



Research Article

Effect of *Lippia citriodora kunth* Extract on Embryogenesis and Hatching of *Fasciola Hepatica* eggs, in vitro

Mona Moghadasi ¹ , Mahdi Mosayebi ^{2,*} , Reza Hajhossein ³ 

¹ Student of Laboratory Science Expert, Student Research Committee, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

² Associate Professor, Department of Parasitology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

³ Master in Parasitology, Department of Parasitology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

* **Corresponding author:** Mahdi Mosayebi, Department of Parasitology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. E-mail: m.mosayebi@arakmu.ac.ir

DOI: [10.61186/jams.26.6.1](https://doi.org/10.61186/jams.26.6.1)

How to Cite this Article:

Moghadasi M, Mosayebi M, Hajhossein R. Effect of *Lippia citriodora kunth* Extract on Embryogenesis and Hatching of *Fasciola Hepatica* eggs, in vitro. *J Arak Uni Med Sci.* 2024;**26**(6):1-6. DOI: [10.61186/jams.26.6.1](https://doi.org/10.61186/jams.26.6.1)

Received: 10 Jan 2024

Accepted: 05 Feb 2024

Keywords:

Lippia citriodora
Fasciola hepatica
Eggs
Miracidia

© 2024 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Fasciolosis is one of the most important parasitic disease common among both humans and livestock. That causes several health problems and economical losses in different parts of Iran. In order to control this disease, chemicals are used, which in some cases lead to resistance to the used substances and cause environmental problems. In this study, the effectiveness of the ethanolic extract of *Lippia citriodora* on the eggs of *Fasciola hepatica* is investigated.

Methods: *Fasciola hepatica* eggs were obtained from the liver and gall bladders of naturally infected sheep and kept at 4 °C until use. Ethanol extract of *Lippia citriodora kunth* was provided from dried leaves. The eggs were exposed to Different concentration of extract. Concentrations of *Lippia citriodora* extract (10, 20, 30, 40, 50, 75 and 100%). Control group eggs were placed in chlorine-free water. Egg and embryo development stages to complete and release miracidia were examined every day. Ethical considerations: This study was conducted after receiving the code of ethics (93-175-13) from the University Research Council.

Results: In concentration of 10 percent *Lippia citriodora*, miracidia was formed after 16 days in the egg. With increasing of concentration percentage of the extract, time of miracidia formation in eggs also rose. The time of miracidia formation between cases and control group is significantly different ($P < 0.05$).

Conclusions: Our study shows that extract of *Lippia citriodora* is an effective inhibiting factor against development of *Fasciola* eggs.

بررسی عصاره گیاه به لیمو (*Lippia citriodora kunth*) بر جنین زایی و باز شدن تخم‌های فاسیولا هیاتیکا در محیط برون تنی

منا مقدسی^۱، مهدی مسیبی^{۲*}، رضا حاجی حسین^۳

^۱ دانشجوی علوم آزمایشگاهی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۲ دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۳ کارشناس ارشد، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

* نویسنده مسئول: مهدی مسیبی، دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. ایمیل:

m.mosayebi@arakmu.ac.ir

DOI: 10.61186/jams.26.6.1

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۱
مقدمه: فاسیولوزیس یکی از مهم‌ترین عفونت‌های انگلی مشترک بین انسان و دام است که آسیب‌های بهداشتی و صدمات اقتصادی زیادی را در مناطق مختلف ایران به وجود می‌آورد. جهت کنترل این بیماری از مواد شیمیایی استفاده می‌گردد، که در برخی از موارد، مقاومت در برابر آلودگی و مشکلات زیست محیطی را ایجاد می‌نماید. در این مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی به لیمو بر روی تخم‌های فاسیولا هیاتیکا مورد بررسی قرار گرفت.	تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۳
روش کار: تخم‌های فاسیولا هیاتیکا از کبد و کیسه صفرا گوسفند‌های آلوده جمع‌آوری گردید، تخم‌ها تا زمان آزمایش داخل یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. عصاره الکلی "به لیمو" از برگ خشک به لیمو تهیه شد. تخم‌ها در غلظت‌های مختلف از عصاره به لیمو (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) قرار داده شد. در گروه کنترل تخم‌ها در آب بدون کلر قرار گرفت. تخم‌ها و مراحل رشد جنین تا کامل و آزاد شدن میراسیدیوم هر روز مورد بررسی قرار می‌گرفتند. این مطالعه پس از دریافت کد اخلاق (۹۳-۱۷۵-۱۳) از شورای پژوهشی دانشگاه انجام شد.	واژگان کلیدی: به لیمو فاسیولا هیاتیکا تخم میراسیدیوم
یافته‌ها: در غلظت ۱۰ درصد از عصاره به لیمو، میراسیدیوم بعد از ۱۶ روز در داخل تخم تشکیل گردید. با افزایش غلظت عصاره، زمان تشکیل میراسیدیوم در داخل تخم نیز افزایش یافت.	تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.
نتیجه‌گیری: مطالعه ما نشان می‌دهد عصاره به لیمو به عنوان یک عامل مؤثر بر ضد تکامل تخم فاسیولا است.	

