

اثرات ضد هلیکوباکتریلوری عصاره متانولی برخی گونه‌های جنس *Melia* و *Stachys*

مهناز خانوی^۱، سیده ملیحه صفوی^۲، فریده سیاوشی^۳، عسل فلاح تفتی^۴، منان حاجی محمودی^۵، عباس حاجی آخوندی^۶، شمسعلی رضازاده^۷، علیرضا فرومدی^{۸*}

۱- استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران

۴- دستیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم پزشکی تهران

۵- استادیار، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۶- استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۷- استادیار، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، تهران

۸- استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی

صندوق پستی: ۱۴۱۵۵/۶۴۵۱، تلفن: ۶۶۹۵۴۷۰۸ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۴۶۱۱۷۸ (۰۲۱)

پست الکترونیک: aforumadi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۱۳

تاریخ تصویب: ۸۷/۶/۲۴

چکیده

مقدمه: باکتری گرم منفی هلیکوباکتریلوری که اولین بار در سال ۱۹۸۲ میلادی شناسایی شده است، امروزه به عنوان مهم‌ترین عامل التهاب معده و زخم‌های گوارشی مطرح است. با افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های موجود، لزوم مطالعه برای یافتن داروهایی با منشأ گیاهی ضروری به نظر می‌رسد.

هدف: هدف از مطالعه حاضر، بررسی خواص ضد هلیکوباکتریلوری عصاره ۱۰ گیاه موجود در ایران بر علیه سوش‌های بالینی هلیکوباکتریلوری است.

روش بررسی: نمونه‌های بیوپسی معده از بیماران با مشکلات گوارشی معده و اثنی عشر گرفته و *H. pylori* از نمونه‌ها با روش‌های استاندارد میکروبیولوژی جدا شد. از روش دیسک دیفیوژن جهت بررسی حساسیت ۱۲ سوش بالینی هلیکوباکتریلوری به عصاره متانولی میوه و برگ *Melia azedarach* و *Melia indica*، سرشاخه‌های هوایی *Stachys setifera*، *Stachys turcomanica*، *Stachys laxa*، *Stachys inflata*، *Stachys persica*، *Stachys byzanthina*، *Stachys subaphylla*، *Stachys trinervis* استفاده شد.

نتایج: گیاهان آزمایش شده در غلظت ۸ mg/disc فعالیت ضد هلیکوباکتریلوری با قطر هاله عدم رشد در محدوده ۳۸ - ۱۲ میلی‌متر از خود نشان دادند. سرشاخه‌های گیاه *Stachys setifera*، میوه گیاه *Melia indica* و برگ *Melia azedarach* اثرات قوی‌تری بر روی سوش‌های هلیکوباکتریلوری از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری: به دنبال افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، نیاز به داروهای جدید ضد هلیکوباکتریلوری بیشتر احساس می‌شود. استفاده از گیاهان دارویی ممکن است در ریشه‌کنی چنین مشکلاتی مناسب باشد. براساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، تحقیقات بیشتر برای یافتن اثرات گونه‌های دیگر از گیاهان ایرانی، علیه عفونت‌های حاصل از هلیکوباکتریلوری ضروری به نظر می‌رسد.

کل واژگان: هلیکوباکتریلوری، *Melia*، *Stachys*، عصاره متانولی



مقدمه

به عنوان گیاه زینتی به وفور یافت می‌شود. هسته‌های چریش وقتی زیر آسیاب خرد و فشرده می‌شوند، ۴۰ تا ۵۰ درصد روغن تولید می‌کنند که به عنوان ضد عفونی‌کننده زخم حیوانات، دافع حشرات، قارچ‌کش و در لوازم آرایشی بهداشتی استفاده می‌شود. پوست درخت، ایجاد کننده انقباض تونیک عضلانی است و برگچه‌های آن برای درمان بزرگی غدد لنفاوی و تاول مفید است [۱۲].

هم‌چنین گونه دیگری از این گیاه به نام *Melia azedarach* یا *Persian Lilac* در شمال کشور به صورت بومی وجود دارد که در این منطقه به زیتون تلخ معروف است. میوه آن با طعمی شبیه ساخارین برای درمان جذام و سل غدد لنفاوی به کار می‌رود. با شکسته شدن دانه‌ها، روغنی به دست می‌آید که علاوه بر خاصیت ضد باروری و ضد انگلی به عنوان درمان موضعی عفونت‌های مفصل و زخم‌های مقاوم مفید است [۱۲].

