



مروری بر تاثیر ترکیبات روغنی گیاهان دارویی در دارو سازی

پرنیا رازقی^{۱*}، فاطمه عبدلی^۲، مهسا حیدری فارسی^۳، یاسمن صادقی^۴، هومن روشنایی^۵، امید روشنایی^۶

- ۱- دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، موسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، فارس، ایران
- ۲- دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، موسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، فارس، ایران
- ۳- دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، موسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، فارس، ایران
- ۴- دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، موسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، فارس، ایران
- ۵- استادیار موسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، فارس، ایران
- ۶- استادیار موسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، فارس، ایران

*parniarazeghi1381@gmail.com

ارسال: خرداد ماه ۱۴۰۳ پذیرش: مرداد ماه ۱۴۰۳

چکیده

روغن به لیمو باعث بهبود اختلالات خواب سالمندان می شود باتوجه به کم عارضه و ارزان بودن گیاهان دارویی و تاثیر آرام بخشی گیاه به لیمو می توان از آن برای بهبود اختلالات خواب سالمندان استفاده کرد. اختلالات مربوط به خواب باعث ایجاد تغییرات عصب شناختی، اتونومیک و زیست شناختی می شود. از روغن مغز گردو غنی شده با β -sitosterol به عنوان یک ترکیب مفید برای کنترل دیابت استفاده می شود. عصاره برگ مورد و روغن زیتون باعث افزایش بیان ژن های الیام دهنده زخم از جمله فاکتور های آندوتلیال عروقی، اپیدرمال، فیبروبلاستی-۱، شبه انسولینی-۱ می شود. کاربرد پزشکی نانوامولسیون روغن در آب به دلیل خواص ویژه گسترش یافته است.

واژگان کلیدی: اختلالات خواب، کنترل دیابت، الیام زخم، نانوامولسیون.

۱- مقدمه

فاکتور رشد اپیدرمال که یک فاکتور رشد عمومی است که با فعالیت ذاتی تیروزین کیناز است. این گیرنده به طور گسترده در بسیاری از انواع سلول ها از جمله دودمان اپیتلیال و مزانشیمی بیان می شود و اتو فسفوریلاسیون آن موجب فعال شدن تعداد زیادی مولکول های هدف پائین دست می شود.[۱].

فاکتور رشد شبه انسولین-1 نقش مهمی در بهبود زخم دارد به عنوان یک عامل کموتاکتیک برای سلول های اندوتلیال عمل می کند همچنین عامل تحریک کراتینوسیت ها و فیبروبلاست ها جهت تکثیر و مهاجرت است و سبب استحکام زخم می شود[۲]. فاکتور رشد شبه انسولین-1 در روند انژیونز دخیل است. فرایند انژیونز نقش باز سازی و ترمیم رگ های خونی را در بافت های آسیب دیده دارد و علاوه بر مواد غذایی و اکسیژن مورد نیاز برای حمایت از رشد و عملکرد سلول ها، هورمون ها و فاکتور های رشد را به محل زخم هدایت می کند[۳].

فاکتور رشد اندوتلیال عروقی یکی از فاکتورهای رشد در پوست است که میزان بیان آن با میزان ترمیم زخم ارتباط دارد [۴]. فاکتور رشد فیبرو پلاستی_1 از موثرترین فاکتورها در مراحل ترمیم زخم است. این فاکتور به طور عمده توسط سلولهای پوستی از جمله فیبروبلاستها و کراتینوسیتها و برخی سلولهای دیگر نظیر سلول اندوتلیال و عضله صاف بیان می شود. از مهم ترین نقش های این فاکتور رشد، تاثیر تحرکی بر سلول های سنتز کننده کلاژن برای تنظیم، تولید و بازسازی اجزای ماتریکس خارج سلولی است [۵]. طبق تحقیقات انجام شده محققان به این نتیجه رسیده اند که بسیاری از گیاهان دارویی و مواد بیولوژیک می توانند برای درمان زخم مفید باشند گیاه مورد با دارا بودن اثرات ضد میکروبی، ضد التهابی، آنتی سمپتیک و ضد احتقانی باعث تسریع در فرایند التیام زخم می شود [۶] و روغن زیتون به دلیل داشتن مقادیر زیادی از ویتامین های A, E, D, K که منبع اصلی محافظت در برابر رادیکال های آزاد است در درمان زخم استفاده می شود [۷].

در سالهای اخیر نانومولسیون ها به دلیل کاربردهای بالقوه در صنایع مختلف مانند مواد غذایی، آرایشی، دارویی و کشاورزی مورد مطالعه گسترده قرار گرفته اند [۸-۹]. نانومولسیون ها به عنوان واسطه امولسیون ها و میکروامولسیون ها معمولاً در محدوده اندازه ۲۰ تا ۵۰۰ نانومتر در نظر گرفته می شوند [۱۰-۱۱]. طبقه بندی اصلی نانومولسیون شامل روغن در آب یا آب در روغن است [۱۲-۱۳]. هموژنایزر فشار بالا یکی از روشهای پر انرژی برای تشکیل نانومولسیون ها است [۱۴-۱۵]. کاربرد پزشکی نانومولسیون به دلیل خطرات بالقوه مانند سمیت برخی از اجزا به عنوان مثال سورفاکتانت ها، امکان استفاده برخی ترکیبات زیست فعال و اثرات نامطلوب بر سلامت انسان محدود می شود [۱۶-۱۷]. سم شناسی نانومواد عبارت از مطالعه برهمکنش های این مواد با سامانه های زیستی برای ارائه رابطه های منطقی بین ویژگی فیزیکی و شیمیایی و پاسخ های زیستی آنها می باشد [۱۸]. گیاه پونه با نام علمی *Mentha pulegium* و نام محلی خالواش یکی از گونه های خانواده نعناعیان است و کاربردهای فراوان به عنوان تسهیل کننده فرآیند قاعدگی، مسکن، مدر، معرق و باد شکن معده دارد [۱۹]. وجود ترکیبات فنولی به خصوص ترکیبات فلوئوئیدی در این گیاه باعث خواص بالقوه مذکور و خاصیت ضد اکسیدانی می شود [۲۰-۲۱]. از این رو در این پژوهش نانومولسیون حاوی عصاره و اسانس پونه تهیه و فعالیت ضدباکتری، ضد اکسیدانی و سمیت سلولی آن مورد ارزیابی قرار گرفت. در دنیا و ایران جمعیت سالمندان روز به روز در حال افزایش است. میزان مرگ ناشی از اغلب بیماری های مهم با بالا رفتن سن و به تناسب آن مشکلات مربوط به خواب نیز افزایش می یابد [۲۲]. شیوع شکایات خواب در میان سالمندان از ۱۶ تا ۶۸ درصد است. رایج ترین اختلال خواب در میان سالمندان بی خوابی است [۲۳-۲۴]. اختلال خواب دارای تقسیم بندی متفاوتی است و بر اساس کتابچه تشخیصی و کد گذاری ICSID منتشر شده از انجمن اختلال خواب آمریکا، به ۴ دسته تقسیم می شود که شامل کژخوابی، بدخوابی، اختلالات خواب مرتبط با اختلالات روانی-طبی و اختلال خواب برنامه ریزی شده است [۲۳ و ۲۵].

تغییرات شاخص عملکرد قلبی، ظرفیت حیاتی ریه و جریان پلاسمایی کلیه، اختلال خواب نیز عوارضی را ایجاد می کند [۲۲] که از جمله می توان به خستگی، سردرد، اختلال در تمرکز حواس، خواب آلودگی، ضعف حافظه، افزایش زمان پاسخ دهی و کاهش سطح عملکرد اشاره کرد [۲۳ و ۲۶]. پیامدهای فوق موجب می شود سالمندان در معرض خطرات بیشتری نظیر سقوط، اختلالات شناختی و روانی، عملکرد فیزیکی ضعیف، کاهش کیفیت زندگی، افزایش وابستگی و اسب پذیری و نهایتاً مرگ باشد [۲۶]. در درمان دارویی برای ارزیابی بیمار با اختلالات خواب نه تنها وجود چند بیماری بلکه درمان های مرتبط نیز بایستی در نظر گرفته شود. بعضی از داروها تحریک کننده هستند و ممکن است سبب بی خوابی شوند که از آن جمله می توان به محرک های سیستم عصبی مرکزی، تابلوکرها، داروهای دیورتیک ها، برونکودیلاتورها، مسدود کننده های کانال کلسیم، کورتیکواستروئیدها، دکونژستان ها، ضدافسردگی ها و هورمون های تیروئیدی اشاره کرد [۲۷].

بیماری دیابت ملیتوس یکی از اختلالات شایع غدد درون ریز بدن است که سالانه تعداد زیادی از افراد جامعه را تحت تاثیر قرار می دهد. این بیماری با عوارض گسترده های همراه است و ابعاد مختلف جسمی، روانی و اجتماعی بیمار را تحت تاثیر قرار می دهد [۲۸]. بیماری دیابت تغییرات عمده های در اغلب سیستم های بدن ایجاد میکند و باعث بروز عوارض فوری و یا دیررس می شود [۲۹]. این اختلال به دلیل تغییرات گسترده در تولید و جذب انسولین در بدن ایجاد می شود [۳۰]. کبد یکی از ارگانهایی است که عملکرد

آن به سطح انسولین خون و میزان حساسیت به آن وابسته است [۳۱]. بررسی ها نشان می دهد که عملکرد کبد در پاتوژنز دیابت نقش مهمی دارد، به طوری که میزان چربی کبد و سطوح آنزیمهای خونی مانند ALT و GGT که نشان دهنده مقدار چربی کبد هستند، با خطر دیابت مستقل از مصرف الکل و دیگر عوامل خطرزا ارتباط دارند [۳۲]. علاوه بر این، شاخص های دیگری همچون AST، آسپاراتات آمینوترانسفراز، نیز در افراد مبتال به دیابت به صورت شایع بالاست [۳۳].