مقدمه

این خود یک مشکل جدی قلمداد می‌گردد (۸-۱۰). لذا در حال حاضر از بین بردن و یا غیر فعال کردن تخم فاسیولا هیاتیکا یک روش کنترل این انگل محسوب می‌شود. برای این منظور می‌توان از روش‌هایی مانند حرارت دادن و مواد شیمیایی استفاده کرد. این روش‌ها باعث تخریب دیواره تخم شده و یا مانع تشکیل توده سلولی و جنین (میراسیدیوم) در داخل تخم انگل می‌گردد و به این ترتیب تخم را غیر فعال می‌نماید (۱۱، ۱۲). سرزمین ایران از نظر غنای گیاهی و تنوع زیستی رتبه بالایی دارد. براساس نظر گیاه شناسان و پژوهشگران، تعداد گونه‌های گیاهی ایران در حدود ۸۰۰۰-۷۵۰۰ گونه است (۱۳). به لیمو نام یک گیاه دارویی معطر است از راسته نعناسانان، تیره شاه پسندیان و نام علمی آن *Lippia Citriodora Kunth* می‌باشد. این گیاه بومی آمریکای جنوبی بوده و به طور طبیعی رویش آن در آرژانتین، شیلی و پرو گزارش شده است و از آن جا به سایر نقاط جهان از جمله ایران رفته است و کشت می‌شود. به لیمو دارای خاصیت آنتی باکتریال است، و نیز یک آنتی اکسیدان قوی نیز محسوب می‌شود (۱۴، ۱۵). با توجه به کشت گیاه به لیمو در ایران در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر عصاره الکلی به

فاسیولوزیس، یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام (zoonotic) می‌باشد که به وسیله کرم کبدی فاسیولا هیاتیکا ایجاد می‌گردد (۱). عفونت ناشی از فاسیولوزیس انسانی از ۷۰ کشور از سراسر جهان گزارش شده که باعث آلودگی ۲/۴ میلیون نفر گردیده است و ۱۸۰ میلیون نفر نیز از جمعیت جهان در معرض خطر فاسیولوزیس هستند (۲، ۳). آلودگی در دام بیشتر در گاو و گوسفند مشاهده می‌شود که باعث آلودگی کبد، کاهش وزن، کاهش شیر در دام‌های آلوده شده و در نهایت خسارات اقتصادی قابل توجهی به همراه دارد (۴). اگر چه کانون آلودگی بیشتر در شمال ایران است اما مواردی از آلودگی انسانی و حیوانی فاسیولوزیس از نقاط مختلف ایران گزارش شده است. این انگل در شمال کشور موجب بروز چند همه گیری شده است، به طوری که در سال ۱۹۸۷ بیش از صد هزار نفر از مردم استان گیلان به این انگل آلوده شدند (۵، ۶). ریشه کن نمودن فاسیولا هیاتیکا تقریباً دور از انتظار می‌باشد (۷). درمان بی رویه فاسیولا با استفاده از داروهای کرم کش مانند تریکلاندازول باعث مقاومت دارویی در برخی از نقاط دنیا گشته که

تخم‌ها استفاده شد). به این ترتیب تعداد گروه‌های مورد آزمایش ۸ گروه بود. هر آزمایش ۳ بار تکرار شد.

