

اثر گیاه خرزهره، دانه فلفل، پودر بادام و روغن کرچک بر روی گونه های انگل جلدی لیشمانیا در شرایط آزمایشگاهی و تاثیر آن بر روند ایجاد ضایعه در موش سوری

محمد یخچالی^۱، مهدی رنجبری کی جندابه^۲

۱. دانشیار گروه پاتوبیولوژی، بخش انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. (مؤلف مسؤل) تلفن ثابت: ۰۴۴۱-۲۷۷۰۵۰۸

m.yakhchali@urmia.ac.ir

۲. کارشناس علوم آزمایشگاهی، بخش خصوصی، اصفهان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوزیس بیماری انگلی است که توسط گونه های مختلف لیشمانیا در انسان، گوشتخواران و جوندگان بروز می کند. در ایران، گونه های لیشمانیا عامل لیشمانیوزیس جلدی است که از نواحی مختلف از جمله استان اصفهان به دفعات گزارش گردیده است. این مطالعه به منظور ارزیابی اثر ترکیب گیاهی خرزهره، دانه فلفل، پودر بادام و روغن کرچک بر ضایعه جلدی ناشی از گونه های لیشمانیا در شرایط آزمایشگاهی و تاثیر آن بر روند ایجاد ضایعه در موش سوری انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه که از نوع تجربی (Repeated) بود، از ضایعات جلدی ۱۰ نفر از افراد مبتلا به صورت تصادفی نمونه برداری شد. از ۳ مورد آلوده به گونه های لیشمانیا (۳۰ درصد) در محیط کشت حاوی سرم جنین گاو ۱۰ درصد پروماستیگوت تهیه شد. سپس اثر ترکیب گیاهی (برگ گیاه خرزهره، دانه فلفل، پودر بادام و روغن کرچک، ۱۰ میکرولیتر) حاصل از جوشانده صاف شده برگ و تکه های نازک ساقه گیاه خرزهره به اضافه پودر مغز بادام، دانه کرچک و فلفل بر تکثیر انگل در محیط کشت حاوی پروماستیگوت های لیشمانیا (5×10^4 در میکرولیتر) و سرم جنین گاو (۱۰ درصد) با ۳ تکرار و در حضور شاهد مطالعه گردید. در هفته چهارم ۰/۲ میلی لیتر از رقت های تهیه شده از پروماستیگوت های لیشمانیا گروه های تیمار و شاهد غنی شده در محیط در قاعده دم موش های سوری در گروه های تیمار (۶ عدد) و شاهد (۲ عدد) تلقیح شد و وسعت ضایعه جلدی تا ۷ هفته مطالعه گردید. در خصوص ارزیابی اثر ترکیب گیاهی بر رشد کمی ضایعه جلدی از آزمون t استفاده گردید.

یافته ها: از نظر کمی، تعداد پروماستیگوت های انگل لیشمانیا در مواجهه با ترکیب گیاهی در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته بودند. مطالعه ضایعه جلدی در قاعده دم موش های سوری تحت بررسی نیز بیانگر تاثیر معنی دار ترکیب گیاهی بر روند تشکیل زخم و ندول جلدی در قاعده دم موش های تیمار در مقایسه با گروه شاهد بود.

نتیجه گیری: ارزیابی اثر این ترکیب گیاهی بر رشد انگل در شرایط آزمایشگاهی و در تلقیح به موش سوری بیانگر تاثیر مثبت آن بر لیشمانیا و روند تشکیل زخم بود. توصیه می شود تحقیقات تکمیلی در خصوص سایر جنبه های داروشناسی این ترکیب گیاهی انجام شود.

کلمات کلیدی: خرزهره، لیشمانیا، پروماستیگوت، ایران.

