

تأثیر عصاره گیاه اکیناسه آ پورپورا بر لیشمانیوز

جلدی در موش‌های آلوده به لیشمانیا ماژور

چکیده:

مقدمه و هدف: لیشمانیوز به وسیله انگل‌های تک یاخته‌ای داخل سلولی از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. این بیماری در برخی مناطق ایران به صورت آندمیک مشاهده می‌شود. گیاه اکیناسه آ پورپورا یکی از گیاهان دارویی است که دارای خاصیت تقویت کننده‌گی ایمنی و قدرت دفاعی بدن می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثر تجویز خوراکی عصاره گیاه اکیناسه آ پورپورا بر بهبود زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در موش آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد، تعداد ۱۸ سر موش کوچک آزمایشگاهی به صورت تصادفی به سه گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه اول به مدت ۲ هفته عصاره هیدروالکی گیاه اکیناسه آ پورپورا (۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) دریافت نموده سپس به انگل لیشمانیا ماژور آلوده شدند. گروه دوم ابتدا با انگل آلوده شده و پس از ایجاد زخم، به مدت ۲ هفته عصاره گیاه را دریافت نمودند. گروه سوم به عنوان گروه کنترل بدون دریافت عصاره به انگل لیشمانیا آلوده شدند. زخم‌های ایجاد شده ناشی از انگل لیشمانیا در سه ناحیه قاعده دم، پای راست و پای چپ هر موش در فواصل زمانی منظم اندازه‌گیری و ثبت شد و براساس این اندازه‌ها مساحت زخم‌های نواحی ذکر شده محاسبه گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری کروسکال - والیس تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین میانگین اندازه زخم‌ها در گروه‌های اول و دوم با گروه کنترل وجود ندارد ($p > 0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که عصاره الکی گیاه اکیناسه آ پورپورا در غلظت ذکر شده قادر به کنترل رشد انگل لیشمانیا ماژور نمی‌باشد، هم‌چنین مصرف عصاره، قبل از تزریق انگل نیز مانع رشد انگل و ایجاد زخم نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: اکیناسه آ پورپورا، لیشمانیا ماژور، درمان

مریم سادات ساداتی *

بهادر سرکاری **

قاسم عسگری ***

صفورا حاتمی پور ****

الهام توکل ****

* رزیدنت پوست، دانشگاه علوم پزشکی شیراز،

دانشکده پزشکی، بخش پوست

** دکترای ایمونولوژی، دانشیار دانشگاه علوم

پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

و قارچ شناسی

*** کارشناس ارشد انگل شناسی، مربی دانشگاه

علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل

شناسی و قارچ شناسی

**** دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی

یاسوج، کمیته تحقیقات دانشجویی، مرکز تحقیقات

گیاهان دارویی

تاریخ وصول: ۱۳۸۹/۷/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۹/۱۳

مؤلف مسئول: بهادر سرکاری

پست الکترونیک: sarkarib@sums.ac.ir

مقدمه

نه تنها می‌تواند شانس ابتلا به برخی بیماری‌های عفونی واگیر را کاهش دهد، بلکه در کاهش دوره بیماری و شدت علائم نیز بسیار مؤثر است. در راستای تحقق این هدف نقش تعدادی از گیاهان به عنوان محرک سیستم ایمنی در مقیاس آزمایشگاهی و نیز کارآزمایی‌های بالینی مشخص شده است (۶).

