# تاثیر غلظت های مختلف عصاره گیاه Hedera helix و گلوکانتیم بر عامل لیشمانیوز احشایی در in vitro

دکتر صفرعلی طالاری *، مهندس عباس درودگر *
جواد ازوجی **

**خلاصه**

**سابقه و هدف:** با توجه به شیوع لیشمانیوز احشائی و مقاومت عامل آن نسبت به داروهای سنتتیک متعارف و نیز عوامل آنها، این پژوهش به منظور تعیین تاثیر غلظت های مختلف گلوکانتیم وعصاره گیاه Hedera helix (عشقه) بر پروماستیگوتهای Leishmania infantum انجام گرفت.

**مواد و روشها:** تحقیق به روش تجربی بر روی ۲۱۰۰۰۰ پروماستیگوت L.infantum با کد (MHOM/SI/68/ER.L1) تایید شده سازمان بهداشت جهانی ، گلوکانتیم (Specia ، فرانسه) و گیاه H.helix تهیه شده از اداره امور دام و منابع طبیعی اصفهان صورت پذیرفت . در این مطالعه در تعداد ۱۴ ردیف ده‌تایی لوله های محتوی محیط کشت لیشمن (N.N.N) تعداد ۱۵۰۰ پروماستیگوت کشت داده شد ، در ۶ ردیف ده تایی آن از غلظت های ۱۰۰ ، ۵۰ ، ۲۵ ، ۱۰ ، ۵ ، ۱ میلی گرم در میلی لیتر گلوکانتیم ، ۶ ردیف ده تایی دیگر غلظتهای مشابه هیدراهلیکس و در ۲ ردیف ده تایی باقیمانده (گروه شاهد ) فقط سرم فیزیولوژی اضافه شد . تمام لوله ها را در حرارت ۲۶ درجه سانتی گراد قرار گرفته و هر روز به مدت ۱۰ روز با لام نئوبار تعداد انگل های زنده شمارش و ثبت گردید .

**یافته ها:** تحقیق نشان داد که در تمام لوله های شاهد طی روزهای مطالعه انگلها زنده بودند اما درصد انگلهای زنده و زمان زنده بودن آنها در غلظت های مختلف گلوکانتیم متفاوت بود .به گونه‌ای که غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی‌لیتر آن پس از یک روز فقط ۲/۵ درصد آنها را از بین برد و در غلظت های ۲۵ میلی گرم عصاره گیاه عشقه پس از یک روز کلیه انگلها از بین رفتند. در این مطالعه غلظت های مختلف گیاه عشقه نسبت به غلظت های مشابه گلوکانتیم اثر کشندگی بیشتری بر روی انگلها داشت و این اختلاف از نظر آماری معنی داربود ($P<0/05$) .

**نتیجه گیری:** با توجه به مؤثر بودن عصاره گیاه H. helix نسبت به گلوکانتیم بر روی عامل لیشمانیوز احشایی در in vitro و عوارض داروهای سنتتیک ، توصیه می شود که ساپونین های مختلف گیاه جدا و ماده مؤثر در غلظت‌های مختلف آن تعیین گردد و پس از تأئید تاثیر آن بر لیشمانیوز احشایی در حیوانات حساس آزمایشگاهی و نداشتن عوارض جانبی در درمان لیشمانیوز احشایی مورد استفاده قرار گیرد .

واژگان **کلیدی:** لیشمانیوز احشایی ، Hedera helix ، گلوکانتیم

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی کاشان ، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی
** پزشک عمومی