وصول مقاله ۹۱/۸/۸: اصلاحیه نهایی: ۹۲/۲/۱ پذیرش: ۹۲/۳/۱۹

مقدمه

بهداشتی مهم شایع است (۱) که موجب بروز زیان های مالی و جانی فراوانی می شود. بر اساس بررسی های انجام شده از ۲۹ گونه لیشمانیای شناخته شده ۱۷ گونه آن در بین

لیشمانیوزیس بیماری انگلی است که توسط گونه های مختلف لیشمانیا در انسان، گوشتخواران و جوندگان بروز می کند. این بیماری در ۸۸ کشور جهان به عنوان یک مشکل

(۳). برخی از محصولات طبیعی، به عنوان منبع غنی از ترکیبات ضد لیشمانیایی محسوب می شوند (۹ و ۱۰). در ایران نیز از گیاهان دارویی برای کاهش وسعت ضایعه لیشمانیوزیس جلدی استفاده شده است (۱۲). اثرات ضد لیشمانیا مازور و لیشمانیا تروپیکا گیاه دارویی درمنه (آرتمیزیای سبزی) در مراکش مشخص شده است (۱۳). مجموعه ای از فرآورده های آلکالوئیدی و کوینون های گیاهی موثر بر سالک در گیاهان آویشن شیرازی، حنا، سیر و بومادران گزارش گردیده است (۱۴). اثر عصاره جوشانده و هیدروالکلی میوه گیاه فلوس نیز بر لیشمانیوزیس جلدی در مطالعه با بهبودی کامل بیماران گزارش گردیده است (۱۵). مطالعه اثر عصاره سیر بر لیشمانیوزیس جلدی با بروز توانایی آن در کنترل زخم لیشمانیایی همراه بود (۱۶). از گیاهان دارویی استفاده شده بر ضد سالک می توان به امتین، انفوزه، شیرین بیان و اوکالپتوس اشاره نمود (۱۱). با توجه به اینکه شهرستان اصفهان و بخش های اطراف آن تا باتلاق گاو خونی از مناطق آندمیک بیماری می باشند، در روستاهای اطراف اصفهان از نوعی مرهم گیاهی برای درمان زخم های لیشمانیایی استفاده می شود که مخلوطی از برگ گیاه خرزهره (نریوم اولئاندر)، دانه کرچک (رسیوس کامونیس)، پودر مغز بادام و فلفل (کپسیکوم) است. با توجه به استفاده متداول این ترکیب در روستاهای اطراف اصفهان، این تحقیق به منظور ارزیابی اثر آن بر پروماستیگوت لیشمانیا انجام شد.

روش بررسی

روش نمونه برداری

این تحقیق از نوع مطالعه تجربی (Repeated) بود. برای مطالعه اثر ترکیب گیاهی بر ضایعه جلدی لیشمانیا در شرایط آزمایشگاهی، از ۱۰ نفر از مبتلایان به زخم های جلدی به صورت تصادفی در روستاهای اطراف شهرستان اصفهان و از

انسان و حیوانات مشترک هستند (۲). بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی ۱۲ میلیون نفر در جهان مبتلا بوده و در حدود ۳۵۰ میلیون نفر نیز در معرض ابتلا می باشند (۳). بروز سالیانه موارد جدید در حدود ۲ میلیون نفر است که ۱/۵ میلیون نفر از آنها به لیشمانیوزیس جلدی مبتلا می شوند (۴)، به طوری که لیشمانیوزیس بعد از مالاریا در درجه دوم اهمیت قرار دارد. در ایران، لیشمانیوزیس جلدی یکی از بیماری های بومی در اکثر نقاط ایران است و گونه های لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا مازور عامل لیشمانیوزیس جلدی می باشند (۵). در سال های اخیر تعداد موارد لیشمانیوزیس جلدی و کانون های آن در حال افزایش و توسعه بوده و سالیانه تعداد موارد ۲۰-۱۵ هزار مورد تخمین زده می شود. از کانون های لیشمانیوزیس جلدی شهری تهران، مشهد، شیراز، کرمان، قم، ساوه، کاشان، سبزوار و بلوچستان (۶) و لیشمانیوزیس جلدی روستایی در ایران می توان به اصفهان، سرخس، ترکمن صحرا، اسفراین، نطنز، ارسنجان، تبریز و مرودشت اشاره کرد (۷). وجود پشه های خاکی فلپوتوموس ناقل انگل و مخازن آن (جوندگان به خصوص موش های رومبومیس) باعث شده است تا کانون های بیماری در حال افزایش باشند (۲).

