

## Investigating the Cytotoxic Effect of Chitosan and Chitosan Nanoparticles in a Laboratory Environment: An In Vitro Model

Laya Ebrahimi <sup>1</sup> , Enayat Berizi <sup>2</sup> , Maryam Montaseri <sup>1</sup> , Mansour Rahsepar <sup>3</sup> , Saeid Hosseinzadeh <sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup> Dept of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

<sup>2</sup> Dept of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

<sup>3</sup> Dept of Materials Science and Engineering, School of Engineering, Shiraz University, Shiraz, Iran

---

### Article Info

**Article type:**

Research article

**Article History:**

Received: May. 07, 2023

Revised: Dec. 13, 2023

Accepted: Dec. 30, 2023

Published Online: Jan. 21, 2024

**\* Correspondence to:**

Saeid Hosseinzadeh

Dept of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Email:

hosseinzadeh@shirazu.ac.ir

---

### ABSTRACT

**Introduction:** Considering the broad spectrum of using nanoparticles in food coatings as a potent antimicrobial agent and their possible cytotoxic effects and accidental consumption of these toxic materials, this study was performed. The present study aimed to investigate the cytotoxicity of chitosan and nano-chitosan *in vitro*.

**Material & Methods:** This cross-sectional study was conducted in 2019 in the Laboratory of the Department of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran. The XRD and FITR techniques were employed to study the characteristics of these nanoparticles. Moreover, two cell lines, HT-29 and Vero, were used to study the cytotoxic effects of chitosan and nano-chitosan by MTT assay, acridine orange, and ethidium bromide staining. One-way ANOVA and independent t-test were used to analyze the collected data with the help of SPSS software (version 19).

**Results:** Based on the obtained findings, the maximum values of XRD at the angle of  $\theta=2$  were observed at  $20^\circ$ . The highest peak appeared at  $1530\text{ cm}^{-1}$ , which was associated with tensile vibration of N-P-N. The spectrum diagram of chitosan due to the tensile vibration of synthetic nanochitosan of N-H bound appeared at  $1646\text{ cm}^{-1}$ . The results showed a proportional increase in the cytotoxicity with time and concentration of nanoparticles in the cells.

**Discussion & Conclusion:** Since by increase in time and concentration of nanoparticles, toxicity was observed in cells; therefore, the time and concentration of chitosan nanoparticles are important in causing cytotoxicity. Considering the toxic effects of these nanocomposites on cancer cells, they can be used in cancer treatment, which requires further studies.

**Keywords:** Chitosan, Cytotoxicity, HT-29 cell, Vero cells

---

#### ➤ How to cite this paper

Ebrahimi L, Berizi E, Montaseri M, Rahsepar M, Hosseinzadeh S. Investigating the Cytotoxic Effect of Chitosan and Chitosan Nanoparticles in a Laboratory Environment: An In Vitro Model. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2024;31(6): 36-49.



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

## بررسی اثر سمیت سلولی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان در محیط آزمایشگاهی

لیا ابراهیمی<sup>۱</sup>, عنايت بریزی<sup>۲</sup>, مریم منتصری<sup>۱</sup>, منصور رهسپار<sup>۲</sup>, سعید حسین‌زاده<sup>\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

<sup>۲</sup> گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

<sup>\*</sup> گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

#### نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۷

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۹

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱

نویسنده مسئول:  
سعید حسین‌زاده

گروه بهداشت و کنترل کیفی  
مواد غذایی، دانشکده  
دامپزشکی، دانشگاه شیراز،  
شیراز، ایران

Email:  
hosseinzadeh@shirazu.ac.ir

**مقدمه:** با توجه به استفاده گسترده از نانوذرات به عنوان یک ماده ضدیکروبی قوی در پوشش‌های مواد غذایی و احتمال آثار سمی سلولی آن‌ها بر بدن و یا مصرف تصادفی این مواد سمی، این مطالعه انجام شد. هدف از این مطالعه بررسی سمیت سلولی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان در شرایط آزمایشگاهی است.

**مواد و روش‌ها:** مطالعه حاضر یک مطالعه مقطعی است که در سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز صورت گرفت. برای بررسی ویژگی‌های این نانوذرات از روش‌های طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس (XRD) و طیف‌سنجی مادون‌قمرنی تبدیل فوریه (FTIR) استفاده گردید. به‌منظور بررسی اثر سمیت سلولی کیتوزان و نانوکیتوزان، دوره سلولی 29-HT (لاین سرطان کولون) و Vero (لاین اپتیلیا کلیه میمون) به کار گرفته شد؛ سپس آزمون سمیت سلولی با روش MTT و بررسی آپوپتوز سلولی با استفاده از روش رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بر ماید صورت گرفت.

**یافته‌های پژوهش:** برای آنالیز آماری از واریانس یک‌طرفه و آزمون  $F$  مستقل با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.19 استفاده گردید. حداقل مقادیر طیف‌سنجی برash اشعة ایکس نانوذرات کیتوزان در زاویه ۰۲ در ۲۰ درجه دیده شد. پیک ظاهر شده در عدد موجی ۱۵۳۰ cm<sup>-1</sup> به ارتعاش کششی N-O-P مربوط بود. در نمودار طیفی کیتوزان ارتعاش خشمی گروه عاملی N-H در عدد موجی ۱۵۴۲ cm<sup>-1</sup> ظاهر گردید، درحالی که در طیف نانوذرات کیتوزان ستترشده ارتعاش خشمی N-H در ۱۶۴۶ دیده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که سمیت سلولی کیتوزان در سلول‌های 29-HT و Vero با افزایش زمان و غلظت نانوذرات، افزایش بافتی است.

**بحث و نتیجه‌گیری:** از آنجاکه با افزایش زمان و افزایش غلظت نانوذرات، سمیت در سلول‌ها بیشتر مشاهده گردید؛ بنابراین، زمان و غلظت نانوذرات کیتوزان در ایجاد سمیت سلولی اهمیت دارد. با توجه به آثار سمی این نانوذرات بر روی سلول‌های سرطانی، این ذرات می‌تواند در درمان سرطان استفاده شود که نیازمند مطالعات بیشتری در این زمینه است.

**واژه‌های کلیدی:** کیتوزان، سمیت سلولی، ردۀ سلولی 29-HT و Vero

**استناد:** ابراهیمی لیا، بریزی عنايت، منتصری مریم، رهسپار منصور، حسین‌زاده سعید. بررسی اثر سمیت سلولی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان در محیط آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، بهمن ۱۴۰۲؛ (۳۱): ۴۹-۳۶.



## مقدمه

آزوما و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که سلول‌های MDA-MB-231 کاهش واپسی به غلظت داشتند (۹). محصول نانوکیتوزان تولید شده کی و همکاران در سال ۲۰۰۵، باعث مهار رشد رده سلول MGC803 در آزمایشگاه گردید و به نظر رسید، نانوذرات کیتوزان آثار مفیدی در درمان سرطان در انسان داشته باشد (۱۰). در مطالعه‌ای که لوح و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند، سلول‌های سالم کبدی تحت تأثیر غلظت‌های متفاوتی از نانوذرات کیتوزان قرار گرفتند. سلول‌ها غلظت‌های کمتر از ۵٪ درصد وزنی/حجمی این ذرات را به مدت ۴ ساعت تحمل کردند؛ اما در غلظت‌های بالاتر از این مقدار، یکپارچگی غشای سلولی در معرض خطر قرار گرفت. این مورد توسط نشت آلانین ترانس آمیناز به محیط خارج سلولی اثبات شد (۱۱). در مطالعه‌ای که سلیمانی و همکاران در سال ۱۳۹۶ انجام دادند، آثار ایمنولوژیک نانوذرات کیتوزان بر روی سلول‌های سرطان پستان در مدل حیوانی را بررسی کردند. آنان نشان دادند که این نانوذرات ممکن است به عنوان کاندید مناسب و مؤثری برای درمان سرطان در آینده مطرح باشد (۱۲). با توجه به تنوع این نانوذرات و همچنین تنوع رده‌های سلولی و نبود اطلاعات کافی در زمینه سمیت آن‌ها، هدف از مطالعه حاضر بررسی سمیت سلولی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان در شرایط آزمایشگاهی است.