یکی از گیاهانی که اثر آن به عنوان تعدیل‌کننده و تقویت‌کننده قدرت دفاعی و ایمنی بدن به اثبات رسیده است گیاه دارویی اکیناسه آ می‌باشد که در ایران به عنوان گل سرخار شناخته می‌شود. اکیناسه آ گیاهی علفی و چندساله از تیره کاسنی با گل‌های مخروطی شکل و ارغوانی رنگ است. از معروف‌ترین گونه‌های این گیاه اکیناسه آ پورپورا است که به خوبی در آب و هوای شمال ایران قابل پرورش است. در مطالعه‌های بالینی و آزمایشگاهی مختلف، متعاقب مصرف فرآورده‌های حاوی اکیناسه آ، افزایش فعالیت فاگوسیتی گرانولوسیت‌های انسانی، افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون، افزایش تعداد و فعالیت لکوسیت‌ها، و به خصوص تولید سیتوکین‌هایی گزارش شده است که این آثار را می‌توان در ایمنی‌زایی این گیاه دخیل دانست (۷-۹).

عصاره الکلی گیاه اکیناسه آ سیستم ایمنی را از طریق فعال‌سازی نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها در نتیجه تولید مدیاتورهای التهابی در مقابله با بیماری‌ها تقویت می‌کند (۱۰). در مطالعه‌های آزمایشگاهی اکیناسه آ تأثیر قابل ملاحظه‌ای روی تعداد سلول‌های سیستم ایمنی (۱۱)، مهاجرت گرانولوسیت‌ها (۱۲ و ۱۳)،

لیشمانیوز به گروهی از بیماری‌ها اطلاق می‌شود که به وسیله انگل‌های تک یاخته‌ای داخل سلولی از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود و از طریق پشه خاکی فلپوتوموس منتقل می‌شوند (۱).

لیشمانیوز جلدی یا سالک در بسیاری از مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیری وجود دارد. تخمین زده می‌شود که حدود ۱۲ میلیون مورد از این بیماری در نقاط مختلف جهان وجود داشته باشد و ۳۵۰ میلیون نفر نیز در معرض ابتلا به بیماری قرار دارند. میزان بروز بیماری در ایران ۲۸ در هر هزار نفر جمعیت می‌باشد (۲).

پاسخ ایمنی بدن در مقابل لیشمانیا از نوع ایمنی سلولی است. انگل درون ماکروفاژها به وسیله ماکروفاژهای فعال شده کشته می‌شود و بهبود به ایمنی سلولی و سایتوکین‌های ترشحی در اوایل بیماری مربوط می‌شود (۳ و ۴).

ترکیبات آنتی موان ۵ ظرفیتی اولین خانواده دارویی هستند که در درمان لیشمانیا به کار گرفته شدند. دارویی که سمیت داشته، نیاز به تزریق مکرر دارد و ممکن است در درمان مؤثر نباشد. به همین خاطر داروهای دیگری نظیر آمفوتریسین و پنتامیدین مورد استفاده قرار گرفته‌اند که سمیت قابل ملاحظه‌ای روی سیستم‌های کلیوی، قلبی، کبد و پانکراس دارند (۵).

تحقیقات نشان دادند که تعدیل و تقویت سیستم ایمنی بدن با روش‌هایی غیر از واکسیناسیون

شده و مقدار ۲۵۰ گرم از پودر به ۱۵۰۰ سی سی الکل ۸۰ درجه اضافه گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت از قرار دادن این مخلوط بر روی دستگاه شیکر ارلن در شرایط تاریکی و دور از گرما در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، مخلوط حاصل را در روز سوم از پارچه تمیز و بدون آهار عبور داده و محلول صاف شده به جا مانده از آن، به یک ارلن منتقل شده و در دمای ۴ درجه نگهداری گردید. سپس تفاله‌های به جا مانده از پالایش مرحله اول مجدداً در الکل ۸۰ در صد خیسانده شد و همانند مرحله قبل به مدت ۲۴ ساعت بر روی دستگاه شیکر ارلن قرار گرفته و سپس مانند مرحله قبل پالایش گردید.