از جمله داروهای مطرح در درمان لیشمانیوزیس جلدی، ترکیبات آنتیموان می باشد که از ۶۰ سال قبل تاکنون مورد استفاده داشته اند (۸). در سال های اخیر، افزایش میزان مقاومت به این ترکیبات منجر به معرفی ترکیبات جدیدتری شده است (۹). البته در مناطق روستایی به دلیل هزینه زیاد درمان (۳ و ۱۰) و با توجه به اینکه داروهای گیاهی عوارض جانبی زیادی نداشته و نیز در دسترس و ارزان می باشند، استفاده از گیاهان محلی به عنوان مرهم های سنتی مطرح است (۱۱). اخیرا پیشرفت های زیادی در زمینه استفاده از گیاهان دارویی در درمان لیشمانیوزیس حاصل شده است (۱). عصاره های گیاهی و ترکیبات مشتق شده از آنها احتمالا منبع غنی از عوامل دارویی جدید را فراهم می کنند

از رسوب حاصل از سانتریفوژ با استفاده از PBS تهیه گردید به طوری که در هر میلی لیتر از آن $10^6 \times 1/75$ پروماستیگوت به کمک لام نئوبار شمارش گردید. سپس ۰/۲ میلی لیتر از رقت های تهیه شده از محیط غنی شده پروماستیگوت لیشمانیا در قاعده دم موش های سوری گروه تیمار (۶ عدد موش سوری) و گروه شاهد (۲ عدد موش سوری) تلقیح شدند. روند تشکیل ندول های حاوی اماستیگوت لیشمانیا در پوست (تایید شده با رویت جسم لیشمن) و وسعت ضایعه در موش های تیمار و شاهد تا ۷ هفته بدون ثبت تصویر و فقط با استفاده از کولیس ورنیه اندازه گیری، کنترل و ثبت گردیدند.

ارزیابی آماری

یافته ها در خصوص اثر ترکیب گیاهی بر میزان رشد کمی ضایعه جلدی ناشی از گونه های انگل جلدی لیشمانیا با استفاده از آزمون t تحلیل لازم انجام شد و p کوچکتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

از افراد دارای زخم جلدی در روستاهای اطراف شهرستان اصفهان، ۳ (۳۰ درصد) مورد از زخم ها آلوده به انگل لیشمانیا بودند. کشت انگل منجر به تولید تعداد زیادی پروماستیگوت لیشمانیا گردید (5×10^6 در میکرولیتر).

مطالعه ضایعه جلدی در قاعده دم موش های سوری تحت بررسی بیانگر تاثیر ترکیب گیاهی بر روند تشکیل زخم و ندول جلدی در قاعده دم موش های تیمار در مقایسه با گروه شاهد بود. به طوری که در موش های آلوده (گروه تیمار)، محل تلقیح متورم گردید ولی در ادامه سطح آن توسط بافت قرمز و تازه پوشیده شد. به طوری که اثر ناچیزی از ضایعه در قاعده دم موش های تیمار بر جای ماند. اندازه گیری وسعت زخم در هفته های مختلف نشان داد که در گروه تیمار میانگین اندازه قطر طولی و عرضی زخم در هفته آخر آخر (۲/۳۱±۱/۱۸ و ۱/۰۱±۰/۵۱) کمتر از اندازه آن در گروه شاهد (۸/۱±۱/۹۱ و ۵/۳۴±۱/۱۹±۰/۴۴) بود.

حاشیه زخم، نمونه برداری شد. از نمونه ها گسترش تهیه گردید و پس از رنگ آمیزی به روش رایت گیمسا از نظر آلودگی به اماستیگوت انگل لیشمانیا بررسی میکروسکوپی شدند. نمونه مورد نیاز برای کشت و مطالعه در شرایط آزمایشگاهی از نمونه های مثبت که در ماکرو فاژ دارای اجسام لیشمن بودند تهیه و استفاده گردید.

