

Research Paper

Fabrication and Characterization of Silibinin-loaded Liposomes for Skin Wounds Healing

Mohammad Taebpour¹ , Hamidreza Javadi² , Hadi Sardarabadi³ , Mohammad Hasan Darvishi^{2*} 

1. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

2. Nanobiotechnology Research Centre, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Faculty of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.



Citation Taebpour M, Javadi H, Sardarabadi H, Darvishi MH. Fabrication and Characterization of Silibinin-Loaded Liposomes for Skin Wounds Healing. *Qom Univ Med Sci J.* 2023; 17:E2832.1. <https://doi.org/10.32598/qums.17.2832.1>

doi <https://doi.org/10.32598/qums.17.2832.1>

Received: 14 Feb 2023

Accepted: 12 Jun 2023

Available Online: 20 Dec 2023

ABSTRACT

Background and Objectives: Silibinin, an antioxidant, is used to prevent and treat skin inflammatory disorders. This study aimed to develop a liposomal silibinin formulation to increase its bioavailability and water solubility and control its kinetic release to improve the healing process of skin wounds.

Methods liposomes carrying silibinin were prepared using the thin film method. The loading capacity and drug release kinetics were evaluated using the reading drug absorption in the suitable wavelength. The particle size and surface potential (ζ -potential) of nanosystems were determined using dynamic light scattering technique. Lipid nanoparticle morphology was determined using a scanning electron microscope. An MTT assay was then used to determine the cytotoxicity on human skin fibroblasts. The obtained data were analyzed using a 1-way analysis of variance in SPSS software, version 18.

Results The particle size and ζ -potential of liposomal nanoparticles with silibinin optimized liposomal silibinin are 112 ± 9.07 nm and -14.5 ± 2.2 mV, respectively. The encapsulation of silibinin in liposome was $84\% \pm 5.3\%$, and the total drug release at 37°C during 24 h was $67.3\% \pm 4.98\%$. In addition, the results of cellular toxicity showed that silibinin alone or liposomes containing silibinin do not have cytotoxicity on healthy human fibroblasts. Further, encapsulated silibinin versus its free form promotes the growth of fibroblast healthy cells.

Conclusion The results show that a nanoliposomal silibinin formulation can be used as a nanodrug containing an effective herbal agent for speeding up the healing of skin wounds.

Keywords:Liposomes, Silibinin,
Local drugging,
Wound healing*** Corresponding Author:**

Mohammad Hasan Darvishi

Address: Faculty of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

Tel: +98 (912) 419 7610

E-Mail: darvishi@alumnus.tums.ac.ir

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Introduction

Flavonoids, as natural phenolic compounds, are considered a strong complex for disease prevention. However, the use of these biodegradable compounds has received less attention. Silibinin is a semi-purified fraction of silymarin found in the milk thistle plant. Silymarin may stimulate epithelialization and reduce inflammation in cut wounds. However, the healing properties of silibinin have not been well studied. This study investigates the synthesis of liposomal slow-release nanosystems containing the active ingredient silibinin and its effect on human skin fibroblast cells. We intended to improve the biological function of silibinin as an effective drug in healing inflammatory skin wounds.

Methods

First, a series of dilutions with specific concentrations of silibinin were prepared and read using a plate reader at a maximum wavelength of 286 nm to draw the standard curve of the effective ingredient silibinin. The silibinin line diagram was drawn in isopropanol and phosphate buffer saline (PBS) solvents. Also, soy phosphatidylcholine and cholesterol were used in different ratios to synthesize liposomal nanoparticles using the rotary thin film method. In this method, a specific amount of phospholipid and cholesterol, along with the effective ingredient silibinin, was weighed, dissolved in the organic solvent chloroform, and transferred to a round bottom balloon. The rotary device was set at a temperature of 45°C and rotation of 1500 rpm and the raw materials of liposome synthesis were mixed for 45 min. In the next step, the vacuum pump was turned on until the used chloroform was evaporated entirely, then the device was completely vacuumed to form a thin lipid film. Then, to hydrate the thin film, a specific amount of PBS solvent was used at a temperature of 50°C and a rotating wheel of 1500 rpm to form a milky-colored suspension at the bottom of the balloon. The solution was collected, and after sonication and passing through a 200-nm filter, it was kept in the refrigerator for the next steps. After the synthesis of liposomal nanoparticles, the amount of silibinin inclusion in the liposomal nanoparticles was investigated to optimize the formulation and characterization of the nanoparticles. The liposome suspension was mixed in an organic solvent of isopropanol with a ratio of one to ten until the lipid layer of the nanoparticles was broken and the drug was released. Then, it was read at the maximum wavelength of 286 nm using a plate reader. In addition, the system's pen-

etration amount was determined using the corresponding standard graph line equation. Also, the diffusion method from the dialysis bag in PBS solvent was used to check the release rate of silibinin from liposomal nanoparticles. The release kinetics of the lipid system were drawn based on the line equation of the standard PBS diagram. The size and ζ -potential of liposomal nanoparticles containing silibinin were measured and reported using a dynamic light scattering (DLS) device. The morphology of the optimal liposomal system was investigated and reported through scanning electron microscopy (SEM). To investigate the cytotoxicity and the effect of silibinin on human skin fibroblast cells, the cytotoxicity test (MTT) was used. The relevant results were analyzed and reported using a 1-way analysis of variance.

Results

Our study shows that the penetration rate of the optimal liposomal system containing silibinin in formulation number 2 was reported to be 84%, which is acceptable based on retrospective studies. Also, silibinin release kinetics in the optimal formulation 2 follows a two-phase model. In this study, the release of silibinin from liposomal nanoparticles at 37°C is reported as 67%. The size and ζ -potential of liposomal nanoparticles containing silibinin were reported using a DLS device and found to be 112 nm and -14.5 mV for the optimal formulation 2, respectively. The morphology of liposomal nanoparticles containing silibinin is spherical, and the spread was one-handed. Also, the results of the cytotoxicity test (MTT) showed that not only silibinin and liposomes containing it did not have any cytotoxicity on healthy human fibroblast cells, but also increased the growth of these cells in higher concentrations compared to the control state. Also, drug-free liposomes were completely safe and did not have a negative and lethal effect on fibroblast cells.

Conclusion

The results showed that silibinin, a safe herbal medicine, can be used to treat skin injuries. In addition to lacking any cytotoxicity on the skin structure, this effective substance can also benefit damaged skin cells as an antioxidant and an anti-inflammatory agent. On the other hand, nano-encapsulation technology can play an important role in improving the optimal performance of effective plant substances. In general, this new technology can play a significant role in making and replacing optimal formulations with chemical drugs with dangerous side effects.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of [Shahid Sadougi University of Medical Sciences](#) (Code: IR.SSU.RSL.REC.1398.038).

Funding

This research did not receive any grant from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

Authors contributions

The authors equally contributed to preparing this article

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

Authors are grateful to all people who have contributed to this project.