جهت پالایش بهتر محلول‌های نهایی از کاغذ صافی واتمن (شماره یک) استفاده شده که محلول به دست آمده به عنوان ماده اولیه در مرحله عصاره‌گیری مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور عصاره‌گیری مواد حاصل از پالایش پودر گیاه را در بالن مخصوص دستگاه ریخته و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و میزان چرخش ۶۰ دور در دقیقه در شرایط خلاء این عمل انجام پذیرفت. محلول حاصل در این مرحله به تدریج در دستگاه روتاری حلال خود را از دست داده و غلیظتر گردید. در مرحله بعد عصاره به دست آمده در دستگاه آون یافور به مدت ۵ روز در دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس ماده‌ای با ویسکوزیته مناسب حاصل گردید که به ظروف نگهداری درب دار منتقل شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا هنگام آمیزشها نگهداری شد.

فاگوسیتوز ماکروفاژها (۱۴)، سیتوتوکسیسیتی سلول‌های کشنده ذاتی (۱۶ و ۱۵) و تولید سیتوکین‌ها (۱۷، ۱۴ و ۱۱) به همراه داشته است.

استعمال موضعی فرآورده گیاه اکیناسه آ به طور سنتی در تسریع التیام زخم‌ها و ترمیم بافت‌ها کاربرد داشته است که این اثر مربوط به مهار فعالیت آنزیم هیالورونیداز بافتی به وسیله مواد مؤثره این گیاه می‌باشد (۱۸). این گیاه به صورت تجربی در ترمیم زخم، کنترل درد و درمان علایم سرماخوردگی استفاده می‌شود (۱۹). ویژگی‌های مذکور عمدتاً به وجود آلكامیدها، گلیکوپروتئین‌ها، مشتقات کافئیک اسید (پیکوریک اسید) و پلی‌ساکاریدها در این گیاه می‌باشند (۲۰).

این مطالعه با هدف بررسی اثر گیاه اکیناسه آ پورپورا جهت کنترل لیشمانیوز جلدی در موش‌های آلوده به لیشمانیوز ماژور انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۸ در بخش انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد.

گیاه اکیناسه آ از باغ گیاهان دارویی یاسوج جمع‌آوری گردید. گیاه فوق به منظور شناسایی و تشخیص و شماره هر باریوم در مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان کهگیلویه و بویر احمد مورد بررسی قرار گرفت.

ابتدا قسمت‌های هوایی گیاه در سایه خشک گردید، سپس به وسیله آسیاب برقی به پودر تبدیل

تعداد ۱۸ سر موش از نژاد بالبسی^(۱) انتخاب شده و به صورت تصادفی به سه گروه ۶ تایی تقسیم شدند. در موش‌های گروه اول در شروع مطالعه عصاره گیاه اکیناسه آ پورپورا تجویز شد، بدین صورت که عصاره با غلظت نهایی ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به آب مصرفی موش‌ها اضافه شد و با اتمام آب مصرفی در فواصل دو روز در میان به مدت ۵ بار مجدداً این عمل تکرار شد.

یک هفته پس از شروع تجویز عصاره، به گروه اول آماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور از یک گروه موش بالب سی که قبلاً به انگل آلوده شده بودند، تهیه شد و با غلظت نهایی ۵ هزار آماستیگوت در هر میلی‌لیتر به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر جهت آلوده کردن موش‌ها مورد استفاده قرار گرفت و در نواحی قاعده دم، کف پای راست و کف پای چپ موش‌ها تزریق گردید. تجویز عصاره به گروه اول برای بررسی اثر پیشگیرانه گیاه اکیناسه آ پورپورا در جلوگیری از رشد انگل لیثمانیا صورت گرفت.

موش‌های گروه دوم ابتدا با انگل لیثمانیا آلوده شده و پس از ایجاد زخم در آنها، عصاره گیاه اکیناسه آ مانند گروه اول به آنها تجویز گردید. گروه سوم، گروه کنترل بوده که به انگل آلوده شدند، اما عصاره را قبل یا بعد از آلودگی دریافت نکردند.

پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید و در کمیته اخلاق دانشگاه به تصویب رسید.

