Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

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

Laya Ebrahimi [1], Enayat Berizi [2], Maryam Montaseri [1], Mansour Rahsepar [3], Saeid Hosseinzadeh [1*]

[1] Dept of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
[2] Dept of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[3] 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

A B S T R A C T

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 θ2 were observed at 20°. The highest peak appeared at 1530 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 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام
JIUMS
P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

بررسی اثر سمیت سلولی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان در محیط آزمایشگاهی

لعیا ابراهیمی [۱]، **عنایت بریزی** [۲]، **مریم منتصری** [۱]، **منصور رهسپار** [۳]، **سعید حسین‌زاده** [۱*]

[۱] گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[۲] گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکدهٔ تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه، علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
[۳] گروه مهندسی مواد، دانشکدهٔ مهندسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

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، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
Email:
hosseinzadeh@shirazu.ac.ir

چکیده

مقدمه: با توجه به استفادهٔ گسترده از نانوذرات به‌عنوان یک مادهٔ ضدمیکروبی 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: مطالعهٔ حاضر یک مطالعهٔ مقطعی است که در سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه شیراز صورت گرفت. برای بررسی ویژگی‌های این نانوذرات از روش‌های طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس (XRD) و طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (FTIR) استفاده گردید. به‌منظور بررسی اثر سمیت سلولی کیتوزان و نانوکیتوزان، دو ردهٔ سلولی HT-29 (لاین سرطان کولون) و Vero (لاین اپیتلیال کلیهٔ میمون) به‌کار گرفته شد؛ سپس آزمون سمیت سلولی با روش MTT و بررسی آپوپتوز سلولی با استفاده از روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم برماید صورت گرفت.

یافته‌های پژوهش: برای آنالیز آماری از واریانس یک‌طرفه و آزمون t مستقل با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.19 استفاده گردید. حداکثر مقادیر طیف‌سنج پراش اشعهٔ ایکس نانوذرات کیتوزان در زاویهٔ θ2 در ۲۰ درجه دیده شد. پیک ظاهرشده در عدد موجی 1530 cm-1 به ارتعاش کششی N-O-P مربوط بود. در نمودار طیفی کیتوزان ارتعاش خمشی گروه عاملی N-H در عدد موجی 1542 cm-1 ظاهر گردید، درحالی‌که در طیف نانوذرات کیتوزان سنتزشده ارتعاش خمشی N-H در cm-1 1646 دیده شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که سمیت سلولی کیتوزان در سلول‌های HT-29 و Vero با افزایش زمان و غلظت نانوذرات، افزایش‌یافته است.

بحث و نتیجه‌گیری: ازآنجاکه 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، ردهٔ سلولی HT-29 و Vero

استناد: ابراهیمی لعیا، بریزی عنایت، 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(۶): ۴۹-۳۶.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

CC BY NC

مقدمه

کیتوزان مشتق داستیله کیتین است. کیتوزان به علت دارا بودن ویژگی‌هایی مانند فعالیت ضدمیکروبی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، به‌عنوان یک نگه‌دارنده در محصولات غذایی موردتوجه است (۱). بار مثبت گروه‌های آمینه کیتوزان با بار منفی غشای سلول‌های میکروبی وارد واکنش می‌شود و منجر به خروج پروتئیناز و دیگر اجزای درون‌سلولی میکروارگانیسم‌ها 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 به‌صورت 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 دامنهٔ اندازهٔ 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 زمینهٔ پوشش‌های مدرن مواد غذایی نیز کاربرد فراوانی دارند. برای نانوذرات نقره خاصیت ضدمیکروبی بیان‌شده است؛ زیرا باعث تخریب ترکیبات سولفور و فسفر موجود در پروتئین و محتویات مادهٔ ژنتیکی می‌شوند. از کیتوزان می‌توان به‌عنوان 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 استفادهٔ گستردهٔ نانوذرات به‌عنوان یک مادهٔ ضدمیکروبی در پوشش‌های مواد غذایی و مهاجرت آن‌ها به مادهٔ غذایی و متعاقباً مصرف مادهٔ 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 انجام‌شده است؛ به‌عنوان‌مثال، نانز و همکاران دریافتند که کیتوزان اثر سمیت روی سلول‌های HT-29 و Vero دارد (۸). آزوما و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که سلول‌های MDA-MB-231 که تحت درمان کیتوزان قرار گرفته‌اند، کاهش وابسته به غلظت داشتند (۹). محصول نانوکیتوزان تولیدشدهٔ کی و همکاران در سال ۲۰۰۵، باعث مهار رشد ردهٔ سلولMGC803 در آزمایشگاه گردید و به‌نظر رسید، نانوذرات کیتوزان آثار مفیدی در درمان سرطان در انسان داشته باشند (۱۰). در مطالعه¬ای 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 ۰/۵ 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 به‌عنوان کاندید مناسب و مؤثری برای درمان سرطان در آینده مطرح باشند (۱۲). با توجه به تنوع این نانوذرات و همچنین تنوع رده‌های سلولی و نبودِ اطلاعات کافی در زمینهٔ سمیت آن‌ها، هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی سمیت سلولی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ 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 ۸۵–۷۵ درصد و ویسکوزیته 200-800 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 مگنت بر روی همزن مغناطیسی (شرکت Labtech، ایران)، ۴ میلی‌لیتر از محلول تری‌پلی‌فسفات به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کیتوزان اضافه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

