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

Tooran Nayeri[1], Farahnaz Bineshian[2], Fariba Khoshzaban[3], Abdolhossein Dalimi Asl[4], Mohammad Saaid Dayer[5], Fatemeh Ghaffarifar[6]

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: ghafarif@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 macropodum* 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 macropodum* 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 macropodum*, *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 macropodum* 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-25]

[DOI: 10.52547/sjku.26.7.23]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و شش / بهمن و اسفند ۱۴۰۰/۳۳-۲۳

فعالیت ضد آمیبی عصاره چایروفیلوم (Chaerophyllum macropodum) روی ژنوتیپ T4 آکانتاموبا در شرایط برون تنی

توران نیری[۱]، فرحناز بینشیان[۲]، فریبا خوش‌زبان[۳]، عبدالحسین دلیمی‌اصل[۴]، محمد سعید دایر[۵]، فاطمه غفاری‌فر[۶]

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

۲. استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، 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: ghafarif@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 *چایروفیلوم 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) 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 رنگ‌آمیزی تریپان بلو و لام نئوبار محاسبه شدند. همچنین درصد آپوپتوز کیست ها با استفاده از فلوسایتومتری بررسی گردید.

یافته‌ها: در حضور ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی در محیط کشت درصد تروفوزوئیت های 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 *چایروفیلوم 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 *چایروفیلوم 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، *چایروفیلوم ماکروپودیوم*، شرایط *برون تنی*

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-25]

[DOI: 10.52547/sjku.26.7.23]

مقدمه

آکانتاموبا (*Acanthamoeba*) در محیط‌های 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 سلول‌ها و داروها تبدیل به کیست می‌شود، پروسه‌ای که تحت عنوان آنکیسته شدن شناخته شده است. کیست فرم مقاوم تک یاخته محسوب می‌شود 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 می‌شود (۲, ۳). آنسفالیت گرانولوماتوز *آکانتاموبایی* عفونت نادر، مزمن و پیشرونده سیستم اعصاب مرکزی بوده و غالباً منجر به مرگ می‌شود. 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 می‌تواند منجر به افزایش حضور پاتوژن ها گردد، از اهمیت بالایی برخوردار است؛ بنابراین احتمال مواجهه میزبانان حساس با این آمیب افزایش می‌یابد (۴, ۵). کراتیت *آکانتاموبایی* عفونت مزمن قرنیه است که عوامل متعددی از جمله ضربه‌های وارد شده به قرنیه، تماس با آب آلوده و استفاده از لنزهای تماسی در ایجاد آن نقش دارند. لنزهای تماسی اصلی‌ترین 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 می‌گردد (۸). پاتوژنز عفونت‌های *آکانتاموبایی* بسیار پیچیده است و فاکتورهای مرتبط با انگل و میزبان در آن دخیل هستند. فاکتورهایی که مستقیماً در بیماری‌زایی انگل نقش دارند شامل فاکتورهای وابسته به تماس (اتصال، فاگوسیتوز و آپوپتوز) و غیر وابسته به تماس (ترشح آنزیم ها) می‌باشند. فاکتورهایی که به صورت غیر مستقیم در بیماری‌زایی نقش دارند شامل مورفولوژی، تحمل درجه 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 (Polyhexamettylen biguanide) در کمترین غلظت کیست کشی، اثر توکسیسیته شدیدی روی کراتوسیت های انسان دارد. این داروها دارای اثر توکسیسیته 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 سال‌های 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 می‌باشد (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 به‌طور عمده در مناطق معتدل شمالی رشد می‌کنند. *چایروفیلوم ماکروپودیوم* یک گونه شناخته شده است که در بسیاری از مناطق جغرافیایی می‌روید و قسمت های هوایی آن به عنوان سبزی خوراکی و در تهیه غذا و پنیر در ایران و ترکیه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷). در روغن به دست آمده از بخش‌های هوایی گیاه *چایروفیلوم* به‌عنوان یکی از این گیاهان دارویی که در ایران می‌روید، ۱۶ ترکیب شناسایی شده است

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-25]