مقاله پژوهشی

ساخت و مشخصه‌یابی لیپوزوم‌های بارگذاری شده با سیلیبینین جهت درمان زخم‌های پوستی

محمد طائب‌پور^۱، حمیدرضا جوادی^۲، هادی سردارآبادی^۳، *محمدحسن درویشی^۴

۱. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.

۲. مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران.

۳. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.



Citation Taebpour M, Javadi H, Sardarabadi H, Darvishi MH. Fabrication and Characterization of Silibinin-Loaded Liposomes for Skin Wounds Healing. *Qom Univ Med Sci J*. 2023; 17:E2832.1. <https://doi.org/10.32598/qums.17.2832.1>

doi <https://doi.org/10.32598/qums.17.2832.1>

چکیده

تاریخ دریافت: ۲۵ بهمن ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش: ۲۲ خرداد ۱۴۰۲

تاریخ انتشار: ۲۹ آذر ۱۴۰۲

زمینه و هدف: سیلیبینین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی برای پیشگیری و درمان اختلالات التهابی پوست استفاده می‌شود. هدف از این پژوهش ساخت فرمولاسیون لیپوزومال سیلیبینین جهت افزایش زیست‌فراهمی و حلالیت این ماده در آب و همچنین کنترل کنتیک رهایش آن با هدف بهبود روند درمان آسیب‌های پوستی است.

روش بررسی: لیپوزوم حاوی سیلیبینین به روش فیلم نازک تهیه شد. میزان بارگذاری و کنتیک رهایش دارو با استفاده از خوانش جذب دارو در طول موج مناسب مورد بررسی قرار گرفت. اندازه ذرات و بار سطحی (پتانسیل زتا) نانوسامانه‌ها با استفاده از تکنیک پراکندگی نور پویا تعیین شد. مورفولوژی نانوذرات لیپیدی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مشخص شد. سمیت سلولی با روش رنگ‌سنجی سمیت سلولی بر روی سلول‌های فیبروبلاست پوستی انسان بررسی شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (آنووا) تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانوذرات لیپوزومال حاوی سیلیبینین در فرمولاسیون بهینه به ترتیب 9.07 ± 112 نانومتر و $22/2 \pm 14/5$ میلی‌ولت بود. میزان انکپسوله‌شده سیلیبینین در لیپوزوم $84 \pm 5/3$ درصد و میزان رهایش جمعی دارو در دمای 37°C در مدت ۴۸ ساعت ۶۷/۳±۴/۹۸ درصد بود. همچنین نتایج ارزیابی سمیت سلولی نشان دادند هم سیلیبینین به‌تنهایی و هم لیپوزوم‌های حاوی سیلیبینین بر روی سلول‌های سالم فیبروبلاست انسانی اثرات سمی نداشته‌اند. علاوه بر آن، سیلیبینین در حالت انکپسوله نسبت به حالت آزاد در افزایش رشد سلول‌های سالم فیبروبلاستی تأثیر گذار بوده است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهند فرمولاسیون نانولیپوزومال سیلیبینین می‌تواند به‌عنوان یک نانوداروی حاوی ماده مؤثره گیاهی برای تسریع بهبود زخم‌های پوستی به کار رود.

کلیدواژه‌ها:

لیپوزوم‌ها، سیلیبینین، دارورسانی موضعی، ترمیم زخم

* نویسنده مسئول:

محمدحسن درویشی

نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی.

تلفن: ۰۲۱-۴۱۹۷۶۱۰ (۹۱۲) +۹۸

رایانامه: darvishi@alumnus.tums.ac.ir

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

مقدمه

مواد و روش‌ها

ماده مؤثر سیلیبینین، کلسترول، بافر فسفات سالین^۲، پودر^۳ - (۴/۵ - دی متیل تیزاول - ۲ - ایل) - ۲/۵ - دی فنیل تترازولیموم برمید^۴ و دی متیل سولفوکسید^۵ از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شدند. فسفولیپید دانه سویا همراه با فسفاتیدیل کولین از شرکت Lipoid GmbH و حلال کلروفرم از شرکت Merck تهیه شدند. محیط کشت DMEM و سرم جنین گاوی^۶ و پنی سیلین استرپتومایسین از شرکت GIBCO تهیه شدند. سلول‌های فیبروبلاست انسانی^۷ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

رسم نمودار استاندارد سیلیبینین

برای رسم نمودار استاندارد ابتدا ماده مؤثر سیلیبینین با فرمول شیمیایی c25h22o10 و کد ۲۲۸۸۸-۷۰-۶ از شرکت سیگما آلدریج در حلال ایزوپروپانول حل شده سپس سری رقت در غلظت‌های مختلف در بافر فسفات سالین و ایزوپروپانول ساخته شده و جذب هر کدام به صورت جداگانه با استفاده از دستگاه پلیت ریدر خوانش شد. همه داده‌ها با ۳ بار تکرار انجام شد. در انتها با استفاده از طول موج‌های جذبی به دست آمده نمودار استاندارد سیلیبینین در بافر فسفات سالین و ایزوپروپانول رسم شد.

تهیه نانوذرات لیپوزومی حاوی سیلیبینین

در این پژوهش از روش آب‌پوشانی لایه نازک برای تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیبینین استفاده شد. به این صورت که در ابتدا فسفاتیدیل کولین سویا به همراه کلسترول و سیلیبینین در ۵ میلی‌لیتر حلال کلروفرم به عنوان فاز آلی حل شده سپس به بالن ته گرد منتقل شد. دستگاه روتاری بر روی دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۱۰۰۰ دور در دقیقه تنظیم شد و فاز آلی به مدت ۴۵ دقیقه توسط دستگاه روتاری میکس شد. در مرحله بعد پمپ خلأ روشن شد و زمان داده شد تا فیلم نازک لیپیدی تشکیل شود. این مرحله غالباً ۵ تا ۱۵ دقیقه تا تبخیر شدن کامل کلروفرم ادامه می‌یابد. در مرحله هیدراتاسیون لایه نازک، ابتدا دمای روتاری را به ۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش داده می‌شود و حجم مشخصی از بافر فسفات سالین به بالن اضافه می‌شود و ۳۰ دقیقه در سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده می‌شود تا سوسپانسیون شیری‌رنگ پدید آید. در مرحله بعد نمونه‌ها جمع‌آوری شده و سپس تحت سونیکاسیون پروبی با قدرت ۱۲۰ وات و پالس ۵ ثانیه‌ای به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار داده شد. برای حفظ شرایط دمایی در طول انجام فرایند، ظرف نمونه درون حمام یخ قرار داده شد. همچنین به منظور