اختلالات در سطوح گلوکز، کلسترول، تریگلیسرید، ALP، HDL، بیلروبین و آلبومین از دیگر شاخص های خونی است که در افراد مبتال به دیابت با تغییرات چشمگیری همراه است [۳۴]. مطالعات نشان می دهند که سطوح بالای از آنزیمهای خونی مانند GGT و ALT با پیش بینی شیوع دیابت ارتباط دارند. گردو یکی از گیاهان دارویی رایج در کنترل دیابت و افزایش قند خون است [۳۶]. در مطالعه های انجام شده توسط Fink و همکاران، نشان داده شده است که کاهش در میزان گلوکز خون در دوران طولانی مدت می تواند باعث کاهش تریگلیسرید کبدی و تغییرات معنی داری در الگوهای اسیدهای چرب در کبد شود [۳۷]. این کاهش همراه با تغییرات در شاخص فعالیت SCD و کاهش نسبت اسیدهای چرب امگا ۶ به امگا ۰ در کبد است [۳۵]. معمولاً، برای تشخیص بیماریها و ارزیابی تأثیرات داروهای که احتمالاً دارای اثرات سمی هستند، از شاخص های عملکرد کبد استفاده می شود. شاخصهای معمول شامل آمینوترانسفرازهای سرمی، آلکالین فسفاتاز، بیلروبین و آلبومین هستند. در صورت بروز اختلال یا آسیب در بافت کبد، این شاخص ها به خون آزاد می شوند و می توانند به عنوان نشانگرهایی برای مشکلات کبدی استفاده شوند. افزایش در فعالیت آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز، الکتات دهیدروژناز، آلکالین فسفاتاز و اسید فسفاتاز ممکن است ناشی از نقص در عملکرد کبد باشد. این پژوهش به منظور تعیین تأثیر غنی سازی روغن مغز گردو با sitosterol-B اضافی بر روی اثر محافظتی آن در رتهای نر دیابتی، تأثیر ترکیب روغن گردو بر روی رتهای نر دیابتی و تعیین تأثیر روغن گردو بر روی آنزیمهای کبدی در رتهای نر دیابتی انجام شده است.

۲- متدولوژی

طبق تحقیقات انجام شده توسط فرخنده نعمتی و همکاران در سال ۱۴۰۲ [۳۸] ۱۰۰ گرم پودر برگ مورد به مدت ۳ روز در ۱۰۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد درون ارلن خیسانده می شود سپس از کاغذ صافی واتمن شماره یک و قیف عبور داده می شود همچنین برای پراندن اتانول محلول از دستگاه روتاری و برای داشتن یک محلول غلیظ به مدت چند روز در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده می شود برای محافظت از اکسیداسیون درون ظرف تیره با روکش آلومینیوم در دمای ۰ تا ۴ درجه نگهداری می شود. د آخر عصاره برگ مورد به نسبت ۱ به ۱ با روغن زیتون ترکیب می شود. ۳۶ موش نر سوری با وزن های ۳۵ الی ۴۵ در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت نور و ۱۳ ساعت تاریکی در رطوبت نسبی مناسب هوا و دمای ۲۲ درجه استفاده شد تزریق ماده کتامین زایلازین با نسبت ۱:۱۰ به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن برای بیهوشی موش استفاده شد موهای ناحیه زخم کاملاً تراشیده و با الکل ۷۰ درصد پاکسازی شد سپس با تیغ استریل زخمی به اندازه در پشت حیوان ایجاد شد. تقسیم بندی حیوانات به ۳ گروه ۱۲ تایی به طور تصادفی ۱. گروه کنترل: هیچ نوع زخمی در بدن موش ایجاد نشد ۲. گروه مورد مطالعه: زخم در پشت آنها ایجاد شد و روزانه یک بار به مدت ۱۵ روز با پماد تهیه شده تیمار شدند ۳. گروه سالی: همانند گروه دوم زخم در بدن آنها ایجاد شد و روزانه یک بار با استفاده از نرمال سالین تیمار شدند. در فاصله ۵ روز ۴ حیوان از هر گروه به طور تصادفی انتخاب و با استفاده از دوز کشنده کداملین زایلارین کشته و بیوپسی شدند و پوست ناحیه زخم در حال ترمیم جدا شد و برای بررسی میزان ژن های فاکتور رشد فیبروبلاستی_۱، اپیدرمال، اندوتلیال عروقیو شبه انسولین_۱ از روش Real Tme PCR استفاده شد.

با استفاده از کیت های استخراج RNA شرکت سیناکولون RNA استخراج شد و کیفیت آن با بردن نمونه روی ژل آگار ۱ درصد و با توجه به پر رنگی و وضوح باند ها تعیین شد کمیت آن نیز با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر نوری (با جذب نور در طول موج ۲۶۰ بر جذب نور ۲۸۰ خوانده شد) تعیین شد و نمونه های با جذب نور ۱٫۵ الی ۲ انتخاب شدند. برای هر یک از ژن های مورد نظر واکنش، PCR انجام شد (جدول شماره ۱).

جدول ۱- اجزای واکنش استاندارد Real Tme PCR

مواد واکنش	حجم برای یک نمونه
آب دیونیزه	۱۱/۲ میکرولیتر
cDNA	۲ میکرولیتر
منزیم کلرید	۱/۵ میکرولیتر
پرایمر پیشرو	۰/۱۵ میکرولیتر
پرایمر معکوس	۰/۱۵ میکرولیتر
مخلوط آماده سایبرگرین	۱۰ میکرولیتر
حجم کل	۲۵ میکرولیتر

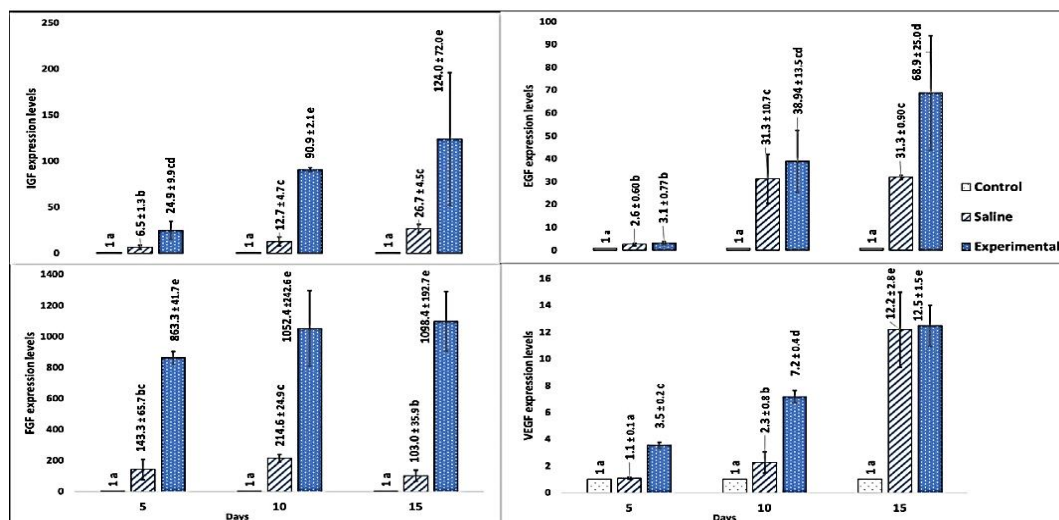
تعیین کمیت نسبی در Real Tme PCR به وسیله اندازه گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ سایبر گرین انجام شد. اجزای واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر غلظت نهایی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. از هیپوگزانتین فسفوریبوزیل ترانسفراز به عنوان ژل کنترل کننده استفاده شد. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن ها با استفاده از روش Real Tme PCR مطابق جدول شماره ۲ بود.

