بررسی تاثیر جوشانده چای سیاه بر پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* در شرایط برون‌تنی

وحید نصیری[1]*، غلامرضا کریمی[1]، حبیب الله پایکاری[1]، غلامرضا معتمدی[1]، شهلا ریواز[1]، ابراهیم نوروزی[1]

۱-موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی کرج، بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های انگلی.
*نویسنده مسئول مکاتبات: v.nasiri@rvsri.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۲/۱۱/۲۵ پذیرش نهایی: ۹۴/۲/۳۰)

چکیده

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری‌های آندمیک در برخی از نقاط ایران بوده و از جمله بیماری‌های انگلی است که فاقد داروی درمانی موثری می‌باشد. در این مطالعه، تاثیر جوشانده چای سیاه بر رشد پروماستیگوت‌ها در شرایط *برون‌تنی (In vitro)* مورد بررسی قرار گرفت. پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* تکثیر و در پلیت‌های کشت سلولی ۲۴ خانه‌ای به میزان ۳ میلیون انگل در هر میلی‌لیتر در محیط تازه پاساژ داده شدند. جوشانده چای سیاه به نسبت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد حجم نهایی به سوسپانسیون کشت سلولی اضافه گردیده و پلیت‌ها به انکوباتور ۲۶ درجه سلسیوس انتقال داده شده و در فواصل ۰/۵، ۱، ۵، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه روند رشد و تکثیر آن‌ها ارزیابی گردید. اثربخشی جوشانده چای سیاه بر پروماستیگوت انگل با استفاده از روش شمارش مستقیم و نیز آزمون MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) سنجیده شد و نتایج با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج حاصل از شمارش مستقیم و آزمون MTT نشان داد که تعداد پروماستیگوت‌ها در گروه‌های تیمارشده با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد جوشانده گیاه چای سیاه ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت کاهش یافته ولی در گروه کنترل از روند رشد طبیعی تبعیت می‌نمود که در مقایسه با گروه‌های تحت آزمایش دارای اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بود. نتایج مطالعه نشات داد که جوشانده چای سیاه در از بین بردن پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* در شرایط برون‌تنی، اثر مطلوبی دارد.

کلید واژه‌ها: چای سیاه، لیشمانیا ماژور، پروماستیگوت، MTT، طب گیاهی.

مقدمه

لیشمانیازیس عفونت انگلی وسیع الطیفی است که موارد عفونت انسانی آن از سراسر جهان به غیر از استرالیا و نواحی قطبی گزارش شده و متاسفانه تاکنون واکسن یا داروی مناسبی برای مهار انگل و اشکال مختلف بیماری و نیز روش شیمیایی مناسبی در مبارزه با ناقل آن ارائه نشده است. عامل لیشمانیازیس تک‌یاخته انگلی از خانواده تریپانوزوماتیده، به نام لیشمانیا است. لیشمانیازیس سبب ایجاد طیف گسترده‌ای از عفونت‌های انسانی شامل ضایعات جلدی خودبه‌خود بهبود یابنده (سالک) تا اشکال جلدی مخاطی منتشره و گاهاً کشنده احشایی (کالاآزار) می‌گردد.بر طبق گزارش های سازمان بهداشت جهانی این عارضه مهمترین بیماری گرمسیری بوده و هر ساله بیش از بیست میلیون انسان در سراسر جهان به اشکال مختلف بیماری مبتلا گردیده (Castelli *et al*., 2014) و بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در ریسک ابتلای به عفونت قرار دارند (Nasiri *et al*., 2013).

شواهد باستان‌شناسی دلالت بر این دارند که ضایعات چهره ناشی از لیشمانیازیس در تصاویر موجود بر روی ظروف سفالی کشف شده در آمریکای مرکزی که قدمت آن‌ها به ۱۰۰۰ سال می‌رسد و نیز در تصاویر فاتحان اسپانیایی در قرن شانزدهم مشاهده شده‌اند (Cox, 2002) . بر طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی ۹۸ کشور و ۳ حاکم نشین در ۵ قاره از نظر انتقال لیشمانیازیس آندمیک گزارش شده‌اند. در مجموع، بر اساس موارد رسمی اعلام شده در جهان هر ساله بیش از ۵۸۰۰۰ مورد لیشمانیازیس احشایی و ۲۲۰۰۰۰ مورد لیشمانیازیس جلدی روی می‌دهد (Alvar *et al*., 2012).