انکوباسیون تخم‌ها

لوله‌های ذکر شده در بخش قبلی، در اتاقک رشد که دمای آن در طول شبانه روز دارای تغییرات دمایی همانند محیط بیرون، بود، قرار داده شد. حداقل دما در این اتاقک رشد ۲۳ درجه سانتی‌گراد و حداکثر ۲۸ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و میانگین دما ۲۷ درجه سانتی‌گراد بود. از یک منبع نور با حداقل شدت نور ۸۴۰ لوکس (LUX) و حداکثر ۱۰۷۰ لوکس استفاده شد. میانگین شدت نور ۹۷۳ لوکس بود. شدت نور توسط دستگاه نور سنسور هاگنر (Hagner مدل Ecl ساخت کشور سوئد) اندازه‌گیری گردید.

بررسی میکروسکوپی تخم‌ها

روند تکاملی و تشکیل جنین، درون تخم‌های فاسیولا هپاتیکا در طی ۱ ماه مورد بررسی روزانه قرار گرفت. برای این کار هر روز ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات هر یک از لوله‌ها به طور مجزا بر روی لام قرار داده شد و توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰X مشاهده قرار شد. مراحل تکاملی تخم‌های فاسیولا در جدولی ثبت شد. در این جدول مراحل تکامل تخم‌ها در ۶ مرحله شامل تخم نارس، مرحله سلولی، مرحله پر سلولی، مرحله ادغام سلولها، تشکیل میراسیدیوم و آزاد شدن میراسیدیوم ثبت گردید. سپس با استفاده از نرم افزار Spss نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل آماری صورت گرفت.

نتایج

نتایج مشاهده میکروسکوپی تخم‌ها در رقت‌های مختلف عصاره به لیمو در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. در گروه کنترل، میراسیدیوم بعد از گذشت ۱۶ روز در داخل تخم تشکیل گردید و در روز ۱۸ از تخم آزاد شد (تصویر ۱). در رقت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۷۵ درصد میراسیدیوم به ترتیب در روزهای ۱۶، ۲۰، ۲۵، ۲۶، ۳۵ و ۳۸ در داخل تخم تشکیل گردید و در روزهای ۲۱، ۲۵، ۲۷، ۲۸، ۳۷ و ۴۰ از تخم خارج گردید. بررسی تخم‌هایی که در مواجهه با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره گیاه به لیمو قرار گرفته بودند نشان داد که در این تخم‌ها تا ۳ ماه پس از شروع آزمایش (۹۰ روز) روند تکاملی اتفاق نیفتاد و میراسیدیوم تشکیل نشد (تصویر ۲). نتایج آزمون آنالیز واریانس نشان داده است که هر یک از مراحل رشد تخم فاسیولا از نظر تعداد روزها، با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند ($P=0.0001$)، که این نتیجه در غلظت‌های مختلف نیز تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد ($P=0.0001$).

جدول ۱. مدت زمان (روز) تشکیل مراحل مختلف تکاملی تخم فاسیولا هپاتیکا در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره به لیمو

غلظت (ug/ml)	تخم نارس	مرحله سلولی	مرحله پرسلولی	ادغام سلول‌ها	میراسیدیوم	آزاد شدن میراسیدیوم
۱۰	۵ (روز)	۷ (روز)	۱۲ (روز)	۱۴ (روز)	۱۶ (روز)	۲۱ (روز)
۲۰	۶ (روز)	۹ (روز)	۱۲ (روز)	۱۴ (روز)	۲۰ (روز)	۲۵ (روز)
۳۰	۷ (روز)	۱۰ (روز)	۱۴ (روز)	۱۸ (روز)	۲۵ (روز)	۲۷ (روز)
۴۰	۸ (روز)	۱۲ (روز)	۱۴ (روز)	۲۱ (روز)	۲۶ (روز)	۲۸ (روز)
۵۰	۱۶ (روز)	۲۰ (روز)	۲۵ (روز)	۳۰ (روز)	۳۵ (روز)	۳۷ (روز)
۷۵	۱۸ (روز)	۲۳ (روز)	۲۸ (روز)	۳۳ (روز)	۳۸ (روز)	۴۰ (روز)
۱۰۰	-	-	-	-	-	-
گروه کنترل	۵ (روز)	۷ (روز)	۱۲ (روز)	۱۴ (روز)	۱۶ (روز)	۱۸ (روز)

لیمو را بر روی مراحل تکاملی تخم فاسیولا، از تشکیل توده سلولی تا خروج جنین (میراسیدیوم) از تخم، در محیط بیرون تنی بررسی نماییم.