پوست بزرگ‌ترین و بیرونی‌ترین عضو است که کل بدن را می‌پوشاند. مهم‌ترین وظیفه پوست حفاظت از اجزای زیرین بدن مانند ماهیچه‌ها، استخوان‌ها، رباط‌ها و اندام‌های داخلی در برابر عوامل بیولوژیک خارجی، عوامل شیمیایی، مکانیکی و فیزیکی است [۱، ۲]. علاوه بر این، پوست در تنظیم دما و شرایط ایمنولوژیک بدن نقش مهمی دارد. بلافاصله پس از آسیب پوستی، هم برای حفظ هموستازی پایدار بدن و جلوگیری از خون‌ریزی و هم به منظور مقابله با عفونت‌های میکروبی، باید روند بهبود زخم آغاز شود [۳، ۴]. دلیل اصلی عدم بهبود سریع زخم‌های مزمن، تجمع میکروارگانیسم‌ها در زخم است [۵]. سیلیبینین جزء فعال بیولوژیک اصلی عصاره فلاونوئیدی سیلیمارین است که از خار مریم^۱ مشتق شده است و از سیلیبین A و سیلیبین B با نسبت برابر تشکیل شده است [۶]. از زمانی که برای اولین بار سیلیبینین در سال ۱۹۶۸ استخراج شد خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی قوی آن مورد توجه قرار گرفته است [۷، ۸]. این فلاونوئید به طور گسترده برای پیشگیری و درمان اختلالات التهابی پوست، از جمله درماتوز مورد مطالعه قرار گرفته است. با این حال به دلیل حلالیت پایین سیلیبینین در آب، امکان استفاده از این ترکیب در توسعه فرمولاسیون‌های دارویی جهت استفاده در کاربردهای پوستی دارای محدودیت جدی است [۹]. امروزه توسعه روزافزون سیستم‌های نوین دارورسانی در جهت افزایش کارایی داروها و کاهش اثرات جانبی آن‌ها در حال انجام است. از این میان، سیستم‌های دارورسانی نانویی جایگاه ویژه‌ای دارند. یک گروه اصلی و پیشرو در توسعه نانوداروها، نانوحامل‌های لیپیدی و به ویژه لیپوزوم‌ها هستند که در طیف وسیعی از دارورسانی‌ها و از جمله در دارورسانی پوستی کاربرد دارند [۱۰]. لیپوزوم‌ها وزیکول‌های کروی غشا مانند، متشکل از یک یا چند لایه لیپیدی هستند که بخش آبی را احاطه می‌کنند. این ساختار غشایی به طور معمول از لیپیدهای زیست‌سازگار مانند فسفولیپیدها، کلسترول و تری‌گلیسیرید تشکیل شده‌اند. نانوحامل‌های لیپیدی و از جمله لیپوزوم‌ها به دلیل مزایای متعدد نظیر زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری مناسب در مقایسه با سایر سیستم‌های دارورسانی، مانند نانوذرات پلیمری، یک سیستم دارورسانی ایده‌آل هستند. ساخت فرمولاسیون نانومقیاس سیلیبینین می‌تواند راهکاری جهت بهبود حلالیت آن و در نتیجه افزایش کارایی عملکردی آن برای استفاده در مدل پوستی باشد. در نتیجه در این پژوهش نانوذرات لیپوزومی جهت انکپسوله کردن ماده مؤثر سیلیبینین ساخته شده تا نه تنها فراهمی زیستی دارو افزایش یابد، بلکه با کنترل رهایش دارو از نانوذرات لیپوزومی، روند درمان آسیب‌های پوستی بهبود یابند.

2. Phosphate bufferde saline (PBS)
3. Diphenyltetrazolium (MTT)
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
5. Fetal bovine serum (FBS)
6. Human foreskin fibroblast (HFF)

1. Silybum marianum

جدول ۱. ترکیبات فرمولاسیون های مختلف لیپوزومی

نسبت وزنی لیپید به دارو	کلسترول (درصد)	فسفاتیدیل کولین (درصد)	فرمولاسیون
۱۵	۳۰	۷۰	۱
۱۰	۳۰	۷۰	۲
۱۰	۱۰	۹۰	۳

$$Mt(n) = \left(\frac{Vb \times Cn + Vr \times \sum_{i=1}^{n-1} Cm}{Mt_{total}} \right) \times 100$$

ارزیابی سمیت نانولیپوزوم ها

جهت بررسی سمیت نانولیپوزوم ها از آزمون رنگ سنجی سمیت سلول که یک روش رنگ سنجی است، به صورت زیر استفاده شد [۱۳]:

ابتدا سلول های HFF در فلاسک های دارای محیط کشت DMEM حاوی ۵ درصد بافر فسفات سالین و پنی سیلین - استرپتومایسین کشت داده شدند و در انکوباتور با ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سلول ها به صورت تک لایه کف فلاسک چسبیده و گسترش یافتند. جهت بررسی سمیت لیپوزوم ها، ۱۰۴ سلول همراه با محیط کشت درون هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت روی سلول ها با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه، حاوی لیپوزوم های بارگذاری شده با سیلیسین، لیپوزوم های فاقد دارو و سیلیسین به فرم آزاد جایگزین شد. سلول های تیمار نشده با لیپوزوم ها و دارو به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. مدت انکوبه شدن سلول ها با نانولیپوزوم ها و دارو ۲۴ ساعت بود. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول رنگ سنجی سمیت سلول به هر چاهک اضافه شد و سلول ها ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از آن، محلول رویی سلول ها خارج و برای حل شدن بلورهای نامحلول در ته چاهک، ۱۸۰ میکرولیتر از DMSO به هر چاهک اضافه شد. شدت جذب نور توسط دستگاه خوانش الایزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری و درصد زنده ماندی سلول ها تعیین شد.

تحلیل آماری

تحلیل آماری آنووا با استفاده از نرم افزار GraphPadPrism نسخه ۸/۴ انجام شد و حد معنی داری P کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. این مطالعه با کد اخلاق IR.SSU.RSI.REC.1398.038 در مرکز تحقیقات ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد به ثبت رسیده است.

یکنواخت سازی نانولیپوزوم ها از نظر اندازه و استریل شدن آن ها از نظر آلودگی های احتمالی، از فیلتر ۲۰۰ نانومتر استفاده شد. ترکیبات فرمولاسیون های لیپوزومی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است

تعیین میزان انکپسوله شده سیلیسین در نانولیپوزوم ها

برای تعیین بازده انکپسوله شدن دارو در فرمولاسیون های مختلف لیپوزوم، ۱۰۰ میکروگرم از نانوذرات حاوی سیلیسین با نسبت حجمی ۱:۱۰ با ایزوپروپیل الکل مخلوط شد تا غشای لیپوزوم ها تخریب و داروی بارگذاری شده آزاد شود. سپس با استفاده از دستگاه طیف سنج فرابنفش مرئی در طول موج بیشینه ۲۸۶ نانومتر و نمودار استاندارد سیلیسین، مقادیر داروی انکپسوله شده در هر فرمولاسیون تعیین می شود. درصد انکپسوله شدن دارو در فرمولاسیون های مختلف لیپوزوم از طریق فرمول شماره ۱ محاسبه شد [۱۱].