## مقدمه

لیشمانیوز احشایی یکی از بیماریهای عفونی انگلی است که توسط گونه های مختلف لیشمانیا ایجاد می شود (۱). این بیماری در ایران از نوع مدیترانه ای با عامل Leishmania infantum است که در مناطقی از استانهای فارس ، اردبیل ، خوزستان و بوشهر به طور آندمیک و در سایر نقاط کشور بطور اسپورادیک با اشکال بالینی متفاوت بروز می کند و در حال حاضر برای درمان بیماری از داروهای مختلفی استفاده می‌شود که مهمترین آنها گلوکانتیم است (۲). عدم درمان به موقع موجب مرگ و میر حدود ۹۰ تا ۹۵ درصد می‌شود (۱). گاهی اوقات انگل نسبت به درمان دارویی پاسخ مناسبی نمی دهد و نیاز به تزریقات مکرر دارد از طرفی عوارض کبدی ، کلیوی و قلبی ناشی از مصرف داروها نیز مطرح است (۳). بنابراین یکی از راههای متصور ، استفاده از داروهای گیاهی تیره Araliacea مثل Congronema latifo، Picralima nitida و Hedera helix می‌باشد. در قرن اول میلادی جوشانده برگهای Hedera helix برای رفع اسهال خونی ، سردرد ، زردی ، تنظیم قاعدگی در زنان جوان و در درمانهای موضعی گال ، کچلی سر و زگیل استفاده می‌شد ( ۵ ، ۴ ) . اولین بار در سال ۱۹۹۱ Majester و همکارانش در فرانسه تاثیر گیاه H. helix (عشقه ) را بر عامل لیشمانیوز احشایی مطالعه کردند (۶) . با توجه به اینکه H. helix در مناطق مختلف بطور ساپروفیت می‌روید و احتمالا" مواد موثره و ساپونین های مختلفی دارد و در کشور ایران گزارش منتشر شده ای مشاهده نگردیده و از طرفی تنوع در گونه های لیشمانیا و در نهایت استفاده ایران پزشکان ایرانی از گلوکانتیم جهت درمان بیماری ، این بررسی به منظور تعیین اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه H. helix در مقایسه با اثرات گلوکانتیم به روش in vitro بر گونه L.infantum در آزمایشگاه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی کاشان‌در سال ۱۳۷۵ انجام گردید تا در صورتی که اثرات آن قابل قبول باشد، ساپونین‌های مختلف آن استخراج سپس اثر ساپونین‌ها مشخص گردد و پس از تاثیر بر لیشمانیوز احشایی ایجاد شده در حیوانات حساس آزمایشگاهی در صورت مثبت بودن و نداشتن عوارض جانبی آن پایه‌ای بر یافتن درمان لیشمانیوز احشایی قرار گیرد .

## مواد و روشها

تحقیق به روش تجربی روی انگل L.infantum با کد (MHOM/SI/68/ERL1) تائید شده سازمان بهداشت جهانی از انستیتو تحقیقاتی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران تهیه گردید و در محیط کشت N.N.N بطور استریل پاساژ داده و در حرارت ۲۶ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا پروماستیگوتهای موردنیاز جهت مطالعه بدست آید .

برگ گیاه Hedera helix (عشقه) را از اداره منابع طبیعی و امور دام استان اصفهان تهیه و با آب کاملا" شسته، سپس در سایه خشک گردید. آنگاه مقدار ۵۰ گرم آن در ۳۰۰ سانتی‌متر مکعب متانول ۸۰ درصد ( حلال ) حل شد. برای جلوگیری از تبخیر حلال سر ارلن را با چوب پنبه بسته و برای مدت ۴ تا ۵

ساعت روی دستگاه تکان دهنده قرار داده و آن را دور از نور به مدت ۴۸ ساعت در حرارت اتاق قرار داده تا عمل استخراج کامل گردد ، سپس با استفاده از کاغذ واتمن ، قیف بوخنر و پمپ خلا عصاره گیاه جدا و ازعصاره بدست آمده غلظت ۱۰۰ ، ۵۰، ۲۵ ، ۱۰، ۵ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر تهیه شد .

آمپول گلوکانتیم (Specia ، فرانسه) با غلظت ۰/۵ گرم در سانتیمتر مکعب خریداری و غلظت‌های ۱۰۰ ، ۵۰ ، ۲۵ ، ۱۰ ، ۵ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر از آن تهیه گردید .

در این پژوهش غلظت‌های مختلف عصاره گیاه هیدراهلیکس و گلوکانتیم بر پروماستیگوت های لیشمانیوز احشایی در شرایط یکسان از نظر محیط کشت ، تعداد انگل ، غلظت‌های مختلف عصاره گیاه و گلوکانتیم ، درجه حرارت ، لام شمارش انگل و میکروسکوپ بررسی شد . در ۱۴ ردیف ده تایی لوله‌های محتوی محیط کشت لیشمن (N.N.N) به طریقه استریل در کنار شعله تعداد ۱۵۰۰ پروماستیگوت کشت داده و در ۶ ردیف ده تایی آن به ترتیب در هر لوله یک سانتی متر مکعب سرم فیزیولوژی محتوی غلظت‌های مختلف ۱۰۰ ، ۵۰، ۲۵، ۱۰ ، ۵ و ۱ میلی گرم در سانتیمتر مکعب از عصاره گیاه هیدراهلیکس اضافه کرده و در ۶ ردیف ده تایی دیگر در هر لوله یک سانتی متر مکعب سرم فیزیولوژی محتوی غلظت های مختلف ۱۰۰ ، ۵۰، ۲۵، ۱۰، ۵ و ۱ میلی گرم در سانتی متر مکعب از گلوکانتیم و در دو ردیف ده تایی باقیمانده در هر لوله یک سانتی متر مکعب سرم فیزیولوژی (گروه شاهد ) افزوده گردید .