کشور ایران در میان ۱۰ کشوری قرار گرفته است که طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی بیش از ۷۵-۷۰ درصد موارد جهانی لیشمانیازیس جلدی از آن‌ها گزارش شده است. ایران در منطقه خاورمیانه از نظر ابتلا به لیشمانیازیس جلدی در رتبه نخست و از نظر ابتلا به لیشمانیازیس احشایی در رتبه چهارم قرار دارد (Alvar *et al*., 2012). قدمت بیماری لیشمانیوزیس در ایران به بیش از۶۵۰ سال پیش از میلاد می‌رسد. پورسینا در کتاب پزشکی مشهور قانون به ضایعاتی پوستی شبیه سالک و به نام خیرونیه (جیرونیه) که مدتی به طول می‌انجامیده و درمانش مشکل و در برابر داروهای گوناگون استقامت می‌نموده، اشاره نموده است که با نشانه‌ها و علائمی که ذکر شده، تصور می‌رود منظور زخم سالک بوده است. در ایران به این بیماری سالک اطلاق می‌شود که به معنای سال کوچک است. در سال ۱۳۹۰ به ۲۰۵۸۵ مورد سالک با میزان بروز ۲۷ در ۱۰۰ هزار نفر ثبت گردیده است. بیش از ۹۰ درصد موارد بیماری در ۸۸ شهرستان کشور اتفاق افتاده است و در ۱۷ استان انتقال بیماری صورت می‌گیرد (احمدنیا و همکاران، ۱۳۹۱).

عامل لیشمانیازیس جلدی در بیشتر مناطق دنیای قدیم *گونه لیشمانیا ماژور* است. علائم بالینی به شکل زخمی است که از چند هفته تا چند ماه پس از آلوده شدن شخص سر باز می‌کند. سالک یک بیماری خود محدودشونده است و معمولاً در طی یک سال بهبود می‌یابد. آنچه که درمان سالک را ضروری می‌سازد این است که در ۱۰ درصد موارد، بیماری سالک به صورت

مزمن یا لوپوئید درمی‌آید. در کانون‌های شهری، انسان ممکن است مخزن بیماری باشد و با درمان مناسب موارد انسانی، از احتمال انتقال عفونت به افراد سالم کاسته می‌شود (WHO, 2014). زخم سالک اغلب خودبه‌خود بهبود می‌یابند، ولی به دلائل متعددی از جمله طولانی بودن دوره زخم و احتمال عفونت‌های ثانویه ارائه روش درمانی قابل تحمل و بدون عوارض جانبی ضروری به نظر می‌رسد (WHO, 2010).

تاکنون اقدامات درمانی مختلفی در درمان سالک به کار رفته است که بطور کلی شامل درمان فیزیکی یا جراحی و درمان دارویی می باشد. درمان فیزیکی و جراحی شامل کرایوتراپی، گرمای موضعی، کورتاژ و لیزر آرگون می‌باشد. درمان دارویی شامل درمان سیستمیک و موضعی است. مهمترین داروهای سیستمیک عبارتند ازآنتی موان‌های پنج ظرفیتی (گلوکانتیم و پنتوستام)، کلروکین، پنتامیدین، مترونیدازول، کتوکونازول، داپسون، ایتراکونازول، تربینافین و ریفامپیسین می‌باشد که بیشترین طیف درمانی سالک را در بر می‌گیرند (WHO, 2014). مهمترین درمانی که امروزه برای انواع لیشمانیازیس به کار می‌رود، ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی‌موان هستند که شامل سدیم استیبوگلوکونات (پنتوستام) و مگلومین آنتی موانات (گلوکانتیوم) می‌باشند.

مواردی از این بیماری نیز وجود دارد که به داروهای مذکور مقاوم بوده و به درمان پاسخ نمی‌دهند. از طرفی به علت وجود عوارض متعدد دارو، تلاش برای دستیابی به داروی جدیدی که بتواند ضمن اینکه زخم را سریع‌تر بهبود بخشد، کمترین عوارض جانبی را داشته باشد و پس از بهبودی، جوشگاهی بر جای نگذارد، ادامه دارد (Jaffary *et al*., 2012; WHO, 2014). بنابراین، مطالعه بر روی گیاهان دارویی جهت یافتن دارویی مناسب علیه انگل لیشمانیا و بیماری لیشمانیازیس از اهمیت بالایی برخوردار است. ترکیبات طبیعی و مواد مشتق از گیاهان به صورت گسترده‌ای در مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به کار می‌روند (Bisset, 1994). استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های انگلی به دوران باستان بازمی‌گردد که مثالی از آن استفاده از پوست درخت گنه گنه به عنوان داروی ضد مالاریا می باشد (Kayser *et al*., 2002). مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تاثیر جوشانده چای سیاه بر پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* در شرایط برون‌تنی انجام شد.