جدول ۲- برنامه دمایی تکثیر ژنهای فاکتور های رشد فیبروبلاستی_۱، اپیدرمال، آندوتلیال عروقی، شبه انسولین_۱ HPRT

با استفاده از روش PCR time R

دما (بر حسب درجه سانتی گراد)					طول دوره (ثانیه)	مراحل سنجش (بخش ها)
IGF-1	FGF-1	EGF	VEGF	HPRT		
۹۵	۹۵	۹۵	۹۵	۹۵	۱۵	واسرشته سازی
۵۷	۵۴	۵۳	۵۷/۵	۶۰	۱۰	اتصال آگارگر
۷۲	۷۲	۷۲	۷۲	۷۲	۲۰	گسترش
۸۰	۷۶	۸۸	۸۰	۸۶	۳	جذب فلورسنس

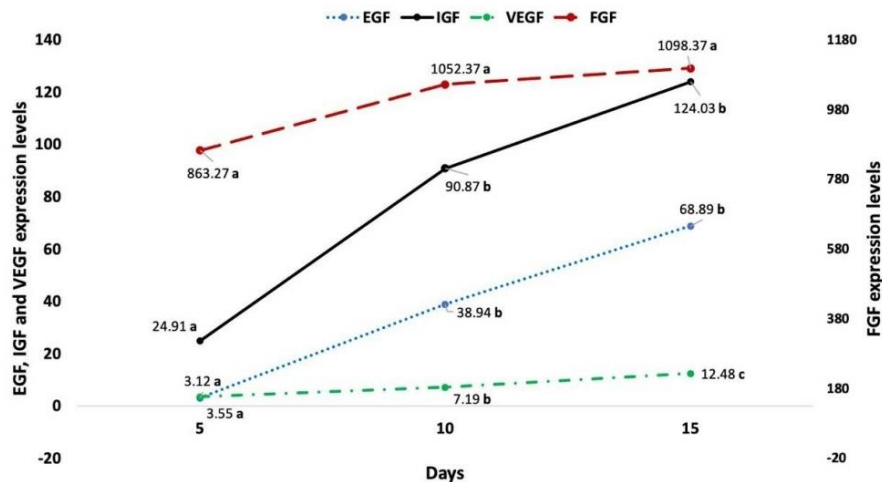
ژن فاکتورهای رشد پرایمر ندارند زیرا ژن فاکتور رشد اپیدرمال باند ۱۹۸ جفت بازی (bp)، ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و شبه انسولین_۱ باند ۱۸۹ جفت بازی (bp)، ژن فاکتور رشد فیبروبلاستی_۱ باند ۱۲۲ جفت بازی (bp) و همچنین ژن هیپوگزانتین فسفریبوزیل ترانسفراز باند ۱۳۱ جفت بازی (bp) روی ژل آگارز دارد (تصویر شماره ۱).



شکل ۱- میانگین + انحراف معیار میزان بیان ژن های فاکتور رشد فیبروبلاستی_۱، اپیدرمال، آندوتلیال عروقی و شبه انسولین_۱ با روش PCR Time Real در گروه کنترل، سالین و ترکیب عصاره مورد و روغن زیتون در روند ترمیم زخم، میانگینها دارای حروف الفبایی متفاوت، اختلاف آماری معناداری در سطح ۰,۰۵ دارند

نتایج حاصله از بررسی میانگین میزان بیان ژن فاکتورهای رشد فیبروبلاستی_۱، شبه انسولین_۱، آندوتلیال عروقی، اپیدرمال نشان داد که افزایش زیادی در میزان بیان ژن گروه تیمار با عصاره برگ مورد و روغن زیتون نسبت به گروه سالین و کنترل اتفاق افتاد

($P < 0.05$) بیشترین تاثیر را در افزایش بیان ژن فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱ نسبت به سایر ژن ها پس از ۱۵ روز دارد (۱۰۹۸,۳۷) تصویر شماره ۲).



شکل ۲- مقایسه میزان بیان ژن های فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱، اپیدرمال، آندوتلیال عروقی و شبه انسولین ۱ با روش PCR Time Real تحت تیمار با ترکیب عصاره مورد و روغن زیتون در روند توهمیم زخم، میانگینها دارای حروف الفبایی متفاوت، اختلاف آماری معناداری در سطح ۰,۰۵ دارند

بر اساس تحقیقات اشکان زندی و همکاران در سال ۱۴۰۲ [۳۹] مواد و تجهیزات نمونه برداری از گیاه پونه از مناطق بکر پلکو انجام شد و پس از تایید در بخش هرباریوم دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران ۱۶۳۴-AUPF در سایه و به دور از نور مستقیم خورشید و در شرایط استاندارد خشک شد. اسپن ۸۰ و کیتوزان از مرک خریداری شد. دستگاه هموژنایزر مدل Heidolph برای تهیه نانومولسیون استفاده شد. اسپکتروفتومتر مدل ۳۰ GENESYS استفاده شد. دستگاه پراکندگی نور دینامیکی مدل Quadix جنوبی برای ارزیابی اندازه و توزیع اندازه نانومولسیون استفاده شد. میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل Zeiss-EM10C 100 KV برای بررسی شکل و اندازه نانومولسیون استفاده شد.

برای اسانس گیری ابتدا ۱۰۰ گرم از گیاه پونه در یک بالن ۲ لیتری ریخته و به آن کمی بیشتر از نصف حجم بالن آب اضافه شد. سپس با دستگاه کلونجر عمل اسانسگیری با اعمال با اعمال حرارت به مدت ۳ ساعت تا زمان ثابت ماندن سطح اسانس انجام شد. در نهایت آبنگیری اسانس توسط سولفات سدیم انیدر برای افزایش کیفیت انجام شد و نمونه نهایی در ظرف شیشهای درب بسته و با فویل پوشیده در یخچال نگهداری شد.

برای عصاره گیری پودر گیاه پونه با نسبت ۱ نمونه به ۱۰ حلال در یک بالن ژوژه ریخته و به مدت ۶ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد و دور چرخش ۷۰۰ rpm حرارت داده شد. سپس عصاره با کاغذ صافی صاف شده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری میشود. لازم به ذکر است که اگر حلال آب باشد عصاره آبی، و اگر ۸۰ درصد متانول باشد عصاره متانولی است. تهیه عصاره فراکشن متانولی مشابه عصاره متانولی است با این تفاوت که به مدت ۴۸ ساعت تحت همزدن در دما محیط و دور از نور قرار داده شد. سپس مخلوط صاف شده و در ظرفی دربدار نگهداری شد و بار دیگر به آن متانول اضافه و روند ذکر شده به مدت ۴۸ ساعت دیگر تکرار شد. سپس مخلوط صاف شده و هر دو عصاره با یکدیگر مخلوط شده و درون روتاری تحت شرایط خلاء و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده تا به پودر همان فراکشن متانولی تبدیل شود. سپس برای بدست آوردن فراکشن آبی ابتدا ۱۰ گرم از پودر متانولی تام را درون ارلن ۵۰۰ لیتری ریخته و به آن ۲۰۰ میلی لیتر ان هگزان اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت تحت همزدن بدون دما قرار گرفت. سپس محلول حاصله را با کاغذ صافی شده و به مواد باقیمانده ۲۰۰ میلی لیتر دی کلرومتان افزوده و به مدت ۲۴ ساعت همزده و سپس صاف شد. سپس به آن اتیل استات افزوده و همین روند تکرار شد. در نهایت به همین روش با اضافه کردن آب مقطر عصاره حاصله فراکشن آبی خواهد بود.

سه ماده اساسی شامل فاز پیوسته، فاز پراکنده و سورفکتانت برای تهیه نانوامولسیون نیاز است. منظور تهیه نانوامولسیون از ۲ میلی لیتر اسپن ۸۰ به عنوان سورفکتانت، ۴۴ میلی لیتر عصاره پونه به عنوان فاز پیوسته و ۴ میلی لیتر اسانس پونه به عنوان فاز پراکنده با دستگاه هموژنایزر به مدت ۳۰ دقیقه با دور rpm1900 استفاده شد.

فعالیت ضدباکتری علیه باکتری گرم منفی و باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بدست آمده. برای انجام تست MIC ابتدا مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت را درون هر چاهک ریخته سپس به هر چاهک مقدار ۱۰ میکرولیتر باکتری فعال شده افزوده و در ادامه ۳ غلظت متفاوت از اسانس، عصاره و نانوامولسیونها اضافه می کنیم. در نهایت پلیت ها را درون انکوباتور شیکردار گذاشته و بعد از طی ۲۴ ساعت جذب نوری آنها را در طول موج ۶۲۰ nm خواندیم به دلیل تعداد بالای نمونه ها در ۳ غلظت متفاوت و ۳ بار تکرار از پلیتهای ۹۶ خانه استفاده شده است. پس از مشخص شدن مقدار بهینه در تست MIC، در تست MBC یک دوز بالاتر انتخاب می شود. در این تحقیق از روش چاهک گذاری استفاده شد. برای این کار در ابتدا در دو پلیت حاوی محیط کشت مولر هیلتون آگار به صورت جداگانه، به کمک سرسمپلر آبی و با رعایت فواصل کافی چاهک ایجاد شد، سپس باکتری های مورد نظر را با رعایت تمام موارد ایمنی در این دو پلیت به صورت جداگانه و به روش کشت چمنی کشت شد. پس از این کار برای باکتری E.Coli مقدار ۴۰ μL از اسانس، عصاره ها و نانوامولسیون ها به همراه ۱۶۰ μL آب مقطر مخلوط و درون هر چاهک ریخته شد و همین کار را برای باکتری S.Aureus انجام شد با این تفاوت که مقدار ماده موثره و مقدار آب مقطر اضافه شده به ترتیب ۵۰ و ۱۲۰ میکرولیتر بوده است. دلیل اضافه کردن آب مقطر نیز جلوگیری از خشک شدن سریع نمونه های درون چاهک پس از گذاشتن نمونه ها درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد می باشد.

بررسی فعالیت ضداکسیدانی با اندازه گیری ترکیبات فنولی تام و ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد (diphenyl1_2,2_DPPHpicrylhydrazyl_1) انجام شد. اساس کار در این روش، احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۰ نانومتر نشان می دهد. به طور خلاصه در این روش، ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره درون لوله آزمایش با ۱/۱۶۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شدند. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰٪ وزنی/حجمی) به محتوای لوله آزمایش افزوده شد. لوله های آزمایش بعد از تکان دادن و پس از گذشت ۳۰ دقیقه در تاریکی جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. اصول روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید، تشکیل کمپلکس های اسیدی آلومینیوم کلرید با گروه کتو و یا گروه هیدروکسیل فالونوئیدها است که این ترکیبات بیشترین جذب را در طول موج ۴۱۵ نانومتر دارند. در این روش میزان ۰/۵ میلی لیتر از محلول عصاره با ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۹۵٪، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک موالر و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید. بعد از نگهداری نمونه ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، جذب مخلوط در ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. از کوئرستین به منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد.