دو گیاه مذکور از تیره *Meliaceae* و راسته *Terebinthales* هستند. تیره *Meliaceae* شامل ۴۵ جنس و بیش از ۷۵۰ گونه به صورت درخت و یا درختچه‌هایی است که در نواحی گرمسیری می‌رویند. این تیره در ایران فقط دارای یک جنس به نام *Melia* است که دو گونه چریش و زیتون تلخ، تنها گونه‌های شناخته شده موجود در کشور هستند [۱۱، ۱۳].

گزارش‌های متعددی از موثر بودن جنس *Melia* به عنوان ضد باکتری و ضد قارچ ارائه شده است [۱۲، ۱۴]. روغن چریش به عنوان تحریک‌کننده غیر اختصاصی سیستم ایمنی، به واسطه تغییرات میتوزنیک و آنتی‌ژنیک عمل می‌کند و فعالیت اختصاصی آن روی سلول‌های واسطه ایمنی صورت می‌گیرد. هم‌چنین عصاره برگ، با اثر روی سلول‌های ایمنی باعث افزایش تیتراژ *IgG* و *IgM* می‌شود [۱۵].

در ایران نیز مطالعه جامعی بر روی عصاره اتانولی و متانولی میوه چریش و زیتون تلخ انجام شده است که بیانگر اثرات مناسب این عصاره بر مراحل مختلف اسپرماتوزن است [۱۶، ۱۷].

هلیکوباکتریلوری^۱ که یک باسیل گرم منفی بی‌هوازی است، هم‌اکنون به عنوان مهم‌ترین عامل التهاب معده، زخم‌های معده، اثنی‌عشر و سرطان معده شناخته شده است. این عفونت‌ها در کشورهای در حال توسعه شایع‌تر از کشورهای توسعه یافته است [۱]. ریشه‌کن کردن هلیکوباکتریلوری می‌تواند به طور قابل توجهی خطر بازگشت زخم را کاهش داده و ممکن است به پیشگیری سرطان معده نوع MALT^۲ و سرطان‌های دیگر کمک کند [۲]. بروز مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص مترونیدازول و آموکسی‌سیلین استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها را محدود کرده است. این عامل و دیگر فاکتورها از جمله شکایت بیماران از عوارض جانبی زیاد نظیر تهوع، استفراغ، اسهال و هزینه بالای مصرف توام چند دارو موجب شده است تا تلاش برای دستیابی به داروهای جدید که به صورت انتخابی روی هلیکوباکتریلوری اثر کرده و عوارض جانبی کمتری داشته باشند دو چندان شود [۳، ۴، ۵].

تاکنون اثرات متعدد *in-vivo* و *in-vitro* از عصاره یا اسانس گونه‌های مختلف جنس *Stachys* دیده شده است [۶، ۷]. از سوی دیگر اثرات ضد میکروبی اسانس گونه‌هایی از جنس *Stachys* بررسی شده است که از آن میان *S. candida* واجد اثر ضد میکروبی مناسبی است [۸]. هم‌چنین اسانس گیاهان *S. recta*، *S. euboica*، *S. cretica*، *S. cardiaca*، *S. menthifolia* و *S. germanica subsp heldreichil* اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی مناسبی از خود نشان داده‌اند [۹]. لازم به اشاره است که در طب سنتی ایران این جنس در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت، سرطان، آرتریت روماتوئید، سکته‌های قلبی و مغزی، پارکینسون، کاتاراکت، زخم‌های پوستی و بیماری‌های تنفسی، موثر است [۱۰].

یکی از گیاهان معروف آنتی‌باکتریال که فرمولاسیون‌های متعددی از آن در بازار دارویی جهان موجود است *Neem* یا چریش^۳ بوده که بومی هند است [۱۱، ۱۲] و در جنوب ایران

¹ *H. Pylori* ² Mucosa-associated lymphoid tissue

³ *Melia indica*



دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط اتمسفری ۵ درصد O_2 ، ۱۵ درصد CO_2 و ۸۰ درصد N_2 در انکوباتور آنایروبیک (Hirayama, Tokyo, Japan) به مدت ۵ - ۳ روز انکوبه شدند. سپس رنگ‌آمیزی گرم انجام و در صورت مشاهده باکتری‌های خمیده باسیلی تست‌های تشخیصی دیگر از قبیل اکسیداز، کاتالاز، اوره آز و بررسی حساسیت نالیدیکیسیک اسید و سفالوتین جهت تایید هلیکوباکتریپیلوری انجام شد. در صورت تایید هلیکوباکتریپیلوری باکتری‌ها به صورت سوسپانسیون مطابق با استاندارد مک فارلند ۱ تهیه شدند و جهت آزمایش‌های میکروبی استفاده شدند.