با شروع تجویز عصاره به گروه دوم اندازه‌گیری زخم قاعده دم، پای راست و چپ موش‌های هر سه گروه به وسیله کولیس ورنیه آغاز شد. این اندازه‌گیری در فواصل دو روز در میان صورت گرفت. در طی تحقیق یک موش از گروه سوم در هفته سوم از تزریق انگل و یک موش از گروه اول در هفته چهارم از تزریق از بین رفتند و از مطالعه خارج شدند.

اندازه‌های زخم‌ها برحسب میلی‌متر ثبت گردید. زخم ناحیه قاعده دم در دو مقطع طولی و عرضی اندازه‌گیری شد و زخم‌های نواحی پای راست و چپ در مقطع عرضی اندازه گرفته شد. براساس فرمول مساحت بیضی، سطح مقطع زخم قاعده دم اندازه‌گیری شد و براساس فرمول مساحت دایره، سطح مقطع زخم نواحی پای راست و چپ تعیین شد.

در هفته هفتم از تزریق انگل از زخم‌های نواحی قاعده دم، پای راست و چپ موش‌ها نمونه‌برداری شده و رنگ‌آمیزی گیمسا برای تعیین وجود انگل در زخم صورت گرفت.

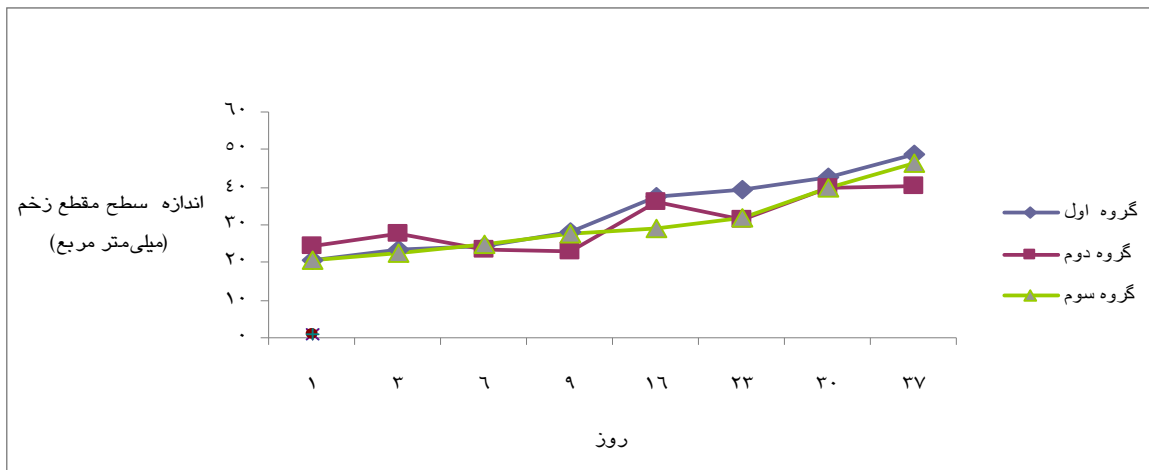
داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS^(۲) و آزمون آماری کروسکال - والیس^(۳) تجزیه و تحلیل شدند.