روش تهیه ترکیب سنتی

ابتدا برگ و تکه های نازک ساقه گیاه خرزهره را جوشانده و صاف گردید. سپس پودر مغز بادام، دانه کرچک و فلفل را در آن ریخته و مجددا جوشانده شد. پس از ۱۵-۱۰ دقیقه ترکیب قوام پیدا کرد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

کشت لیشمانیا در محیط کشت و مجاورت آن با ترکیب گیاهی

نمونه پوستی تهیه شده از زخم های لیشمانیا در محیط کشت (مخلوط آگار و خون خرگوش- جنتامایسین ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) و در انکوباتور ۲۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند (۱۷). برای شمارش و تهیه پروماستیگوت مورد نیاز انگل لیشمانیا از لام هماسیتومتر استفاده گردید.

در میکروپلیت های کشت سلول (۲۴ خانه) از ترکیب گیاهی (۱۰ میکرولیتر) به محیط کشت حاوی پروماستیگوت های لیشمانیا (5×10^4 در میکرولیتر) و سرم جنین گاو (۱۰ درصد) (۵۰ میکرولیتر) با ۳ تکرار و در حضور شاهد (پروماستیگوت لیشمانیا بدون ترکیب گیاهی) اضافه شد و در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. از هفته دوم، روزانه از تیمارها گسترش تهیه شد و با گروه شاهد از نظر رشد پروماستیگوت انگل مقایسه گردیدند. حجم محیط کشت در طول دوره مطالعه با جبران مقدار مورد استفاده در تهیه گسترش ثابت نگه داشته شد. در هفته چهارم پروماستیگوت های لیشمانیا گروه های تیمار و شاهد در محیط RPMI غنی شدند. پس از سانتریفوژ، رسوب با بافر سالین فسفات (PBS) چند بار شستشو داده شد. حجمی

(جدول ۱). این یافته از نظر آماری اختلاف معنی داری داشت ($P=0/0001$). در گسترش های تهیه شده از محل ضایعه نیز ماکروفاژهای آلوده به اماستیگوت انگل مشاهده نگردیدند. در صورتی که در موش های سوری گروه شاهد جدول ۱: نتایج یافته های حاصل از تاثیر عصاره گیاهی بر میزان قطر ضایعه جلدی لیشمانیا در موش سوری (میانگین \pm انحراف معیار).

آزمون گروه ها	شاهد (میلی متر)		تیمار (میلی متر)		زمان (هفته)
	عرض	طول	عرض	طول	
$P > 0/05$	۲/۴ \pm ۰/۳۱	۵/۳ \pm ۰/۶	۲ \pm ۰/۱۱	۳/۹ \pm ۰/۴۶	۱
$P > 0/05$	۲/۹۲ \pm ۰/۴۵	۵/۱ \pm ۰/۷۲	۱/۶ \pm ۰/۲۷	۳/۶ \pm ۰/۵۴	۲
$P = 0/0170$	۳/۴۳ \pm ۰/۵۱	۵/۶۱ \pm ۰/۹۵	۱/۳۱ \pm ۰/۳۱	۳/۱ \pm ۰/۷۱	۳
$P = 0/0021$	۳/۹۹ \pm ۰/۶۹	۶/۱۱ \pm ۱/۴۳	۱/۲۸ \pm ۰/۴۲	۲/۸ \pm ۰/۹۸	۴
$P = 0/0018$	۴/۴۸ \pm ۰/۸۱	۶/۹۸ \pm ۱/۷۱	۱/۲۴ \pm ۰/۴۵	۲/۵ \pm ۰/۹۶	۵
$P = 0/0011$	۵/۱۱ \pm ۱/۱۰	۷/۷۶ \pm ۱/۸۵	۱/۱ \pm ۰/۴۹	۲/۴ \pm ۱/۰۱	۶
$P = 0/0001$	۵/۳۴ \pm ۱/۱۹	۸/۱ \pm ۱/۹۱	۱/۰۱ \pm ۰/۵۱	۲/۳۱ \pm ۱/۱۸	۷
$P = 0/0001$	۳/۹۵ \pm ۰/۴۴	۶/۴۲ \pm ۱/۳۱	۱/۳۹ \pm ۰/۳۷	۲/۶۵ \pm ۰/۸۳	جمع کل

بحث

بنابراین استفاده از داروهای گیاهی در درمان بیماری های پوستی از جمله لیشمانیوزیس جلدی اهمیت پیدا می کنند (۱۸).