روش کار

این مطالعه تجربی پس از دریافت کد اخلاق (۹۳-۱۷۵-۱۳) از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شد. مراحل این تحقیق به شرح ریز است.

جمع آوری تخم

کبدهای گوسفند آلوده به فاسیولا هپاتیکا از کشتارگاه اراک تهیه گردید. سپس کرم‌های فاسیولا از مجاری صفراوی آلوده تخلیه کرم‌ها کاملاً شدند. کرم‌ها درون پلیت حاوی سرم فیزیولوژی قرار داده شدند و چند بار شستشو شده تا از ترشحات کبد جدا گردد. رحم این کرم‌ها نیز در زیر میکروسکوپ برش داده شده و پس از صاف کردن سوسپانسیون موجود تخم‌های کرم کاملاً تخلیه شد. این تخم‌ها ۲۰ بار با آب فاقد کلر شستشو شد. سپس سوسپانسیون حاوی ۲۰۰۰ تخم در هر میلی لیتر آب فاقد کلر از تخم فاسیولا تهیه گردید و تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری شد.

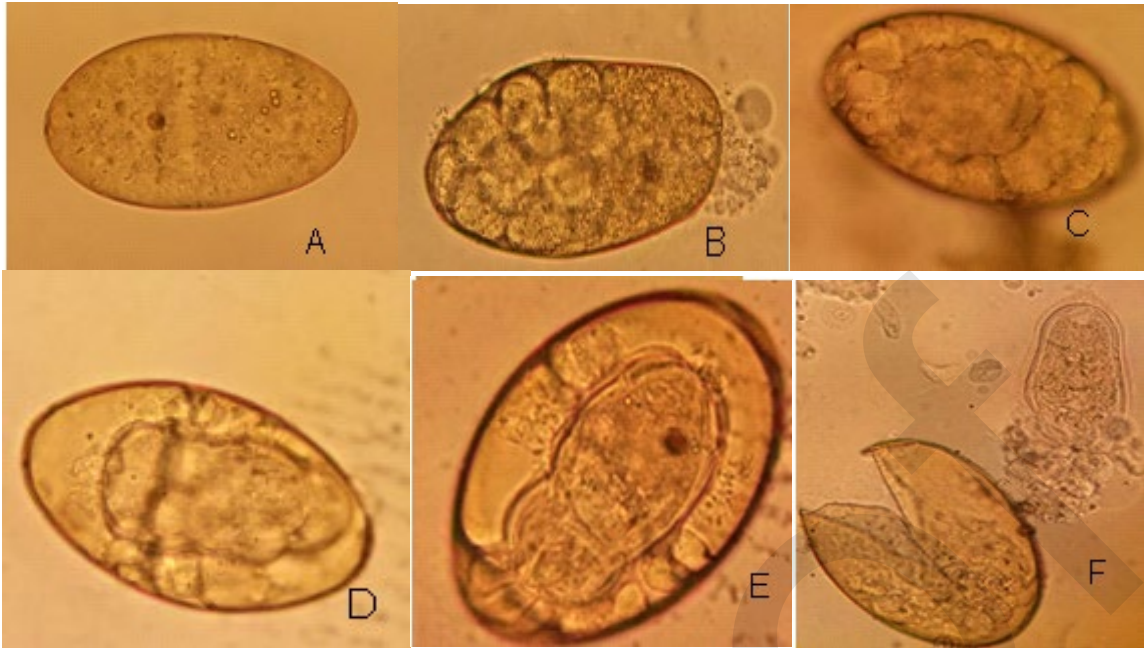
تهیه عصاره الکلی به لیمو

روش ماسراسیون برای تهیه عصاره الکلی گیاه به استفاده شد. روش کار به شرح زیر است. ۱۰ گرم از برگ خشک شده به لیمو کشت شده در استان فارس را به ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد اضافه نموده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق انکوبه کردیم. سپس محلول بدست آمده را صاف نموده و تا زمان تبخیر کامل الکل، محلول را در دمای اتاق انکوبه نمودیم. به این ترتیب محلول خشک شد و پودری که عصاره گیاه به لیمو بود به دست آمد. پودر مذکور تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (۱۶).