مواد و روش‌ها

کشت انگل *لیشمانیا ماژور*

انگل استفاده شده در این مطالعه، *لیشمانیا ماژور* سویه استاندارد ایران (MRHO/IR/75/ER) می‌باشد. ابتدا از زخم فعال موش سفید آزمایشگاهی (نژاد BALB/c) مبتلا به لیشمانیوز جلدی ناشی از *لیشمانیا ماژور* نمونه برداشته شد و به محیط کشت NNN (Nicolle-Novy–MacNeal) منتقل گردید. لوله‌های حاوی محیط کشت به مدت ۵ روز انکوبه شدند. به منظور کشت و تولید انبوه پروماستیگوت، انگل‌ها درمحیط کشت مایع RPMI1640 پاساژ داده شدند.

کشت پروماستیگوت‌ها با غلظت‌های مختلف چای سیاه

پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* تکثیر و در پلیت‌های کشت سلولی ۲۴ خانه‌ای به میزان ۳ میلیون انگل در هر میلی‌لیتر در محیط تازه پاساژ داده شدند. جوشانده چای سیاه به نسبت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰

درصد حجم نهایی به سوسپانسیون کشت سلولی اضافه گردیده و پلیت‌ها به انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شده و در فواصل ۰/۵، ۱، ۵، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه روند رشد و تکثیر و همین‌طور تغییرات موفولوژیک آن‌ها با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ اینورت (Nikon Ti-E) (از هر غلظت، سه چاهک شمارش شد) ارزیابی گردید. از محیط کشت RPMI حاوی انگل بدون عصاره به عنوان شاهد استفاده شد.

تعیین درصد زنده بودن پروماستیگوت با استفاده از آزمایش MTT

تعداد $10^6 \times 1$ انگل در مرحله لگاریتمی توسط لام نئوبار شمارش و در پلیت کشت ۹۶ خانه در محیط RPMI 1640 و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد کشت داده شد. غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد از جوشانده چای سیاه به چاهک‌ها اضافه شد و برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد.

چاهک‌ها در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT [3-(4, 5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] بررسی شدند. طبق دستورالعمل کیت، پودرMTT با غلظت ۵ µg/mL **در محلول فسفات بافر** (PBS) حل شده و از فیلتر ۰/۲ عبور داده شد و به هر چاهک ۲۰µL افزوده شد و سپس پلیت در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی به مدت ۵-۲ ساعت انکوبه شد. رنگ در داخل میتوکندری سلول زنده در اثر آنزیم‌های دهیدروژناز تبدیل به کریستال‌های نامحلول بنام فورمازان می‌شود. پس از گذشت ۵-۲ ساعت پلیت با دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ µL دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به عنوان حل‌کننده فورمازان افزوده شد. پس از ۱۰ دقیقه جذب نوری با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۴۰ nm خوانده شد. درصد زنده بودن سلول از طریق فرمول: (AT-AB)/(AC-AB)×100 محاسبه شد. AB جذب نوری چاهک بلانک، AC جذب نوری چاهک کنترل و AT جذب نوری سلول تیمار شده با عصاره گیاه است.

تحلیل آماری داده‌ها

تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای مقایسه هر گروه با گروه کنترل انجام شد.

یافته‌ها

به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت تعداد پروماستیگوت‌های زنده تیمارشده با جوشانده چای سیاه در هر چاهک با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ شمارش گردید که با افزایش غلظت اسانس گیاه تعداد پروماستیگوت در سه زمان مورد نظر پس از کشت کاهش یافت. کمترین تعداد شمارش‌شده انگل مربوط به غلظت ۴۰ درصد بود که در این غلظت ۷۲ ساعت پس از کشت تعداد انگل به ۶۶۹۶ پروماستیگوت در هر میلی‌لیتر کاهش یافت (جدول ۱). درصد زنده بودن پروماستیگوت‌ها با استفاده از آزمایش MTT به‌دست آمد که این نتایج نشان داد بیشترین درصد زنده بودن پروماستیگوت‌ها مربوط به غلظت ۱۰ درصد از اسانس دارو در ۲۴ ساعت پس از کشت بود (جدول ۲).