1-balb/C
2-Statistical Package for Social Sciences
3-Kruskal-Wallis

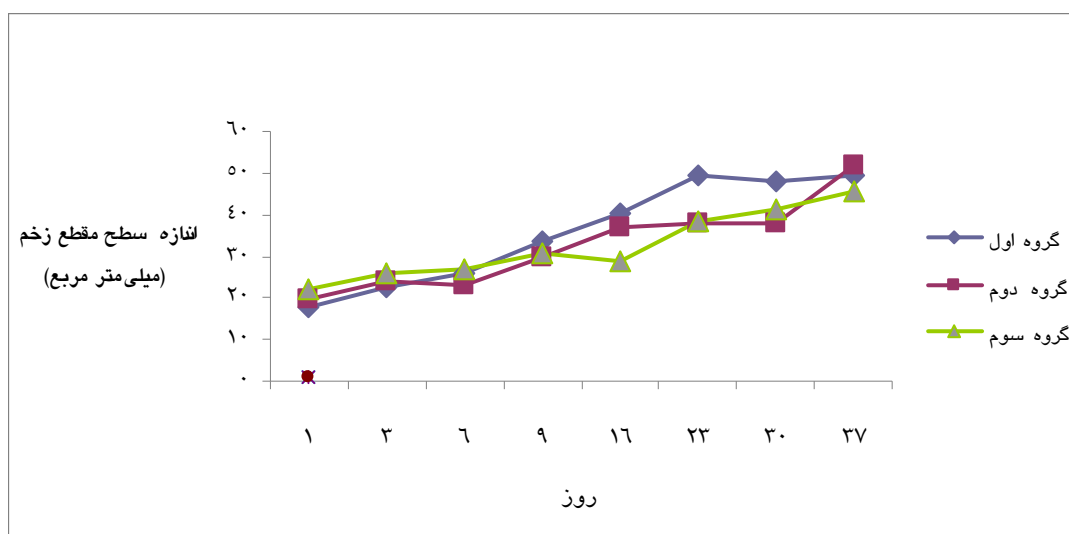
یافته‌ها

ترتیب ۳۰/۶، ۳۵/۳، ۳۲/۶ میلی‌متر و در زخم قاعده دم به ترتیب ۳۰/۳، ۲۹/۳، ۳۲/۹ میلی‌متر مربع به دست آمد و اختلاف قابل توجهی را میان سه گروه موش مورد مطالعه نشان نداد. هم‌چنین نتایج حاصله اختلاف معنی‌داری را در میانگین اندازه زخم‌ها در سه گروه مورد مطالعه نشان نداد ($p > 0.05$).

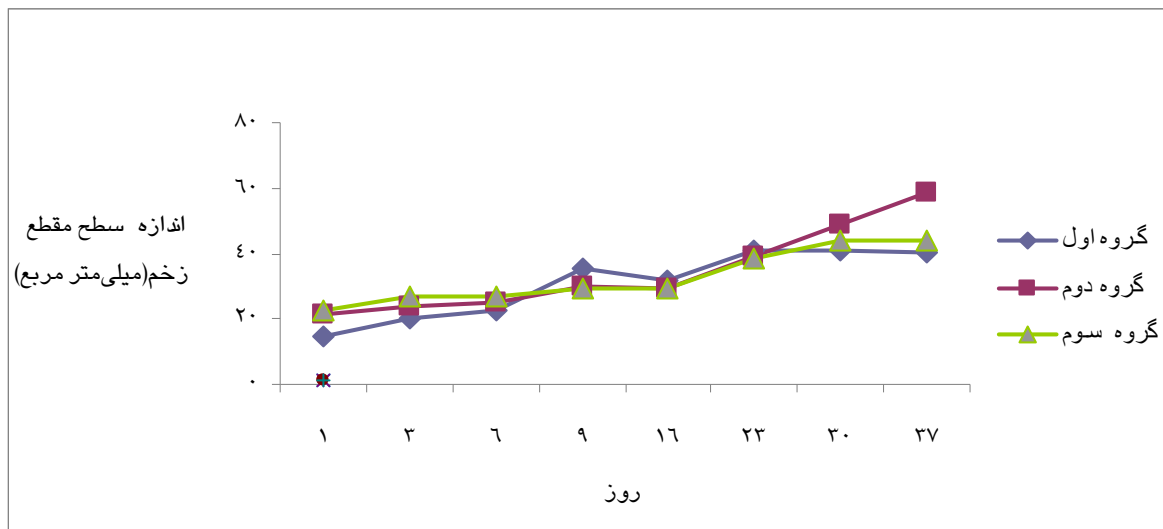
نمودارهای ۱ تا ۳، تغییرات میانگین اندازه زخم‌های ایجاد شده در قاعده دم، پای راست و پای چپ موش‌ها را بر حسب زمان در سه گروه مختلف موش‌ها نشان می‌دهد. میانگین اندازه زخم پای راست در گروه‌های اول، دوم و سوم به ترتیب ۳۵/۵، ۳۲/۸ و ۳۲/۸ میلی‌متر مربع بود. این میانگین در زخم پای چپ به