روش آزمایش

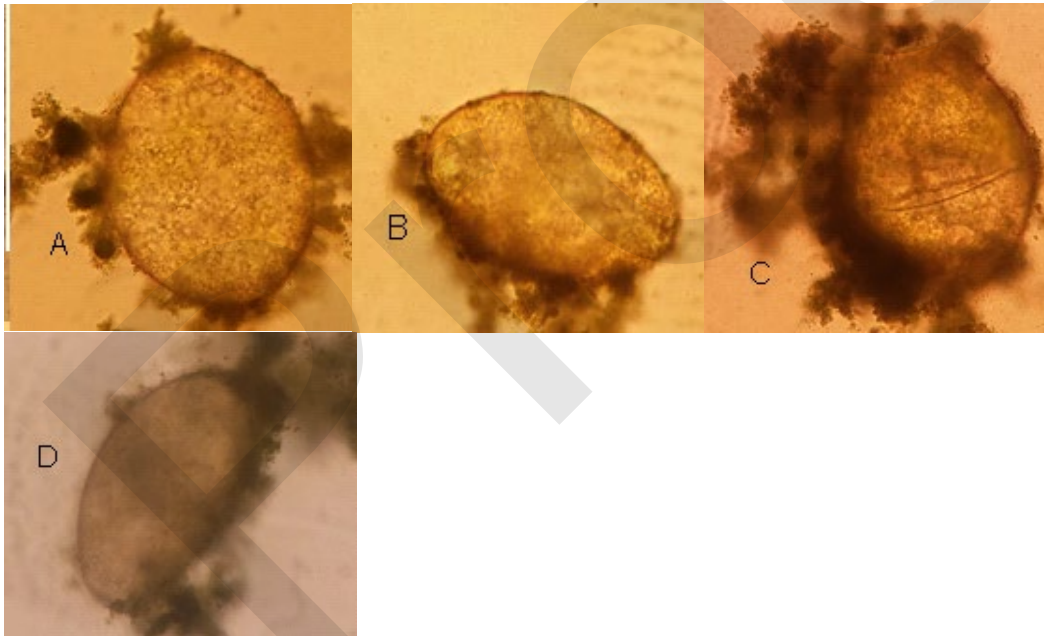
در این مطالعه تخم‌های فاسیولا با غلظت‌های متفاوتی از عصاره گیاه به لیمو مواجهه داده شد. برای این منظور غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره به لیمو تهیه شد و به حجم ۵ میلی لیتر در لوله‌های آزمایش مجزا ریخته شد. همین مقدار آب فاقد کلر در لوله آزمایش دیگر ریخته شد و به عنوان کنترل در این مطالعه استفاده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از رسوب انتهایی لوله حاوی سوسپانسیون تخم انگل برداشت شد و به هر یک از لوله‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه به لیمو (گروه‌های مورد) و لوله کنترل آزمایش اضافه شد (به منظور حفظ غلظت عصاره‌ها فقط از رسوب

تصویر ۱: مراحل مختلف تکامل تخم فاسیولا در گروه کنترل



A روز پنجم تخم نارس، B روز هفتم مرحله مورولا، C روز دوازدهم مرحله بلاستوسیسیت، D روز چهاردهم جنین، E روز شانزدهم جنین تکامل یافته، F روز هجدهم آزاد شدن میراسیدیوم

تصویر ۲: مراحل مختلف تکامل تخم فاسیولا در گروه مواجهه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره



A روز اول تخم نارس، B روز سی ام تخم نارس، C روز شصتم تخم نارس، D روز نودم تخم نارس

