵/۳۱ درصد کیست زنده بعد از ۲۴ ساعت، ۴۳/۳۱ درصد بعد از ۴۸ ساعت و صفر درصد بعد از ۷۲ ساعت در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) نشان داد که اثر افزایش غلظت عصاره در زمان معین و افزایش زمان تأثیر در غلظت معین بر روی درصد حیات کیست‌های *آکانتاموبا* معنی دار است. همچنین در این مطالعه نتایج فلوسایتومتری نشان داد که عصاره اتانولی چایروفیوم ماکروپودیوم بر آپوپتوز کیست‌ها در شرایط آزمایشگاهی تأثیر معناداری ندارد. با تأثیر عصاره اتانولی چایروفیوم ماکروپودیوم بر کیست‌های *آکانتاموبا* ۹۹/۹ درصد کیست‌ها دچار نکروز شدند؛ بنابراین این عصاره برای کیست‌ها بسیار سمی بود.

گیاه چایروفیوم ماکروپودیوم بر روی انگل لیشمانیا نیز مطالعه شده است. در مطالعه‌ای توسط ابراهیمی صدر و همکاران، اثر سمیت سلولی عصاره گیاه چایروفیوم ماکروپودیوم بر انگل لیشمانیا مائور و رده سلولی J774 در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد. IC50 عصاره چایروفیوم

ماکروپودیوم بعد از ۲۴ ساعت، ۸۰/۶۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود. درصد سایتوتوکسیسیته پروماستیگوت‌ها و ماکروفاژهای J774 پس از افزودن عصاره گیاه چایروفیوم ماکروپودیوم با روش MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) ۹۱ درصد و ۴۵ درصد بود. درصد آپوپتوز (آپوپتوز اولیه و تأخیری) در ماکروفاژهای تحریک شده با ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره گیاه چایروفیوم ماکروپودیوم پس از ۲۴ ساعت به ترتیب ۰/۱، ۰/۱۳، ۰/۰۱ و ۰/۱ درصد بود. مطابق با آزمون MTT، غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره چایروفیوم ماکروپودیوم با ۹۰ درصد سمیت سلولی در مقابل پروماستیگوت‌های لیشمانیا مائور مؤثر بود (۱۴).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ در ترکیه، Degerli و همکاران به بررسی اثر ضد *آکانتاموبایی* عصاره آبی گیاه *Inula ocula-christi* پرداختند. در این مطالعه غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر در زمان‌های ۱، ۳، ۶، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ارزیابی شد. در حالی که در مطالعه ما چهار غلظت ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در حضور ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره در زمان ۲۴ ساعت تروفوزوئیت زنده‌ای وجود نداشت، علاوه بر این در حضور ۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره هیچ تروفوزوئیت زنده‌ای در ۷۲ ساعت دیده نشد. تأثیر این گیاه بر روی کیست‌ها متوسط بود. در حضور ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره فقط ۲۵/۳ درصد از کیست‌ها کشته شده بودند. همچنین در این مطالعه عصاره *Pastinaca armenea* مورد ارزیابی قرار گرفت. در حضور ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره *Pastinaca armenea* در ۷۲ ساعت به ترتیب ۴۰/۳ درصد و ۲۳ درصد از تروفوزوئیت‌ها و کیست‌ها کشته شده بودند (۲۸). مقایسه نتایج حاصل از تأثیر این دو عصاره با عصاره گیاه چایروفیوم ماکروپودیوم نشان می‌دهد که عصاره گیاه چایروفیوم اثر ضد آمیبی قوی تری را نشان داده و در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر پس از ۷۲ ساعت هیچ

Peganum (۳۳)، اسپند (۳۴)، *Artemisia annua* (۳۵)، *harmala* (۳۶)، *Myrtus communis* (۳۷)، به عنوان گیاهانی که دارای خواص ضد آکانتاموبایی هستند، مطالعه شده اند و اثرات ضد آکانتاموبایی خوبی را نشان داده اند.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد عصاره اتانولی چایروفیلوم ماکروپودیوم در غلظت‌های مختلف بر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبیا مؤثر است؛ لذا پیشنهاد می‌گردد مدل حیوانی جهت تعیین اثر این گیاه بر روی رشد و تکثیر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های آکانتاموبیا بررسی شود. همچنین تحقیقات و بررسی‌های بیشتری در زمینه ماده مؤثره گیاه چایروفیلوم ماکروپودیوم و اثرات توکسیسیته آن بر روی سلول‌های انسانی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله به عنوان بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی پزشکی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به شماره ۵۲۵/۸۶۳۵ است. بدین وسیله، از گروه انگل‌شناسی و معاونت پژوهشی دانشگاه و دانشکده تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. همچنین از همکاری صمیمانه خانم دکتر بیتا بخشی دانشیار باکتری‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس به خاطر مساعدت در اجرای این طرح تشکر و قدردانی می‌نمایم. نویسندگان هیچ تضادی در منافع مالی یا موارد دیگر را اعلام نکردند.