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 سنتزشده روی لام شیشه‌ای قرار داده شد. برای تعیین ماهیت، این نانوذرات به آزمایشگاه بخش فیزیک دانشکده علوم در دانشگاه شیراز ارسال گردید. دستگاه (D8 advannce, Bruker) روی ۴۰ KeV و ۴۰ mA با پرتو CuKα1 با تابش ۱.۵۴=λ در زاویه θ2، در درجه‌ای با دامنهٔ ۲۰ تا ۸۰ تنظیم‌شده بود.

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

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

کشت سلول: از دو ردهٔ سلولی HT-29 و Vero استفاده شد. این دو ردهٔ سلولی به‌صورت 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 انجماد و خارج کردن دی‌متیل سولفوکساید موجود در محیط انجماد، سلول‌ها پس از ذوب شدن به لولهٔ فالکون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل RPMI 1640 حاوی گلوتامکس (شرکت Shell Max، ایران) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو (شرکت Gibco، آمریکا)، یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین–استرپتومایسین (100 IU/ml و 100µg/ml) (شرکت Bio-idea، ایران) و ۰/۰۵ درصد آمفوتریسین (B 5/2 µg/ml) (شرکت Sigma، آمریکا) منتقل گردید و در سانتریفیوژ (شرکت Biosan، Latvia) با سرعت rpm1000 × 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 C37° و 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.

به‌منظور 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 C37° گرم خانه‌گذاری (شرکت Word science، کره) 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 rpm 1000× به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. درنهایت، شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار 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 rpm 1000× به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی حذف گردید. رسوب به‌دست‌آمده در ۱

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

میلی‌لیتر محیط کشت کامل تازه شناور شد؛ سپس سلول‌ها شمارش گردید و ۱۰۴ سلول در هریک از تیمارها استفاده شد. برای ادامهٔ 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 به‌صورت یک‌به‌دو رقیق شده بود، بررسی گردید. کیتوزان در غلظت‌های ۲۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر تا ۳/۹ میکروگرم/میلی‌لیتر که به‌صورت یک‌به‌دو رقیق شده بود، بررسی گردید. اثربخشی همهٔ تیمارهای ذکرشده در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بر روی دو ردهٔ 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: به‌منظور بررسی میزان 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 محتویات پلیت خالی و تک لایهٔ موجود در کف چاهک‌ها، ۴ بار با محلول بافر فسفات (PBS) شستشو گردید. در پلیت ۹۶ خانه‌ای در هر چاهک به‌ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر RPMI- 1640 بدون فنل رد و ۱۰ میکرولیتر MTT (۱۲ میلی‌مولار) موجود در کیت ریخته و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد؛ سپس محتویات چاهک‌ها خالی گردید و در هر چاهک ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید موجود در کیت ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس جذب نوری چاهک‌های میکروپلیت در طول‌موج nm¬570 قرائت شد. این آزمایش ۳ بار تکرار گردید و درصد سمیت سلولی از طریق فرمول زیر محاسبه شد (۱۵):

٪Cytotoxicity=(1-(OD of the test sample)/(OD of the control))×100

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

آماده‌سازی سلول‌ها برای میکروسکوپ الکترونی روبشی: سلول‌ها به تعداد ۱/۵×۱۰۴ در ۲ میلی‌لیتر در پلیت شش‌خانه ریخته شدند. پس از تشکیل تک لایهٔ 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 درجهٔ سانتی‌گراد فیکس گردیدند. دهیدراسیون توسط الکل (شرکت Merck، آلمان) ۵۰ درصد، 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 (۱۷، ۱۶).