محلولهایی با غلظت های مختلف ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (از عصاره و نیز آنتیاکسیدان سنتزی DPPH) (BHT) Butylatedhydroxytoluene در حلال متانول آماده شدند. یک میلی لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت یک میلی موالر معادل ۰،۳۹۴ میلی گرم) به ۳ میلی لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت همزده شد. لوله های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت، میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد الزام به ذکر است که در نمونه کنترل، عصاره با ۳ میلی لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکالهای DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه می شود:

$$I \% = ((Ac - As) / Ac) \times 100 \quad (1)$$

که در این رابطه Ac و As به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه است. آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی جهت ارزیابی فعالیت متابولیک سلولی است. فعالیت میتوکندری در سلولهای زنده به صورت پایدار است و بنابراین افزایش یا کاهش تعداد

سلولهای زنده به صورت خطی با فعالیت میتوکندری در ارتباط است. رنگ تترازولیوم در MTT در سلولهای فعال) به لحاظ متابولیکی (احیاء می شود. دهیدروژنازهای میتوکندریایی در سلولهای زنده، حلقه تترازولیوم را شکسته و با تولید NADH و NADPH منجر به تشکیل رسوب نامحلول ارغوانی رنگ به نام فورمازان می شوند. این رسوب میتواند توسط ایزوپروپانول یا دی متیل سولفواکسید (DMSO) حل شود. از سوی دیگر، سلولهای مرده، چنین توانایی را نداشته و بنابراین واکنشی را نشان نمیدهند. در این روش، تشکیل رنگ به عنوان نشانگر سلولهای زنده مورد استفاده قرار می گیرد. بدیهی است که با افزایش غلظت رنگ تولید شده در سلولها، میزان جذب خوانده شده در دستگاه الیزا را بدر افزایش می یابد. در این پژوهش سلولهای فیبروبلاست جنینی موش برای بررسی سمیت سلولی استفاده شد. ابتدا محیط کشت روی سلولها توسط سمپلر خالی شد. سپس ته فالسک را با ۴ میلی لیتر مخلوط PBS/EDTA شست و شو داده شد. در مرحله سوم به آنها مقدار ۵،۰ میلی لیتر آنزیم تریپسین مستقیماً به ته فالسک اضافه کرده و فالسک را به صورت عدد ۸ انگلیسی حرکت داده و مدت زمان کوتاهی آن را درون انکوباتور گذاشته شد. سپس فالسک خارج و محتویات آن را درون یک فالکون ۱۵ میلی لیتری ریخته شد. در مرحله چهارم فالکون را درون دستگاه سانتریفیوژ گذاشته و پس از تنظیم کردن دستگاه (به مدت ۵ دقیقه، ۱۲۰۰ دور در دقیقه) روشن شد. در مرحله پنجم، به دلیل نیروی گریز از مرکز سلولها در ته فالکون ته نشین شدند، به همین دلیل ابتدا سطح رویی را به آرامی خالی شد و سپس مقداری محیط کشت DMEM و یا FB به آن اضافه شد تا آنزیم تریپسین خنثی شود. در مرحله ششم، مقداری محیط کشت غنی شده (DMEM، FBS، Pen/Strep) به آن اضافه شد. مرحله هفتم، در ادامه مقدار ۱۰۰ μL محیط کشت دارای سلول، مقادیرهای ۲، ۱۰، ۲۰، ۵۰ μL از نمونه ها که بیانگر غلظت های ۱۰، ۲۰، ۱۰۰، ۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ می باشند را درون چاهک های پلیت ریخته و در نهایت پلیتها را درون انکوباتور ۳۷ درجه همراه با CO_2 درصد گذاشته تا تست سمیت سلولی آنه را در روزهای ۱، ۳ و ۵ انجام شود. برای انجام تست MTT ابتدا محیط کشت رویی را کاملاً خالی و سپس به هر یک از چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر MTT رقیق شده اضافه و به مدت ۳ ساعت پلیت را درون انکوباتور گذاشته شد. سپس پلیت را بیرون آورده و محیط حاوی MTT رقیق شده به دقت و با سمپلر خالی کرده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد و پیتاژ کرده و بعد از چند دقیقه میزان جذب آن را به کمک دستگاه الیزا در طول موج بین ۵۷۰ تا ۶۳۰ نانومتر با ارتباط مستقیم با تعداد سلول های زنده بررسی شد.

طبق تحقیقات سیران محمدی و همکاران در سال ۱۳۹۹ [۴۰] مطالعه از نوع کارآزمایی بالینی شاهددار تصادفی شده دو سوکور است که البته به آن (Stratified design) نیز گفته می شود. معیارهای ورود شامل تمایل به شرکت در مطالعه داشتن سن ۶۰ سال و بالاتر، ابتلا به اختلال خواب به صورت خود اظهاری و نیز در سطح کلینیکی و با توجه به پرسش نامه پیتزبرگ، توانایی پاسخ دادن به سوالات پرسش نامه، ندانستن سابقه هرگونه حساسیت به به لیمو یا گیاهان تیره شاه پسند، عدم مصرف مداوم (دو بار یا بیشتر در هفته) دمنوش یا عصاره به لیمو در طول یک ماه گذشته، ندانستن مشکلات مربوط به راه هوایی و انسداد بینی بوده. معیارهای خروج نیز شامل تمایل شخصی به خروج از مطالعه، ابتلا به افسردگی، اضطراب یا استرس شدید در طول مداخله، قطع مصرف یا مصرف کردن کمتر از ۲۴ روز متوالی از روغن به لیمو توسط فرد تا قبل از اتمام دوره مداخله، نشان دادن هرگونه واکنش حساسیتی به روغن به لیمو بود. بعد از پرسیدن اطلاعات فوق به بیماران کارتی داده شد که حاوی اطلاعات و کد بود و بر اساس ترتیب به ورود بیماران و اینکه به کدام جدول Balanced-bloc randomization وارد شدند، به آنها کد اختصاص داده شد در این جدول در کنار هر حروف A,B,C,D درج شده است و براساس این حروف داروهای مربوط را که روغن بی اثر یا روغن به لیمو هستند، به بیماران اختصاص داده شد. برای پیشگیری از تورش احتمالی مربوط به جنسیت جدولهای Balanced block randomization به صورت جداگانه برای خانمها و آقایان و نیز با توجه به مصرف داروی موثر روی خواب و بر اساس سن ۶۰ تا ۷۴ سال و ۷۵ سال به بالا تعیین و در مجموع ۸ جدول رسم شد.

مردان مصرف کننده دارو ۶۰ و ۷۴ سال: Balance Block Randomization Table P

مردان مصرف کننده دارو ۷۵ سال به بالا: Balance Block Randomization Table O

مردانی که مصرف کننده دارو نیستند ۶۰ سال تا ۷۴ سال: Balance Block Randomization Table T

مردانی که مصرف کننده دارو نیستند ۷۵ سال به بالا: Balance Block Randomization Table H

زنان مصرف کننده دارو ۶۰ تا ۷۴ سال: Balance Block Randomization Table S

زنان مصرف کننده دارو ۷۵ سال به بالا: Balance Block Randomization Table R

زنانی که مصرف کننده دارو نیستند ۶۰ تا ۷۴ سال: Balance Block Randomization Table L

زنانی که مصرف کننده دارو نیستند ۷۵ سال به بالا: Balance Block Randomization Table M

در موارد Protocol deviation دارو قطع می‌شد و استراتژی به این صورت بود که بیمار به مدت یک پنجم طول دوره مداخله یعنی ۶ روز دارو را قطع کند. آنالیز انجام می‌شد در ابتدای مداخله، سه مورد مشکل سردرد خفیف داشتند که بعد از بررسی مشخص شد که قسمتی از مداخله در پاییز و زمستان انجام می‌شد و قطره‌ها غلیظ و به صورت روغنی و چکاندن در بینی بودند، در سالمندانی که سابقه سینوزیت داشتند جذب کمتر می‌شد و باعث سردردهای مقطعی و کوتاه می‌شد. از ابتدای شروع مطالعه به صورت متوالی، ۹۳ نفر شامل ۴۵ مرد و ۴۸ زن وارد مداخله شدند که ۲۲ نفر از مردان در گروه مداخله، ۲۳ نفر در گروه کنترل، ۲۴ نفر از زنان در گروه مداخله و ۲۴ نفر در گروه کنترل قرار گرفتند و از بین این افراد ۸۵ نفر تا مرحله سوم رفتن موارد ریزش مربوط به بستری در بیمارستان، مرخصی رفتن و فوت بود. بیماران در طی درمان سه بار توسط پزشک ویزیت و عوارض احتمالی بررسی شد. از نظر وجود بیماری‌های مزمن از مجموعه سالمندان پاسخگو در مطالعه حاضر ۸۳ نفر (۹۷/۶ درصد) دارای بیماری مزمن و تنها دو نفر (۲/۴ درصد) اظهار داشتند که فاقد بیماری مزمن هستند. در این مطالعه دو هدف کلی اهداف توصیفی و اهداف تحلیلی دنبال شد که روش تحلیلی داده‌ها به صورت زیر بود در اهداف توصیفی برای متغیرها پاسخ مورد مطالعه که کمی هستند، از شاخص‌های مرکزی و پراکندگی مناسب و برای متغیرهای کیفی از توزیع فراوانی و برای متغیرهای کمی از میانگین و انحراف معیار استفاده شد (جدول شماره ۳، ۴).