تروفوزوئیت و کیست زنده‌ای مشاهده نشد. در مطالعه ما نتایج فلوسایتومتری نشان داد که عصاره دارای سمیت بالایی است و ۹۹/۹ درصد کیست‌ها دچار نکروز شدند، در حالی که در مطالعه Degerli و همکاران، آپوپتوز و نکروز بررسی نشده بود.

Tepe و همکاران طی سال ۲۰۱۱ در ترکیه، تأثیر ضد آکانتاموبایی عصاره الکلی مریم نخودی (*Teucrium polium*) را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه نیز غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۱، ۳، ۶، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ارزیابی شد. در حالی که در مطالعه ما غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. این بررسی نشان داد که در غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت بعد هیچ تروفوزوئیت زنده‌ای مشاهده نشد؛ اما در غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و زمان ۷۲ ساعت، این عصاره تنها موجب کاهش رشد ۱۹/۳ درصد از کیست‌ها شد. همچنین در این مطالعه عصاره *Teucrium chamaedrys* نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. عصاره *Teucrium chamaedrys* در حضور ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر یا غلظت بالاتر در حدود ۴۸ ساعت بعد هیچ تروفوزوئیت زنده‌ای مشاهده نشد؛ اما در غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و زمان ۷۲ ساعت، این عصاره تنها موجب کاهش رشد ۳۰/۳ درصد از کیست‌ها شد (۲۹). نتایج حاصل از تأثیر این دو عصاره در مقایسه با عصاره گیاه چایروفیلوم ماکروپودیوم نشان می‌دهد که این دو عصاره اثر ضعیفی بر کیست‌ها دارند و اثر سمیت این عصاره‌ها روی تروفوزوئیت‌ها و کیست‌ها بررسی نشده بود.

در ایران شنبلیله (*Trigonella Foenum Graecum*) (۳۰)،

(۳۱)، عناب (*Ziziphus vulgaris*) (۳۲)، گندواش

منابع

- Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol*. 2004;34(9):1001-27.
- Sharma S, Srinivasan M, George C. *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers. *Br J Ophthalmol*. 2000;84(10):1103-8.
- Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. 1997;7(1):583-98.

4. Martínez AJ, García CA, Halks-Miller M, Arce-Vela RJ. Granulomatous amebic encephalitis presenting as a cerebral mass lesion. *Brain Pathol.* 1997;7(1):583-98.
5. Khan N. *Biology and Pathogenesis.* Caister Academic Press, Norfolk. 2009: 290.
6. Stehr-Green JK, Bailey TM, Visvesvara GS. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *Am J Ophthalmol.* 1989;107(4):331-6.
7. Visvesvara GS, Stehr-Green JK. Epidemiology of free-living ameba infections. *J Protozool.* 1990;37(4):25S-33S.
8. Jones D, Visvesvara G, Robinson N. *Acanthamoeba* polyphaga keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 1975;95(2):221-32.
9. Alfieri SC, Correia CE, Motegi SA, Pral EM. Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba* polyphaga trophozoites. *J Parasitol.* 2000 Apr;86(2):220-7.
10. McClellan K, Howard K, Mayhew E, Niederkorn JY, Alizadeh H. Adaptive immune responses to *Acanthamoeba* cysts. *Exp Eye Res.* 2002;75(3):285-93.
11. Ficker L, Seal D, Warhurst D, Wright P. *Acanthamoeba* keratitis—resistance to medical therapy. *Eye.* 1990;4(6):835.
12. McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. Effect of steroids on *Acanthamoeba* cysts and trophozoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(12):2885-93.
13. Visvesvara GS. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23(6):590-4.
14. Robbers JE, Tyler VE. Tyler's herbs of choice. The therapeutic use of phytomedicinals. The Haworth Press, New York. 1999: 296.
15. Polat ZA, Vural A, Tepe B, Cetin A. *In vitro* amoebicidal activity of four *Allium* species on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. *Parasitol Res.* 2007;101(2):397-402.
16. Butler TK, Males JJ, Robinson LP, Wechsler AW, Sutton GL, Cheng J, Taylor P, McClellan K. Six-year review of *Acanthamoeba* keratitis in new south Wales, Australia: 1997-2002. *Clin Exp Ophthalmol.* 2005; 33(1): 41-46.
17. Ebrahimisadr P, Majidiani H, Bineshian F, Jameie F, Ghasemi E, Ghaffarifar F. Evaluation of the cytotoxicity effect of *Chaerophyllum* extract on *leishmania major* and J774 cell line *in vitro*. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2017;12(3 (Supp)).
18. Shafaghat A, Salimi F, Mahmoodi R. Antioxidant, antimicrobial activity and chemical analysis of the flavonoid from *Chaerophyllum macropodum* (Boiss.). *J Med Plant Res.* 2012;6(11):2111-6.
19. Ebrahimabadi AH, Djafari-Bidgoli Z, Mazoochi A, Kashi FJ, Batooli HJ. Essential oils composition, antioxidant and antimicrobial activity of the leaves and flowers of *Chaerophyllum macropodum* Boiss. *Food Control.* 2010;21(8):1173-8.
20. Durmaz H, Sagun E, Tarakci Z, Ozgokce. Antibacterial activities of *Allium vineale*, *Chaerophyllum macropodum* and *Prangos ferulacea*. *Afr J Biotechnol.* 2006;5(19): 1795-1798.
21. Padalia H, Moteriya P, Baravalia Y, Chanda S. Antimicrobial and synergistic effects of some essential oils to fight against microbial pathogens-a review. *The Battle Against Microbial Pathogens* 2015: 34-45.
22. Yousofi Darani H, Sharafi SM, Jafari R, Yousefi HA, Jafari A, Ghanadian M, et al. Effect of *Chaerophyllum macropodum* extracts on *Trichomonas vaginalis* *in vitro*. *J Herb Med Pharmacol.* 2015;4(2): 61-64.
23. 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: 542-544.
24. 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.
25. Nayeri Chegeni T, Ghaffarifar F, Pirestani M, Dalimi Asl A, Maspi N. Genotyping of *Acanthamoeba* species isolated from keratitis patients by PCR sequencing methods in Tehran, Iran. *IJML*, 2019, 6(4), 259-265.