بر اساس واکاوی آماری انجام شده تعداد پروماستیگوت‌ها در حضور غلظت‌های مختلف

جوشانده چای سیاه در هر سه زمان شمارش شده در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معناداری بود (p<۰/۰۵). بر اساس نتایج آزمایش MTT درصد زنده بودن تعداد پروماستیگوت‌ها در همه غلظت‌ها با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵).

جدول ۱- تعداد پروماستیگوت‌های انگل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اضافه کردن غلظت‌های جوشانده چای سیاه

غلظتهای جوشانده چای سیاه	تعداد انگل ۲۴ ساعت پس از کشت	تعداد انگل ۴۸ ساعت پس از کشت	تعداد انگل ۷۲ ساعت پس از کشت
*٪۱۰	۱۱۱۳۳۳۳	۷٦۰۰۰۰	٦٥۰۰۰۰
*٪۲۰	۹۸٦٦٦٦/٦	٦۷۳۳٦۳/۳	٤۹٥۳۳۳/۳
*٪۳۰	٤٥۳۳۳۳/۳	۲٥۳۳٤۳/۳	۱۷۳۳۳۳/۳
*٪٤۰	۲۰۰٤۰۰	۱۰۸۰۰۰	٦٦۹٦
کنترل	۱۲٤۰۰۰۰	۱۳۸٦٦٦۷	۱٥۲۰۰۰۰

*اختلاف بین گروه مورد آزمایش و گروه کنترل معنی دار است (p<۰/۰۵)

جدول ۲- درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های انگل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اضافه کردن غلظت‌های جوشانده چای سیاه

غلظتهای جوشانده چای سیاه	درصد زنده بودن انگل ۲۴ ساعت پس از کشت	درصد زنده بودن انگل ۴۸ ساعت پس از کشت	درصد زنده بودن انگل ۷۲ ساعت پس از کشت
*٪۱۰	۸٤/٦	۸۲	۷٥
*٪۲۰	۸۱/۳	۷٥/٦	٦۹/۳
*٪۳۰	٦۳/۳	٥۹/۳	٥۳/٦
*٪٤۰	۳۹/٦	۲٤/٦	۱۳/٦

*اختلاف بین گروه مورد آزمایش و گروه کنترل معنی دار است (p<۰/۰۵)

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر جوشانده چای سیاه میزان تکثیر و مدت زمان بقای انگل را به‌طور معنی‌داری کاهش داد به‌طوری که، با افزایش غلظت جوشانده میزان این تاثیر نیز افزایش یافت. نتایج مطالعه ما با یافته‌های سایر مطالعات هم‌خوانی دارد. در یک بررسی که روی تاثیر ترکیبات عصاره چای سیاه شامل اسید تانیک، کافئین، تئوفیلین و تئوبرومین بر پروماستیگوت و آماستیگوت‌های *لیشمانیا دنوانی*، *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور* انجام پذیرفت، نشان داده شد که اسید تانیک بیشترین تاثیر کشندگی روی لیشمانیا را دارد (Mahdi *et al*., 2005). در تحقیقی دیگری که جهت بررسی تاثیر عصاره الکلی چای سبز بر پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* انجام پذیرفت، نشان داده شد که این عصاره دارای اثر کشندگی بسیار خوبی بر فرم تاژک‌دار انگل بوده و قادر به ممانعت از رشد آن می‌باشد (Feily *et al*., 2012).

سن و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر ضد لیشمانیایی گیاه *آرتمیسنین ترایگرس* را بر پروماستیگوت‌های *لیشمانیا دونووانی* بررسی کردند و مشاهده نمودند که گیاه آرتمیسنین دارای اثر ضد لیشمانیایی بر پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌های انگل می باشد (Sen

et al., 2007). در مطالعه دیگری یوسفی و همکاران در سال ۲۰۰۹ تاثیر کشندگی گیاهان *پکانوم هارمالا* و *آلکانا تینکتورا* را بر *لیشمانیا ماژور* در شرایط برون‌تنی انجام دادند و دریافتند که هر دو عصاره دارای اثر مهاری بر پروماستیگوت‌ها بودند (Yousefi *et al.*, 2009).