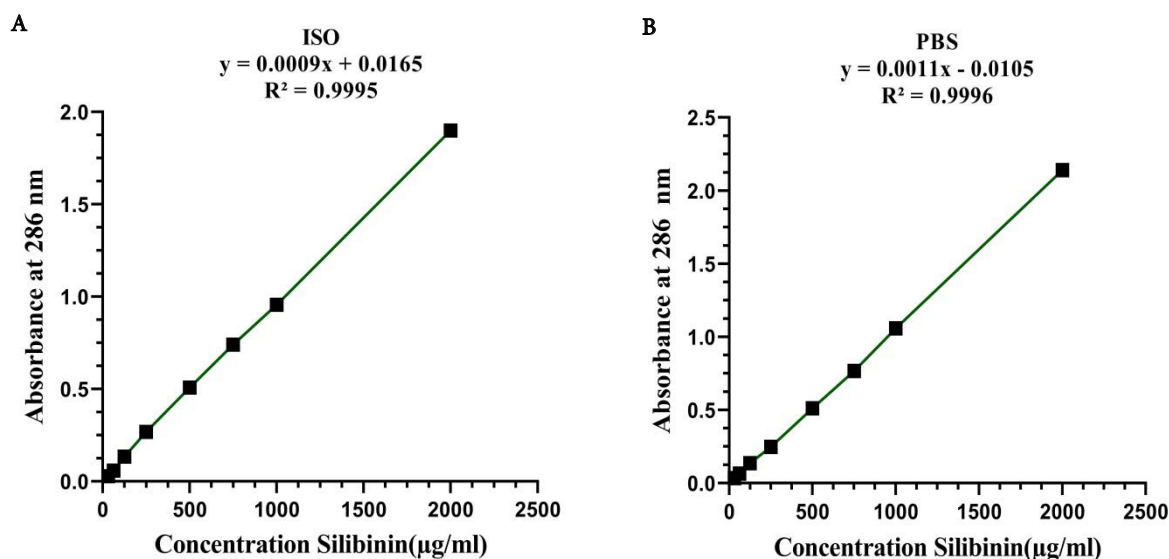
1.

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{The weight of SLB in the nanoparticles}}{\text{The total weight of the feeding SLB}} \times 100$$

بررسی رهایش دارو از نانولیپوزوم ها

برای بررسی رهایش دارو از نانولیپوزوم ها، ۱ میلی لیتر از نانوحامل های لیپوزومی حاوی سیلیسین، درون کیسه دیالیز با Cut-off 12 kDa ریخته شد و سپس کیسه دیالیز درون ۱۰ میلی لیتر محلول بافر فسفات سالین با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در زمان های معین، ۱ میلی لیتر از محلول اطراف کیسه دیالیز جمع آوری و با همان حجم از بافر تازه جایگزین شد. سپس میزان رهایش سیلیسین در هر زمان با استفاده از دستگاه طیف سنج فرابنفش مرئی در طول موج ۲۸۶ نانومتر و نمودار استاندارد سیلیسین در محلول بافر فسفات سالین تعیین شد. درصد رهایش تجمعی سیلیسین از نانولیپوزوم ها از طریق فرمول شماره ۲ محاسبه شد [۱۲].

2.



تصویر ۱. نمودار استاندارد جذب - غلظت ماده مؤثر سیلیبینین در حلال ایزوپروپانول (A) و PBS (B)

یافته‌ها

نمودار استاندارد سیلیبینین

نمودار استاندارد سیلیبینین در ایزوپروپانول و بافر فسفات سالین با استفاده از روش سری استاندارد و در طول موج بیشینه ۲۸۶ نانومتر رسم شد (تصویر شماره ۱). معادله خط درجه ۱ دارو، برای استفاده در محاسبات میزان بارگذاری و رهایش دارو تعیین شد. نمودارها R^2 قابل قبول و بالای ۰/۹۹ داشتند.

مشخصه‌یابی نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیبینین

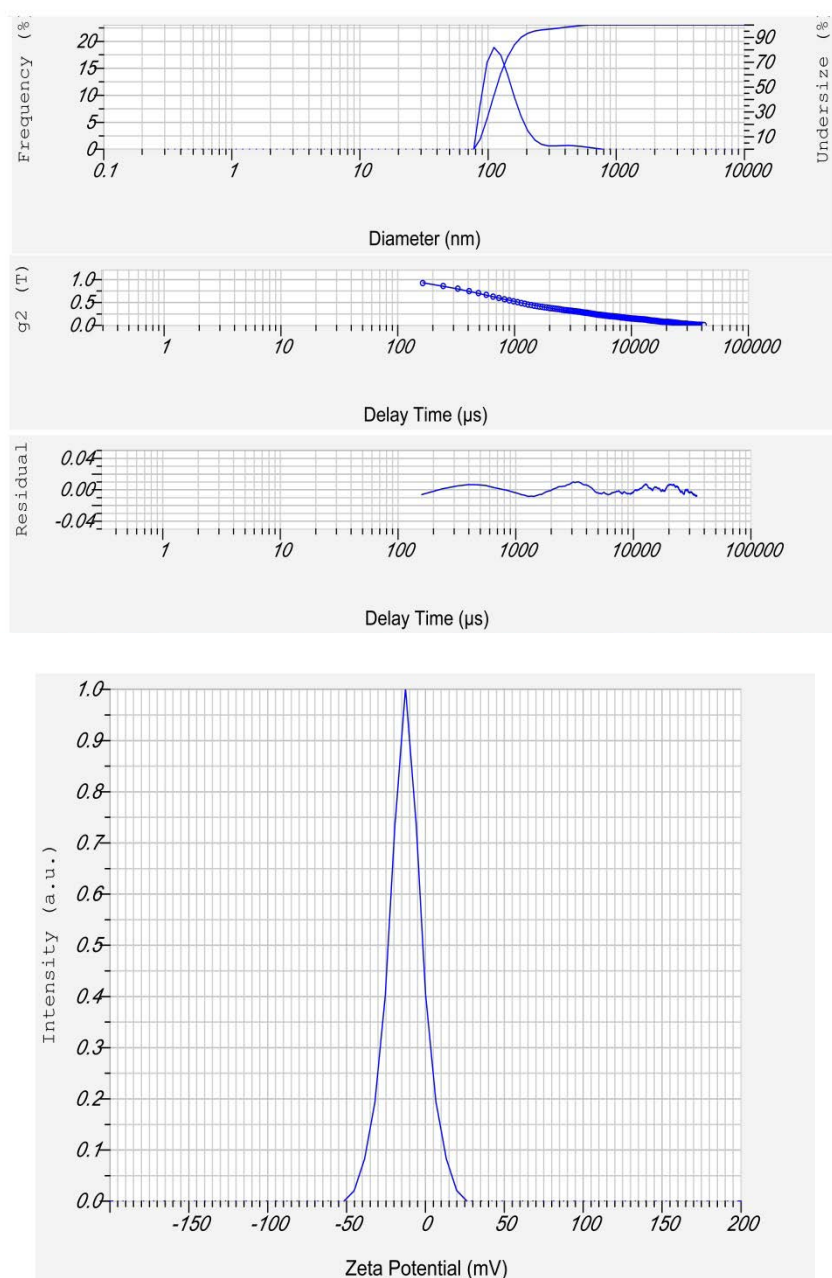
اندازه ذرات و پتانسیل زتا

نتایج آزمون پراکندگی نور پویا^۷ در ۳ تکرار جهت تعیین اندازه ذرات، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی برای تمامی فرمولاسیون‌ها در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