26. Malatyali E, Tepe B, Degerli S, Berk S, Akpulat H. *In vitro* amoebicidal activity of four *Peucedanum* species on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. Parasitol Res. 2012 Jan;110(1):167-74.
27. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):564-82.
28. Degerli S, Berk S, Malatyali E, Tepe B. Screening of the *in vitro* amoebicidal activities of *Pastinaca armena* (Fisch. & CA Mey.) and *Inula oculus-christi* (L.) on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. Parasitol Res. 2012;110(2):565-70.
29. Tepe B, Degerli S, Arslan S, Malatyali E, Sarikurkcü C. Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and anti-amoebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. Fitoterapia. 2011;82(2):237-46.
30. Dodangeh S, Niyyati M, Kamalinejad M, Lorenzo-Morales J, Moshfe A, Haghighi A, et al. *In vitro* activity of *Trigonella foenum graecum* seeds against a clinical strain of *Acanthamoeba* genotype T4. Iran J Pharm Res. 2018;17(2):661-7.
31. Dodangeh S, Niyyati M, Kamalinejad M. Anti-*Acanthamoeba* activities of chloroformic fractions of *Trigonella Foenum graecum* (seed) and their cytotoxicity on mice macrophage cell. NBM 2015;3(4):182-8.
32. Dodangeh S, Niyyati M, Kamalinejad M, Lorenzo-Morales J, Haghighi A, Azargashb E. The amoebicidal activity of *Ziziphus vulgaris* extract and its fractions on pathogenic *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. Trop Biomed. 2017; 34 (1):127-136.
33. Nayeri Chegeni T, Ghaffarifar F, Khoshzaban F, Dalimi Asl A. The effects of artemisinin and aqueous and alcoholic extracts of *Artemisia annua* on *Acanthamoeba* genotype T4 *in vitro*. Modares J Med Sci Pathol. 2016;19(2):75-87.
34. Nayeri Chegeni T, Ghaffarifar F, Khoshzaban F, Dalimi Asl. Evaluation of anti-amoebic activity of *Peganum harmala* ethanolic extract on *Acanthamoeba in vitro*. AMUJ. 2018;20(12):74-82.
35. Nayeri Chegen T, Ghaffarifar F, Khoshzaban F, Dalimi Asl A. Effect of aqueous extract of *Peganum harmala* on *Acanthamoeba in vitro*. Qom Univ Med Sci J. 2018;12(6):20-8.
36. Nayeri Chegeni T, Ghaffarifar F, Khoshzaban F, Dalimi Asl A, Mirzaian H, Jameie F. Effects of aqueous and ethanolic extracts of *Myrtus Communis* leaves on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba*: an *in vitro* study. IJML. 2019;6(3):219-225.
37. Nayeri T, Bineshian F, Khoshzaban F, Dalimi Asl A, Ghaffarifar F. Evaluation of the effects of *Rumex obtusifolius* seed and leaf extracts against *Acanthamoeba*: an *in vitro* study. Infect. Disord. Drug Targets, 2020; 20: 1-9.