[DOI: 10.52547/sjku.26.7.23]

که بیشترین درصد (۹۷/۴ درصد) مربوط به مونوترپن ها است (۱۸). بر اساس مطالعات قبلی، این گیاه در آزمایش‌های ضد باکتریایی علیه برخی از باکتری‌ها (۱۹-۲۱)، پروماستیگوت های *لیشمانیا* (۱۷) و همچنین بر روی *تریکوموناس واژینالیس* (۲۲) مؤثر بوده است؛ اما تاکنون خاصیت ضد *آکانتاموبایی* این گیاه مطالعه نشده است. با توجه به اینکه ژنوتایپ T4 شایع‌ترین 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 *چایروفیلوم ماکروپودیوم* بر روی تروفوزوئیت ها وکیست های *آکانتاموبا* (ژنوتیپ T4) در شرایط *برون تنی* طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

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

جمع‌آوری نمونه و شناسایی مولکولی:

نمونه های ۳۵ بیمار (شامل نمونه‌های خراش قرنیه، اشک و لنز تماسی) مراجعه کننده به کلینیک چشم بینا آفرین-تهران بر روی محیط کشت آگار غیر مغذی به همراه باکتری *اشرشیاکلی* (*Escherichia. coli*) کشت داده شدند. پس از استخراج DNA با استفاده از پرایمرهای JDP1 (5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3') و JDP2 (5'-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)، نمونه‌ها برای تعیین توالی به شرکت پیشگام-ایران ارسال شد. پس از تعیین توالی با استفاده از نرم افزار Sequencher و ابزار جست‌وجوی هم ترازی پایه (BLAST) سایت NCBI، همولوژی داده‌های 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 نئوبار تعیین گردید. غلظت نهایی $۱۰^۴\times$ ۱۵ تروفوزوئیت یا کیست در میلی لیتر بود.

آماده کردن عصاره:

برگ‌های گیاه *چایروفیلوم ماکروپودیوم* از رودبارک واقع در ۶۵ کیلومتری شمال شرقی مهدی‌شهر سمنان جمع‌آوری شد. گیاه توسط گیاه‌شناس 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، استوانه‌ای و در بخش فوقانی دارای انشعاب‌های دیهیمی است. برگ‌های پهن دراز، کرکینه پوش، متمایل به خاکستری و سفید، بسیار بریده و منقسم دارد. گل‌های آن سفید، گلبرگ‌های 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 برگ‌های گیاه جهت استفاده در کیسه‌های پلاستیکی نگهداری شدند. برای تهیه عصاره اتانولی برگ‌های 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-25]

[DOI: 10.52547/sjku.26.7.23]

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

تهیه رقت‌های مختلف از عصاره:

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

تعیین فعالیت ضدآمیبی عصاره گیاهی:

در این مطالعه از میکروتیوپ های ۱,۵ میلی لیتری استفاده شد. زمانی که تعداد ترفوزوئیت ها و کیست های آمیب در هر میلی لیتر به ۱۵×۱۰^{۴} می‌رسید، در کنار شعله مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون تروفوزوئیت یا کیست به هر میکروتیوپ اضافه می‌گردید. سپس مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره *چایروفیلوم ماکروپودیوم* در غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به‌طور جداگانه به میکروتیوپ های حاوی انگل اضافه شده و میکروتیوب‌ها در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ 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 میکرولیتر سوسپانسیون تروفوزوئیتی یا کیستی همراه شده با عصاره را با ۲۰ میکرولیتر 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 نمی‌کنند (۲۶). محاسبه درصد حیات به‌وسیله شمارش انگل‌های زنده و مرده با لام نئوبار با استفاده از فرمول زیر صورت گرفت.