7. Dynamic Light Scattering (DLS)

جدول ۲. اندازه ذرات، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیبینین

فرمولاسیون	اندازه نانوذرات (نانومتر)	شاخص پراکندگی	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)
۱	$124 \pm 4/58$	$0/457 \pm 0/2$	$-10/7 \pm 5/3$
۲	$112 \pm 9/07$	$0/297 \pm 0/07$	$-14/5 \pm 2/2$
۳	$102 \pm 8/03$	$0/324 \pm 0/11$	$-25/2 \pm 2/5$



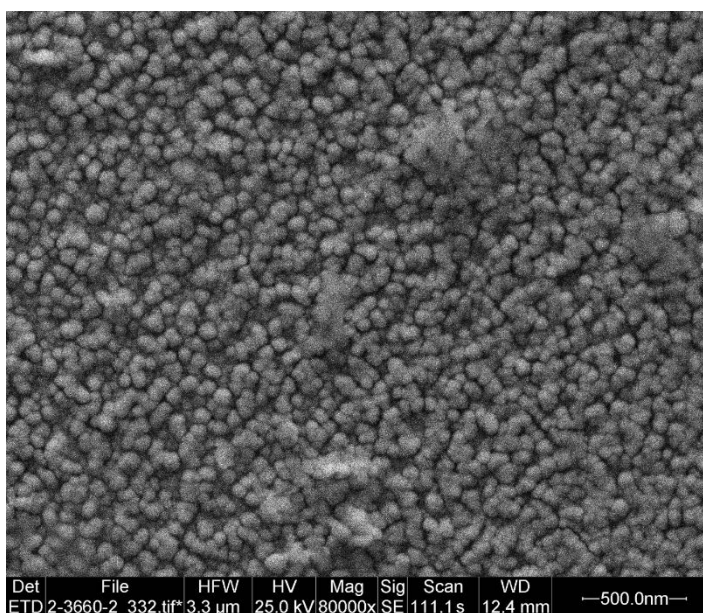
تصویر ۲. اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیبینین

زمان ۴۸ ساعت بررسی شد. نتایج نشان دادند رهایش سیلیبینین از نانولیپوزوم‌ها به صورت آهسته رهش بوده، به طوری که بعد از یک رهایش سریع حدود ۱۰ درصد داروی انکپسوله شده در هر ۳ فرمولاسیون طی ۲ ساعت اول رهایش یافت، اما حدود ۵۷ درصد دیگر دارو در طی ۴۸ ساعت و به صورت تدریجی در فرمولاسیون ۲ رها شد. **تصویر شماره ۴** پروفایل رهایش دارو در هر ۳ فرمولاسیون را نشان می‌دهد.

سیلیبینین توسط لیپوزوم‌ها با افزایش نسبت فسفاتیدیل کولین به کلسترول افزایش می‌یابد. به طوری که در فرمولاسیون ۱ حدود $72 \pm 6/6$ درصد دارو انکپسوله شده ولی در فرمولاسیون ۳، حدود $92 \pm 5/5$ دارو انکپسوله شده است. **جدول شماره ۳** مقدار داروی انکپسوله شده در فرمولاسیون‌های مختلف را نشان می‌دهد.

رهایش دارو در محیط برون تنی

رهایش سیلیبینین از نانولیپوزوم‌ها با استفاده از روش دیالیز در چند بازه زمانی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و $pH=7/4$ در طی



تصویر ۳. ریزنگاره میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیبینین

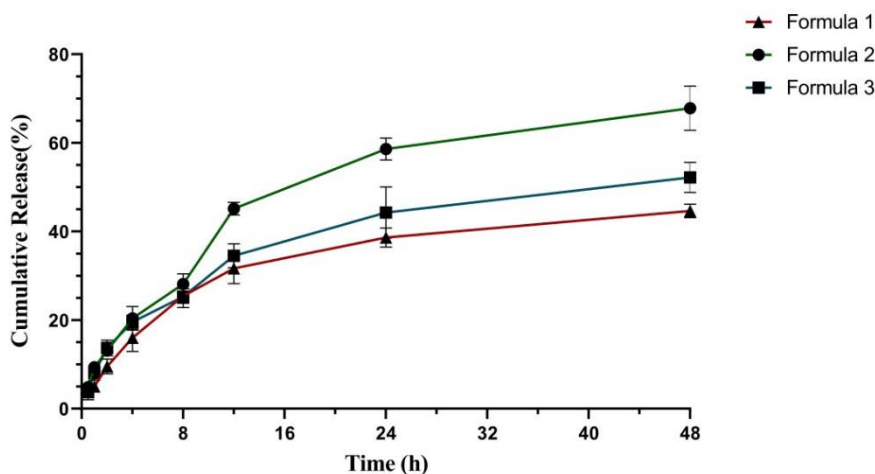
سمیت سلولی

بعد از ۲۴ ساعت منجر می‌شوند. از طرف دیگر نشان داده شد که لیپوزوم‌های حاوی دارو نسبت به لیپوزوم‌های بدون دارو و همچنین داروی آزاد اثر بیشتری بر روی تحریک رشد سلول‌های سالم داشته است ($P > 0.05$).

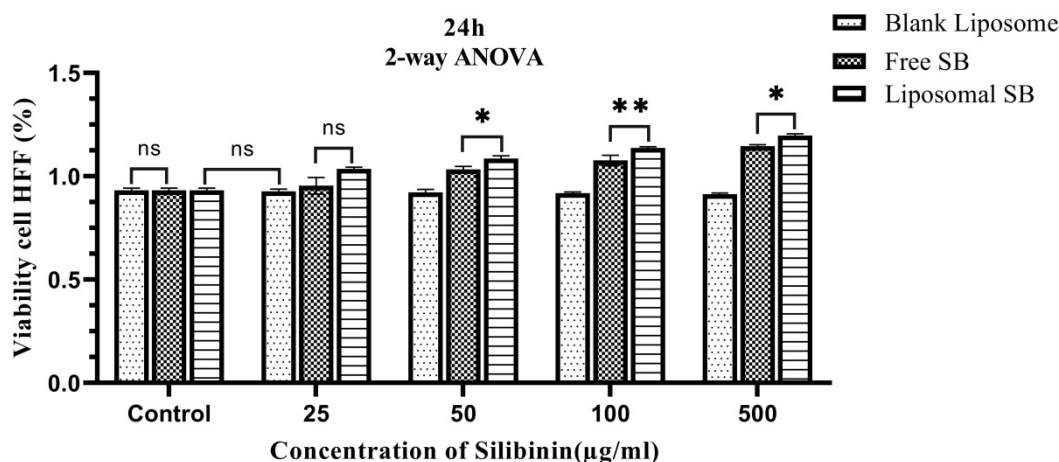
بحث

بهبود زخم فرایند پیچیده‌ای است و عوامل مختلفی بر بازسازی پوست تأثیر می‌گذارند. مرطوب نگه داشتن محیط اطراف زخم، گردش خون و اکسیژن رسانی مؤثر و همچنین عدم عفونت باکتریایی در فرایند ترمیم زخم بسیار مؤثرند. تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که ترکیبات گیاهی از طریق مکانیسم‌های متعددی در مراحل مختلف بهبود زخم نقش دارند. به‌طوری‌که برخی از