کلیه لوله های محیط کشت شاهد و مورد را درحرارت ۲۶ درجه سانتی گراد قرارداده و هر روز به مدت ۱۰ روز نمونه‌ها بررسی و تعداد انگلهای زنده را با لام نئوبار باکمک میکروسکوپ شمارش و نتایج حاصل در فرمهای اطلاعاتی ثبت شد . داده های فرم اطلاعاتی طبقه‌بندی و با آزمونهای آماری $\chi^2$ و دقیق فیشر قضاوت آماری گردید .

## یافته ها

تحقیق نشان داد که پروماستیگوت های L.infantum در تمام لوله های محتوی سرم فیزیولوژی (گروه شاهد ) در روزهای مورد مطالعه کاهش پیدا نکردند . در حالیکه غلظت های مختلف گلوکانتیم در زمانهای مختلف نتایج متفاوتی داشت (جدول ۱) ، به گونه‌ای که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در سانتی متر مکعب گلوکانتیم‌روز اول ۲/۵ درصد ، روز دوم ۷۶ درصد ، روز سوم ۷۸/۷ درصد و در روز چهارم کلیه انگلها از بین رفتند و این اختلاف کاهش طی روزهای مختلف درمقایسه باگروه شاهد از نظر آماری معنی دار بود ($P<0/05$) .

جدول ۱ـ توزیع پروماستیگوت های L.infantum در غلظت های مختلف گلوکانتیم طی روزهای مختلف در دانشگاه علوم پزشکی کاشان سال ۱۳۷۵ .

| روز / نتیجه / غلظت mg/cm-3 | اول | | | دوم | | | سوم | | | چهارم | | | پنجم | | | ششم | | | هفتم | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | زنده | مرده | جمع | زنده | مرده | جمع | زنده | مرده | جمع | زنده | مرده | جمع | زنده | مرده | جمع | زنده | مرده | جمع | زنده | مرده | جمع |
| ۱۰۰ | ۹۵۰ (۶۳/۳) | ۵۵۰ (۳۶/۷) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۳۶۲ (۲۴) | ۱۱۳۸ (۷۶) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۱۷۰ (۱۱/۳) | ۱۳۳۰ (۸۸/۷) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۵۰ | ۱۴۶۲ (۹۷/۵) | ۳۸ (۲/۵) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۵۱۲ (۳۴) | ۹۸۸ (۶۶) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۳۲۰ (۲۱/۳) | ۱۱۸۰ (۷۸/۷) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۲۵ | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ (۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۱۰۷۷ (۷۱/۸) | ۴۲۳ (۲۸/۲) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۷۶۲ (۵۰/۸) | ۷۳۸ (۴۹/۲) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۳۰۶ (۲۰/۴) | ۱۱۹۴ (۷۹/۶) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۰ | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ (۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ (۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۱۱۲۵ (۷۵) | ۳۷۵ (۲۵) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۷۵۰ (۵۰) | ۷۵۰ (۵۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۲۲۵ (۱۵) | ۱۲۷۵ (۸۵) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۵ | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ (۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ (۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ | ۱۵۰۰ | ۹۶۲ (۶۴) | ۵۳۸ (۳۶) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۵۱۸ (۳۴/۵) | ۹۸۲ (۶۵/۵) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۱۵۰ (۱۰) | ۱۳۵۰ (۹۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱ | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ (۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ (۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۱۱۱۲ (۷۴) | ۳۸۸ (۲۶) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۶۶۸ (۴۴/۵) | ۸۳۲ (۵۵/۵) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۳۰۰ (۲۰) | ۱۲۰۰ (۸۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۷۵ (۵) | ۱۴۲۵ (۹۵) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) |

تاثیر غلظت ۲۵میلی گرم در سانتی‌متر مکعب عصاره H.helix بر روی پروماستیگوتها پس از یک روز موجب از بین رفتن کلیه انگلها شد ، نتایج نشان داد که تاثیر غلظت های مختلف عصاره گیاه در زمانهای مختلف ،تفاوت است (جدول ۲ ) . و این اختلاف کاهش رشد پروماستیگوت ها در روزهای مورد مطالعه در مقایسه باگروه شاهد از نظر آماری معنی دار بود ($P<0/05$)