نمودار ۱: مقایسه تغییرات میانگین اندازه زخم قاعده دم بر حسب زمان در گروه‌های مورد مطالعه



نمودار ۲: مقایسه تغییرات میانگین اندازه زخم پای راست بر حسب زمان در گروه‌های مورد مطالعه



نمودار ۳: مقایسه تغییرات میانگین اندازه زخم پای چپ بر حسب زمان در گروه‌های مورد مطالعه

بحث و نتیجه‌گیری

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری‌های آندمیک در مناطق مختلف ایران می‌باشد. در حال حاضر از ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی‌موان مانند گلوکانتیم جهت درمان این بیماری استفاده می‌گردد که این ترکیب‌ها دارای عوارض جانبی متعددی می‌باشند (۳). بنابراین بررسی در خصوص یافتن داروهای جایگزین در این مورد ضروری به نظر می‌رسد. این مطالعه در همین راستا و با هدف بررسی اثر گیاه اکیناسه آ پورپورا جهت کنترل و درمان لیشمانیوز جلدی در موش‌های آلوده به لیشمانیوز ماژور انجام شد.

جهت یافتن داروی جایگزین، ترکیب‌های مختلفی جهت درمان لیشمانیوز مورد بررسی قرار گرفته است. از گیاه دارچین به صورت خوراکی و داخل صفاقی جهت درمان لیشمانیوز

استفاده شده است که نوع خوراکی آن اندازه ضایعه لیشمانیا را کاهش داده و در تزریق داخل صفاقی ابتدا اندازه زخم افزایش و سپس کاهش یافته است (۲۱).

اثر موضعی عصاره الکلی زرشک روی زخم لیشمانیا نیز مورد بررسی قرار گرفته است که اثر مثبت آن بر اندازه زخم و بار انگلی زخم مشاهده شده است (۲۲). لیمّا و همکاران^(۱) (۲۰۰۹) ترکیب‌های RT-01 از ترکیب ارگانوتلیوریوم را بررسی کرده و نشان دادند که این ترکیب‌ها در درمان لیشمانیوز اثر مشابهی با ترکیبات آنتی‌موان دارند (۲۳).

در مطالعه حاضر پس از بررسی میانگین زخم‌های ایجاد شده در گروه‌های مختلف موش‌ها تفاوت معنی‌داری بین اندازه زخم‌ها

1-Lima et al

مؤثره گیاه در پژوهش‌های آتی پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

از آنجا که هزینه‌های مالی این پژوهش به وسیله معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی یاسوج تأمین گردیده است، لذا مراتب تقدیر و سپاس خویش را اعلام می‌دارد.

در گروه‌های مختلف به دست نیامد و اثربخشی احتمالی گیاه اکیناسه آ پورپورا در درمان لیشمانیوز ثابت نگردید. همچنین اثر پیشگیرانه گیاه اکیناسه آ پورپورا نیز در ایجاد زخم ناشی از انگل لیشمانیا تأیید نگردید. نتیجه به دست آمده ممکن است به علت غیرفعال شدن ماکروفاژها به وسیله عصاره الکی گیاه باشد، چنانچه زهای و همکاران^(۱) (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای عنوان کردند که عصاره الکی گیاه اکیناسه آ به طور واضحی از تولید نیتریک اکسید و $TNF - \alpha$ به وسیله ماکروفاژها جلوگیری می‌کند (۲۴). این در حالی است که تولید نیتریک اکسید به وسیله ماکروفاژها یکی از اصلی‌ترین مکانیسم‌های حذف انگل به وسیله ماکروفاژها می‌باشد (۳ و ۴). علاوه بر این ناکافی بودن دوز گیاه مصرفی می‌تواند علتی برای عدم تأثیر عصاره این گیاه در درمان لیشمانیوز جلدی در موش‌ها باشد و این امکان وجود دارد که مصرف موضعی دوزهای بالاتری از عصاره گیاه و یا طولانی‌تر شدن زمان استفاده از عصاره اثر مثبتی روی زخم لیشمانیا داشته باشد.