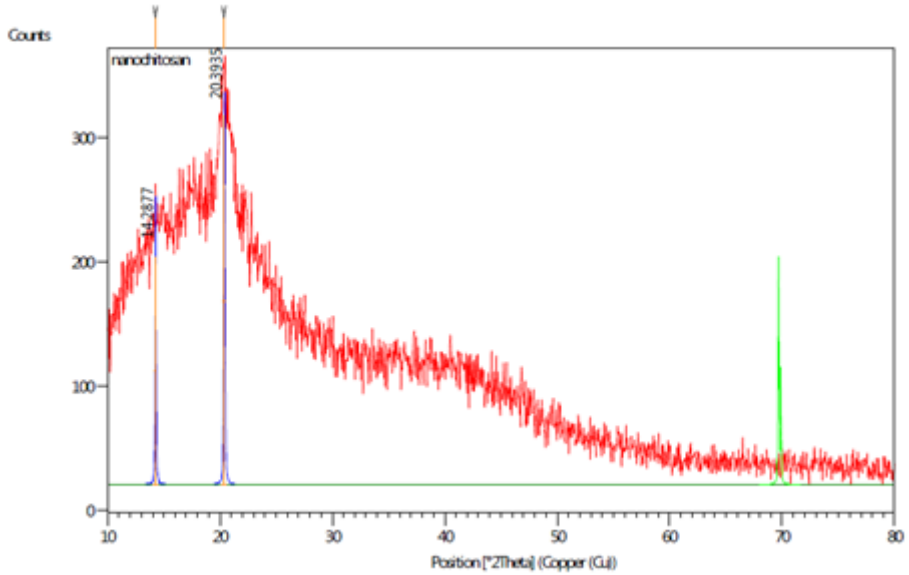
آنالیز آماری: همهٔ داده‌ها به‌عنوان میانگین±انحراف معیار (SD) از سه تکرار آزمایش آنالیز گردیدند. اختلاف آماری مربوط به آزمون MTT با آنالیز آماری واریانس یک‌طرفه و آزمون t مستقل و برای بررسی آپوپتوز سلولی از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.19 انجام شد. مقادیر P<0.05 از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. IC50 با استفاده از روش تحلیل رگرسیون غیرخطی و با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism vol.8.3.0 محاسبه گردید؛ به این روش که غلظت‌های مادهٔ مدنظر و درصدهای سمیت سلولی به‌دست‌آمده از تست MTT در نرم‌افزار قرار داده شد و غلظتی که باعث مهار رشد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

۵۰ درصد از سلول‌ها گردید، محاسبه شد. مطالعهٔ حاضر با کد طرح مصوب شمارهٔ ۲۶۰۶۰۲۶ در دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه شیراز تصویب‌شده است.

یافته‌های پژوهش

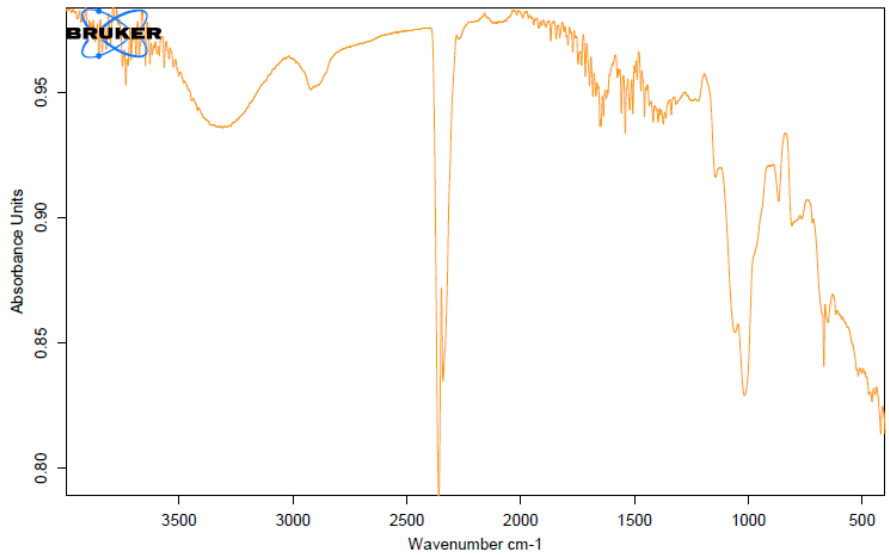
طیف¬سنج پراش اشعهٔ ایکس مربوط به نانوذرات کیتوزان: الگوی طیف¬سنج پراش اشعهٔ ایکس مربوط به نانوذرات کیتوزان در تصویر شمارهٔ ۱ نشان داده‌شده است. در تصویر شمارهٔ ۱، پیک در زاویهٔ θ2 مساوی ۲۰ درجه مربوط به نانوذرات کیتوزان است.