با در نظر گرفتن هم‌زمان میزان انکپسوله شدن دارو و همچنین رهایش دارو از لیپوزوم، فرمولاسیون ۲ به‌عنوان فرمولاسیون بهینه از نظر میزان بارگذاری و رهایش دارو انتخاب شد. بنابراین ارزیابی‌های بعدی و مقایسه با گروه‌های کنترل برای این فرمولاسیون انجام شد. سمیت سلولی فرمولاسیون شماره ۲ لیپوزوم‌های حاوی دارو و بدون دارو به همراه داروی آزاد بر روی سلول‌های فیبروبلاست بررسی شد. نتایج در تصویر شماره ۵ نشان دادند لیپوزوم‌های حاوی دارو و همچنین داروی آزاد در غلظت ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر و بالاتر نه تنها هیچ سمیتی نداشتند، بلکه به تحریک رشد سلول‌های فیبروبلاست



تصویر ۴. رهایش دارو در فرمولاسیون‌های مختلف در ۴۸ ساعت



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۵. میزان سمیت سلولی فرمولاسیون شماره ۲ لیپوزوم‌های حاوی دارو و بدون دارو به همراه داروی آزاد بر روی سلول‌های فیبروبلاست
 $P > 0.05 = ns$ $P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$ $^{***} P < 0.001$

بهبود زخم‌ها در مدل‌های موشی مؤثر بوده و می‌توانند به‌عنوان یک مدل جدید پانسمان زخم ارائه شوند [۲۲، ۲۱]. سیلیبینین حلالیت پایینی در آب دارد، بنابراین امکان استفاده از این ترکیب در توسعه فرمولاسیون‌های دارویی جهت استفاده بر روی پوست دارای محدودیت جدی است. سامانه دارورسانی پوستی روشی غیرتهاجمی و کارآمد است که رهایش آهسته دارو را فراهم کرده و دارو را به محل هدف می‌رساند. این سیستم می‌تواند اثر درمانی و ایمنی داروها را بهبود بخشد، سطح پلاسمایی دارو را ثابت نگه دارد و از متابولیسم گذر اول کبدی جلوگیری کند. با وجود مزایای زیاد این سامانه، استراتژم کورنثوم مانع اصلی برای نفوذ دارو به درون پوست است. تحقیقات زیادی به منظور غلبه بر آن جهت بهبود نفوذ دارو صورت گرفته است. دارورسانی مؤثر و کنترل‌شده از طریق پوست می‌تواند به‌وسیله حامل‌های نانویی پایدار با قابلیت تغییر شکل برای عبور آسان از منافذ پوست به دست آید. برخی از نانوحامل‌ها، مانند نانوحامل‌های لیپیدی می‌توانند حلالیت داروهای آب‌گریز را افزایش دهند تا کارایی آن‌ها را بهبود بخشند که سبب کاهش دژ مصرفی دارو می‌شوند. آن‌ها همچنین قادر به تحویل مولکول‌های هیدروفیل و نیز آب‌گریز هستند و از تخریب آن‌ها جلوگیری می‌کنند. لیپوزوم‌ها

ترکیبات نظیر گیاه آلئوتورا [۱۴] بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی^۱ و همچنین $TGF-\beta$ را افزایش می‌دهند که نقش مهمی در تحریک اپی تلیال شدن مجدد، رگ‌زایی، تشکیل بافت گرانوله و رسوب فیبرکلانز ایفا می‌کنند. برخی از دیگر ترکیبات گیاهی، نظیر عصاره سیاه گینه [۱۵] به‌عنوان مهارکننده $TNF-\alpha$ ، اینترلوکین-۱ و بیان پروتئین نیتریک اکساید سنتتاز عمل می‌کنند و در نتیجه خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی را در انواع مختلف سلول‌های پوستی القا می‌کنند. سیلیبینین یکی از فلاونوئید اصلی استخراج‌شده از دانه‌های خارمریم است [۱۷، ۱۶] و اخیراً به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، به‌عنوان یک عامل بالقوه برای درمان بیماری‌های پوستی مختلف مانند درماتیت [۱۸] و زخم‌ها [۱۹] استفاده شده است. این ماده می‌تواند باعث تحریک اپیتلیزاسیون و کاهش التهاب در زخم برش‌خورده شود. مطالعات قبلی خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد میکروبی سیلیبینین را نشان داده‌اند [۲۰]. در مطالعه‌ای از هیدروژل حاوی سیلیبینین در زخم‌های مدل موشی استفاده شده است. نتایج این مطالعه نشان داده که هیدروژل‌های حاوی سیلیبینین در تسریع

8. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

جدول ۳. مقدار داروی انکپسوله‌شده در فرمولاسیون‌های مختلف

فرمولاسیون	داروی انکپسوله‌شده (درصد)
۱	۷۳±۶/۶
۲	۸۴±۵/۳
۳	۹۲±۵/۵

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

کاهش قابل توجه در شاخص چندپاشیدگی^۹ و در نتیجه توزیع همگن تر نانوذرات منجر شوند [۱۲] شاخص چندپاشیدگی کمتر از ۰/۴ نشان دهنده توزیع همگن ذرات در فرمولاسیون است. در پژوهش حاضر نیز شاخص پراکندگی ذرات بین ۰/۴ تا ۰/۱ بود که یکنواخت بودن توزیع ذرات را نشان می دهد. همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی^{۱۰} نیز یکنواختی ذرات را تأیید می کند و نشان می دهد لیپوزوم ها در اندازه نانومتری بوده و شکل کروی همگن داشتند. از طرف دیگر، مولکول های دارویی احتمالاً در هر ۳ بخش لیپوزوم توزیع می شوند، آن ها یا جذب سطحی غشای لیپوزوم می شوند یا در داخل دو لایه غشا و یا درون فاز آبی داخلی قرار می گیرند. ماهیت آب گریز سیلیسین سبب می شود عمدتاً دارو در ۲ لایه لیپیدی لیپوزوم به دام بیفتد. میزان بارگذاری سیلیسین در نانوذرات لیپوزومی در تمام فرمولاسیون های مورد مطالعه بیش از ۷۰ درصد است که نشان دهنده این است که این نانوحامل از ظرفیت بالایی برای انکپسوله کردن و انتقال دارو برخوردار است. یکی از چالش های دارورسانی توسط نانوحامل ها بهینه کردن سرعت رهایش داروهای انکپسوله شده با کنترل زمانی و مکانی است. بنابراین میزان رهایش دارو فاکتور مهم دیگری در طراحی نانوحامل ها است. نتایج حاصل از بررسی رهایش دارو با استفاده از کیسه دیالیز نشان دادند فرمولاسیون های لیپوزومی حاوی سیلیسین، طول مدت رهایش دارو را افزایش می دهند. هر ۳ فرمولاسیون مورد مطالعه قادر به رهایش آهسته دارو بودند. پروفایل رهایش دارو برای تمام فرمولاسیون ها، رهایش سریع تری در ۸ ساعت اول نشان می دهد و سپس دارو با شیب ملایم تری رهایش می یابد. بیشترین رهایش تجمعی در ۴۸ ساعت مربوط به فرمولاسیون ۲ است که احتمالاً به دلیل نسبت مناسبی از فسفولیپید به کلسترول (نسبت ۷۰ به ۳۰ فسفاتیدیل کولین نسبت به کلسترول) است که در پایداری مناسب تر لیپوزوم ها مؤثر است. این نسبت هم پایداری ساختار را به اندازه ای بالا می برد که داروی انکپسوله رهایش سریع نداشته باشد و هم اینکه مانع از رهایش دارو نمی شود و امکان رهایش تدریجی را فراهم می کند. ارزیابی سمیت نشان داد لیپوزوم های فاقد دارو نه سمیت سلولی داشتند و نه تحریک کننده رشد بودند. از طرف دیگر لیپوزوم های حاوی دارو و همچنین داروی آزادانه تنها سمیتی روی سلول ها نداشته، بلکه در غلظت های بالاتر باعث تحریک افزایش رشد در مدت زمان ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل شده است که این نشان دهنده این است که هم سیلیسین به تنهایی و هم سیلیسین لیپوزومال تحریک کننده رشد هستند. سیلیسین لیپوزومال نسبت به سیلیسین به تنهایی رشد سلولی را بیشتر تحریک می کند که احتمالاً مربوط به رهایش آهسته دارو از لیپوزوم است که باعث شده سلول ها در مدت طولانی تری در معرض دارو قرار داشته باشند و رشد بیشتری را نشان بدهند.

9. Polydispersity Index (PDI)

10. Scanning Electron Microscope (SEM)

نانوحامل های لیپیدی هستند که می توانند دارو ها را به اعماق پوست و یا گردش خون سیستمیک انتقال دهند. جهت داشتن لیپوزوم های پایدار توجه به اجزای سازنده و نسبت بین آن ها لازم است. از بین این ترکیبات، فسفولیپید استفاده شده نقش مهمی دارد. به طوری که لیپوزوم های به دست آمده از فسفاتیدیل کولین با دمای انتقال فاز بالا در خون پایدارتر از لیپوزوم های تهیه شده از فسفاتیدیل کولین با دمای انتقال فاز پایین هستند [۱۱]. از طرف دیگر مطالعات متعددی در مورد استفاده از کلسترول به عنوان تثبیت کننده ساختار لیپوزومی انجام شده و نشان می دهد این استروئید می تواند ۲ لایه لیپیدی را پایدارتر کند. همچنین نسبت بین فسفولیپید و کلسترول نیز در پایداری و رهایش دارو از لیپوزوم ها مؤثر است. مطالعات متعدد نشان داده اند پایدارترین فرمولاسیون برای تضمین رهایش کنترل شده دارو در نسبت ۷۰ به ۳۰ (فسفاتیدیل کولین نسبت به کلسترول) به دست می آید [۱۳]. در مطالعه حاضر اثر نسبت های مختلف فسفاتیدیل کولین به کلسترول در ۳ فرمولاسیون لیپوزومی با نسبت های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. پایدارترین شکل لیپوزومی با رهایش تدریجی دارو در نسبت ۷۰ به ۳۰ (فسفاتیدیل کولین نسبت به کلسترول) به دست آمد. توزیع زیستی نانوحامل ها و اثرات بیولوژیکی آن ها به ویژگی های فیزیکی شیمیایی نظیر اندازه، بار سطحی و مورفولوژی آن ها بستگی دارد. هر چقدر اندازه آن ها کوچک تر باشد عبور از غشا راحت تر است، ولی در مقابل، داروی کمتری در داخل آن ها به دام می افتد و در نتیجه بازده به دام انداختن دارو کاهش می یابد.

پتانسیل زتا نیز به عنوان تعادل بین نیروهای جاذبه و دافعه در وزیکول ها در نظر گرفته می شود و نقش مهمی در ثبات آن ها دارد. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان می دهند نسبت فسفولیپید به کلسترول در اندازه ذرات و پتانسیل زتا نانوحامل ها مؤثر بوده است. به طوری که در فرمولاسیون ۳ که نسبت فسفولیپید بالاتری نسبت به فرمولاسیون ۲ دارد اندازه لیپوزوم ها و پتانسیل زتا کاهش یافته است. از طرف دیگر، نسبت فسفولیپید به دارو نیز در اندازه ذرات و پتانسیل زتا نانوحامل ها مؤثر است. به طوری که در فرمولاسیون ۲ که نسبت فسفولیپید به دارو ۱۰ برابر است، اندازه ذرات کوچک تر شده و پتانسیل زتای آن ها نسبت به فرمولاسیون ۱ که نسبت فسفولیپید به دارو ۱۵ برابر است کاهش یافته است. در واقع با افزایش مقدار فسفولیپید، یک ساختار میسل به جای وزیکول ها تشکیل می شود که اندازه آن ها نسبتاً کوچک تر است [۱۴]. مطالعات نشان داده اند که اندازه ذرات در فرمولاسیون های لیپیدی با افزایش محتوای لیپید کاهش می یابد. توضیح احتمالی این است که فضای اشغال شده توسط مولکول های لیپید همراه با افزایش مقداری لیپید افزایش می یابد و در نتیجه سیالیت غشا افزایش یافته و اندازه فرمولاسیون های لیپیدی کاهش می یابد [۱۴]. افزایش میزان لیپید همچنین به افزایش بار منفی نانوذرات و کاهش تمایل به تجمع نانوذرات منجر می شود. همچنین مطالعات نشان داده اند نسبت بالاتر فسفولیپید به کلسترول می تواند به

نتیجه‌گیری

دارورسانی مؤثر و کنترل شده از طریق پوست می‌تواند به وسیله حامل‌های نانویی پایدار با قابلیت تغییر شکل برای عبور آسان از لایه‌های پوست به دست آید. با استفاده از فناوری نانو، حلالیت ترکیبات افزایش یافته و انتظار می‌رود دارورسانی پوستی با حداقل تهاجم، نفوذپذیری و ماندگاری بیشتری را در لایه‌های پوستی ایجاد کند. ماده مؤثر سیلیبینین می‌تواند باعث تحریک مؤثر سلول‌های فیبروبلاست پوستی شود. نانوذرات لیپوزومی بارگذاری شده با سیلیبینین که بستری برای سیستم آهسته رهش سیلیبینین هستند قادر خواهند به آرامی در محل زخم منتشر شوند و با رهایش کنترل شده دارو باعث افزایش تأثیرگذاری این ماده بر روی سلول‌های فیبروبلاست شوند. به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان دادند نانوذرات لیپوزومی حاوی سیلیبینین به دلیل افزایش نفوذپذیری در سلول‌ها و رهایش کنترل شده می‌تواند اثرگذاری داروها را نسبت به حالت آزاد افزایش دهد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد اخلاق IR.SSU.RSI.REC.1398.038 در مرکز تحقیقات ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد به ثبت رسیده است.