با توجه به اهمیت لیشمانیوز و نیازی که کماکان به داروهای جدید در درمان آن وجود دارد، همچنین از آن جا که در این مطالعه تنها عصاره الکی گیاه اکیناسه آ پورپورا مورد استفاده قرار گرفت، مطالعه سایر ترکیب‌های

1-Zhai et al

Effect of Echinacea purpurea on Control of *Leishmania major* Induced Cutaneous Leishmaniasis in Mice

Sadati MS^{*},
Sarkari B^{**},
Asgari Q^{***},
Hatami S^{****},
Tavakl E^{*****}

^{*}Resident of Dermatology, Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

^{**}Associate Professor of Immunology, Department of Parasitology & Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

^{***}Msc of Parasitology, Department of Parasitology & Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

^{****}General Practitioner Student, Student Research Comity, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

Received: 06/10/2010

Accepted: 04/12/2010

Corresponding Author: Sarkari B
Email: sarkarib@sums.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Leishmaniasis is a disease caused by intracellular protozoa parasites of the genus *Leishmania* and is endemic in some areas of Iran. *Echinacea purpurea* is a native plant from North America which is one of the most important medical herbs known with immuno-stimulant properties. This study was performed to determine the effect of alcoholic extract of *Echinacea purpurea* on prophylaxis and treatment of *Leishmania* cutaneous lesions.

Materials & Methods: In this experimental study which was conducted at Shiraz University of Medical Sciences in 2009, eighteen mice were divided into 3 groups. Group one received Echinacea purpurea extract (200 mg/ml) in their water, for 2 weeks before parasite injection, while group two were first injected with parasite amastigotes, followed by administration of *Echinacea purpurea* extract for 2 weeks. Group three was the control group, which received parasites, but not the extract. The size of *Leishmania* lesions in the tail base, right and left foot were measured with vernier caliper. The lesion areas were calculated and the collected data were analyzed with SPSS software.

Results: The mean of lesion size in each group of mice were compared and analyzed. No significant differences in the lesions size were found between the three mice groups. Therefore, *Echinacea purpurea* extract was not effective against *Leishmania major* based on the findings of this study.

Conclusion: Our findings suggest that Echinacea extract is not effective in treatment or prophylaxis of leishmaniasis in mice. Yet, further studies are needed to determine the effects of other extracts of this plant.

Key words: Echinacea purpurea, *Leishmania major*, treatme

REFERENCES:

1. Velayati A. Nelson infectious disease. 5th ed. Iran: Hayan Publication; 1383; 445-50.
2. Edrissian GH. Visceral leishmaniasis in Iran and the role of serological tests in the diagnosis and epidemiological studies. Journal of Kerman University of Medical Sciences 1998; 3(2):97-108.
3. Saebi E. Parasitic diseases in Iran. 2nd ed. Iran: Hayan Publication; 1382; 137-57.
4. Consuelo V, David Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Derm Therapy 2009; 22: 491-502.
5. Sampaio RN, Lucas LC, da Costa Filho AV. The use of azithromycin and N- methyl glucamine for treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis* in C57BL6 mice. An Bras Dermatol 2009; 84: 60-75.
6. Modabber F. Vaccines against leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 1995; 89: 83-8.
7. Taghizadeh M, Jarvandi S, Yasa N. A review on Echinacea. Journal of Medicinal Plants 2004; 4: 2.
8. Steinmuller C, Rosler S, Grottrup E, Franke C, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Polysaccharides isolated from plant cell cultures of Echinacea enhance the resistance of immunosuppressed mice against systemic infections with *Candida albicans* and *Listeria monocytogenes*. Int J Immunopharmacol 1993; 15: 605-14.
9. Fata A, Rakhshandeh H, Berenji F, Jalalifard A. Treatment of cutaneous leishmaniasis in murine model by alcoholic extract of *Berberis vulgaris*. Iranian J Parasitol 2006; 1: 39-42.
10. Awang DVC. Immune stimulants and antiviral botanicals: Echinacea and ginseng. In: Janick J, editor. Perspectives on new crops and new uses. Alexandria, VA: ASHS Press 1999. pp. 450-456.
11. Cundell DR, Matrone MA, Ratajczak P, Pierce JD. Jr The effect of aerial parts of Echinacea on the circulating white cell levels and selected immune functions of the aging male Sprague-Dawley rat. Int Immunopharmacol 2003; 3:1041-8.
12. Roesler J, Steinmuller C, Kiderlen A, Emmendorffer A, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to mice mediates protection against systemic infections with *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans*. Int J Immunopharmacol 1991; 13: 27-37.
13. O'Neill W, McKee S, Clarke AF. Immunological and haematonic consequences of feeding a standardised Echinacea (*Echinacea angustifolia*) extract to healthy horses. Equine Vet J 2002; 34: 222-7.
14. Goel V, Chang C, Slama J, Barton R, Bauer R, Gahler R, Basu T. Echinacea stimulates macrophage function in the lung and spleen of normal rats. J Nutr Biochem 2002; 13: 487-92.
15. Currier NL, Miller SC. Natural killer cells from aging mice treated with extracts from *Echinacea purpurea* are quantitatively and functionally rejuvenated. Exp Geronto 2000; 35: 627-39.
16. Currier NL, Miller SC. *Echinacea purpurea* and melatonin augment natural-killer cells in leukemic mice and prolong life span. J Altern Complement Med 2001; 7: 241-51.
17. Mishima S, Saito K, Maruyama H, Inoue M, Yamashita T, Ishida T, Gu Y. Antioxidant and immune-enhancing effects of *Echinacea purpurea*. Biol Pharm Bull 2004; 27: 1004-9.

18. Rousseau B, Tateya I, Lim X, Munoz-del-Rio A, Bless DM. Investigation of anti-hyaluronidase treatment on vocal fold wound healing. *J Voice* 2006; 20:443–51.
19. Borchers AT, Keen CL, Stern JS, Gershwin ME. Inflammation and Native American medicine: the role of botanicals. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 339–47.
20. Barnes J, Anderson LA, Gibbons S, Phillipson JD. Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell, *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt, *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57: 929–54.
21. Ngue PK, Nganga Z, Ingogna J, Rukunga G, Tonui WK. In vivo efficacy of oral and intraperitoneal administration of extracts of *Warburgia ugandensis* (Canellaceae) in experimental treatment of old world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2009; 6: 207-12.
22. Kazemi E, Talari SA, Hoshyar H. Effect of alcoholic extract of on *Leishmania major* in BALB/c mice. *Scientific Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research* 2007; 3: 35-42.
23. Lima CB, Arrais- Silva WW, Cunha RLOR, Giorgio S. A novel organotellurium compound (RT-01) as a new antileishmanial agent. *Korean J Parasitol* 2009; 47: 213-8.
24. Zhai Z, Haney D, Wu L, Salco A, Murphy PA, Wurtele E, et al. Alcohol extracts of echinacea inhibit production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by macrophages in vitro. *Food Agric Immunol* 2007; 18: 221-36.