



# دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده طب ایرانی

پایان نامه مقطع دکترای تخصصی (Ph.D.)

عنوان:

تهیه و استاندارد سازی فرآورده طب سنتی ایرانی ترمیم سوختگی ضماد آس (مورد) و فرمولاسیون نیوزومی آن و ارزیابی برون تنی اثرات ترمیمی

توسط:

محبوبه رئیس زاده

اساتید راهنما:

دکتر میترا مهربانی

دکتر فریبا شریفی فر

دکتر عباس پرداختی

اساتید مشاور:

دکتر علیرضا فارسی نژاد

دکتر مهرناز مهربانی

سال تحصیلی: ۹۶-۱۳۹۵

## چکیده فارسی

مقدمه و اهداف: مورد به عنوان یک گیاه دارویی از زمانهای قدیم در درمان بیماریهای مختلف من جمله زخم به کار می رفته است. تعدادی از ویژگی های قابل توجه مورد شامل اثرات آنتی اکسیدان، آنتی میکروبیال، ضد التهاب و آنتی سپتیک، این گیاه را به عنوان گزینه مناسبی جهت درمان زخم و سوختگی مطرح می کند. با این وجود عواملی مانند حالیت و نفوذپذیری کم عصاره مورد و همچنین تبخیر و تخریب راحت اسانس مورد استفاده درمانی این گیاه را محدود کرده است. با توجه به مشکلات ذکر شده، مطالعه پیش رو با هدف توسعه فرمولاسیون های نیوزومی گیاه مورد و بررسی اثرات آن ها بر برخی از مکانیسم های دخیل در ترمیم زخم انجام شده است.

روش تحقیق: به طور خلاصه فرمولاسیون های نیوزومی متعدد با استفاده از ترکیب سورفکتانت های غیر یونی و کلسترول با نسبت های مولی مختلف ساخته شد. سپس سایز، درصد محبوس سازی، درصد آزادسازی و پایداری فیزیکی فرمولاسیون های نیوزومی ساخته شده از عصاره و اسانس مورد تعیین شدند. در مرحله بعد اثرات آنتی میکروبیال عصاره و اسانس مورد و همچنین فرمولاسیون نیوزومی آن ها در برابر استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، اشرشیا کلی، باسیلوس سابتلیس و میکروکوکوس لوتئوس ارزیابی شد. در پایان تاثیر عصاره و اسانس مورد و همچنین فرمولاسیون های نیوزومی آن ها بر زمان زنده ماندن رده سلولی فیروبلاست پوست موش (3T3) و سلولهای اندوتلیالی ورید بند ناف انسان (HUVEC) با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. همچنین اثر فرمولاسیونها بر قدرت رگ زایی سلولهای اندوتلیالی ورید بند ناف انسان با استفاده از متود ایجاد خراش (Scratch) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: سایز نیوزوم های عصاره بین  $0.3 \pm 5/3$  و  $2/2 \pm 15/9$  میکرون و پتانسیل زتا بین  $0.3 \pm 4/1$  و  $1/9 \pm 26/9$  میلی ولت بود. همچنین در مورد فرمولاسیون های نیوزومی حاوی اسانس سایز بین  $0.3 \pm 6/17$  و  $0.6 \pm 17/24$  میکرون و پتانسیل زتا در رنج  $0.17 \pm 20/41$  و  $0.45 \pm 31/75$  میلی ولت به دست آمد. بیشترین درصد محبوس سازی مربوط به فرمولاسیون F6 از بین نیوزوم های عصاره و همچنین E6 (اسپن: توپین: کلسترول با نسبت مولی ۲/۵: ۲/۵: ۵) در بین فرمولاسیونهای نیوزومی اسانس بود. نتایج مطالعات آزادسازی به روش برون تنی بر روی فرمولاسیون های F5 و E6 حاکی از آزادسازی طولانی مدت عصاره و اسانس بود، که در واقع نیوزوم به عنوان یک سیستم ذخیره برای آزادسازی پیوسته ترکیبات گیاهی عمل می کند. فرمولاسیون های F5 و E6 اثرات آنتی میکروبیال قوی تری نسبت به اسانس و عصاره بر اساس حداقل غلظت مهارکننده رشد پایین تر و هاله عدم رشد بزرگتر

نشان دادند. همچنین فرمولاسیون های نیوزومی به طور معناداری سمیت کمتری بر روی سلول ها داشتند و رگ زایی را در سلول های HUVEC افزایش دادند.