## مواد و روش‌ها

تهیه نانوذرات کیتوزان: نانوذرات کیتوزان با استفاده از روش ژل‌سازی یونی با استفاده از کیتوزان (شرکت Aldrich chemical، آلمان) و تری‌پلی‌فسفات (شرکت Sigma، انگلستان) بر اساس روش زارعی و همکاران (۱۳۹۴) آماده شدند (۵). بر اساس این روش، ۲ گرم کیتوزان با درجه داستیلاسیون ۷۵–۸۵ درصد و ویسکوزیته ۲۰۰ cP در ۱۰۰ سی‌سی محلول اسید استیک ۱ درصد (w/v) (شرکت Merck، آلمان) حل گردید. محلول تری‌پلی‌فسفات ۲ درصد در آب مقطر نیز تهیه شد. با استفاده از یک عدد مگت بر روی همزن مغناطیسی (شرکت Labtech، ایران)، ۴ میلی‌لیتر از محلول تری‌پلی‌فسفات به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کیتوزان اضافه

کیتوزان مشتق داستیله کیتین است. کیتوزان به علت دارا بودن ویژگی‌هایی مانند فعالیت ضدمیکروبی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، به عنوان یک نگهدارنده در محصولات غذایی مورد توجه است (۱). باز مثبت گروه‌های آمینه کیتوزان با باز منفی غشای سلول‌های میکروبی وارد واکنش می‌شود و منجر به خروج پروتئیناز و دیگر اجزای درون‌سلولی میکرووارگانیسم‌ها می‌گردد و این گونه اثر ضدمیکروبی خود را اعمال می‌کند. کیتوزان به سبب توانایی تشکیل فیلم، قابلیت استفاده برای بسته‌بندی و پوشش را دارد (۲). امروزه، استفاده از فناوری نانو در صنایع غذایی به صورت چشمگیری در حال افزایش است که علت این امر ویژگی‌های جدیدی است که مواد در مقیاس نانومتری از خود نشان می‌دهند (۳). نانوذرات از پلیمرهای طبیعی یا مصنوعی در دامنه اندازه زیر ۱۰۰ نانومتر ساخته شده‌اند (۴). از پلیمر طبیعی کیتوزان می‌توان نانوذرات کیتوزان تولید کرد که این ترکیبات فعالیت ضدمیکروبی بالاتری نسبت به کیتوزان دارند (۵). کی و همکاران در سال ۲۰۰۴، فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات کیتوزان را ارزیابی کردند (۶). بر اساس تحقیقات آنان، از رشد باکتری‌های دارای اهمیت در مواد غذایی جلوگیری شد (۵). نانوذرات در زمینه پوشش‌های مدرن مواد غذایی نیز کاربرد فراوانی دارند. برای نانوذرات نقره خاصیت ضدمیکروبی بیان شده است؛ زیرا باعث تخریب ترکیبات سولفور و فسفر موجود در پروتئین و محتویات ماده ژنتیکی می‌شوند. از کیتوزان می‌توان به عنوان ماتریکسی برای جا دادن نانوذرات نقره در پوشش‌ها استفاده کرد و پوشش‌هایی با عنوان نانوکامپوزیت کیتوزان نقره تولید کرد که خاصیت ضدمیکروبی دارند (۷).

با توجه به استفاده گسترده نانوذرات به عنوان یک ماده ضدمیکروبی در پوشش‌های مواد غذایی و مهاجرت آن‌ها به ماده غذایی و متعاقباً مصرف ماده غذایی توسط انسان و ایجاد آثار سمی در سلول‌های بدن، بررسی اثر سمیت این نانوذرات داری اهمیت است. در گذشته مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده است؛ به عنوان مثال، نانز و همکاران دریافتند که کیتوزان اثر سمیت روی سلول‌های HT-29 و Vero دارد (۸).

و IU/ml ۱۰۰ (شرکت Bio-idea، ایران) و ۵/۲ µg/ml درصد آمفوریسین (B) (شرکت Sigma آمریکا) منتقل گردید و در سانتریفیوژ (شرکت Biosan، Latvia) با سرعت  $\times$  rpm ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی خارج گردید و رسوب باقیمانده در انتهای لوله فالکون که شامل سلول‌ها بود، در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل شناور و در فلاسک کشت سلول T25 کشت داده شد و در دمای  $^{\circ}$ C ۳۷ در حضور ۵ درصد گاز دی‌اکسید کربن و رطوبت اشباع گرم خانه‌گذاری گردید. محیط کشت سلول‌ها هر ۴۸ ساعت یک‌بار تعویض شد و پس از رسیدن سلول‌ها به انبوهی حدود ۹۰ درصد، برای ادامه کار پاساژ داده شدند.

به منظور پاساژ دادن سلول‌ها، ابتدا مایع رویی سلول‌ها از فلاسک خارج و سلول‌ها ۳ مرتبه با PBS (شرکت Bio-Idea، ایران) استریل شستشو گردیدند. در ادامه، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول تریپسین ورسن با غلظت ۰/۰۵ درصد (شرکت Bio-Idea، ایران) به سلول‌ها اضافه شد و به مدت دو دقیقه در دمای  $^{\circ}$ C ۳۷ گرم خانه‌گذاری (شرکت Word دیجیت آزمایشکاری) گردید. پس از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک، ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل دارای ۱۰ درصد سرم جنینی گاو به فلاسک اضافه و سلول‌های موجود در فلاسک در آن شناور شد و توسط پیپت به یک لوله فالکون استریل منتقل گردید و با سرعت  $\times$  rpm ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. درنهایت، شمارش سلول‌ها با استفاده از لام ثنویار انجام گردید (۱۴).

تیمار سلول‌ها: برای انجام آزمون سمیت سلولی، ابتدا سلول‌های HT-29 و Vero با استفاده از ۹۰۰ میکرولیتر از محلول تریپسین ورسن با غلظت ۰/۰۵ درصد (شرکت Bio-Idea ایران) از کف فلاسک جدا شدند. ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل دارای ۱۰ درصد سرم جنینی گاو به فلاسک اضافه گردید و سلول‌های موجود در فلاسک در آن شناور شدند؛ سپس توسط پیپت به یک لوله فالکون استریل منتقل گردید و با سرعت  $\times$  rpm ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی حذف گردید. رسوب به دست آمده در ۱

گردید و عمل همزدن به مدت ۶۰ دقیقه ادامه داشت؛ سپس تحت تأثیر سونیکیشن (شرکت Bandelin، آلمان) با قدرت ۳۰۰ وات به مدت ۴۵ دقیقه قرار گرفت.

طیف‌سنج پراش پرتو ایکس (XRD): در روش پراش پرتو X، پودر حاوی نانوذرات سنترال شده روی لام شیشه‌ای قرار داده شد. برای تعیین ماهیت، این نانوذرات به آزمایشگاه بخش فیزیک دانشکده علوم در دانشگاه شیراز ارسال گردید. دستگاه (D8 advanncce، Bruker) روی  $\lambda$  KeV ۴۰ و  $\theta_2$  ۹۰ با پرتو CuK $\alpha$  با تابش  $\theta_1 = ۱۵۴$  mA در درجه‌ای با دامنه ۲۰ تا ۸۰ تنظیم شده بود.

طیف‌سنجی مادون‌فرم ز تبدیل فوریه (FTIR): برای تعیین مولکول‌ها و گروه‌های عاملی زیستی مسئول سنترال نانوذرات، از روش FT-IR استفاده گردید. برای این منظور، پودر حاوی نانوذرات سنترال شده و همچنین کیتوزان به آزمایشگاه مرکزی در دانشگاه شیراز ارسال شدند و طیف (NIRS XDS، Metrohm، Swiss) توسط دستگاه FTIR اندازه‌گیری گردید (۱۳).

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): تصاویر از پودر حاوی نانوذرات سنترال شده و همچنین پودر کیتوزان TESCAN، Czech (Republic، Model-TESCAN-Vega 3 آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شیراز اخذ شد. جزئیات مربوطه در تصاویر شماره ۳ و ۴ ارائه گردیده است.