همین امر باعث شده است که محققان هنوز بدنبال روش‌ها و راهکارهای مناسب‌تر جهت کنترل انگل مذکور باشند (۱۷). یکی از روش‌هایی که در سال‌های اخیر مورد توجه محققان قرار گرفته است، مطالعه اثرات عصاره‌های گیاهی مختلف بر روی روند تکاملی تخم کرم‌ها از جمله تخم فاسیولا می‌باشد. اگرچه همه این مطالعات تجربی در محیط برون تنی (in vitro) و در محیط آزمایشگاه انجام شده است ولی هدف نهایی آنها بکارگیری این عصاره‌ها در کنترل بیماری فاسیولیاژیس، به عنوان یک روش بیولوژیک است. از آنجا که منشأ این نوع از مواد از طبیعت می‌باشد قاعدتاً می‌توان تصور نمود که اثرات سوء آنها در میزبان

بحث

در حال حاضر، درمان فاسیولا بر پایه استفاده از مواد شیمیایی کرم کش استوار است که می‌تواند باعث ایجاد مقاومت دارویی و عوارض جانبی در انسان شده و همچنین در صورت ورود به محیط، باعث تخریب و آلودگی محیط زیست گردد (۱۷، ۱۸). مطالعات مختلف نشان داده که امکان کاهش موارد بیماری فاسیولیاژیس (در دام و انسان) از طریق به کارگیری سموم حلزون کش (۲) و استفاده از برخی از مواد بیولوژیک وجود دارد (۱۷). مبارزه با فاسیولا دارای محدودیت‌هایی است.

این عصاره گیاهی زمان تشکیل میراسیدیوم به روز ۳۸ رسید. در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره به لیمو، تخم‌های فاسیولا در طی مدت ۹۰ روز به صورت نارس باقی می‌ماند. مقایسه آماری این نتایج با گروه کنترل نیز موید وجود اختلاف معنی دار در فرآیند تکامل تخم فاسیولا در گروه‌های تحت تأثیر عصاره به لیمو بود ($p < 0.05$). در سال ۲۰۱۲ مورینو و همکارانش با تأثیر عصاره به لیمو بر روی متاسرکرهای فاسیولا هپاتیکا به این نتیجه رسیدند که متاسرکرهای فاسیولا هپاتیکا بعد از ۷۲ ساعت غیر فعال می‌گردند (۱۲). با توجه به این نکته که مطالعه ما بر روی تخم فاسیولا هپاتیکا و مطالعه مورینو بر روی متاسرکر فاسیولا صورت گرفته است، هر دو مطالعه نشان می‌دهد که عصاره به لیمو بر روی تخم و متاسر فاسیولا تأثیر گذار است. پس می‌توانیم از عصاره به لیمو به عنوان یک ماده مؤثر بالقوه در کنترل فاسیولا هپاتیکا در طبیعت استفاده کنیم.

نتیجه گیری

استفاده از عصاره گیاه به لیمو با مهار تکامل تخم‌های فاسیولا هپاتیکا چرخه زندگی این انگل را قطع نموده و می‌تواند باعث کاهش موارد آلودگی در بین دام و انسان شود. از طرفی با توجه به این که این عصاره یک محصول طبیعی است، به نظر می‌رسد که حداقل تأثیرات سوء را بر روی اکوسیستم بگذارد. ولی برای اطمینان از این مساله نیاز به مطالعات عمیق‌تر در زمینه اثرات این عصاره در تغییرات اکوسیستم داریم.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر با کد اخلاق ۹۳-۱۷۵-۱۳ در شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک تصویب شده است.

حامی مالی

این مقاله از طرح تحقیقاتی با کد ۲۰۹۵ مجریان مهدی مسیبی و منا مقدسی گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک استخراج گردیده است.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

مشارکت نویسندگان

مهدی مسیبی (طراحی، راه اندازی روش کار و تحلیل)، منا مقدسی (نمونه گیری) و رضا حاجی حسین (انجام آزمایشات و استخراج نتایج).

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک و تمام کسانی که برای انجام این مطالعه ما را یاری نمودند، اعلام می‌دارند.