بحث و نتیجه گیری: فرمولاسیون F5 حاوی ۴٪ عصاره مورد و فرمولاسیون E6 حاوی ۵٪ اسانس وزیکول های چند لایه پایدار با آزادسازی و درصد محبوس سازی بهینه تولید کردند. همچنین این فرمولاسیون ها اثرات آنتی میکروبیال بهتر با سمیت سلولی کمتر را در مقایسه با عصاره و اسانس ایجاد کردند. در نهایت نتایج مطالعه حاضر توجیه علمی برای استفاده از فرمولاسیون نیوزومی مورد در ترمیم زخم را نشان می دهد.

واژگان کلیدی: مورد، نیوزوم، آنتی میکروبیال، سمیت سلولی، آنتی اکسیدان

## ENGLISH ABSTRACT

**Background and Objective:** As a medicinal herb, *Myrtus communis* L. (Myrtle) has been widely used in traditional remedies for curing of several medical conditions such as wounds. Some important properties make myrtle a good candidate for healing the wounds including antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and antiseptic activities. However, there are some factors, namely, low solubility and permeability of myrtle extract (ME) and simply evaporation and decomposition of myrtle essential oil (MEO), restrict use of myrtle in medical applications. Regarding these limitations, the current study was undertaken to develop a new niosomal myrtle formulation and investigate its effect on some molecular mechanisms involved in the wound healing process.

**Methods:** Briefly, several niosomal formulations were prepared by non-ionic surfactants and cholesterol with different molar ratios. Afterward, size, zeta potential, entrapment efficiency (EE%), release and physical stability of myrtle extract niosome (nME) and myrtle essential oil niosome (nMEO) were investigated. In the next step, *in vitro* antibacterial activity of ME, nME, MEO and nMEO was assessed against *staphylococcus aureus*, *staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, and *Bacillus subtilis*. Finally, the effect of ME, nME, MEO and nMEO on viability of HUVECs and 3T3 fibroblast was evaluated using MTT assay. Moreover, cell migration activity of ME, nME, MEO and nMEO was evaluated by scratch assay on HUVECs.

**Results:** Sizes of nME were  $5.3 \pm 0.3$  to  $15.9 \pm 2.2$   $\mu\text{m}$  with  $4.1 \pm 0.3$  to  $26.9 \pm 1.7$  mV zeta potential. Moreover, values for nMEO size and zeta potential ranged from  $6.17 \pm 0.32$  to  $7.24 \pm 0.61$  ( $\mu\text{m}$ ) and  $-20.41 \pm 0.17$  to  $-31.75 \pm 0.45$  (mV), respectively. Higher degrees of EE% were obtained by F6 and E6 (Span60: Tween60: Cholesterol (2.5:2.5:5 molar ratio)) in nME and nMEO formulations, respectively. An *in vitro* release study on F5 (Span60: Tween60: cholesterol (3:3:4 molar ratio)) and E6 formulations revealed prolonged-release characteristics of ME and MEO, where niosomes act as a reservoir system for continuous delivery of phytoconstituents. F5 and E6 had higher antibacterial activity that has been shown by lower MICs and higher zone of inhibition compared to ME and MEO, respectively. Furthermore, they significantly showed lower toxicity on cells and enhanced migration potentials of HUVECS.

**Conclusion:** Overall, F5 in the presence of 4% ME and E6 in the presence of 0.5% MEO produced stable multi lamellar vesicles with optimum *in-vitro* release and EE%. These formulations also exhibited better antibacterial activity and lower cytotoxicity compared to

ME and MEO. Taken together, present study has provided a scientific basis for the ethno-medicinal use of myrtle niosomal formulation in wounds healing.

Keywords: *Myrtus communis*, Myrtle, Niosome, Antibacterial activity, Cytotoxicity, Anti oxidant