جدول ۳- آمارهای توصیفی مربوط به شاخص اختلالات خواب در سه مرحله نمونه گیری

تعداد	میانگین \pm انحراف معیار	گروه	مراحل
۳۴	۱۱/۰۶ \pm ۳/۴۴	گروه کنترل	اختلالات خواب قبل از مداخله
۴۰	۱۱/۰۵ \pm ۴/۳۳	گروه مداخله	
۷۴	۱۱/۰۵ \pm ۳/۹۲	کل	
۳۴	۱۰/۶۵ \pm ۴/۶۲	گروه کنترل	اختلالات خواب دو هفته پس از مداخله
۴۰	۸/۱۷ \pm ۳/۴۳	گروه مداخله	
۷۴	۹/۳۱ \pm ۴/۱۸	کل	
۳۴	۱۲/۷۱ \pm ۳/۴۰	گروه کنترل	اختلالات خواب یک ماه بعد از مداخله
۴۰	۹/۲۰ \pm ۴/۳۱	گروه مداخله	
۷۴	۱۰/۸۱ \pm ۴/۲۷	کل	

جدول ۴- مقایسه میانگین نمره اختلالات خواب بین گروه مداخله و گروه شاهد در طول زمان مداخله

Effect Size	P	F عدد	میانگین \pm انحراف معیار			گروه	نام متغیر
			قبل از شروع مداخله	دو هفته پس از شروع مداخله	یک ماه پس از شروع مداخله		
۰/۱۵۵	۰/۰۰۰۳	۷۸۶/۸۶۲	۴/۳۱ \pm ۱۱/۰۵	۲/۴۳ \pm ۸/۱۷	۴/۳۳ \pm ۱۱/۰۵	مداخله	اختلالات خواب
		۷/۱۴۳	۳/۴۰ \pm ۱۲/۷۱	۴/۶۲ \pm ۱۰/۶۵	۳/۴۴ \pm ۱۱/۰۶	کنترل	خواب

طبق تحقیقات منیره قربانی و همکاران در سال ۱۳۹۹ [۴۱] مطالعه ای به صورت تجربی آزمایشگاهی در سال ۱۰۹۷ با استفاده از ۰۳ عدد رت نر نژاد ویستار انجام شد. این رت‌ها در شرایط آزمایشگاهی با دمای ۲۲۱ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۶۳ درصد، در دانشگاه علوم پزشکی گرگان نگهداری شدند و غذای استاندارد و آب آزادانه در اختیار آنها قرار گرفت. پس از عادت کردن رت‌ها به محیط جدید، دیابت با استفاده از STZ به آنها ایجاد شد. سپس پس از گذشت ۷۲ ساعت، خون گرفته شده از ناحیه دم رت‌ها و میزان قند خون اندازه گیری شد.

برای اطمینان از دیابتی بودن رتھا، یک هفته پس از تزریق، خون گیری مجدد صورت گرفت و رتھایی که قند خون بیش از ۰.۳۳ mg/dL داشتند، به عنوان رتھای دیابتی در نظر گرفته شدند. بعد از این مرحله، ۵ گروه از رتھا در نظر گرفته شدند: یک گروه کنترل که نرمال سالیین به آنها داده شد و ۴ گروه دیگر که به ترتیب روغن خالص مغز گردو بدون افزودن sitosterol-B، روغن خالص مغز گردو با افزودن ۰.۳، ۴۵ و ۹۰ mg/kg sitosterol- به آنها داده شد. روغن خالص مغز گردو مورد استفاده در این مطالعه از شرکت گل کاران کاشان تهیه شده است و تحلیل ترکیبات آن با استفاده از دستگاه های GC و HPLC انجام شده است. همچنین پروفایل اسیدهای چرب و استرولی با استفاده از دستگاه های GC و HPLC مورد بررسی قرار گرفته است. سپس بررسیهای خونی از قبیل اندازه گیری هورمون انسولین، قند خون، کلسترول، تریگلیسرید، HDL، AST، ALT، ALP، بیلروبین و آلبومین صورت گرفته است. مصرف روغن خالص مغز گردو باعث کاهش معناداری در میزان گلوکز خون و کلسترول تری گلیسرید شده است. همچنین، این مصرف باعث بهبود معنی داری در شاخص های بیوشیمیایی دیگر خون مانند ALT، AST، HDL و ALP نیز شده است. در مورد ترکیبات موجود در روغن خالص مغز گردو، اسیدهای چرب مهمی مانند اسید لینولئیک و اسید لینولئیک در آن حضور دارند، که به عنوان اسیدهای چرب مفید برای سلامتی تلقی می شوند. همچنین، میزان بالایی از ترکیبات استرولی مانند sitosterol-B در روغن مغز گردو شناسایی شده است که نشان از ارزش تغذیه های و سالمی آن دارد. در نهایت، نتایج آزمایشات نشان میدهند که مصرف روغن خالص مغز گردو ممکن است بهبود معنی داری در شاخص های بیوشیمیایی خون و بافت کبد ایجاد کند، که این موارد می تواند برای سالمی بدن مفید باشد. مصرف این نوع روغن ممکن است بهبود معنی داری در ساختار بافتی کبد رتھای دیابتی ایجاد کند. به طور خاص، غنی شدن روغن مغز گردو با sitosterol-B منجر به جلوگیری از بی نظمی در صفحات سلول کبدی، کاهش رشته رماک و بازگرداندن شکل ظاهری سینوزوئیدها به حالت طبیعی می شود. این تغییرات بافتی نه تنها به جلوگیری از التهاب، بلکه به ایجاد نظم در صفحات سلول کبدی و بازگرداندن شکل ظاهری سینوزوئیدها به حالت نرمال کمک میکند. نتایج این مطالعه تأیید می کند که sitosterol-B به عنوان آنتی اکسیدان در روغن مغز گردو دارای تأثیر محافظتی در رتھای دیابتی است و غنی کردن روغن با این ترکیب باعث افزایش این اثر محافظتی می شود. علاوه بر این مصرف روغن مغز گردو به همراه sitosterol-B به طور مثبت بر آنزیمهای کبدی رتھای دیابتی اثر محافظتی دارد. با توجه به این نتایج می توان نتیجه گرفت که استفاده از روغن غنی شده با sitosterol-B به عنوان یک ترکیب مفید برای کنترل دیابت و بهبود اثرات ناشی از آن مطرح است.

۳- نتایج و بحث

طبق تحقیقات انجام شده توسط فرخنده نعمتی و همکاران در سال ۱۴۰۲ [۳۸] محققان به این نتیجه رسیده اند که تیمار با ترکیب عصاره اتانول برگ مورد و روغن زیتون در محل زخم، باعث افزایش بیان ژن فاکتور های رشد اندوتلیال عروقی، شبه انسولین-۱ به عنوان مهم ترین عامل در ترمیم زخم های پوستی در موش می باشد. ترکیب حاصل از عصاره برگ مورد و روغن زیتون به روند ترمیم زخم های پوستی سرعت می بخشد طبق آزمایش انجام شده نشان داده شد که تیمار با ترکیب عصاره اتانولی برگ گیاه مورد و روغن زیتون درصد بهبود زخم تا حد زیادی را افزایش می دهد، همچنین باعث افزایش درصد ضخامت پوست و قطر فولیکول مو نسبت به گروه دریافت کننده کرم سولفادیازین نقره ۱ درصد می باشد. این ترکیب تا حد زیادی بر میزان تشکیل کلاژن و رگ زایی هم موثر بوده است. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داده است که استفاده از عصاره برگ مورد و روغن زیتون باعث تسریع انتقال از مرحله التهابی به مرحله هایپرپلازی فیبروبلاست به دلیل افزایش در سنتز کلاژن و عروق خونی می شود [۴۲]. تیمار با پماد عصاره برگ مورد فرایند بهبود زخم را سرعت می بخشد و باعث افزایش سرعت گذر از فاز التهابی به فاز فیرو پلازی و مانع از تخریب بیشتر بافتی در نهایت افزایش روند بهبود زخم می شود [۴۳]. خانواده فاکتور رشد اپیدرمی از پلاکت ها و ماکروفاژ هادر محل آسیب زخم در بافت، تولید و ترشح شده و پس از ترشح در روند تقسیم میتوز و اپی تلیزاسیون، مهاجرت گلبول های سفید به محل زخم و تا حد کمتری آنژیوژنز و افزایش ترشح رشته های کلاژن در محل زخم فعالیت می کنند [۴۴]. فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ همراه با سایر فاکتور های رشد مثل فاکتور رشد مشتق از پلاکت ها در فرایند ترمیم زخم نقش مهمی دارند به طوری که ضخامت درم و

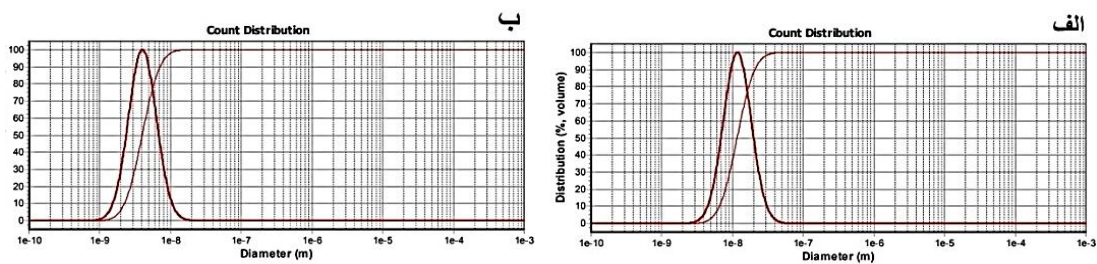
اپیدرم را افزایش می‌دهد. [۴۵] همچنین این فاکتور رشد یک کراتینوسیت میتوزن است و از طریق مسیر وابسته به فاکتور رشد اندوتلیال عروقی باعث رگ‌زایی و بهبود زخم می‌شود [۴۶]. خانواده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی نقش مهمی در نفوذپذیری عروق خونی و اتساع عروق دارد. این فاکتور رشد عروقی خونی جدید را در طول زخم تثبیت می‌کند [۴۷].