کشت سلول: از دو رده سلولی HT-29 و Vero استفاده شد. این دو رده سلولی به صورت منجمد در ازت مایع از مرکز تحقیقات سرطان‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه گردیدند. برای کشت این رده‌های سلولی از روش گاگنون و همکاران (۲۰۱۳) استفاده شد (۱۴). برای خارج کردن سلول‌ها از حالت انجمام و خارج کردن دی‌متیل سولفوکساید موجود در محیط انجمام، سلول‌ها پس از ذوب شدن به لوله فالکون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل RPMI 1640 حاوی گلوتامیکس (شرکت Shell Max، ایران) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو (شرکت Gibco، آمریکا)، یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین

زنده‌مانی سلول‌ها از تست MTT (شرکت Bio idea- ایران) استفاده گردید. آزمایش به این صورت انجام شد که بر اساس دستورالعمل کیت، پس از تیمار کردن سلول‌ها محتويات پلیت خالی و تک لایه موجود در کف چاهک‌ها، ۴ بار با محلول بافر فسفات (PBS) شستشو گردید. در پلیت ۹۶ خانه‌ای در هر چاهک به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر RPMI- 1640 بدون فلر د و ۱۰ میکرولیتر MTT (۱۲ میلی‌مولار) موجود در کیت ریخته و به مدت ۴ ساعت در انکوپیاتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد؛ سپس محتويات چاهک‌ها خالی گردید و در هر چاهک ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید موجود در کیت ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در انکوپیاتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس جذب نوری چاهک‌های میکروپلیت در طول موج ۵۷۰ nm قرائت شد. این آزمایش ۳ بار تکرار گردید و درصد سمیت سلولی از طریق فرمول زیر محاسبه شد (۱۵):

$$\%/\text{Cytotoxicity} = (1 - (\text{OD of the test sample}) / (\text{OD of the control})) \times 100$$

۶۰ درصد، ۷۰ درصد، ۸۰ درصد، ۹۰ درصد و ۱۰۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه برای هر غلظت انجام شد و در پایان، در زیر هود به مدت دو ساعت در دمای اتاق قرار گرفت؛ سپس تصاویر سلول‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی گرفته شد (۱۶، ۱۷).

آنالیز آماری: همه داده‌ها به عنوان میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) از سه تکرار آزمایش آنالیز گردیدند. اختلاف آماری مربوط به آزمون MTT با آنالیز آماری واریانس یک‌طرفه و آزمون t مستقل و برای بررسی آپوپتوz سلولی از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.19 معنی دار در نظر گرفته شد. IC50 با استفاده از روش تحلیل GraphPad رگرسیون غیرخطی و با استفاده از نرم‌افزار Prism vol.8.3.0 محاسبه گردید؛ به این روش که غلظت‌های ماده مدنظر و درصدهای سمیت سلولی به دست آمده از تست MTT در نرم‌افزار قرار داده شد و غلظتی که باعث مهار رشد

میلی‌لیتر محیط کشت کامل تازه شناور شد؛ سپس سلول‌ها شمارش گردید و ۱۰۴ سلول در هریک از تیمارها استفاده شد. برای ادامه کار، سلول‌ها با ترکیبات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان در غلظت‌های مختلف برای بررسی سمیت سلولی تیمار گردید. نانوذرات کیتوزان در غلظت‌های ۴۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر تا ۱/۵۶ میکروگرم/میلی‌لیتر که به صورت یک‌به‌دو رقيق شده بود، بررسی گردید. کیتوزان در غلظت‌های ۲۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر تا ۳/۹ میکروگرم/میلی‌لیتر که به صورت یک‌به‌دو رقيق شده بود، بررسی گردید. اثربخشی همه تیمارهای ذکر شده در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بر روی دو ردۀ سلولی یادشده صورت گرفت. برای هر غلظت سه چاهک در نظر گرفته شد و چاهک‌های شاهد تیماری از ترکیبات یادشده را دریافت نکردند.

آزمون سمیت سلولی: به منظور بررسی میزان

بررسی آپوپتوz سلولی با استفاده از روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم برماید؛ برای تشخیص تشکیل سلول‌های آپوپتوز شده، رنگ‌آمیزی با ترکیب اتیدیوم برماید و آکریدین اورنج انجام گردید.

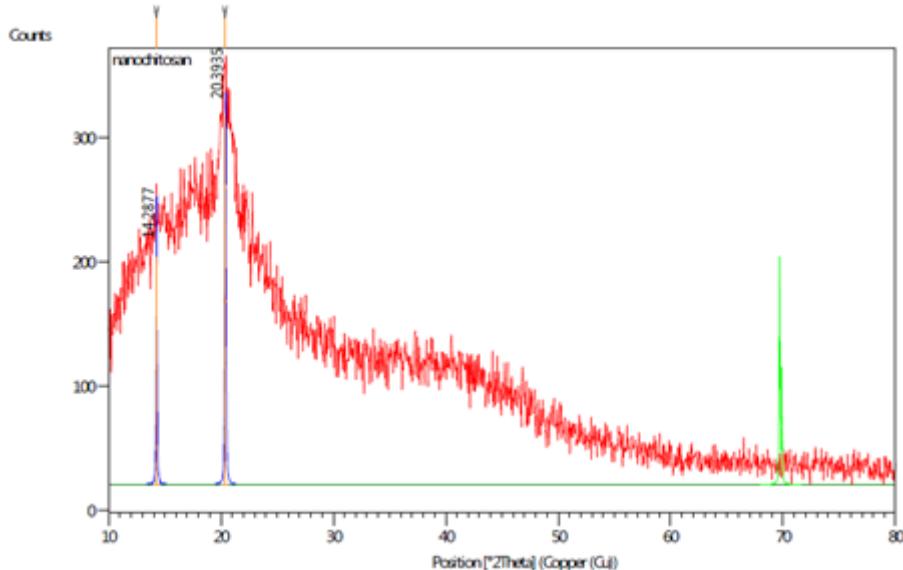
آماده‌سازی سلول‌ها برای میکروسکوپ الکترونی رویشی: سلول‌ها به تعداد  $1/5 \times 10^4$  در ۲ میلی‌لیتر در پلیت شش خانه ریخته شدند. پس از تشکیل تک لایه سلولی، با کیتوزان، نانوذرات کیتوزان در غلظت‌های مختلف به سلول‌ها اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. در حضور کیتوزان در سلول‌های HT-29 و Vero در غلظت ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بررسی گردید. در حضور نانوذرات کیتوزان در سلول‌های HT-29 و Vero در غلظت ۴۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بررسی شد؛ سپس سلول‌ها با PBS شسته و توسط گلوتارآلدهید ۳ درصد (شرکت Dae jung، کره) به مدت ۲ ساعت، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس گردیدند. دهیدراسیون توسط الکل (شرکت Merck، آلمان) ۵۰ درصد،

کیتوزان: الگوی طیف-سنجد پراش اشعه ایکس مربوط به نانوذرات کیتوزان در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. در تصویر شماره ۱، پیک در زاویه  $2\theta = 20^\circ$  مساوی  $20^\circ$  درجه مربوط به نانوذرات کیتوزان است.

۵۰ درصد از سلول‌ها گردید، محاسبه شد. مطالعه حاضر با کد طرح مصوب شماره ۲۶۰۶۰۲۶ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز تصویب شده است.