جدول ۲ـ توزیع پروماستیگوت های L.infantum در غلظت های مختلف H.helix در روزهای مختلف ، دانشگاه علوم پزشکی کاشان طی سال ۱۳۷۵

| روز / نتایج / غلظت | اول | | | دوم | | | سوم | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | زنده | مرده | جمع | زنده | مرده | جمع | زنده | مرده | جمع |
| ۱۰۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۵۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۲۵ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۰ | ۳۴۵ (۲۳) | ۱۱۵۵ (۷۷) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۵ | ۳۶۲ (۲۴) | ۱۱۳۸ (۷۶) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۱۷۰ (۱۱/۳) | ۱۳۳۰ (۸۸/۷) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱ | ۳۷۵ (۲۵) | ۱۱۲۵ (۷۵) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۲۱۹ (۱۴/۶) | ۱۲۸۱ (۸۵/۴) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۱۵۰ (۱۰) | ۱۳۵۰ (۹۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) |

از آنجایی که گلوکانتیم با دوز ۵۰ میلی گرم برای هر کیلو وزن بدن بیماران تجویز می‌شود (۲). بنابراین در این مطالعه تاثیر غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر گلوکانتیم را با ۲۵ میلی‌گرم عصاره H.helix پس از یک روز مقایسه گردید ( جدول ۳). نتایج نشان داد که اثر عصاره هیدراهلیکس بر روی پروماستیگوتها بیشتر از گلوکانتیم است و این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ( $P<0/05$ ).

جدول ۳ـ توزیع پروماستیگوتهای L.infantum در غلظتهای ۵۰ میلی‌گرم گلوکانتیم و ۲۵ میلی‌گرم هیدراهلیکس ، دانشگاه علوم پزشکی کاشان طی سال ۱۳۷۵

| نتیجه / دارو | زنده | مرده | جمع |
|---|---|---|---|
| گلوکانتیم | ۱۴۶۰ (۹۷/۳) | ۴۰ (۲/۷) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) |
| هیدراهلیکس | ۰ (۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) | ۱۵۰۰ (۱۰۰) |

## بحث

تحقیق نشان داد که تاثیر غلظتهای گلوکانتیم بر پـروماستیگوتهای L.infantum در غـلظتهای ۱۰۰ و ۵۰ mg/ml پس از چهار روز ، ۲۵ mg/ml پس از پنج روز ، ۱۰ و ۵ mg/ml پس از شش روز و ۱ mg/ml پس از هـــفت روز مـــوجب از بـــین رفـــتن کـــلیه پروماستیگوتهای زنده داخل محیط کشت شد و ایـن اختلاف از نظر آماری معنی دار بود (P<۰/۰۵ ). در سال ۱۹۹۴ ، Laguna و همکارانش در واشنگتن اثر سه داروی گلوکانتیم ، پنتامیدین و آلوپـورینول را بـر عامل لیشمانیوز جلدی و احشایی مطالعه کردند که اثر درمانی گلوکانتیم نسبت به دو داروی دیگر بیشتر بوده است (۳).

در این پژوهش ، تاثیر غلظتهای مختلف عصاره گیاه H. helix بر پروماستیگوتهای L.infantum متفاوت بود . به گونه‌ای که غلظتهای ۱۰۰ ، ۵۰ و ۲۵ mg/ml آن پس از یک روز ، ۱۰ mg/ml پس از دو روز ، ۵ mg/ml پس از سه روز و ۱ mg/ml پس از چهار روز موجب از بین رفتن کامل پروماستیگوتهای زنده گردید و ایـــن اخـــتلاف از نـــظر آمـــاری مـــعنی دار بـــود (P<۰/۰۵). در سال ۱۹۹۱ میلادی آقای Maurice در نیجریه در مورد تاثیر گیاهان سنتی بر روی فعالیت لیشمانیوز احشایی نشان داد که غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی لیتر عصاره گیاه گانگر و نماتیفولیا موجب از بین رفتن کامل پروماستیگوتها می‌شود(۷). این گیاه و گیاه هیدراهلیکس هر دو از یک خانواده می‌باشند.