با مطالعه روی تاثیر فاکتور رشد فیبروبلاستی بنیادی محققان به این نتیجه رسیدند که افزایش میزان بیان این فاکتور رشد در روند بهبود زخم و ترمیم آن تاثیر بسزایی دارد [۴۸]. خانواده فاکتور رشد اپیدرمال با رگ‌زایی و اپی‌تلیالیزسیون رگ ارتباط قوی دارد. [۴۹، ۵۲] لیگاند های فاکتور رشد اپیدرمال به گیرنده های خود متصل شده و رگ‌زایی و مهاجرت سلول های اندوتلیال را در محل زخم افزایش می‌دهد [۵۳]. ویتامین های E، C، A به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی و ترکیبات فلانوییدی و عناصری مثل روی، مس، سلنیوم به روند ترمیم زخم سرعت می‌بخشد [۵۴]. زیتون حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است که این ترکیبات در ترمیم بافت های تخریب شده و درمان زخم های پوستی نقش دار [۵۵]. طبق تحقیقات انجام شده توسط اشکان زندی و همکاران در سال ۱۴۰۲ [۳۹] نتایج و بحث بررسی اندازه: اندازه و توزیع اندازه نانومولسیون ها با روش پراکندگی دینامیک نوری بررسی شد (جدول ۵).

جدول ۵- نتایج DLS برای نانو امولسیون ها

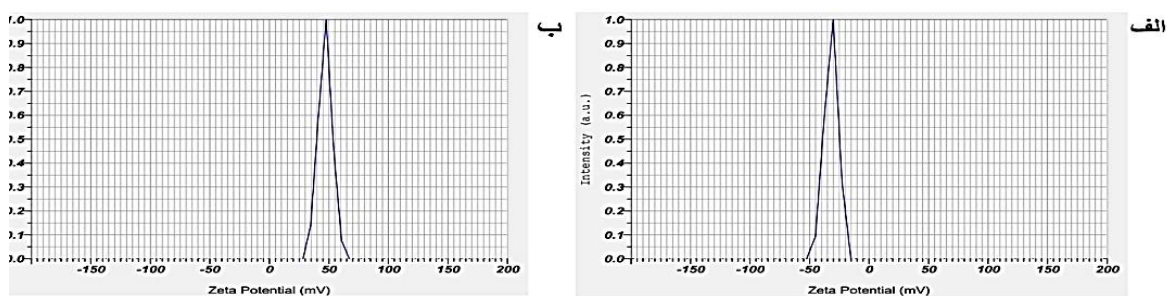
نمونه	نانومولسیون آبی	نانومولسیون متانولی	نانومولسیون با فراکشن آبی	نانومولسیون با فراکشن متانولی	نانومولسیون آبی با کیتوزان ۱٪
اندازه (nm)	۲۱/۶	۱۹۸	۶/۳۸	۸۱/۴	۷/۲۳

بر اساس نتایج نانومولسیون بهینه بر اساس اندازه و پایداری و عدم جدایش فازی نانومولسیون آبی و نانومولسیون آبی با کیتوزان با توزیع اندازه باریک هستند (تصویر شماره ۳).



شکل ۳- نمودار DSL (الف) نانومولسیون آبی (ب) نانو امولسیون آبی با کیتوزان

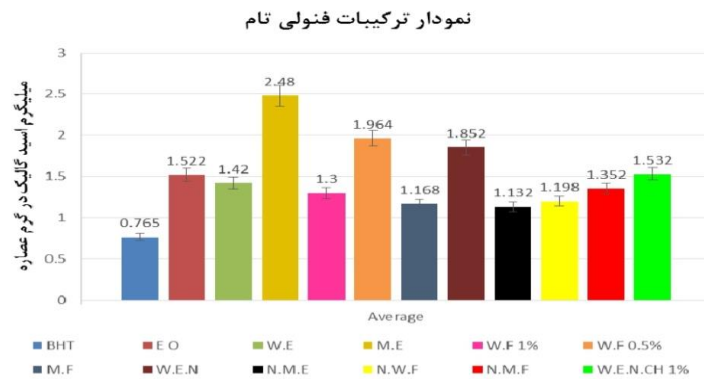
حضور کیتوزان باعث کاهش اندازه شده است، که احتمالاً به دلیل بار کیتوزان و افزایش پایداری نانومولسیون است [۵۶]. پایداری نانومولسیون توسط پتانسیل زتا بررسی شد. پتانسیل زتا برای نانومولسیون آبی و نانومولسیون آبی با کیتوزان به ترتیب برابر با ۳۱- و ۷۰ و ۹۶ میلی ولت است. (تصویر شماره ۴) از این رو افزودن کیتوزان باعث افزایش پایداری نانومولسیون شده است.



شکل ۴- نمودار پتانسیلی زتا (الف) نانو امولسیون آبی (ب) نانو امولسیون آبی با کیتوزان

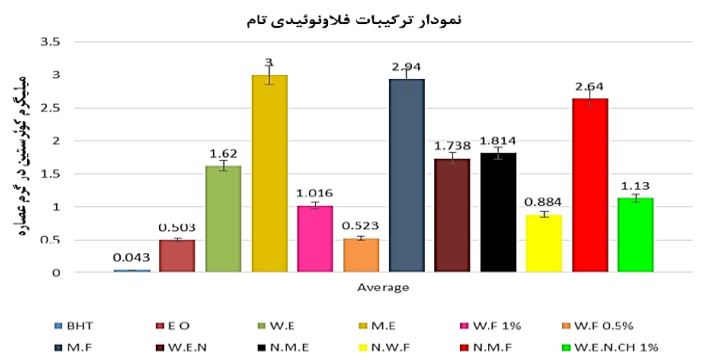
بر اساس نتایج بهترین غلظت مهار کننده برای باکتری E.Coli غلظت ۵۰ برای باکتری Aureus.S غلظت ۱۰/۱۰ ml می‌باشد. و بر اساس نتایج بهترین غلظت مهار کننده برای باکتری Coli.E غلظت ۱۰ و برای باکتری Aureus.S غلظت ۲۰/۲۰ ml است. برای

سنجش ترکیبات فنولی تام، میزان جذب نمونه ها پس از آماده سازی در ۷۶۰ نانومتر با منحنی استاندارد اسید گالیک اندازه گیری شد (تصویر شماره ۵).



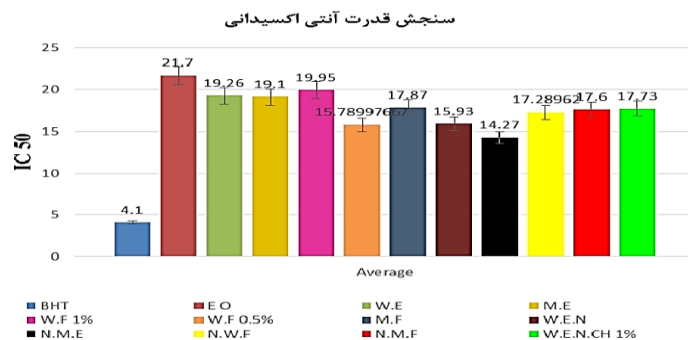
شکل ۵- نمودار ترکیبات فنولی تام بر اساس اسید گالیک

بر اساس نتایج عصاره متانولی بدست آمده در روش حمام روغن دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی بوده و با این که اسانس این گیاه دارای مقدار قابل ملاحظه‌ای از ترکیبات فنولی است، اما در مقایسه با میزان همین مواد در عصاره متانولی بدست آمده در روش حمام روغن بسیار کمتر است. برای سنجش ترکیبات فالونوئیدی تام از روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید با منحنی استاندارد کوئرستین استفاده شد و میزان جذب نمونهها را در ۴۱۵ نانومتر بررسی شد (تصویر شماره ۶).