### یافته‌های پژوهش

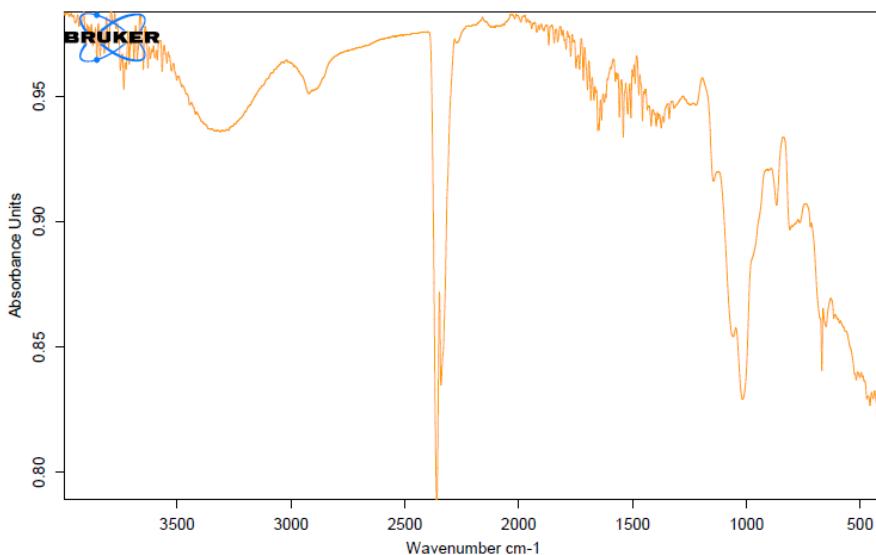
طیف-سنجد پراش اشعه ایکس مربوط به نانوذرات



تصویر شماره ۱. طیف-سنجد پراش اشعه ایکس مربوط به نانوذرات کیتوزان.

خمشی گروه عاملی N-H در عدد موجی  $cm^{-1} 1542$  ظاهر شده است و در  $cm^{-1} 1652$  شاهد پیک جذبی گروه عاملی کربونیل (C=O) خواهیم بود، در حالی که در طیف نانوذرات کیتوزان سنتر شده، ارتعاش خمشی N-H در  $cm^{-1} 1646$  مشاهده می‌گردد؛ همچنین دو پیک  $1026$  و  $1058 cm^{-1}$  مشاهده شده در نمودار طیفی کیتوزان به ارتعاشات کششی C-O نسبت داده می‌شود. طیف تری‌پلی فسفات سدیم پیک مشخصه‌ای در  $1259 cm^{-1}$  نشان می‌دهد که به ارتعاش کششی P=O مربوط است. اعداد موجی کششی متقارن و نامتقارن گروه عاملی O-P=O و PO<sub>3</sub> هستند. پیک ظاهر شده در عدد موجی  $856 cm^{-1}$  به ارتعاش کششی نامتقارن P-O-P اختصاص داده شده است.

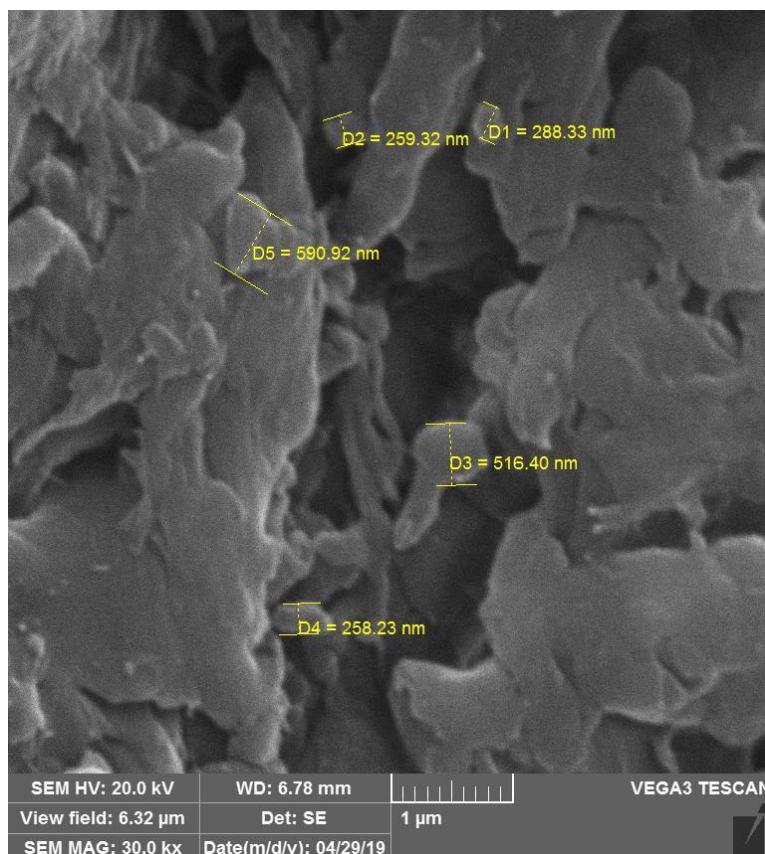
طیف سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه مربوط به نانوذرات کیتوزان: نانوذرات کیتوزان با استفاده از روش ژله‌ای شدن یونی به وسیله کیتوزان و تری‌پلی فسفات سدیم آماده گردیدند. در تصویر شماره ۲، نمودار مربوط به نانوذرات کیتوزان نشان داده شده است. در نمودارهای طیفی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان پیک جذبی پنهانی در ناحیه  $cm^{-1} 3300$  نشان دیده می‌شود که نشانگر همپوشانی مذ ارتعاش کششی پیوندهای N-H و O-H است. پیک جذبی که در محدوده عدد موجی  $2900 cm^{-1}$  مشاهده می‌گردد، به ارتعاش کششی C-H نسبت داده می‌شود، در حالی که پیک جذبی مشاهده شده در  $1375 cm^{-1}$  مربوط به ارتعاش خمشی پیوند C-H است. پیک ظاهر شده در عدد موجی  $1530 cm^{-1}$  به ارتعاش کششی N-O-P مربوط است. در نمودار طیفی کیتوزان، ارتعاش



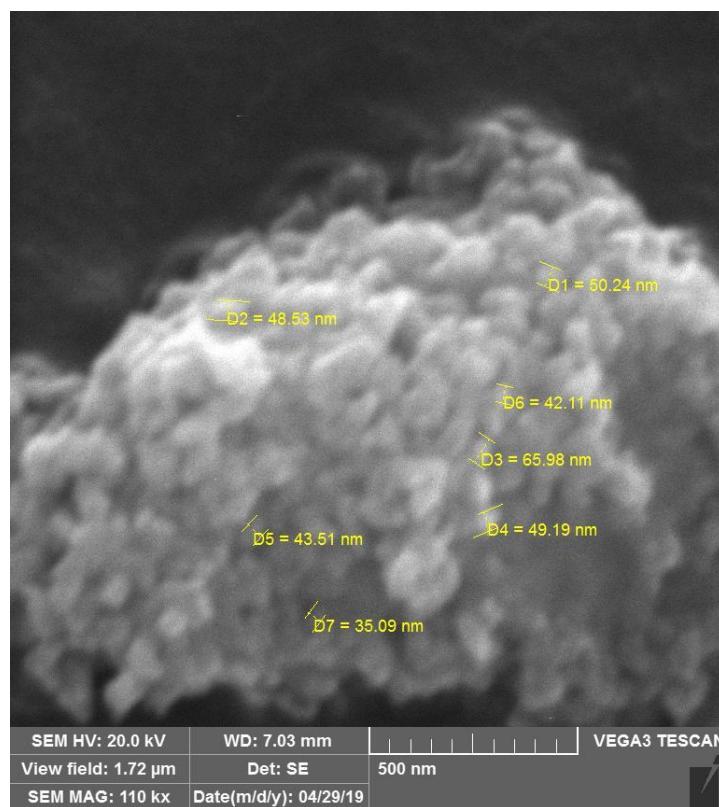
تصویر شماره ۲. طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، پیک‌های مربوط به نانوذرات کیتوzan.

عکس قابل مشاهده است. ذرات کیتوzan به صورت بی‌شکل و در اندازه‌های مختلف دیده شدند. نانوذرات کیتوzan با شکل کروی و اندازه‌های کمتر از ۱۰۰ نانومتر مشاهده گردیدند.