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

فلوسایتومتری:

فلوسایتومتری 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 *چایروفیلوم ماکروپودیوم* در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با انکسین V (Annexin V) و پروپیدیوم یداید (Propidium iodide) مواجهه یافته و ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس میکروتیوپ ها 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 انکسین V و پروپیدیوم یداید جذب شده به سلول‌ها توسط دستگاه BD FACSCanto II Flow cytometer مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری:

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-25]

[DOI: 10.52547/sjku.26.7.23]

آنالیز داده‌های حاصل از تأثیر عصاره بر انگل با استفاده از آزمون مقایسه سه یا چند گروه وابسته (اندازه‌گیری‌های تکراری یاrepeated 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 تجزیه‌وتحلیل شدند.

نتایج

از مجموع ۳۵ نمونه، ۸ نمونه کشت مثبت داشتند که پس از مقایسه توالی‌های به دست آمده با ژنوتایپ های 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 *چایروفیلوم ماکروپودیوم* مورد استفاده قرار گرفت.

برای ارزیابی تأثیر عصاره اتانولی گیاه *چایروفیلوم ماکروپودیوم* بر تروفوزوئیت ها و کیست های *آکانتاموبا* غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده و بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تأثیر عصاره با استفاده از رنگ حیاتی تریپان بلو تعداد تروفوزوئیت ها و کیست‌های زنده در مقایسه با گروه کنترل شمارش گردید. تأثیر عصاره اتانولی گیاه *چایروفیلوم ماکروپودیوم* در شرایط آزمایشگاهی پس از مجاورت با غلظت‌های مختلف عصاره در جدول ۱ نشان داد که درصد تروفوزوئیت های زنده بعد از ۲۴ ساعت در بالاترین غلظت عصاره یعنی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر به ۵۳/۶ درصد و بعد از ۴۸ ساعت به ۱۵/۱۱درصد رسید و در ۷۲ ساعت هیچ تروفوزوئیت زنده ای وجود نداشت. در مورد کیست ها 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 تروفوزوئیت ها و کیست‌ها زنده بودند.

جدول۱. درصد حیات تروفوزوئیت ها و کیست های آکانتاموبا پس از تأثیر قطره پلی هگزانايد و غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی *چایروفیلوم ماکروپودیوم*

دوز (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-25]

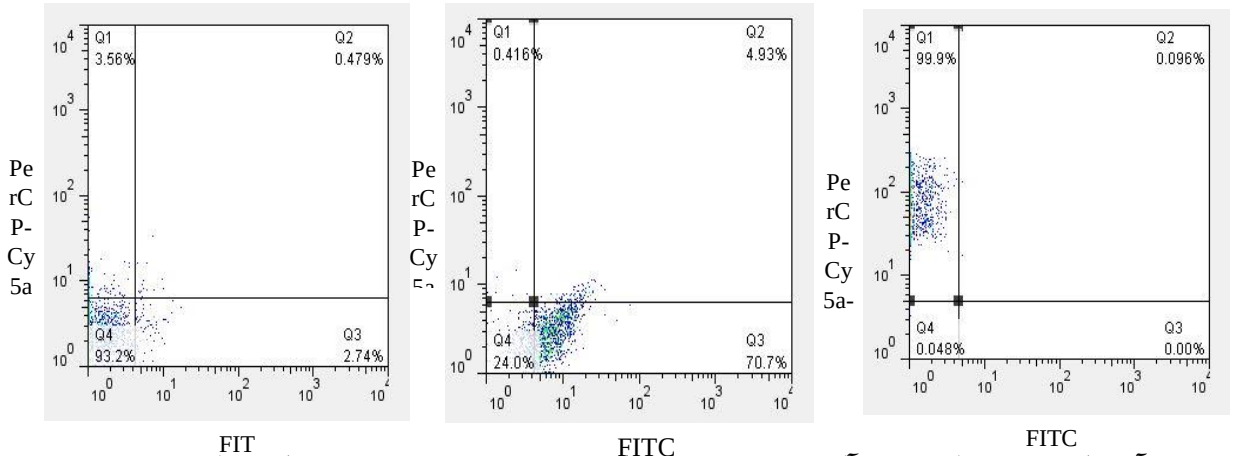
[DOI: 10.52547/sjku.26.7.23]