تعیین قطر هاله عدم رشد با استفاده از روش دیسک دیفیوژن
برای تعیین اثرات مهاری بر روی رشد هلیکوباکتریپیلوری از دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متر روی محیط بروسلا آگار حاوی خون (۷ درصد) در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. بدین‌منظور ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (حاوی $10^7 \times 5$ باکتری) از هر کدام از سوش‌های هلیکوباکتریپیلوری (۱۲ سوش بالینی) در پلیت‌های جداگانه محتوی محیط کشت بروسلا آگار خون‌دار اضافه شده و توسط میله شیشه‌ای پخش شد. سپس غلظت‌های ۲، ۴ و ۸ mg/disc از عصاره‌های گیاهی به دیسک‌های بلانک اضافه شد. هاله عدم رشد پس از انکوباسیون ۲ تا ۵ روزه محاسبه شد. قدرت مهار رشد از روی قطر حلقه مشخص گردید. از مترونیدازول به عنوان شاهد مثبت و از دیسک حاوی حلال عصاره‌ها (متانل) به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

نتایج

نتایج بررسی اثرات ضد هلیکوباکتریپیلوری گیاهان علیه سوش‌های بالینی هلیکوباکتریپیلوری در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. اثرات ضد هلیکوباکتریپیلوری گیاهان به صورت میانگین قطر هاله عدم رشد و محدوده آن به میلی‌متر آورده شده است. نتایج نشان می‌دهند در غلظت ۲ mg/disc گیاهان غیرفعال بوده و در

با توجه به این‌که مطالعه بر روی گیاهان حاوی اثرات آنتی‌هلیکوباکتریپیلوری بسیار با ارزش بوده و گیاهان مطالعه شده در این تحقیق تاکنون مورد چنین نگرشی قرار نگرفته‌اند و نظر به ارزش فراوان برخی از این گیاهان در سایر نقاط جهان، بر آن شده‌ایم که به بررسی اثر فوق بر روی عصاره متانولی این گونه گیاهان رویش یافته در ایران بپردازیم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاهان و عصاره‌گیری

۸ گونه گیاه از جنس *Stachys* که به وفور در ایران یافت می‌شود و دو گونه از جنس *Melia* که در ایران وجود دارد برای بررسی انتخاب شدند. از هر کدام از گیاهان جنس *Melia* برگ و میوه به صورت جداگانه جمع‌آوری شدند. در مورد گیاهان جنس *Stachys* فقط سرشاخه‌های هوایی این گیاهان بررسی شدند. این گیاهان در تیر ماه سال ۸۵ از مناطق استان‌های اردبیل، گلستان، هرمزگان و قزوین جمع‌آوری شده و شناسایی این گونه‌ها در بخش هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت.

قسمت‌های موردنیاز گیاهان به وسیله دستگاه آسیاب به صورت پودر درآورده شد و با متانل ۸۰ درجه به روش پرکولاسیون به مدت سه هفته در دمای آزمایشگاه عصاره‌گیری گردید. پس از صاف کردن، عصاره موردنظر توسط دستگاه تقطیر در خلا در حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد، تغلیظ شده و در آن خلا با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک شد و پودر آن جهت تهیه رقت‌های مختلف عصاره گیاهان استفاده شد.