میکروسکوپ الکترونی روبشی: اندازه و مورفولوژی کیتوzan و نانوذرات کیتوzan توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی به ترتیب در تصاویر شماره ۳ و ۴ نشان داده شده است. جزئیات مربوط به بزرگنمایی، ولتاژ و اندازه نانوذرات در هر



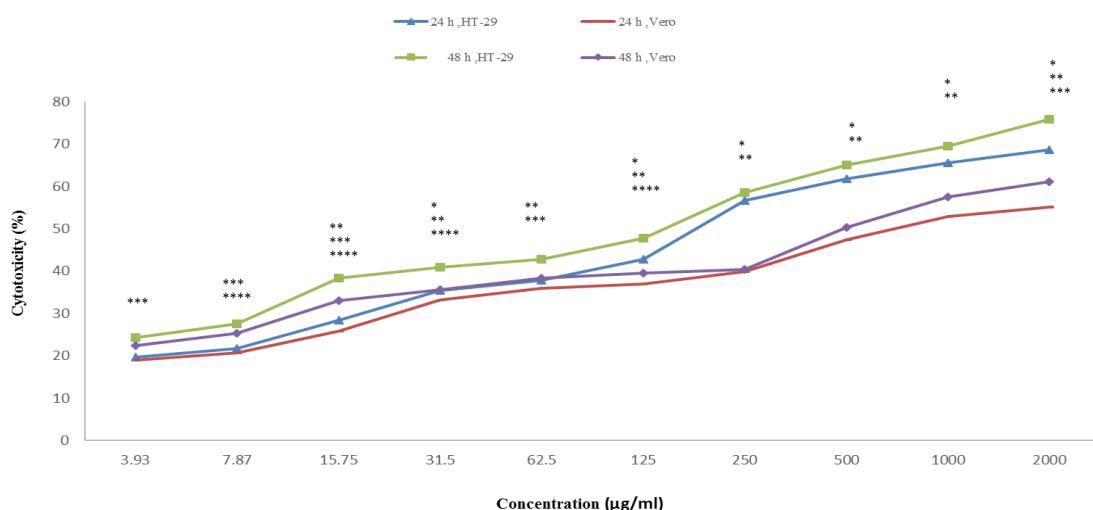
تصویر شماره ۳. تصویر میکروسکوپ روبشی مربوط به کیتوzan.



تصویر شماره ۴. تصویر میکروسکوب رویشی مربوط به نانوذرات کیتوزان.

زمان ۲۴ ساعت برابر با  $\frac{68}{68}$  و  $\frac{19}{36}$  درصد و در زمان ۴۸ ساعت برابر با  $\frac{75}{74}$  و  $\frac{24}{34}$  درصد محاسبه شد. سمیت سلولی کیتوزان در سلول‌های Vero در غلظت‌های ۲۰۰۰ و  $\frac{3}{9}$  میکروگرم/میلی لیتر به ترتیب در زمان ۲۴ ساعت برابر با  $\frac{55}{14}$  و  $\frac{18}{92}$  درصد و در زمان ۴۸ ساعت برابر با  $\frac{61}{16}$  و  $\frac{22}{47}$  درصد محاسبه گردید.

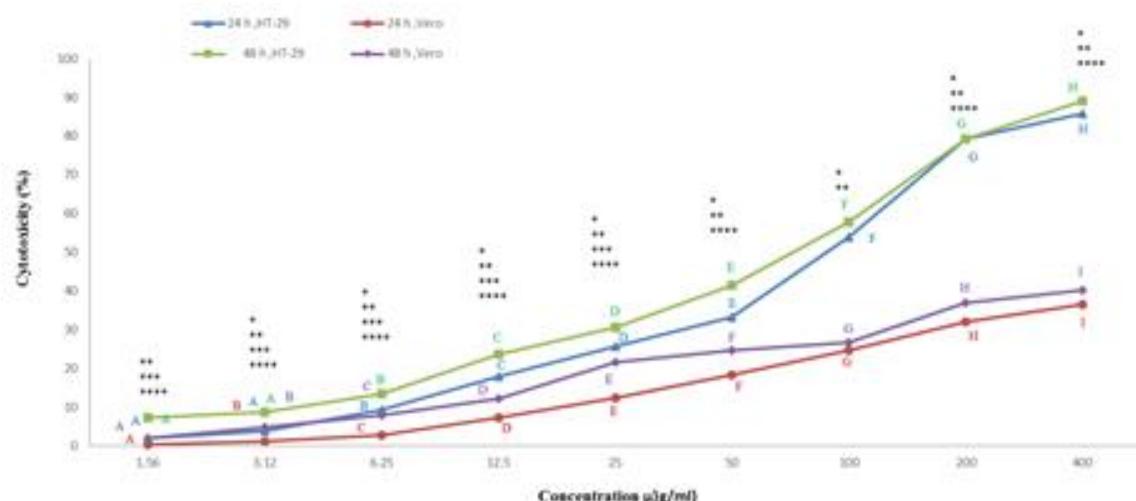
سمیت سلولی کیتوزان در سلول‌های HT-29 و Vero: سمیت سلولی کیتوزان (از غلظت ۲۰۰۰ تا  $\frac{3}{9}$ ) در سلول‌های HT-29 و Vero در تصویر شماره ۵ نشان داده شده است. سمیت سلولی کیتوزان در سلول‌های HT-29 و Vero با افزایش زمان و غلظت نانوذرات افزایش یافت. سمیت سلولی کیتوزان در سلول‌های HT-29 در غلظت‌های ۲۰۰۰ و  $\frac{3}{9}$  میکروگرم/میلی لیتر به ترتیب در



**تصویر شماره ۵.** تصویر شماره ۵. سمیت سلولی سلول‌های HT-29 و Vero در حضور کیتوzan. حروف لاتین مشابه نشان دهنده نبود اختلاف آماری معنی‌دار میان ستون‌ها است؛ علامت \* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت میان دو سلول ۲۹-HT و Vero است و علامت \*\* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در زمان ۴۸ ساعت میان دو سلول ۲۹-HT و Vero است؛ همچنین علامت \*\*\* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میان دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در سلول Vero است و علامت \*\*\*\* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میان دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در سلول ۲۹-HT است. (P<0.05).

۲۴ ساعت برابر با ۸۵/۷۶ و ۱/۹۳ درصد و در زمان ۴۸ ساعت برابر با ۸۹/۱۵ و ۷/۲۶ درصد محاسبه شد. سمیت سلولی نانوذرات کیتوzan در سلول‌های Vero در غلظت‌های ۴۰۰ و ۱/۵۶ میکروگرم/میلی‌لیتر به ترتیب در زمان ۲۴ ساعت برابر با ۱/۹۹ درصد محاسبه گردید.

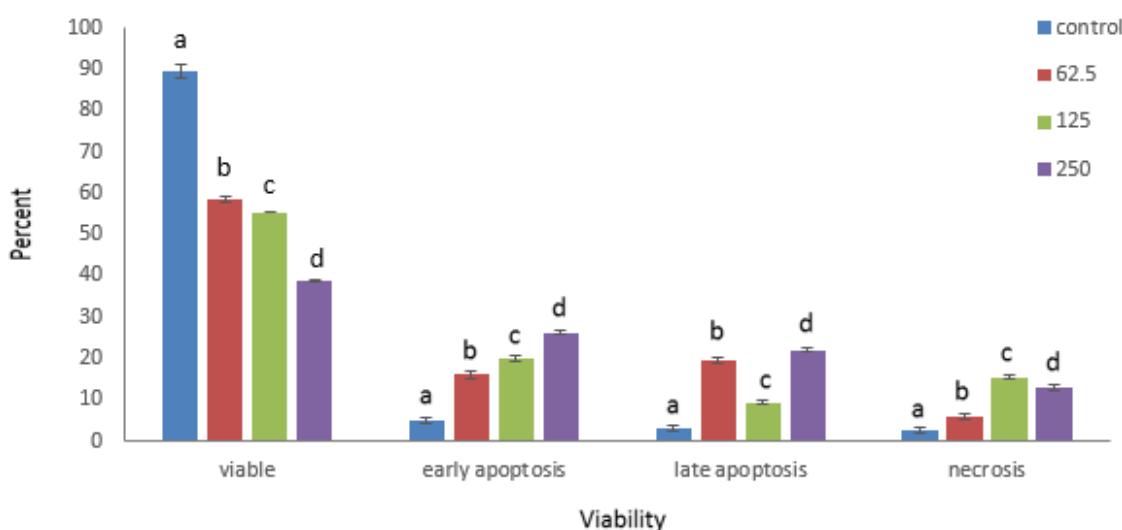
سمیت سلولی نانوذرات کیتوzan در سلول‌های HT-29 و Vero: سمیت سلولی نانوذرات کیتوzan در سلول‌های HT-29 و Vero در تصویر شماره ۶ نشان داده شده است. سمیت سلولی نانوذرات کیتوzan در سلول‌های HT-29 و Vero با افزایش زمان و غلظت نانوذرات افزایش یافت. سمیت سلولی نانوذرات کیتوzan در سلول‌های HT-29 در غلظت‌های ۴۰۰ و ۱/۵۶ میکروگرم/میلی‌لیتر به ترتیب در زمان