بررسی نشان داد که تـاثیر عـصاره بـرگ گـیاه H.helix و گلوکانتیم بر پروماستیگوتهای L.infantum نتایج متفاوتی دارد که شاید مربوط به سـاپونین هـای مختلف گیاه عشقه باشد. به طوری که در مـحیط‌های محتوی هیدراهلیکس درصد پـروماستیگوتهای زنـده کمتر از محیط‌های مـحتوی گـلوکانتیم در غـلظتهای مشابه در طی زمان یکسان بوده است. همچنین مشاهده شد که در غلظتهای مختلف H. helix در روز چـهارم هـیچگونه پـروماستیگوت زنـده L.infantum وجـود نداشت . در صورتی که در غلظتهای مختلف گلوکانتیم درصدی از پروماستیگوتها تا روز هفتم در مقایسه بـا گروه شاهد زنده بودند که می‌توان چنین بـیان کـرد ، شاید ماده موثر بر انگل در گیاه عشقه بیشتر از گلوکانتیم در غلظتهای مشابه باشد. در حالی که اثر H. helix بـر L.infantum نسبت به اثر گلوکانتیم در غلظتهای مشابه کمتر و در زمان کوتاهتری بود و این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ( P<۰/۰۵).

سال ۱۹۹۱ Majester و همکارانش در فرانسه عصاره گیاه H.helix را با گلوکانتیم بر پروماستیگوتهای L.infantum بدون در نظر گرفتن غلظتهای مختلف آنها مورد مطالعه قرار داده و اعلام کردند که عصاره گـیاه H.helix بر پروماستیگوتهای فوق موثرتر از گلوکانتیم می‌باشد (٦).

با توجه به مطالب فوق اثر گلوکانتیم نسبت بـه داروهای دیگـر مـورد بـررسی بـیشتر ولی نسبت بـه هیدراهلیکس کمتر می‌باشد. مقایسه غلظتهای گلوکانتیم و عصاره گیاه فوق در این بررسی نشان داد که نـتایج حـــاصل مشـابه تـحقیقات Majester بـر روی عـامل لیشمانیوز احشایی بوده است . بـا تـوجه بـه عـوارض داروی گـلوکانتیم و زیـانهای اقـتصادی و نـیز مـیزان

موفقیت چشمگیر H.helix توصیه می‌گردد که با استخراج ساپونین های مختلف گیاه مشخص گردد که کدام ماده موثر بر انگل در آن وجود داشته است و مقدار ماده موثر بر انگل چقدر است و تاثیر ماده موثر در غلظتهای مشابه گیاه عشقه در مقایسه با گلوکانتیم چگونه است . سپس با استفاده از ساپونین جدا شده از عصاره گیاه H. helix به جای داروی گلوکانتیم، لیشمانیوز احشائی ایجاد شده در حیوانات حساس آزمایشگاهی درمان گردد . و در صورت موثر بودن و نداشتن عوارض جانبی با توجه به در دسترس بودن و صرفه اقتصادی آن انتظار می‌رود در درمان لیشمانیوز احشائی بجای گلوکانتیم مورد استفاده قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

۱ ـ بدینوسیله از زحمات آقای دکتر محب علی برای تهیه سوش انگل و آقای راستی بواسطه تهیه گیاه H.helix تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

۲ ـ از کلیه همکاران گروه انگل شناسی که بنحوی در انجام این تحقیق همکاری داشتند ، قدردانی می‌شود.

## References:

۱ ـ طالاری ص . تعیین سوشهای لیشمانیا به روش آنالیز ایزوآنزیمها در مبتلایان به لیشمانیوز جلدی در اصفهان. پایان‌نامه PhD انگل شناسی. اصفهان : دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ؛ ۱۳۷۳.

۲ ـ حجاران ه. ادریسیان غ . کاربرد و ارزشیابی تست آگلوتیناسیون مستقیم در تشخیص کالاآزار و مقایسه آن با در تست IFA ایران . سمینار لیشمانیوز در ایران . دانشکده علوم پزشکی دانشگاه امام حسین (ع) . تهران : اول و دوم دیماه ۱۳۷۰ .

3. Laguna F., Jackson JA., Assesment of Allopurinol Pluse Meglumine, in: The Treatment of Visceral Leishmaniasis Patients Infected with HIV., J Infect. 1994; 28:255-259.

۴ ـ زرگری ع . گیاهان دارویی. تهران : انتشارت دانشگاه تهران ، چاپ سوم .جلد اول ؛ ۱۳۶۰ : .

۵ ـ جاویدان نژاد ص. حاجی‌بابایی م . اطلاعات داروی بالینی (داروهای ژنریک ایران) چاپ ششم. تهران : انتشارات دانشگاه تهران ؛ ۱۳۷۰ .

6. Majester B., Saponins of the IVY Plant, Hedera helix, and Their Leishmaniasis Activity., Planta Med., 1991; 57: 260-262.

7. Maurice M., Jackson JA., Evaluation of Plant Extracts for Anti-leishmanial Activity Using a Mechanism Based Radiorespirometric Microtechniqe (RAM). Planta Med., 1992; 58: 190-193.