شکل ۶- نمودار ترکیبات فنولی بر اساس کوئرستین

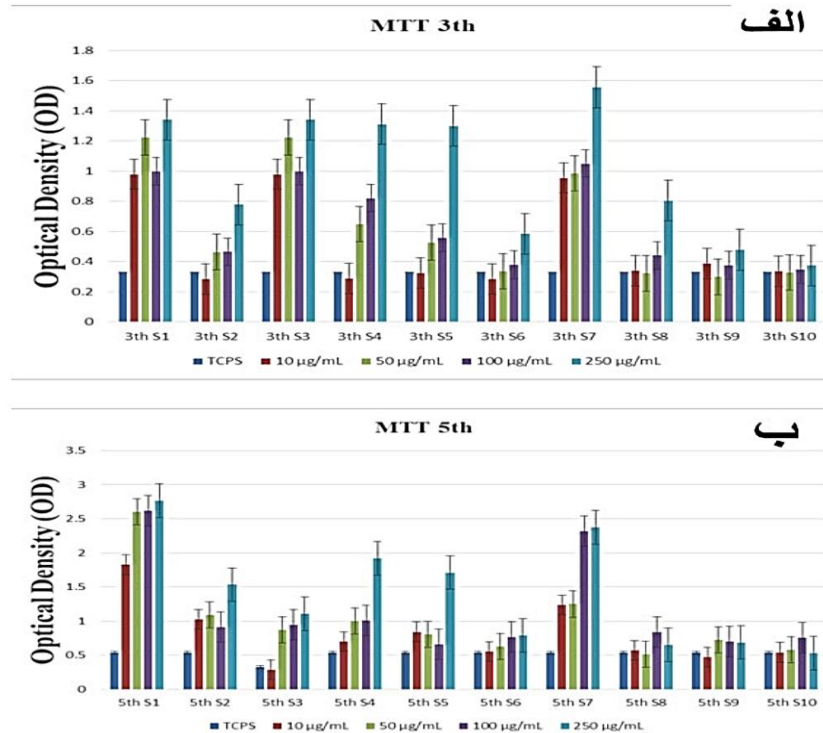
بر اساس نتایج بین عصاره ها، عصاره متانولی و فراکشن متانولی و در بین نانوامولسیونها نانوامولسیون با فراکشن متانولی دارای بیشترین میزان ترکیبات فالونوئیدی است. سنجش قدرت ضداکسیدانی با استفاده از مهار رادیکال آزاد به کمک روش DPPH با بررسی جذب نوری نمونه ها را در طول موج ۵۱۷ نانومتر ارزیابی شد (تصویر شماره ۷).



شکل ۷- مهار رادیکال آزاد به کمک DPPH

بر اساس نتایج فعالیت ضداکسیدانی تمامی نمونه بال است که موید تحقیقات پژوهشگران دیگر است (۵۷-۵۸). نتایج سمیت سلولی در شکل ۸ نشان داده شده است. با توجه به نتایج سمیت سلولی در روزهای سوم و پنجم، نمونه ها نه تنها خاصیت سمی بودن برای سلولهای سالم را ندارند بلکه افزایش غلظت هر یک از نمونه ها موجب افزایش میزان تکثیر سلولها می شوند. از این رو استفاده از

اسانس، عصاره و نانومولسیون های حاوی اسانس و عصاره گیاه پونه می تواند موجب مهار رشد افسار گسیخته سلول های سرطانی شوند.



شکل ۸- تست MTT الف) روز سوم ب) روز پنجم نمونه ها

بر اساس تحقیقات انجام شده توسط سیران محمدی و همکاران در سال ۱۳۹۹ [۴۰] فرضیه مورد بررسی اینگونه بود که میانگین نمره اختلالات خواب سالمندان گروه مداخله و کنترل قبل و بعد از اجرای مداخله با یکدیگر متفاوت است با توجه به نتایج مطالعه فرضیه مورد نظر بررسی و نمره اختلالات خواب سالمندان گروه مداخله نسبت به گروه کنترل کاهش یافت و به عبارت دیگر روغن به لیمو روی اختلالات خواب سالمندان موثر بود. تاثیر آروماتراپی با اسانس اسطوخودوس بر کیفیت خواب پرستاران نشان داد که استنشاق اسانس اسطوخودوس به مدت ۴ هفته به صورت یک روز در میان با سطح معنی داری ۰/۰۰۰۱ باعث کاهش اختلالات خواب در پرستاران شده است که همسو با نتایج مطالعه حاضر بوده است [۵۹].

بازتاب درمانی بر اختلالات خواب موثر نیست و سطح معنی داری ۰/۷۳ به دست آمد که با نتیجه مطالعه حاضر همخوانی ندارد اما در گروه حمام درمانی با سطح معنی داری ۰/۰۰۷ باعث کاهش اختلالات خواب شده است و با نتایج مطالعه حاضر همسو است [۶۰]. مصرف کپسول سدآمین به مدت یک ماه به صورت دو بار در روز با سطح معنی داری ۰/۰۰۱ باعث کاهش میانگین نمره اختلالات خواب زنان یائسه شده و موثر بوده است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد [۶۱].

۴- نتیجه گیری

یافته های پژوهش حاضر نشان دهنده تاثیر گذاری چشم گیر ترکیب عصاره برگ مورد و روغن زیتون در تسریع دوره ترمیم کامل در محل زخم هاست. غنی شدن روغن مغز گردو با sitosterol-B منجر به جلوگیری از بی نظمی در صفحات سلول کبدی، کاهش رشته رماک و بازگرداندن شکل ظاهری سینوزوئیدها به حالت طبیعی می شود. بر اساس نتایج به دست آمده، استفاده از روغن به لیمو به عنوان یک روش درمانی مکمل و بی عارضه بر اختلال خواب سالمندان پیشنهاد می شود. کیتوزان به دلیل زیست سازگاری، و خواص ضد باکتری به عنوان ماده زیستی طبیعی جهت اصلاح نانومولسیون بهینه استفاده شد.

۵- منابع

1. Alvites R, Branquinho M, Sousa AC, Lopes B, Sousa P, Maurício AC. Mesenchymal stem/stromal cells and their paracrine activity-immunomodulation mechanisms and how to influence the therapeutic potential. *Pharmaceutics*. 2022; 14(2):381.
2. Garoufalia Z, Papadopetraki A, Karatza E, Vardakostas D, Philippou A, Kouraklis G, et al. Insulin-like growth factor-I and wound healing, a potential answer to non-healing wounds: A systematic review of the literature and future perspectives. *Biomed Rep*. 2021;15(2):66.
3. Blanco-Fernandez B, Castaño O, Mateos-Timoneda M, Engel E, Pérez-Amodio S. Nanotechnology approaches in chronic wound healing. *Adv Wound Care*. 2021;10(5):23456.
4. Zhu Y, Wang Y, Jia Y, Xu J, Chai Y. Roxadustat promotes angiogenesis through HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 signaling and accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen*. 2019; 27(4):324-34.
5. Haj Ebrahimi Z, Naderi MS, Tabaie SM. [Study of gene expression and nanotechnology in wound healing process (Persian)]. *J Lasers Med*. 2016; 13(2 & 3):50-63.
6. Rezaie A, Mohajeri D, Khamene B, Nazeri M, Shishehgar R, Zakhireh S. Effect of myrtus communis on healing of the experimental skin wounds on rats and its comparison with zinc oxide. *Curr Res J Biol Sci*. 2012; 4(2):176-85.
7. Goli M, Samare Mousavi S, Rahbarian R, Rajabiyan M. [The effect of crocin and safranal components of saffron on skin wound healing in streptozotocin-induced diabetic rat (Persian)]. *Jundishapur Sci Med J*. 2022; 21(1):42-53.
8. Massoud D, Fouada MMA, Sarhan M, Salama SG, Khalifa HS. Topical application of Aloe gel and/or olive oil combination promotes the wound healing properties of streptozotocin-induced diabetic rats. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022;29(39):59727-35.
9. Izquierdo P, Esquena J, Tadros TF, Dederen JC, Feng J, Garcia-Celma MJ, et al. Phase behavior and nanoemulsion formation by the phase inversion temperature method. *Langmuir* 2004;20:6594-8.
10. Guglielmini G. Nanostructured novel carrier for topical application. *Clin Dermatol* 2008;26:3416.
11. Anton N, Benoit J.P, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates: a review. *J Control Release*. 2008; 128:185-199
12. Ee SL, Duan X, Liew J, Nguyen QD. Droplet size and stability of nanoemulsions produced by the temperature phase inversion method. *Chem Eng Sci* 2008; 140:626-631.
13. Porras M, Solans C, Gonzales C, Martínez A, Guinart A, Gutierrez J.M. Studies of formation of W/O nanoemulsions. *Colloids Surf A* 2004; 249:115-118
14. Al-Edresi S, Baie S. Formulation and stability of whitening VCO-in-water nano-cream. *Pharm Nanotechnol* 2009; 373:174-178.
15. Izquierdo P, Feng J, Esquena J, Tadros T.F, Dederen J.C, Garcia M.J, Azemar N, Solans C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. *Colloid Interface Sci* 2005; 285:388-394.
16. Sole I, Maestro A, Gonzales C, Solans C, Gutierrez J.M. Optimization of nanoemulsion preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. *Langmuir* 2006; 22:8326-8332
17. McClements D.J. Edible lipid nanoparticles: digestion, absorption, and potential toxicity. *Prog Lipid Res* 2013; 52:409-423.
18. Pinheiro A.C, Coimbra M.A, Vicente A.A. In vitro behaviour of curcumin nanoemulsions stabilized by biopolymer emulsifiers Effect of interfacial composition. *Food Hydrocoll* 2016; 52:460467.
19. Bruna J, Peñaloza A, Guarda A, Rodríguez F, Galotto M. Development of MtCu²⁺/LDPE nanocomposites with antimicrobial activity for potential use in food packaging. *Appl Clay Sci* 2012; 58:79-87.
20. Miraj S, Kiani S. Study of pharmacological effect of Mentha pulegium: A review. *Der Pharmacia Lettre* 2016; 8:242-245.
21. Aires A, Marrinhas E, Carvalho R, Dias C, José Saavedra M. Phytochemical composition and antibacterial activity of hydroalcoholic extracts of Pterospartum tridentatum and Mentha pulegium against Staphylococcus aureus isolates. *BioMed Res Int* 2016; 2016:1.
22. Baris O, Karadayi M, Yanmis D, Guvenalp Z, Bal T, Gulluce M. Isolation of 3 flavonoids from Mentha longifolia (L.) Hudson subsp. longifolia and determination of their genotoxic potentials by using the E. coli
23. Spence AP. Biology of human aging. Tehran: Publication of University of Welfare and Rehabilitation Sciences; 1929. p. 354.