مطالعه آزمایشگاهی، اثر ترکیب سنتی برگ گیاه خرزه‌ره (تریوم اولئاندر)، دانه کرچک (رسیوس کامونیس)، پودر مغز بادام و فلفل (کپسیکوم) بر پروماستیگوت لیشمانیا نشان نداد که دارو اثر التیام بخش بر زخم های قبلی دارد، بلکه به طور غیر مستقیم بر روند ایجاد زخم تاثیر داشت. درودگر و همکاران (۱۲) در مطالعه ۳۰ روزه بررسی اثر غلظت های مختلف گیاه درمنه بر زخم لیشمانیا در موش BALB/C، اندازه قطر زخم ها در گروه های مورد، دریافت کننده غلظت های ۱، ۳ و ۵ درصد به ترتیب ۵/۹، ۳۳/۱ و ۲۸/۳

امروزه مطالعات مختلفی در زمینه تاثیر عصاره های گیاهی بر روی لیشمانیوزیس جلدی در ایران و جهان صورت گرفته است. به طوری که عصاره گیاهی و یا ترکیبات مشتق از گیاهان منبع با ارزشی برای یافتن داروهای جدید ضد لیشمانیوزیس می باشند. برای دستیابی به داروهای گیاهی موثر با ضریب درمانی بالا بر ضد تک یاخته لیشمانیا نیاز به آزمون ها و ارزیابی های غربالگری دارد تا بتوان پس از شناسایی، اقدام به بررسی و دسته بندی عصاره های موثر و مکانیسم اثر آنها کرد (۱۰). علاوه بر این، درمان لیشمانیوزیس جلدی با داروهای شیمیایی که آنتیموان های پنج ظرفیتی در رأس آنها قرار دارند نیز عاری از عوارض جانبی نمی باشند.

شرایط آزمایشگاهی بر لیشمانیا گزارش شد (۱۹). براتی و همکاران (۲۰) در بررسی آزمایشگاهی عصاره های گیاهی آویشن شیرازی و اسپند، اثرات ضد لیشمانیایی آنها را نشان دادند. امامی و همکاران (۲۱) نیز اثرات ضد لیشمانیایی گونه های آرتمیزیای بومی استان خراسان رضوی را در شرایط خارج بدنی به ویژه در خصوص عصاره های اتانولی آرتمیازیا کولبادیکا، آرتمیزیاسینی فورمیس و آرتمیازیا ساتولیا با قوی ترین تاثیر در مقایسه با سایر گونه ها عنوان نمودند. در تحقیقات دیگر هم اثر ضد لیشمانیایی گیاهانی نظیر باریجه، ترخون، سیر، اوکالپتوس زرشک و درمنه بر زخم ناشی از لیشمانیاها در موش BALB/c نشان داده شده است (۱۹ و ۱۸ و ۱۵). Saleem و همکاران (۲۲) در مطالعه ای بر روی اثر ضد لیشمانیایی ۷ نوع گیاه بومی عراق در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که عصاره های گیاهی خرزهره و آسترگالوس هاموسوس اثر معنی داری بر اماسیتگوت های داخل یاخته ای لیشمانیا در غلظت پایین داشت.

بیماری لیشمانیوزیس جلدی در ایران در مقایسه با اشکال دیگر بیماری به دلیل بهبود خود به خود ضایعات و بروز ایمنی محافظتی به ویژه در ساکنین نواحی روستایی شاید چندان مد نظر نباشد. البته به دلایل متعددی مانند طولانی بودن طول دوره زخم و بهبود آن، بدشکلی جوشگاه به جامانده و عفونت های ثانویه در محل زخم و نیز افراد توریستی که به نواحی اندمیک نظیر شهرستان اصفهان و اطراف سفر می کنند؛ ارایه روش های درمانی قابل تحمل، در دسترس و کم هزینه با کمترین عوارض جانبی اهمیت زیادی پیدا می کند (۱۸ و ۱۷). در این تحقیق مشخص گردید ویژگی های استفاده از ترکیب برگ گیاه خرزهره، دانه لفل، پودر بادام و روغن کرچک در مبتلایان به لیشمانیوزیس جلدی در منطقه به دلیل دسترسی آسان به ترکیبات آن و ارزان بودن روش درمانی و با کمترین اثر بر جای مانده از ضایعه در پوست مبتلایان قابل توجه می باشد.