شناسایی نمونه‌های هلیکوباکتریپیلوری

۱۲ نمونه هلیکوباکتریپیلوری از نمونه‌های بیوپسی ارسالی از بیمارستان شریعتی تهران که از بیماران مشکوک به گاستریت و زخم معده گرفته شده جدا و شناسایی شد. ابتدا نمونه‌ها روی محیط بروسلا آگار^۱ حاوی خون (۷ درصد) کشت داده شدند. پلیت‌ها در

^۱MERCK



جدول شماره ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد گیاهان در ۳ غلظت بر علیه ۱۲ سوش بالینی هلیکوباکتری پیلوری بر حسب میلی متر

ردیف	نام گیاهان	قطر هاله عدم رشد (mm)		
		۸ mg/disc	۴ mg/disc	۲ mg/disc
۱	<i>Stachys setifera</i>	۳۸/۳ (۱۰ - ۴۵)	۲۶/۳ (۶ - ۳۵)	۱۱/۵ (۶ - ۲۰)
۲	<i>Melia indica Fruit</i>	۲۸/۵ (۱۲ - ۴۰)	۲۰/۵ (۶ - ۳۰)	۱۱/۱ (۶ - ۲۳)
۳	<i>Melia azedarach leaves</i>	۲۶/۸ (۶ - ۳۹)	۱۹/۴ (۶ - ۳۰)	۱۰/۳ (۶ - ۲۲)
۴	<i>Stachys inflata</i>	۲۵/۶ (۶ - ۳۲)	۱۹/۷ (۶ - ۲۸)	۶ (۶ - ۶)
۵	<i>Stachys laxa</i>	۲۳/۳ (۶ - ۳۰)	۱۹/۹ (۶ - ۲۷)	۶/۶ (۶ - ۱۶)
۶	<i>Stachys subaphylla</i>	۲۱/۱ (۶ - ۳۸)	۱۷/۲ (۶ - ۲۵)	۶ (۶ - ۶)
۷	<i>Stachys trinervis</i>	۲۰/۲ (۶ - ۴۰)	۱۵/۹ (۶ - ۲۴)	۶ (۶ - ۶)
۸	<i>Stachys persica</i>	۱۹/۹ (۶ - ۲۵)	۱۴/۶ (۶ - ۲۲)	۶ (۶ - ۶)
۹	<i>Stachys turcomanica</i>	۱۹/۸ (۶ - ۳۵)	۱۶/۳ (۶ - ۲۵)	۶ (۶ - ۶)
۱۰	<i>Stachys byzanthina</i>	۱۸/۱ (۶ - ۲۷)	۱۳/۱ (۶ - ۲۰)	۶ (۶ - ۶)
۱۱	<i>Melia azedarach Fruit</i>	۱۵/۴ (۶ - ۲۵)	۱۰/۲ (۶ - ۲۰)	۶ (۶ - ۶)
۱۲	<i>Melia indica leaves</i>	۱۲ (۶ - ۲۸)	۶ (۶ - ۶)	۶ (۶ - ۶)

منبع مفید داروهای گیاهی جدید استفاده شوند.

در این تحقیق ۱۲ عصاره گیاهی از ۱۰ گیاه با استفاده از روش دیسک دیفیوژن غربالگری شدند. قوی ترین عصاره گیاهی، عصاره سرشاخه های *Stachys setifera* با قطر هاله عدم رشد ۳۸/۳ میلی متر در غلظت ۸ mg/disc بوده در حالی که در غلظت ۲ mg/disc دارای قطر هاله عدم رشد ۱۱/۵ میلی متر است. میوه *Melia indica* در غلظت ۸ mg/disc دارای قطر هاله عدم رشد ۲۸/۵ میلی متر است که مانند گیاه فوق در پایین ترین غلظت دارای اثر مهاری چندانی نیست. در مرتبه بعدی عصاره برگ *Melia azedarach* با قطر هاله عدم رشد ۲۶/۸ میلی متر قرار دارد.

غلظت های بالاتر به خصوص غلظت ۸ mg/disc بعضی گیاهان دارای فعالیت خوبی هستند. متانل که به عنوان کنترل منفی استفاده شد، فاقد هر گونه اثر مهاری بر روی نمونه ها است.

بحث

قرن هاست که اثرات ضد میکروبی بسیاری از گیاهان و ترکیبات موثره آن ها شناخته شده است. بسیاری از عوامل ضد هلیکوباکتر که اثرات مهاری قابل توجهی از خود نشان داده اند از گیاهان استخراج شده اند [۱۹،۲۰]. در مطالعه حاضر، خواص ضد هلیکوباکتر چندین گیاه موجود در ایران بررسی شد به امید آن که بتواند به عنوان یک



عدم رشد در محدوده (۳۸ - ۱۲) و در غلظت ۲ mg/disc غیرفعال هستند.