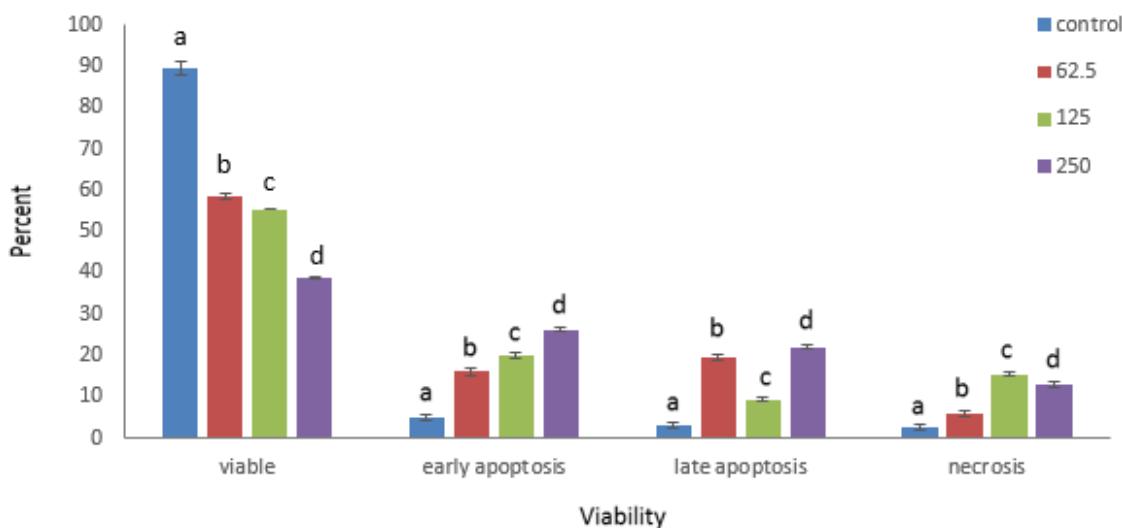
**تصویر شماره ۶.** سمیت سلولی سلول‌های HT-29 و Vero در حضور نانوذرات کیتوzan. حروف لاتین مشابه نشان دهنده نبود اختلاف آماری معنی‌دار میان ستون‌ها است؛ علامت \* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت میان دو سلول ۲۹-HT و Vero است و علامت \*\* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در زمان ۴۸ ساعت میان دو سلول ۲۹-HT و Vero است؛ همچنین علامت \*\*\* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میان دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در سلول ۲۹-HT است و علامت \*\*\*\* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میان دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در سلول Vero است. (P<0.05).

یافت (تصویر شماره ۷). میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز در حضور کیتوzan در غلظت صفر، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بررسی گردید و میزان زنده‌مانی به ترتیب برابر با ۸۸/۷۶، ۶۴/۱۱ و ۴۳/۹۶ درصد شد. با افزایش غلظت کیتوzan، میزان زنده‌مانی کاهش و میزان آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌ها در اندازه گیری با روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بر ماید افزایش یافت (تصویر شماره ۸).

میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های HT-29 و Vero در حضور کیتوzan: میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های HT-29 در حضور کیتوzan در غلظت صفر، ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بررسی گردید و میزان زنده‌مانی به ترتیب برابر با ۵۸/۴۷، ۸۹/۴۰، ۵۸/۴۷ و ۳۸/۸۲ درصد شد. با افزایش غلظت کیتوzan، میزان زنده‌مانی کاهش و میزان آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌ها در اندازه گیری با روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بر ماید افزایش



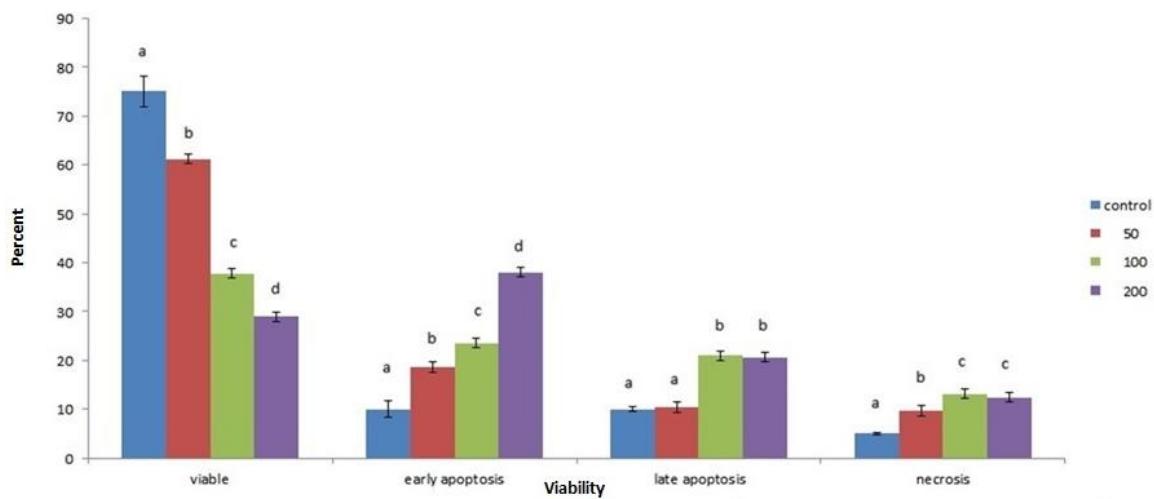
تصویر شماره ۷. میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های 29-HT در حضور کیتوزان. حروف لاتین مشابه نشان‌دهنده نبود  
اختلاف آماری معنی‌دار میان غلظت‌های مختلف است ( $P<0.05$ )



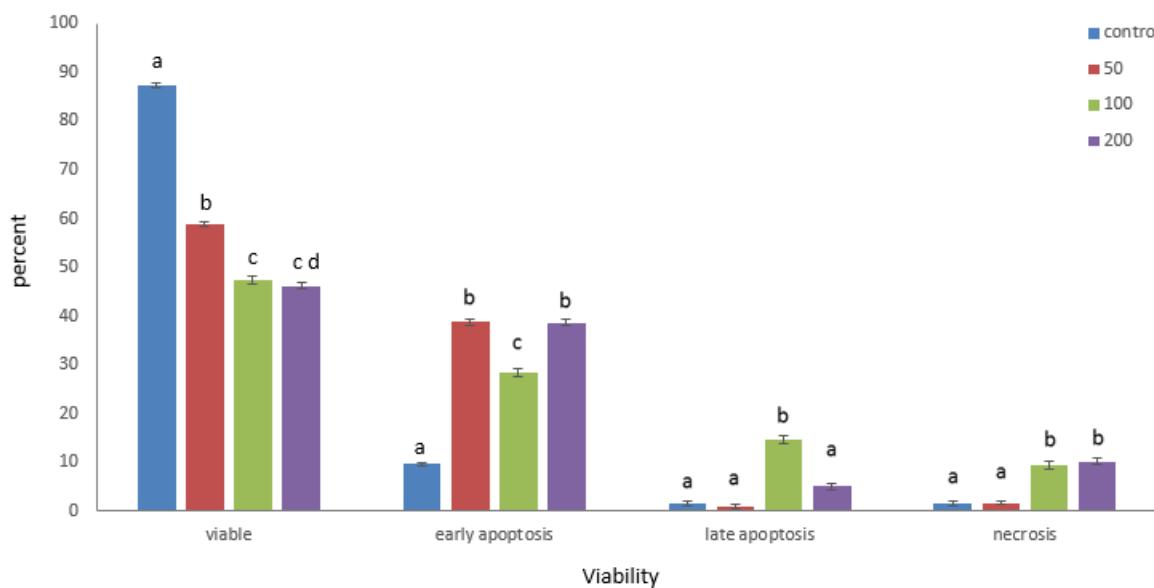
تصویر شماره ۸. میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های Vero در حضور کیتوزان. حروف لاتین مشابه نشان‌دهنده نبود  
اختلاف آماری معنی‌دار میان غلظت‌های مختلف است ( $P<0.05$ )

اورنج و اتیدیوم بر ماید افزایش یافت (تصویر شماره ۹). میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های Vero در حضور نانوذرات کیتوزان در غلظت صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بررسی گردید و میزان زنده‌مانی به ترتیب برابر با  $۸۷/۳۰$ ،  $۵۸/۸۸$ ،  $۴۷/۴۱$  و  $۴۶/۲۰$  درصد شد. با افزایش غلظت نانوذرات کیتوزان، میزان زنده‌مانی کاهش و میزان آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌ها در اندازه‌گیری با روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بر ماید افزایش یافت (تصویر شماره ۱۰).

میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های 29-HT و Vero در حضور نانوذرات کیتوزان: میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های 29-HT در حضور نانوذرات کیتوزان در غلظت صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بررسی گردید و میزان زنده‌مانی به ترتیب برابر با  $۷۵/۰۵$ ،  $۶۱/۲۰$ ،  $۳۷/۷۴$  و  $۲۸/۹۲$  درصد شد. با افزایش غلظت نانوذرات کیتوزان، میزان زنده‌مانی کاهش و میزان آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌ها در اندازه‌گیری با روش رنگ‌آمیزی آکریدین



**تصویر شماره ۹.** میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های HT-29 در حضور نانوذرات کیتوzan. حروف لاتین مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف آماری معنی‌دار میان غلظت‌های مختلف است ( $P<0.05$ ).



**تصویر شماره ۱۰.** میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های Vero در حضور نانوذرات کیتوzan. حروف لاتین مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف آماری معنی‌دار میان غلظت‌های مختلف است ( $P<0.05$ ).

برابر با ۷۵/۶۹ میکروگرم/میلی‌لیتر و در سلول‌های Vero برابر با ۹۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر است. با توجه به کوچک‌تر بودن مقدار IC50 سلول‌های HT-29، این رده سلولی به طور معنی‌داری، حساس‌تر از سلول‌های Vero در حضور نانوذرات کیتوzan هستند ( $P\leq0.05$ ).

### بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به خاصیت ضدمیکروبی کیتوzan و استفاده گسترده از آن در صنعت مواد غذایی، میزان سمیت این پلی‌ساقارید روی سلول‌های پوششی در کشت سلول بررسی

تعیین IC50 حاصل از کیتوzan در دو رده سلولی Vero و HT-29: مقدار IC50 در سلول‌های HT-29 برابر با ۷۹۴ میکروگرم/میلی‌لیتر و در سلول‌های Vero برابر با ۱۸۸ میکروگرم/میلی‌لیتر است. با توجه به کوچک‌تر بودن مقدار IC50 سلول‌های HT-29، این رده سلولی به طور معنی‌داری، حساس‌تر از سلول‌های Vero در حضور کیتوzan هستند ( $P\leq0.05$ ).

تعیین IC50 حاصل از نانوذرات کیتوzan در دو رده سلولی HT-29 و Vero: مقدار IC50 در سلول‌های HT-29

تموری دارند. در مطالعه حاضر، نانوذرات کیتوزان باعث مهار رشد سلول‌های HT-29 شدند. در تحقیقات حاضر، نانوذرات کیتوزان با اندازه‌های کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر باعث مهار رشد سلول‌های 29-HT با IC<sub>50</sub> ۶۹/۷۵ میکروگرم/میلی‌لیتر در عرض ۲۴ ساعت گردیدند. در مطالعه سلیمانی و همکاران (۱۳۹۶)، آثار ایمنولوژیک نانوذرات کیتوزان بر سلول‌های سرطان پستان در مدل حیوانی برسی شد. نتایج آنان نشان‌دهنده این بود که این نانوذرات ممکن است گزینه مناسب و مؤثری برای درمان سرطان در آینده باشند (۱۲).

کی و همکاران (۲۰۰۵) نانوذرات کیتوزان با اندازه ۶۵ نانومتر را تولید کردند. نتایج نشان داد که نانوذرات باعث مهار رشد رده سلول MGC803 در آزمایشگاه می‌شوند و ممکن است آثار مفیدی در برابر سلطان انسان داشته باشند. نانوذرات کیتوزان باعث مهار رشد سلول‌های MGC803 با IC50 ۳/۵ میکروگرم/میلی لیتر در عرض ۴۸ ساعت شدند. آنان بیان کردند، نانوذرات کیتوزان آثار مهاری وابسته به دوز روی تکثیر سلول‌های BEL-7402 داشته‌اند؛ همچنین در این مطالعه نیز اثر مهاری وابسته به غلظت نانوذرات کیتوزان بر تکثیر سلول‌های HT-29 مشاهده گردید. علی‌رغم اثر مهاری این نانوذرات بر مهار تکثیر سلول‌های توموری مختلف، آثار سمی کمتری روی سلول‌های کبدی دارند (۱۰). در مطالعه‌ما، سلول‌های Vero مشاهده گردید که نسبت به سلول‌های سلطانی سیار کمتر بود و با افزایش غلظت نانوذرات کیتوزان، تکثیر سلول‌های Vero کاهش داشت. در مطالعه‌ای که لوح و همکاران (۲۰۱۰) انجام دادند، سلول‌های سالم کبدی تحت تأثیر غلظت‌هایی از نانوذرات کیتوزان قرار گرفتند. سلول‌ها غلظت‌های کمتر از ۰/۵ درصد وزنی/حجمی را به مدت ۴ ساعت تحمل کردند؛ اما در غلظت‌های بالاتر از این مقدار، یکپارچگی غشای سلولی در معرض خطر قرار گرفت. این مورد توسط نشت آلاین ترانس آمیناز به محیط خارج سلولی اثبات شد (۱۱). طبق مطالعه ملاتی و ایر (۲۰۱۸)، نارنجین روزی سلول‌های ۴۰ درصد سمیت سلولی داشت؛ اما

شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان غلظت کیتوزان با سمیت ۵۰ درصد، بر سلول‌های HT-29، ۱۸۸ میکروگرم/میلی‌لیتر و روی سلول‌های Vero ۷۴۹ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. نائز و همکاران (۲۰۱۷) دریافتند که کیتوزان اثر سمیت بر روی سلول‌های HT-29 و Vero دارد. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف تیمار شدند و بر اساس نتایج، در غلظت ۴۱۴ میکروگرم/میلی‌لیتر برای سلول‌های Vero و ۳۳۳ میکروگرم/میلی‌لیتر برای سلول‌های HT-29 سمیت ۵۰ درصد گزارش گردید؛ بنابراین، اثر سمیت سلولی بر روی سلول‌های HT-29 بیشتر از سلول‌های Vero بود؛ زیرا در غلظت کمتری باعث آثار توکسیک روی ۵۰ درصد از سلول‌ها شد (۸). در تحقیق ما نیز اثر سمیت سلولی بر سلول‌های HT-29 بیشتر از Vero بود. با توجه به تحقیقات گذشته، کیتوزان خاصیت ضدسرطانی نیز دارد. در مطالعات نام و همکاران در سال ۲۰۰۷، کیتوزان با وزن مولکولی متوسط فعالیت شیمی‌درمانی در سرطان کولون داشت، به این طریق که باعث افزایش آنزیم کوئینون‌ردوکتاز و گلوتاکسیژناز را در محیط اورینیتین‌دکربوکسیلاز و سیکلواکسیژناز را در آزمایشگاه مهار می‌کند (۱۸). آزوما و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که سلول‌های MDA-MB-231 که تحت درمان کیتوزان قرار گرفته بودند، کاهش واپسته به غلظت داشتند؛ یعنی با افزایش غلظت کیتوزان، تعداد سلول‌های سرطانی کاهش یافت (۹)؛ همچنین در مطالعات لین و همکاران (۲۰۱۶)، سلول‌های Vero روی سطح کامپوزیت‌های کیتوزان با کربوهیدرات‌ها می‌چسبند و تکثیر می‌یابند و یک لایه از سلول را تشکیل می‌دهند (۱۹)، در حالی که در مطالعه مأ این گونه نبود؛ بنابراین، روش کار متفاوت می‌تواند بر سمیت سلولی نانوذرات تأثیر داشته باشد؛ همچنین وجود کربوهیدرات‌ها به رشد سلول‌ها کمک می‌کند (۱۹). با توجه به نتایج مطالعات حاضر، کیتوزان در هر دو سلول Vero و HT-29 سمیت سلولی واپسته به غلظت و زمان دارد که سمیت سلولی در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم بالاتر

## ناؤذرات کتوزان خاصت ضدمکروی و ضد

بر انجام آزمون های کشت سلولی، انجام آزمون آماری، ورود داده ها به نرم افزار، اصلاح مقاله . نویسنده چهارم: پیشنهاد طرح، انجام آزمون و آنالیز داده های نانوذرات، اصلاح مقاله، پاسخ به داوری ها: نویسنده پنجم: سرپرست تیم تحقیقاتی، پیشنهاد طرح، انجام آزمون آماری، اصلاح مقاله، پاسخ به داوری ها.