درصد افزایش داشت. در تمام گروه های تحت بررسی تغییر معنی داری در قطر زخم مشاهده گردید ($P < 0/05$) بجز در موش های تحت درمان با غلظت ۱ درصد اسانس درمنه، با افزایش غلظت اسانس، قطر زخم ها نیز افزایش داشت ($P < 0/001$). حجازی و همکاران (۱۷) در مطالعه ای عصاره الکلی ریشه گیاه زرشک بر زخم ناشی از لیشمانیا مائور در موش BALB/C کاهش قطر زخم، افزایش میانگین وزن موش ها و کاهش بار انگلی به میزان ۸۰ درصد داشت (۱۹). در مطالعه اثر عصاره جوشانده و هیدروالکلی میوه گیاه فلوس بر لیشمانیوزیس جلدی، در گروه جوشانده فلوس ۴۰ درصد، در گروه هیدروالکلی ۳۶/۴ درصد و ۶۵/۵ درصد در گروه گلوکانتیم بهبودی کامل بیماران گزارش گردید (۱۵). احمدی و همکاران (۱۶) در مطالعه اثر درمانی عصاره سیر توام با ویتامین آدر طی درمان سی روزه مانع از گسترش زخم لیشمانیوزیس جلدی شد. در بررسی اثر عصاره بومادران و آویشن بر زخم لیشمانیا در قاعده دم موش های تحت مطالعه نشان دادند که اختلاف معنی داری بین میانگین قطر زخم ها قبل و پس از درمان در گروه شاهد، بومادران و آویشن وجود داشت ($P < 0/05$). بابایی خو و همکاران (۱۸) گزارش کردند که تنتور ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد سیر، اتانول ۹۶ درجه، اسانس ۱۰ درصد و ۲۰ درصد مورد، اسانس ۱۰ درصد و ۲۰ درصد باریجه، عصاره تام گیاه گزنه و غلظت های ۱۰ درصد و ۲۰ درصد گیاه درمنه بر زخم لیشمانیا در موش سوری اثر نداشت در حالیکه اسانس ۱۰ درصد ترخون و ۱۰ درصد اوکالپتوس موجب کاهش در قطر زخم ها و درمان آنها گردیدند. آنان علل بی تاثیری برخی از ترکیبات بکار برده را بی تاثیری عناصر اصلی فعال گیاه (آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، ساپونین ها، روغن های فرار اسانس، تانن ها)، ژنتیک میزبان و ژن های موثر در پاسخ های ایمنی سلولی و ژنتیک گونه لیشمانیای عامل بیماری عنوان کردند. مطالعات دیگری اثر آرتمیازیا ایندیکا در

نتیجه گیری

با توجه به تاثیر عصاره گیاهان بر توان لیشمانیاهای کشت شده و نیز تاثیر مثبت آن بر لیشمانیا و بر روند تشکیل زخم در موش احتمالا این عصاره بر زخم های انسانی نیز تاثیرات مثبتی خواهد داشت که باید در بررسی های آینده مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری جناب آقای دکتر عباس حسنی دانشیار گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه در تائید گونه گیاهان بکار گرفته شده در این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارد. ضمنا از کارشناس بخش انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه آقای اسماعیل آقاپور و نیز همکاری اهالی محترم روستاهای اطراف شهرستان اصفهان تشکر می نمایم.