حامی مالی

هیچ‌گونه سازمان و نهادی به‌عنوان حامی مالی در این طرح مشارکت نداشته است.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان به‌صورت برابر در انجام همه‌بخش‌های پژوهش مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض در منافی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از شرکت کنندگان در این پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنند.

Reference

- [1] Chua AW, Khoo YC, Tan BK, Tan KC, Foo CL, Chong SJ. Skin tissue engineering advances in severe burns: Review and therapeutic applications. *Burns Trauma*. 2016; 4(3). [DOI:10.1186/s41038-016-0027-y] [PMID]
- [2] Sundaramurthi D, Krishnan UM, Sethuraman S. Electrospun nanofibers as scaffolds for skin tissue engineering. *Polym Rev*. 2014; 54(2):348-76. [DOI:10.1080/15583724.2014.881374]
- [3] Simões D, Miguel SP, Ribeiro MP, Coutinho P, Mendonça AG, Correia IJ. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018; 127:130-41. [DOI:10.1016/j.ejpb.2018.02.022] [PMID]
- [4] Paul W. Advances in wound healing materials. Akron: Smithers Information Limited; 2015. [Link]
- [5] Salinas SG. Smart dressings based on nanostructured fibers containing natural origin antimicrobial and anti-inflammatory compounds. Zaragoza: Universidad de Zaragoza; 2021. [Link]
- [6] El Hassanen YA, Badran H, Abd EL-Rahman A, Badawy NM. Potential effect of milk thistle (*Silybum marianum*) on liver disorders induced by carbon tetrachloride. *J Home Econ*. 2021; 31(1):83-92. [Link]
- [7] Federico A, Dallio M, Loguerio C. Silymarin/silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. *Molecules*. 2017; 22(2):191. [DOI:10.3390/molecules22020191] [PMID] [PMC]
- [8] Ding Y, Zhang S, Sun Z, Tong Z, Ge Y, Zhou L, et al. Preclinical validation of silibinin/albumin nanoparticles as an applicable system against acute liver injury. *Acta Biomater*. 2022; 146:385-95. [DOI:10.1016/j.actbio.2022.04.021] [PMID]
- [9] Gehrcke M, Martins CC, de Bastos Brum T, da Rosa LS, Luchese C, Wilhelm EA, et al. Novel pullulan/gellan gum bilayer film as a vehicle for silibinin-loaded nanocapsules in the topical treatment of atopic dermatitis. *Pharmaceutics*. 2022; 14(11):2352. [DOI:10.3390/pharmaceutics14112352] [PMID]
- [10] Bahramizadeh M, Bahramizadeh M, Kiafar B, Jafarian AH, Nikpoor AR, Hatamipour M, et al. Development, characterization and evaluation of topical methotrexate-entrapped deformable liposome on imiquimod-induced psoriasis in a mouse model. *Int J Pharm*. 2019; 569:118623. [DOI:10.1016/j.ijpharm.2019.118623] [PMID]
- [11] Chen J, Yan GJ, Hu RR, Gu QW, Chen ML, Gu W, et al. Improved pharmacokinetics and reduced toxicity of brucine after encapsulation into stealth liposomes: Role of phosphatidylcholine. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7:3567-77. [DOI:10.2147/IJN.S32860] [PMID]
- [12] Barzegar-Jalali M, Adibkia K, Valizadeh H, Shadbad MR, Nokhodchi A, Omid Y, et al. Kinetic analysis of drug release from nanoparticles. *J Pharm Pharm Sci*. 2008; 11(1):167-77. [DOI:10.18433/J3D59T] [PMID]
- [13] Schiweck H, Bär A, Vogel R, Schwarz E, Kunz M, Dusautois C, et al. Sugar Alcohols, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Hoboken: Wiley Online Library; 2005. [DOI:10.1002/14356007.a25_413.pub2]
- [14] Najafi N, Arabi M, Jafarzadeh H. [The healing power of Aloe vera mucilage: Induction of insulin-like growth factor gene expression and regeneration tissue in mouse damaged skin (Persian)]. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2014; 16(2):1-9. [Link]
- [15] Hedayati M, Yazdanparast R, Jafari BB, Azizi F. [Dendrostelera lessertii extract effects on TNF- α release and its receptors down regulation on cultured human monocytes (Persian)]. *Res Med*. 2005; 29(4):337-42. [Link]
- [16] Briuglia ML, Rotella C, McFarlane A, Lamprou DA. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Deliv Transl Res*. 2015; 5(3):231-42. [DOI:10.1007/s13346-015-0220-8] [PMID]
- [17] Moghddam SR, Ahad A, Aqil M, Imam SS, Sultana Y. Formulation and optimization of niosomes for topical diacerein delivery using 3-factor, 3-level Box-Behnken design for the management of psoriasis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016; 69:789-97. [DOI:10.1016/j.msec.2016.07.043] [PMID]
- [18] Song X, Zhao Y, Wu W, Bi Y, Cai Z, Chen Q, et al. PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *Int J Pharm*. 2008; 350(1-2):320-9. [DOI:10.1016/j.ijpharm.2007.08.034] [PMID]
- [19] Ahmad U, Faiyazuddin M, Hussain MT, Ahmad S, M Alshamari T, Shakeel F. Silymarin: An insight to its formulation and analytical prospects. *Acta physiologiae plantarum*. 2015; 37(253):1-17. [DOI:10.1007/s11738-015-2008-3]
- [20] Rigon C, Marchiori MCL, da Silva Jardim F, Pegoraro NS, Chaves PDS, Velho MC, et al. Hydrogel containing silibinin nanocapsules presents effective anti-inflammatory action in a model of irritant contact dermatitis in mice. *Eur J Pharm Sci*. 2019; 137:104969. [DOI:10.1016/j.ejps.2019.104969] [PMID]
- [21] Samanta R, Pattnaik AK, Pradhan KK, Mehta BK, Pattanayak SP, Banerjee S. Wound healing activity of silibinin in mice. *Pharmacognosy Res*. 2016; 8(4):298-302. [DOI:10.4103/0974-8490.188880] [PMID]
- [22] Gehrcke M, de Bastos Brum T, da Rosa LS, Ilha BD, Soares FZM, Cruz L. Incorporation of nanocapsules into gellan gum films: A strategy to improve the stability and prolong the cutaneous release of silibinin. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021; 119:111624. [DOI:10.1016/j.msec.2020.111624] [PMID]