کنترل مثبت	تروفوزوئیت	۶۹/۰۴±۴/۱۲	۳۵/۶۷±۶/۲۰	۰/۰۰
	کیست	۷۹/۵۲±۰/۸۲	۵۲/۳۷±۵/۳۰	۲۳/۷۱±۲/۶۷
کنترل منفی	تروفوزوئیت	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰
	کیست	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰

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 *چایروفیلوم ماکروپودیوم*، مقایسه درصد حیات انگل با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌داری نداشت، به نظر می‌آید عصاره در طی زمان ۴۸ ساعت، ماکزیمم تأثیر خود را بر تروفوزوئیت می‌گذارد. درصد تروفوزوئیت ها و کیست های زنده *آکانتامویا* ۷۲ ساعت بعد از تأثیر قطره پلی هگزانايد ۰/۰۲ درصد بعنوان کنترل مثبت به ترتیب به صفر و ۲۳/۷۱ درصد رسید.

نتایج فلوسایتومتری:

در گروه کنترل منفی درصد سلول‌های دچار آپوپتوز پس از ۷۲ ساعت ۳/۲۱ درصد بود. در نمونه تحت درمان با عصاره اتانولی *چایروفیلوم 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 کیست‌ها بر اثر عصاره اتانولی *چایروفیلوم ماکروپودیوم* دچار نکروز شدند و ۰/۰۴ درصد سلول‌ها زنده بودند. داده‌های حاصل از تجزیه‌وتحلیل نتایج فلوسایتومتری در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: آنالیز فلوسایتومتری کیست‌های *آکانتامویا*. الف: ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی *چایروفیلوم ماکروپودیوم*، ب: کنترل مثبت (قطره پلی هگزانايد ۰/۰۲٪)، پ:کنترل منفی (بدون دارو).

بحث

کراتیت *آکانتامویایی* یکی از عوامل تهدیدکننده بینایی محسوب می‌شود. درمان رایج این بیماری استفاده از داروهای ترکیبی پروپامیدین ایزوتیونات و کلرهگزیدین ۰/۰۲٪ است، از دیگر داروهای مورد استفاده در بیماری کراتیت *آکانتامویایی* نئومایسین و پلی میکسین B است (۱). گزارش‌های زیادی مبنی بر شیوع مقاومت کیست‌های *آکانتامویا* به پروپامیدین ایزوتیونات و کلرهگزیدین، پژوهشگران را بر آن داشته تا به جستجوی داروهای جایگزین بپردازند (۱۱). گیاهان دارویی از گذشته به صورت گسترده در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفتند. این استفاده گسترده می‌تواند 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-25]

[DOI: 10.52547/sjku.26.7.23]

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

در مطالعه حاضر تأثیر غلظت‌های متفاوت عصاره اتانولی *چایروفیلوم 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نشان داد که با افزایش غلظت عصاره در زمان معین درصد کشندگی بر روی تروفوزوئیت ها افزایش می‌یابد. همچنین در این تحقیق با افزایش زمان مجاورت عصاره اتانولی *چایروفیلوم ماکروپودیوم* در هریک از غلظت‌ها درصد کشندگی عصاره در از بین بردن تروفوزوئیت های *آکانتاموبا* به نحو معنی داری افزایش می یابد. در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت، درصد حیات تروفوزوئیت ها تفاوت معنی‌داری نداشت یعنی عصاره در طی زمان ۴۸ ساعت نیز می‌تواند بر روی تروفوزوئیت ها 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) 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 *چایروفیلوم ماکروپودیوم* بر آپوپتوز کیست ها در شرایط آزمایشگاهی تأثیر معناداری ندارد. با تأثیر عصاره اتانولی *چایروفیلوم ماکروپودیوم* بر کیست های *آکانتاموبا* ۹۹/۹ درصد کیست‌ها دچار نکروز شدند؛ بنابراین این عصاره برای کیست ها بسیار سمی بود.