Reference

1. Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. *Phytochemistry*. 2005; 66:2056-2071.
2. MohebAli M. Protozoal zoonoses. Nadi Publisher, 1976: 31-40.
3. Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 2005; 12: 514-535.
4. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27:305-318.
5. Saebi E. Clinical Parasitology: Protozoa diseases in Iran. 5th edition, Aeeizh Publisher, Tehran, Iran. 2010: 223-225.
6. Fazaeli A, Fouladi B, Sharifi I. Epidemiologica study of cutaneous leishmaniosis and determination of parasite species in Mirjaveh, a border area of southeast of Iran. *Iranian Journal of Parasitology* 2008; 3: 5-12.
7. Alipour H, Yakrim Z. Status of cutaneous leishmaniosis in Arsanjan of Fars, Iran during 2004-2008. 3rd Iranian Congress of Clinical Microbiology, Shiraz, 6-8 Oct, 2009.
8. Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123:399-410.
9. Bouvier J, Etges R, Bordier C. Identification of the promastigote surface protease in seven species of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1987; 24:73-79.
10. Azadbakht M, Azadbakht M. Five prevalent antiprotozoal herbal drugs. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2008; 18:118-132.
11. Lamidi M, DiGiorgio C, Delmas F, Favel A, Eyele Mve-Mba C, Rondi ML. In vitro cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. *J Ethnopharmacol* 2005; 102:185-190.
12. Doroodgar A, Arbabi M, Razavi M, Mohebali M, Sadr F, Tashakkor Z. Effect of *Artemisia sieberi* extract on *Leishmania major* ulcers in BALB/c mice. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2007; 11:52-56.
13. Hatimi S., Boudouma M., Bichichi M., Chaib N. Guessous Idrissi N. Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba-alba* Asso. *Therapeutique*. 2000; 21:62-65.
14. Al Gindan H, Kubba R. Cryosurgery in old world Cutaneous Leishmaniasis. *Br J Dermatol* 1998; 118: 851-854.

15. Jafari F, Moradi S, Nilfroshzadeh M, Derakhshan R, Ansari N. Comparison effect of concentrated decoction extract and hydroalcoholic fruit extract of *Cassia fistula* with local injection of glucantim on cutaneous leishmaniosis. *Skin Disease* 2006; 9: 211-216.
16. Ahmadi K, Mahmoodzadeh A, Cheraghali A, Esfehiani A. Effect of Garlic extract on cutaneous leishmaniosis by increasing nitric oxide. *J Shar kord Univ Med Sci* 2002; 4: 1-7.
17. Hejazi SH, Shirani L, Zolfaghari – Baghbaderani A, Saberi S, Nilforoushzadeh M, Moradi Sh et al. Comparison Effectivness of Extracts of Thyme, Yarrow, Henna and Garlic on Cutaneous Leishmaniasis Caused by *L. major* in Animal Model (Balb/c) 2009; 9: 129-137.
18. Babaee Khou L, Moheballi M, Niakan Lahiji, Mehrabi Tavana A. The therapeutic effects of *Eucalyptus*, *Myrtus*, *Ferula*, *Artemisia*, *Allium* and *Urtica* extracts against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmaniaia major* in small white mice (out- bred). *Hakim Research Journal* 2007; 10: 21-27.
19. Kazemi E, Talari S, Hoshiar H. Effect of alcoholic extract of *Berberis vulgaris* on *Leishmania major* in BALB/C mice. *J Facult Health Healthy Res Inst* 2007; 3: 35-42.
20. Barati M, Sharifi I, Sharifi-Far F. Effects of extracts *Zataria Zdlyshmanyayy*, *Peganum* and the colorimetric assay In vitro. *J Kerman Univ Med Sci* 2009; 1:32-41.
21. Emami A, Mahmudi M, Zamani Taqizadeh Rabe Sh.,Ahi A. Assessment of in vivo leishmanicidal effect of *Artemisia* spp. native to Khorasan Razavi province. *Sci J Kurd Univ* 2008; 13:15-20.
22. Saleem OGA, Abdul–Baqi JA, Ismail AH. The effect of some medical plant extracts on the intercellular from of *Leishmania* parasites in-vitro. *J Basrah Researches Sciences* 2007; 33: 89-92.