وقتی نارنجین با نانوذرات کیتوزان بارگذاری گردید، آثار سمی آن نیز بیشتر شد و به ۵۰ درصد رسید (۲۰). در مطالعه حاضر، سمیت سلولی نانوذرات کیتوزان بر سلول های سرطانی بسیار بیشتر از سلول های سالم بود؛ زیرا IC50 در سلول سرطان کولون برابر با  $75/69$  میکرو گرم/ میلی لیتر و در سلول نرم ال اپیتیال کلیه برابر با  $925$  میکرو گرم/ میلی لیتر بود که نشان دهنده آثار سمی کمتر این ترکیبات بر سلول های سالم بوده است. از آنجاکه نانوذرات کیتوزان خاصیت ضد توموری دارند، این نانوذرات در اندازه نانوذره، نفوذ و احتباس بیشتری به سلول های توموری دارند و می توانند آثار ضد توموری خود را اعمال کنند (۱۳). علی رغم اینکه مطالعه حاضر نشان دهنده تأثیرات ضد سرطانی این نوع نانوذرات در شرایط in-vitro است، بررسی نکردن آثار سمی این نوع نانوذرات در شرایط in-vivo از جمله کاستی های این مطالعه است که باید در مطالعات آینده مورد توجه جدی قرار گیرند.

در این مطالعه برای بررسی سمیت سلولی از کیتوزان و نانوذرات کیتوزان استفاده گردید. نتایج نشان می دهد، با توجه به آثار سمی بالایی که نانوذرات کیتوزان بر رده سلولی طبیعی داشتند، برای استفاده در صنعت غذا توصیه نمی شوند؛ اما با توجه به آثار سمی آنها روی سلول های سرطانی می توانند در درمان سرطان مؤثر باشند که نیازمند مطالعات بیشتری در این زمینه است.

### سپاس گزاری

بدین وسیله از کارکنان محترم گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز صمیمانه سپاس گزاری می شود.

### تعارض منافع

بدین وسیله اعلام می گردد که نویسنده گان مقاله هیچ گونه تعارض منافعی ندارند.

### سهم نویسنده گان

نویسنده اول: انجام کارهای عملی، جمع آوری داده ها، انجام آزمون آماری، نوشتن مقاله اولیه، تنظیم مقاله بر اساس فرمت مجله. نویسنده دوم: پیشنهاد طرح، انجام آزمون آماری، اصلاح مقاله، پاسخ به داوری ها. نویسنده سوم: نظارت

## References

1. Ghytasi A, Hosseini Shekarabi SP, Rajabi Islami H, Shamsaie Mehrgan M. Dietary effects of lemon Citrus limon peel essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles on hematological indices and antioxidant defense system of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aqua Animals Nut* 2021; 7: 27-41. doi: 10.22124/janb.2021.20348.1151.
2. Sabbaghi M, Maqsood Y, Khamari M, Ziaeи A. Effect of mixture of chitosan coating and green tea extract on oxidative and fungal activity of walnut kernel. *J Res Innovation Food Sci Ind* 2013; 3: 361-74.
3. Hanifi E, Ahmadifard N, Atashbar B, Meshkini S. Effects of zinc oxide nanoparticles on photosynthetic pigments, zinc accumulation, and activity of antioxidant enzymes of Dunaliella salina. *Aqua Animals Nut* 2023; 8: 31-42. doi: 10.22124/janb.2023.24071.1189.
4. Gao W, Lai JC, Leung S. Functional enhancement of chitosan and nanoparticles in cell culture, tissue engineering, and pharmaceutical applications. *Front Physiol* 2012; 3:321. doi:10.3389/fphys.2012.00321.
5. Zarei M, Ramezani Z, Ein-Tavasoly S, Chadorbaf M. Coating effects of orange and pegrannate peel extracts combined with chitosan nanoparticles on the quality of refrigerated silver comarp fillets. *J Food Proc Preserv* 2015; 39: 2180-87. doi:10.1111/jfpp.12462.
6. Qi L, Xu Z, Jiang X, Li Y, Wang M. Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15:1397-99. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.01.010.
7. Tyliszczak B, Drabczyk A, Kudłacik-Kramarczyk S, Bialik-Wąs K, Kijkowska R, Sobczak-Kupiec A. Preparation and cytotoxicity of chitosan-based hydrogels modified with silver nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017; 160: 325-30. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.09.044.
8. Nunes CS, Rufato KB, Souza PR, Almeida EA de, Silva MJ da, Scariot DB, et al. Chitosan/chondroitin sulfate hydrogels prepared in [Hmim][HSO<sub>4</sub>] ionic liquid. *Carbohydr Polym* 2017; 170: 99-106. doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.073.
9. Azuma K, Osaki T, Minami S, Okamoto Y. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. *J Funct Biomater* 2015; 6: 33-49. doi: 10.3390/jfb6010033.
10. Qi LF, Xu ZR, Li Y, Jiang X, Han XY. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGCG803 cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5136-41. doi: 10.3748/wjg.v11.i33.5136.
11. Loh JW, Yeoh G, Saunders M, Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 249:148-57. doi: 10.1016/j.taap.2010.08.029.
12. Soleimani N, Mohabati Mobarez A. Immunological effects of chitosan nanoparticles on breast cancer cells in animal model. *Qom Uni Med Sci J* 2017; 11: 1-9.
13. Loutfy SA, A El-Din HM, Elberry MH, Allam NG, Hasanin M, Abdellah AM. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model. *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol* 2016; 7:035008. doi: 10.1088/2043-6262/7/3/035008.
14. Gagnon M, Berner AZ, Chervet N, Chassard C, Lacroix C. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *J Microbiol Methods* 2013; 94: 274-9. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.027.
15. Thirabunyanon M, Boonprasom P, Niamsup P. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol Lett* 2009; 31: 571-6. doi: 10.1007/s10529-008-9902-3.
16. Viet Quang D, Hoai Chau N. The effect of hydrothermal treatment on silver nanoparticles stabilized by chitosan and its possible application to produce mesoporous silver powder. *J Powder Technol* 2013; ID 281639. doi:10.1155/2013/281639.
17. Saudi A, Rafienia M, Zargar Kharazi A, Salehi H, Zarabi A, Karevan M. Design and fabrication of poly (glycerol sebacate)-based fibers for neural tissue engineering: Synthesis, electrospinning, and characterization. *Polym Adv Technol* 2019; 30: 1427-40. doi:10.1002/pat.4575.
18. Nam KS, Kim MK, Shon YH. Chemopreventive effect of chitosan oligosaccharide against colon carcinogenesis. *J Microbiol Biotechnol* 2007; 17: 1546-49.
19. Lin YC, Chen GT, Wu SC. Carbohydrates-chitosan composite carrier for Vero cell culture. *Cytotechnol* 2016; 68: 2649-58. doi: 10.1007/s10616-016-9989-7.
20. Malathy S, Iyer P. Naringin loaded chitosan nanoparticle for bone regeneration: A preliminary in vitro study. *J Nanomed Nanotechnol* 2018; 9: 2. doi: 10.4172/2157-7439.1000507.