چای سیاه حاوی پلی‌فنل‌هایی مانند فلاوین و تیرابیجین می‌باشد (Łuczaj and Skrzydlewska, 2005). بیشترین خواص سلامت‌بخشی چای به فعالیت قوی آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلیک چای که تحت عنوان کاتچین‌ها شناخته شده‌اند، نسبت داده می‌شود (Zaveri, 2006; Fujiki *et al.*, 2005). کاتچین‌ها دارای ویژگی‌های‌آنتی‌اکسیدانی قوی بوده و این ترکیبات ممکن است از بدن در مقابل آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت نمایند. علاوه بر این، بسیاری از مطالعات نشان‌دهنده فعالیت ضد میکروبی انواع مختلف عصاره‌های چای روی انواع مختلف میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بوده است (Almajano *et al.*, 2008; Manian *et al.*, 2008).

پلی‌فنل‌ها یکی از مهم‌ترین ترکیبات موجود در برگ‌های چای بوده و گفته شده است که پلی‌فنل‌های گیاهی یا تانن‌ها از طریق اتواکسیداسیون و تولید پراکسیدهیدروژن، اثر مهاری خود را روی رشد یاخته، از جمله یاخته‌های میکروبی اعمال می‌کنند (Nakahara *et al.*, 1993). برگ‌های سبز و تازه چای غنی از فلاونول‌های مونومریک می‌باشند که در این میان کاتچین‌ها و اپی‌گالوکاتچین‌گالات‌ها به‌عنوان فراوان‌ترین کاتچین‌های چای سبز شناخته شده‌اند. تفاوت در انواع چای به دلیل تفاوت در فرآوری آنها می‌باشد . چای سبز از برگ‌های تخمیر نیافته، چای اوولانگ از برگ‌هایی که تخمیر نسبی (نیمه تخمیری) داشته‌اند و چای سیاه از برگ‌های تخمیر یافته به‌دست می‌آید. برگ‌های تخمیر شده حاوی پلی‌فنل‌های کمتر و کافئین بیشتری می‌باشند و به همین دلیل چای سبز دارای بالاترین محتوای پلی‌فنلی بوده و محتوای کافئین در چای سیاه دو تا سه برابر چای سبز می‌باشد (Sasaki *et al.*, 2003).

یکی از مکانیزیم‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی که مهم‌ترین فعالیت کاتچین‌های چای نیز می‌باشد، از بین بردن رادیکال‌های آزاد و در نتیجه مهار فرایند اکسیداسیون می‌باشد. همچنین، این مکانیزیم توجیهی برای فعالیت ضدمیکروبی کاتچین‌ها در سلول‌ها و غشاهای سلولی به شمار می‌آید (Almajano *et al.*, 2008).

در بررسی تاثیر یک فرآورده دارویی بایستی عوامل بسیاری از جمله موثر بودن دارو بر مرحله عفونت‌زای ارگانیسم را مد نظر قرار داد که در مورد انگل لیشمانیا فرم عفونت‌زای انگل، اشکال بدون تاژک داخل سلولی یعنی آماستیگوت می‌باشد. بنابراین، یکی از مهم‌ترین ایرادات این مطالعه و بسیاری از بررسی‌های صورت گرفته، ارزیابی تاثیر دارو بر پروماستیگوت‌های انگل که فرم موجود در بدن پشه است، می باشد که علت آن نیز سهولت برقراری کشت این مرحله از انگل در شرایط برون‌تنی است. در هر صورت، مطالعه حاضر نشان داد که جوشانده چای سیاه به خوبی قادر به مهار الگوی طبیعی رشد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا بوده و با مکانیسمی نامشخص روند تکثیری آن را مختل می‌کند. بررسی شاخصه‌های مورفولوژیکی انگل‌ها نشان‌دهنده

توانایی آلکالوئیدهای موثره گیاه در تخریب ارگانیسم‌ها و بیانگر دارا بودن عوامل غیرفعال‌کننده ساختار انگل می‌باشد.

در مجموع می‌توان بیان نمود که جوشانده چای سیاه که فرم فرآوری شده چای بوده و در عین حال ساده‌ترین حالت تهیه عصاره گیاه می‌باشد، تاثیر بسیار مناسبی بر فرم تاژکدار انگل داشته و با توجه به این تاثیر پیشنهاد می‌شود که بخش‌های مختلف این گیاه تفکیک گردیده و ترکیبات فعال آن شناسایی شده و مطالعات گسترده‌تری جهت ارزیابی تاثیر این آلکالوئیدها بر فرم عفونت‌زای انگل در شرایط درون تنی و برون تنی انجام پذیرد.