در طب سنتی اروپا، گل‌ها و برگچه‌های درخت *Melia indica* به طور موضعی برای درمان سردردهای عصبی استفاده می‌شوند و خمیر میوه و مرهم گل‌ها برای از بین بردن شپش، سایر انگل‌ها و جوش‌های سر به کار می‌رود. پوست درخت ضدکرم بوده و در دوزهای بالا تهوع‌آور است [۱۲].

یک مطالعه چینی نشان داد عصاره اتانلی میوه گیاه *Melia toosendan* دارای MIC = ۱۰۰ µg/ml علیه هلیکوباکتریلوری است [۲۳]. طبق گزارش ناگالاکشمی^۱ و همکاران، اسانس برگ گیاه *Melia dubia* دارای اثرات ضدباکتری و ضدقارچی است [۱۴]. بررسی‌ها نشان دادند که عصاره چریش در کمتر از ۳۰ ثانیه می‌تواند اسپرم حیوان و انسان را کاملاً از بین ببرد و بنابراین به عنوان یک روش جلوگیری از بارداری از آن می‌توان استفاده کرد [۲۴، ۲۵].

بررسی‌های چندانی در مورد هلیکوباکتریلوری و گونه‌های مورد بررسی در این طرح صورت نگرفته است، اما مطالعه ما نشان می‌دهد که *Stachys setifera* دارای اثرات قوی‌تری نسبت به گونه‌های دیگر این جنس است. هم‌چنین عصاره میوه *Melia indica* و برگ *Melia azedarach* دارای فعالیت قابل توجهی بودند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت تامین اعتبار لازم برای انجام تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود.

¹ Nagalakshmi

عصاره سرشاخه‌های *Stachys laxa*، *Stachys inflata* و *Stachys subaphylla* به ترتیب در رده‌های بعدی قرار دارند. ضعیف‌ترین گیاه عصاره برگ *Melia indica* با قطر هاله عدم رشد ۱۲ میلی‌متر در غلظت ۸ mg/disc است. قطر هاله عدم رشد مترونیدازول در غلظت ۸ µg/disc بر علیه ۱۲ سوش بالینی هلیکوباکتریلوری ۱۶ میلی‌متر است. گیاهان مورد بررسی در مقایسه با مترونیدازول ضعیف‌تر هستند.

همان‌طور که از نتایج برمی‌آید گیاهان در غلظت ۲ mg/disc فعال نبوده ولی برخی از آن‌ها در غلظت‌های بالاتر فعال هستند. عصاره سرشاخه‌های *Stachys setifera*، میوه *Melia indica* و برگ *Melia azedarach* بیشترین اثر مهارتی بر هلیکوباکتریلوری از خود نشان دادند اما در غلظت ۲ mg/disc اثرات خوبی از خود نشان ندادند (قطر هاله عدم رشد > ۱۲ میلی‌متر) به علت عدم فعالیت بالای این ترکیبات از انجام MIC صرف‌نظر شد.

در منابع طب سنتی ایران و جهان، اثرات درمانی متعددی را به جنس *Stachys* نسبت می‌دهند به طوری که از ۳۷ گونه *Stachys* موجود در روسیه ۱۲ گونه را واجد اثرات درمانی از جمله خواب‌آور و آرام‌بخش، پایین‌آورنده فشارخون، بهبوددهنده زخم و بند آورنده خون‌ریزی، افزایش‌دهنده ترشحات صفراوی، ضدسرفه و گلو درد، درمان عفونت‌های کلیه و دردهای معده می‌دانند [۲۱]. در طب سنتی ایران *S. recta* به عنوان یک داروی موثر در درمان زخم و جراحت، *S. lavandulifolia* برای درمان دردهای گوارشی [۱۰] و *S. inflata* به دلیل اثرات ضدالتهاب در درمان بیماری‌های تنفسی و آرتريت مصرف می‌شود. مطالعات فارماکولوژیک نشان داده‌اند عصاره و اجزا گیاهان متعلق به این جنس دارای خواص آنتی‌باکتریال قوی هستند [۲۲]. چنان‌که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود گیاهان فوق در غلظت ۸ mg/disc فعال بوده (قطر هاله

منابع

1. Ndip RN, Tarkang AEM, Mbulah SM, Luma HN, Malongue A, Ndip LM, Nyongbela K, Wirmum C, Efange SMN. *In vitro* anti-

Helicobacter pylori activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 114: 452 – 7.