24. Marasinghe C. Sleep disorders in elderly. Journal of the Ceylon College of Physicians. 2014; 43(1-2).
25. Grewal RG, Doghramji K. Epidemiology of insomnia. Clinical handbook of insomnia. Berlin, Germany: Springer; 2017. pp. 13-25.
26. Nobahar M, Vafai AA. Assessment of Elderlies Sleep Disorders and Different Confronts Methods Among Them. Iranian Journal of Ageing. 2007; 2(2):263-8.
27. Abbasi B, Kimiagar M, Sadeghniaat K, Shirazi MM, Hedayati M, Rashidkhani B. The effect of magnesium supplementation on primary insomnia in elderly: A double-blind placebo-con-trolled clinical trial. Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences. 2012; 17(12):1161.
28. Sasai T, Inoue Y, Komada Y, Nomura T, Matsuura M, Matsush-ima E. Effects of insomnia and sleep medication on health-related quality of life. Sleep medicine. 2010; 11(5):452-7.
29. Winograd, M. (2017). Understanding the Predictors of posttraumatic growth among those with a history of a reproductive trauma. Seton Hall University Dissertations and Theses (ETDs). 2319.
30. Vashist, S.K., Luong, J.H. (2017). Diabetes: a growing epidemic and the need for point-of-care testing Point-of-care Glucose Detection for diabetic monitoring and management. CRC Press, p;1128.
31. Colberg, S.R., Sigal, R.J., Yardley, J.E., Riddell, M.C., Dunstan, D.W., Dempsey, P.C., et al. (2016). Physical activity/exercise and diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. Diabetes care. 39(11); 2065-79.
32. Xia, H., Dufour, C.R., Giguère, V. (2019). ERRα as a bridge between transcription and function: role in liver metabolism and disease. Frontiers in endocrinology, 10; 206-215.
33. Zhou, R., Fan, X., Schnabl, B. (2019). Role of the intestinal microbiome in liver fibrosis development and new treatment strategies. Translational Research, 209; 22-38.
34. Salimi, A., Ahmadi, R., Khezerloo, J.K. (2017). Assessment of biochemical parameters after exposure to ultrasound waves; an in vivo study. Biomedical Research, 28(1);13-21.
35. Iglesias, M.M.R., Grajeda, D.M.V., Parra, M.F., Aguilera, A.A., Galindo, H.S.G. (2019). Conjugated linoleic acid supplemented diet influences serum markers in orchidectomized sprague dawley rats. European Journal of Lipid Science and Technology.
36. Fink, A., Rüfer, C.E., Le Grandois, J., Roth, A., Aoude-Werner, D., Marchioni, E., et al. (2014). Dietary walnut oil modulates liver steatosis in the obese Zucker rat. European Journal of Nutrition, 53(2);645-60.
37. Taha, N.A., Al-wadaan, M.A. (2011). Utility and importance of walnut, Juglans regia Linn. A. African Journal of Microbiology Research, 5(32); 5796-805 .
38. Yang, J. (2009). Brazil nuts and associated health benefits: A review. LWT-Food Science and Technology, 42(10);1573-1580
۳۹. فرخنده نعمتی ، روح الله عبدالله پور ، سمانه سلیمانی راد، هاجر پور علی ، فاطمه قهاری. ۱۴۰۲. ارتباط اثرات بیولوژیکی برگ مورد و روغن زیتون با بیان ژن های مرتبط با التیام زخم در موش آزمایشگاهی . مجله دانشگاه علوم پزشکی قم. ۱۵ الی ۱۵
۴۰. اشکان زندیه ف نگار معتکف کاظمی ، نبی شریعتی فر، علی سلیمی، راحله حلییان. ۱۴۰۲. فعالیت ضد باکتری و ضد اکسیدانی نانوامولسیون روغن در اب اسانس و عصاره پونه . مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی . ۴. ۳۵۵ الی ۳۶۴
۴۱. سیران محمدی ، رباب صحاف، مهرداد کریمی ، احمد علی اکبری کامرانی ، محسن شتی ، ارش میراب زاده ، غلامرضا انصاری. ۱۳۹۹. بررسی تاثیر روغن به لیمو بر اختلالات خواب سالمندان ، مطالعه کار آزمایشی بالینی دوسورکو . مقاله پژوهشی سالمند ۱ .
۴۲. منیره قربانی ، عبد الحین شروری ، غلام حسن واعظی ، ویدا حجتی ، حمید سپهری. ۱۳۹۹. بررسی تاثیر مغز گردو غنی شده با B-sitoserol در شاخص های خونی و عملکردی کدی رتهای مبتلا به دیابت. فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری .
43. Nemat F, Atae R, Gorji F, Houseini ST, Lotvarzi A, Bagheri Hashem Abad A. [The effect of combining mord (Myrtus communis) leaf extract and olive oil (Olea europaea) in comparison with silver sulfadiazine cream on skin wound healing in Balb/c mice (Persian)]. Sci Res Q J Biol Sci Iran. 2022; 16(4):15-24.
44. Aleem M, Anis M. Therapeutic potential of Habb-ul-Aas (Myrtus communis Linn.) with unani perspective and modern pharmacology: A review. J Pharmacogn Phytochemistry. 2021;10(1):910-23.
45. Gharaboghaz MNZ, Farahpour MR, Saghaie S. Topical coadministration of Teucrium polium hydroethanolic extract and Aloe vera gel triggered wound healing by accelerating cell proliferation in diabetic mouse model. Biomed Pharmacother. 2020; 127:110189.
46. Basu S, Goswami AG, David LE, Mudge E. Psychological stress on wound healing: A silent player in a complex background. Int J Low Extrem Wounds. 2022.

47. Balaji S, LeSaint M, Bhattacharya SS, Moles C, Dhamija Y, Kidd M, et al. Adenoviral-mediated genetransfer of insulinlike growth factor 1 enhances wound healing and induces angiogenesis. *J Surg Res*. 2014.
48. Johnson T, Zhao L, Manuel G, Taylor H, Liu D. Approaches to therapeutic angiogenesis for ischemic
49. Zhu J, Zhang M, Gao Y, Qin X, Zhang T, Cui W, et al. Tetrahedral framework nucleic acids promote scarless healing of cutaneous wounds via the AKT-signaling pathway. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):120.
50. Koike Y, Yozaki M, Utani A, Murota H. Fibroblast growth factor 2 accelerates the epithelial-mesenchymal transition in keratinocytes during wound healing process. *Sci Rep*. 2020;10(1):18545.
51. Totoli EM, Dorat R, Genta I, Chiesa E, Pisani S, Cont B. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics*. 2020;12(8):735.
- Bártolo I, Reis RL, Marques AP, Cerqueira MT. Keratinocyte growth factor-based strategies for wound re-epithelialization. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022; 28(3):665-76.
52. Blaber SI, Diaz J, Blaber M. Accelerated healing in NONcNZO10/LtJ type 2 diabetic mice by FGF-1. *Wound Repair Regen*. 2015; 23(4):538-49. [DOI:10.1111/wrr.12305] [PMID]
- Ronca R, Giacomini A, Rusnat M, Presta M. The potential of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptors signaling as a therapeutic target in tumor angiogenesis. *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 19(10):1361-77.
53. Michalak M, Pierzak M, Kręćisz B, Suliga E. Bioactive compounds for skin health: A review. *Nutrients*. 2021; 13(1):203.
54. Melguizo-Rodríguez L, de Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Illescas-Montesa R, Costela-Ruiz VJ, García-Martnez O. Potential effects of phenolic compounds that can be found in olive oil on wound healing. *Foods*. 2021.
55. Langaroudi F, Motakef Kazemi N. Preparation and characterization of O/W nanoemulsion with Mint essential oil and Parsley aqueous extract and the presence effect of chitosan. *Nanomed Res J* 2019; 4:48-55.
56. Kamkar A, Shariatifar N, Jamshidi A, Jebelli Javan A, Sadeghi T, Zeagham Monfared M. In vitro evaluation of antioxidant activity of Iranian *Mentha longifolia* essential oil and extracts. *J Med Plant* 2012; 1:185-194.
57. Kamkar A, Javan A.J, Asadi F, Kamalinejad M. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food Chem Tox* 2010; 48:1796-1800
58. Moghadam K, Farmahini Farahani M, Sajadi M, Sarmadian H, Norouzi Zamenjani M, Heydari HR. The effect of lavender oil aromatherapy on sleep quality of the intensive care unit nurses. *Complementary Medicine Journal of Arak*. 2016; 5(4):1303-13.
59. Nasiri K, Jafari M, Eyvanbaga R, Savadpoor M, Seyyedrasooli A. Comparing the effects of reflexology and foot bath on sleep quality. *Complementary Medicine Journal of faculty of Nursing & Midwifery*. 2015; 5(1):1077-90.
60. Ekbatani N, Taavoni S, Haghani H. The effect of valerian on sleep component among menopausal women. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*. 2012; 19(2):190.