(انسان یا دام) و خصوصاً محیط زیست بسیار کمتر از مواد شیمیایی خواهد بود. تا کنون مطالعات اندکی در خصوص تأثیر فاکتورهای فیزیکی، شیمیایی و عصاره‌های گیاهی بر روی تخم فاسیولا انجام شده است. اکثر این مطالعات نیز به بررسی تغییرات فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب بر روی فرآیند تکاملی و میزان تکامل این تخم‌ها در آب پرداخته‌اند. به عنوان مثال: مؤذنی و همکاران در سال ۲۰۱۰ با تغییر بر روی دمای آب حاوی تخم فاسیولا هپاتیکا در بازه‌های زمانی مختلف به این نتیجه رسیدند که با افزایش دما تا ۵۰ درجه سانتی گراد و افزایش زمان مواجهه، مرگ و میر تخم‌های فاسیولا هپاتیکا نیز افزایش می‌یابد (۱۱). در مطالعه‌ای دیگر یخچالی و همکاران با تغییر pH آب حاوی تخم‌های فاسیولا هپاتیکا گزارش نمودند که با کاهش pH به ۳ و افزایش pH تا ۹/۵ هیچ میراسیدیومی در تخم‌ها تشکیل نمی‌گردد (۱۹). از مطالعاتی که با استفاده از عصاره‌های گیاهی بر روی تخم فاسیولا انجام شده می‌توان به مطالعه مؤذنی اشاره نمود. در این مطالعه از عصاره زنجبیل بر روی تخم فاسیولا هپاتیکا استفاده شد. نتایج نشان داد که بعد از ۱۴ روز مواجهه تخم‌های فاسیولا هپاتیکا با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر این عصاره گیاه زنجبیل، میراسیدیوم در تخم‌ها تشکیل نشد (۲۰). مورینو و همکاران به بررسی تأثیر عصاره به لیمو بر روی متاسرکرهای فاسیولا هپاتیکا پرداختند. نتایج آنها نشان داد که متاسرکرهای فاسیولا هپاتیکا بعد از ۷۲ ساعت مواجهه با عصاره به لیمو غیر فعال می‌گردد (۱۲). با توجه به اینکه خاصیت ضد میکروبی عصاره به لیمو به اثبات رسیده و در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶). لذا در مطالعه کنونی تأثیر عصاره الکلی به لیمو بر روی مراحل تکاملی و جنین زایی تخم‌های فاسیولا در محیط برون تنی انجام شد. همانطور که می‌دانیم فاصله زمانی از ورود تخم فاسیولا هپاتیکا به آب رودخانه‌ها و برکه‌ها تا زمان خروج میراسیدیوم از تخم حدود ۱۴ روز است (۲۰). در مطالعه کنونی به بررسی اثر غلظت‌های مختلف از عصاره الکلی به لیمو بر روی این فاصله زمانی پرداختیم. نتایج این مطالعه نشان داد که اولاً عصاره این گیاه بر روی فرآیند تکاملی تخم فاسیولا تأثیر منفی داشته و این فرآیند را طولانی‌تر می‌نماید. ثانیاً میزان تأثیر غلظت‌های مختلف این عصاره بر روی تکامل تخم متفاوت بوده به طوری که با افزایش غلظت عصاره، فرآیند تکامل تخم‌ها طولانی‌تر می‌شود. به طوری که نتایج مطالعه کنونی نشان داد مدت زمان تشکیل میراسیدیوم در تخم فاسیولا مواجهه شده با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره به لیمو با گروه کنترل یکسان است (۱۴ روز)، ولی زمان آزاد شدن میراسیدیوم از تخم مواجهه شده با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره ۲۱ و در گروه کنترل ۱۴ روز بود.

با افزایش غلظت عصاره، مدت زمان تشکیل میراسیدیوم در داخل تخم نیز افزایش یافت به طوری که در غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر

References

1. Khosravi A, Bahaahmady E. Epidemiology of Fasciola Hepatica in Iran. International Journal of Biology. 2012;4(4). doi: 10.5539/ijb.v4n4p86
2. Sunita K, Kumar P, Singh D. Sunita, K., Kumar, P and Singh, D.K. (2013). Fasciolosis control: Phytotherapy of host snail *Lymnaea acuminata* by Allicin to kill *Fasciola gigantica* larvae. Annual Review and Research in Biology, 3(4): 694-704. UK. Annual Review and research in Biology. 2013;3:694-704.
3. Lima Wdos S, Soares LR, Barcante TA, Guimaraes MP, Barcante JM. Occurrence of Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) infection in Brazilian cattle of Minas Gerais, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2009;18(2):27-30. doi: 10.4322/rbvp.01802006 PMID: 19602313
4. Silva ERVea. Fasciolose hepática. Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. 2008;6(11):1-7.