گیاه *چایروفیلوم ماکروپودیوم* بر روی انگل *لیشمانیا* نیز مطالعه شده است. در مطالعه‌ای توسط ابراهیمی صدر و همکاران، اثر سمیت سلولی عصاره گیاه *چایروفیلوم ماکروپودیوم* بر انگل *لیشمانیا ماژور* و رده سلولی J774 در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد. IC50 عصاره *چایروفیلوم ماکروپودیوم* بعد از ۲۴ ساعت، ۸۰/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. درصد سایتوتوکسیسیتی پروماستیگوت ها و ماکروفاژهای J774 پس از افزودن عصاره گیاه *چایروفیلوم ماکروپودیوم* با روش MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) به ترتیب ۹۱ درصد و ۴۵ درصد بود. درصد آپوپتوز (آپوپتوز اولیه و تأخیری) در ماکروفاژهای تحریک شده با ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه *چایروفیلوم ماکروپودیوم* پس از ۲۴ ساعت به ترتیب ۰/۰۱، ۰/۱۳، ۰/۰۱ و ۰/۱ درصد بود. مطابق با آزمون MTT، غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره *چایروفیلوم ماکروپودیوم* با ۹۰ درصد سمیت سلولی در مقابل پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* مؤثر بود (۱۴).

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-25]

[DOI: 10.52547/sjku.26.7.23]

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 غلظت های 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 میلی گرم بر میلی لیتر در ۴۸ ساعت بعد هیچ تروفوزوئیت زنده ای مشاهده نشد؛ اما در غلظت ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر و زمان ۷۲ ساعت، این عصاره تنها موجب کاهش رشد ۱۹/۳ درصد از کیست ها شد. همچنین در این مطالعه عصاره *Teucrium chamaedrys* نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. عصاره *Teucrium chamaedrys* در حضور ۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر یا غلظت بالاتر در حدود ۴۸ ساعت بعد هیچ تروفوزوئیت زنده ای مشاهده نشد؛ اما در غلظت ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر و زمان ۷۲ ساعت، این عصاره تنها موجب کاهش رشد ۳۰/۳ درصد از کیست ها شد (۲۹). نتایج حاصل از تأثیر این دو عصاره در مقایسه با عصاره گیاه *چایروفیلوم ماکروپودیوم* نشان می دهد که این دو عصاره اثر ضعیفی بر کیست ها دارند و اثر سمیت این عصاره ها روی تروفوزوئیت ها و کیست ها بررسی نشده بود.

در ایران شنبلیله (*Trigonella Foenum Graecum*) (۳۰, ۳۱)، عناب (*Ziziphus vulgaris*) (۳۲)، گندواش (*Artemisia annua*) (۳۳)، اسپند (*Peganum harmala*) (۳۴, ۳۵)، مورد (*Myrtus communis*) (۳۶) و رومکس (*Rumex obtusifolius*) (۳۷) به عنوان گیاهانی که دارای خواص ضد *آکانتاموبایی* هستند، مطالعه شده اند و اثرات ضد *آکانتاموبایی* خوبی را نشان داده اند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد عصاره اتانولی *چایروفیلوم ماکروپودیوم* در غلظت‌های مختلف بر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های *آکانتاموبا* مؤثر است؛ لذا پیشنهاد می‌گردد مدل حیوانی جهت تعیین اثر این گیاه بر روی رشد و تکثیر تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های *آکانتاموبا* بررسی شود. همچنین تحقیقات و بررسی‌های بیشتری در زمینه ماده مؤثره گیاه *چایروفیلوم ماکروپودیوم* و اثرات توکسیسیتی 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 ۸۶۳۵/د۵۲ است. بدین‌وسیله، 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 می‌نماییم. نویسندگان هیچ تضادی در منافع مالی یا موارد دیگر را اعلام نکردند

.

منابع

1.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.

2. Sharma S, Srinivasan M, George C. *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers. Br J Ophthalmol. 2000;84(10):1103-8.

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-25]

[DOI: 10.52547/sjku.26.7.23]

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 meningoencephalitides 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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-25]

[DOI: 10.52547/sjku.26.7.23]

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 armenea* (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, Sarikurkcu C. Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamoebic 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 cytotoxity 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, Ghafarifar 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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-25]

[DOI: 10.52547/sjku.26.7.23]