سپاسگزاری

نگارندگان کمال تشکر را از همکاران بخش‌های مختلف موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج ابراز می‌دارند.

منابع

- احمدنیا، ه.، قطبی، م. و رحیمی، ف. (۱۳۹۱). راهنمای جامع نظام مراقبت بیماری‌های واگیر برای پزشک خانواده.، اندیشمند.
- جعفری، ف.، نیلفروش زاده، م.ع.، توکلی، ن.، ذوالفقاری، ب. و شهبازی، ف. (۱۳۹۱). اثر ژل موضعی بومادران همراه با تزریق داخل ضایعه گلوکانتیم در درمان لیشمانیوز جلدی حاد نوع روستایی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان، دوره ۲۹ ،شماره ۱۷۳.
- Almajanoa, M.P., Carbóa, R., López Jiménezb, J.A. and Gordon, M.H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. Food Chemistry, 108(1): 55-63.
- Alvar, J., D.Ve´lez, I., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., *et al*. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Plos One, 7(5): p.e35671.
- Bisset, N.J. (1994). Herbal drugs and phytopharmaceuticals. London and Tokyo: Medpharm, Stuttgart and CRC, Bota Raton, Ann Arbor, pp: 566.
- Castelli, G., Galante, A., Lo Verde, V., Migliazzo, A., Reale, S., Lupo, T., *et al*. (2014). Evaluation of Two Modified Culture Media for Leishmania infantum Cultivation Versus Different Culture Media. The Journal of parasitology, 100(2): 228-230.
- Cox, F.E.G. (2002). History of human parasitology. Clinical microbiology reviews, 15(4): 595-612.

- Feily, A., Saki, J., Maraghi, S., Moosavi, Z., Khademvatan, S. and Siahpoosh, A. (2012). In vitro activity of green tea extract against *Leishmania major* promastigotes. International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology, 50(3): 233-236.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Matsuyama, S. and Miyazaki, K. (2005). Cancer prevention with green tea polyphenols for the general population, and for patients following cancer treatment. Current Cancer Therapy Reviews, 1(1): 109-114.
- Kayser, O., Kiderlen, A.F. and Croft, S.L. (2002). Natural products as potential antiparasitic drugs. Studies in Natural Products Chemistry, 26: 779-848.
- Łuczaj, W. and Skrzydlewska, E. (2005). Antioxidative properties of black tea. Preventive Medicine, 40(6): 910-918.
- Mahdi, H., Al-Bashir, N., Saour, K. and Mahdi, L. (2005). In vitro antileishmanial effects of black tea extract components. Jordan Journal of Applied Science, 7(2): 38-50.
- Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, P. and Manian, S. (2008). The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of Camellia sinensis (L.) O. Kuntz, Ficus bengalensis L. and Ficus racemosa L. Food Chemistry, 107(3): 1000-1007.
- Nakahara, K., Kawabata, S., Ono, H., Ogura, K., Tanaka, T., Ooshima, T., *et al.* (1993). Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glycosyltransferases of mutans Streptococci. Applied and Environmental Microbiology, 59(4): 968-973.
- Nasiri, V., Karimi, G., Dalimi, A., Paykari, H. and Ghaffarifar, F. (2013). Effects of sheep and mouse urine on the growth pattern of *leishmania major* promastigotes. BioMed Research International, Article ID 748592,doi:10.1155/2013/748592.
- Sasaki, H., Matsumoto, M., Tanaka, T., Maeda, M., Nakai, M., Hamada, S., *et al.* (2004). Antibacterial activity of polyphenol components in oolong tea extract against Streptococcus mutans. Caries Research, 38(1): 2-8.
- Sen, R., Bandyopadhyay, S., Dutta, A., Mandal, G., Ganguly, S., Saha, P., *et al*. (2007). Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in Leishmania donovani promastigotes. Journal of Medical Microbiology, 56(9): 1213-1218.
- World Health Organization (2010). Control of the leishmaniases. World Health Organ Technical Report Series, 949: 186.
- World Health Organization (2014). Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region, Available at: http://apps.who.int//iris/handle/10665/120002.

- Yousefi, R., Ghaffarifar, F. and Dalimi Asl, A.D. (2009). The Effect of Alkanna tincturia and Peganum harmala Extracts on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro. Iranian Journal of Parasitology, 4(1): 40-47.
- Zaveri, N.T. (2006). Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. Life Sciences, 78: 2073-2080.