5. Rokni MB. The present status of human helminthic diseases in Iran. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008;102(4):283-95. doi: 10.1179/136485908X300805 pmid: 18510809
6. Moghaddam AS, Massoud J, Mahmoodi M, Mahvi AH, Periago MV, Artigas P, et al. Human and animal fascioliasis in Mazandaran province, northern Iran. *Parasitol Res*. 2004;94(1):61-9. doi: 10.1007/s00436-004-1169-6 pmid: 15338292
7. Howell AK, Williams DJL. The Epidemiology and Control of Liver Flukes in Cattle and Sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2020;36(1):109-23. doi: 10.1016/j.cvfa.2019.12.002 pmid: 32029178
8. Diab TM, Mansour HH, Mahmoud SS. Fasciola gigantica: Parasitological and scanning electron microscopy study of the in vitro effects of ivermectin and/or artemether. *Exp Parasitol*. 2010;124(3):279-84. doi: 10.1016/j.exppara.2009.10.013 pmid: 19861124
9. Elitok B, Elitok OM, Kabu M. Field trial on comparative efficacy of four fasciolicides against natural liver fluke infection in cattle. *Vet Parasitol*. 2006;135(3-4):279-85. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.10.008 pmid: 16289862
10. Fairweather I, Boray JC. Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *Vet J*. 1999;158(2):81-112. doi: 10.1053/tvj.1999.0377 pmid: 10489266
11. Moazeni M, Ansari-Lari M, Masoodfar, Hosseinzadeh S, Mootabi Alavi A. Lethal effect of high temperatures on the eggs of Fasciola hepatica. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2010;11.
12. Ibarra-Moreno S, Ibarra-Velarde F, Ávila-Acevedo JG. <i>In Vitro</i> Evaluation of Fasciolicide Activity with Hexane, Methanol and Ethyl Acetate with Extracts Processed and Obtained from Some Mexican Plants Used in Traditional Medicine Based on Ethno Botanical Studies. *American Journal of Plant Sciences*. 2012;03(04):506-11. doi: 10.4236/ajps.2012.34060
13. Sharafzadeh S, Alizadeh O. Some Medicinal Plants Cultivated in Iran. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012;2:134-7.
14. Abuhamdah S. Phytochemical Investigations and Antibacterial Activity of Selected Medicinal Plants from Jordan. *European Journal of Medicinal Plants*. 2013;3(3):394-404. doi: 10.9734/ejmp/2013/3540
15. Funes L, Carrera-Quintanar L, Cerdan-Calero M, Ferrer MD, Drobnic F, Pons A, et al. Effect of lemon verbena supplementation on muscular damage markers, proinflammatory cytokines release and neutrophils' oxidative stress in chronic exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2011;111(4):695-705. doi: 10.1007/s00421-010-1684-3 pmid: 20967458
16. Moein M, Zarshenas MM, Etemadfard H. Essential oil composition and total flavonoid content of Aloysia citriodora Palau under different cultivation systems. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 2014;4:353-8.
17. Dias AS, Araujo JV, Braga FR, Araujo JM, Puppim AC, Fernandes FM, et al. Biological control of Fasciola hepatica eggs with the Pochonia chlamydsoporia fungus after passing through the cattle gastrointestinal tract. *Parasitol Res*. 2012;110(2):663-7. doi: 10.1007/s00436-011-2538-6 pmid: 21773773
18. Dias AS, Araujo JV, Braga FR, Puppim AC, Perboni WR. Pochonia chlamydsoporia in the biological control of Fasciola hepatica in cattle in Southeastern Brazil. *Parasitol Res*. 2013;112(6):2131-6. doi: 10.1007/s00436-013-3372-9 pmid: 23494156
19. Yakhchali M, Bahramnejad K. Inhibition Effect of pH on the Hatchability of Fasciola Miracidia under Laboratory Conditions. *Iran J Parasitol*. 2016;11(1):30-4. pmid: 27095966
20. Moazeni M, Khademolhoseini AA. Ovicidal effect of the methanolic extract of ginger (Zingiber officinale) on Fasciola hepatica eggs: an in vitro study. *J Parasit Dis*. 2016;40(3):662-6. doi: 10.1007/s12639-014-0554-z pmid: 27605763