2. Sepulveda AR, Coelho LGV. *Helicobacter pylori* and gastric malignancies. *Helicobacter*. 2002; 7: 37 – 42.
3. O’Gara EA, Hill DJ, Maslin DJ. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 2269 – 73.
4. Yesilada E, Gurbuz I, Shibata H. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 66: 289 - 93.
5. Voravuthikunchai SP, Mitchell H. Inhibitory and Killing Activities of Medicinal Plants against multiple antibiotic-resistant *Helicobacter pylori*. *J. Health. Sci.* 2008; 54 (1): 81 - 8.
6. Mantle D, Eddeb F, Pickering AT. Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 72: 497 - 510.
7. Kartsev VG, Stepanichenko NN, Auelbekov SA. Chemical composition and pharmacological properties of plant of the genus *Stachys*. *Chem. of Natur. Compounds* 1994; 30: 645 - 54.
8. Skaltsa HD, Lazari DM, Chinou IB, Loukis AE. Composition and Antibacterial Activity of the Essential oils of *Stachys candida* and *S. chrysantha* from Southern Greece. *Planta. Med.* 1999; 65: 255 - 6.
9. Skaltsa HD, Demetzos C, Lazari D, Sokovic M. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochem.* 2003; 64: 743 - 52.
10. Zargari A. Medicinal plants. Tehran University Press. Iran. 1990, pp: 127 - 33.
11. Ghahreman A. *Persian Cromophytes*. Tehran University Press. Iran. 1994, pp: 328 - 44.
12. Rair SS, Bardham J, Thomas P, Kian AK, Parshad R. Mechanism of antifertility action of Neem oil. *Indian. J. Med. Res.* 1988; 88: 339 – 42.
13. Mozaffarian V. A dictionary of iranian plant names. Farhang Moaser, Tehran. Iran. 1996, p: 343.
14. Nagalakshmi MAH, Thangadurai D, Pullaiah T. *In vitro* antimicrobial efficacy of leaf essential oils of *Chukrasia tabularis* Adr. Juss. and *Melia dubia* Cav. (*Meliaceae*) *Phytother. Res.* 2003; 17 (4): 414 – 6.
15. Upadhyay SN, Dhawan S, Garg S, Talwar GP. Immunomodulatory effects of neem (*Azadirachta indica*) oil. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992; 14: 1187 – 93.
16. Dehghan MH, Martin T, Dehghanan R. Antifertility effect of Iranian neem seed alcoholic extract on epididymal sperm of mice. *Iranian. J. Reprod. Med.* 2005; 3 (2): 83 - 9.
17. Khanavi M, Hadjiakhoondi A, Sadeghipour Roodsari HR, Vosoughi M, Arbabi R. The effects of ethanolic extracts of *Melia indica* and *Melia azedarach* fruits on reproductive indices of male rats. *Medical J. of Reproduction and Infertility* 2007; 8 (1): 7 - 16.
18. Mozaffarian, V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser, Tehran. Iran. 1996, p: 522.
19. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12 (4): 564 - 82.
20. Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, Hatano T, Ito H, Hirai Y. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48 (4): 251 - 61.
21. Kartsev VG, Stepanichenko NN, Auelbekov SA. Chemical composition and pharmacological properties of plant of the genus *Stachys*. *Chem. of Natur. Compounds.* 1994; 30: 645 - 54.
22. Maleki N, Garjani A, Nazemiyah H, Nilfouroushan N, Eftekhar-Sadat AT, Allameh Z, Hasannia N. Potent anti – inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. *J. Ethno. Pharmacol.* 2001; 75: 213 –8.
23. Li Y, Xu C, Zhang Q, Liu JY, Tan RX. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese



herbal medicines used to treat ulcer diseases. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 26; 98 (3): 329 - 33.

24. Sinha KC, Riar SS, Tiwary RS. Neem oil an vaginal contraceptive. *Indian. J. Med. Res.* 1984; 79 (1): 131 - 6.

25. Keshri G, Bajpai M, Lakshmi V, Setty BS, Gupta G. Role of energy metabolism in the pregnancy interceptive action of *Ferula assafoetida* and *Melia azedarach* extracts in rat. *Contraception* 2004; 70 (5): 429 - 32.