تصویر شماره ۱. طیف‌سنج پراش اشعهٔ ایکس مربوط به نانوذرات کیتوزان.

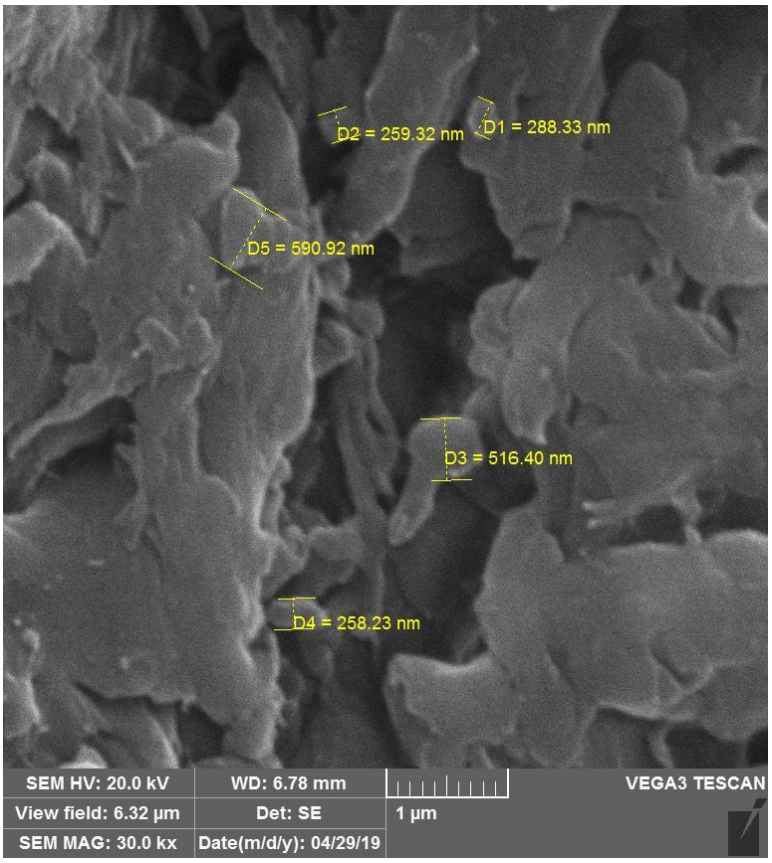
طیف سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه مربوط به نانوذرات کیتوزان: نانوذرات کیتوزان با استفاده از روش ژله‌ای شدن یونی به‌وسیلهٔ کیتوزان و تری‌پلی‌فسفات سدیم آماده گردیدند. در تصویر شمارهٔ ۲، نمودار مربوط به نانوذرات کیتوزان نشان داده‌شده است. در نمودارهای طیفی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان پیک جذبی پهنی در ناحیهٔ 3300 cm-1 دیده می‌شود که نشانگر هم‌پوشانی مد ارتعاش کششی پیوندهای N-H و O-H است. پیک جذبی که در محدودهٔ عدد موجی 2900 cm-1 مشاهده می گردد، به ارتعاش کششی C-H نسبت داده می‌شود، درحالی که پیک جذبی مشاهده‌شده در 1375 cm-1 مربوط به ارتعاش خمشی پیوند C-H است. پیک ظاهرشده در عدد موجی 1530 cm-1 به ارتعاش کششی N-O-P مربوط است. در نمودار طیفی کیتوزان، ارتعاش خمشی گروه عاملی N-H در عدد موجی 1542 cm-1 ظاهرشده است و در 1652 cm-1 شاهد پیک جذبی گروه عاملی کربونیل (C=O) خواهیم بود، درحالی‌که در طیف نانوذرات کیتوزان سنتزشده، ارتعاش خمشی N-H در 1646 cm-1 مشاهده می گردد؛ همچنین دو پیک 1026 cm-1 و 1058 cm-1 مشاهده‌شده در نمودار طیفی کیتوزان به ارتعاشات کششی C-O نسبت داده می‌شود. طیف تری‌پلی‌فسفات سدیم پیک مشخصه‌ای در 1259 cm-1 نشان می‌دهد که به ارتعاش کششی P=O مربوط است. اعداد موجی 1121 cm-1 و 1068 cm-1 به‌ترتیب بیانگر مدهای ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن گروه عاملی O-P=O و PO3 هستند. پیک ظاهرشده در عدد موجی 856 cm-1 به ارتعاش کششی نامتقارن P-O-P اختصاص داده‌شده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]



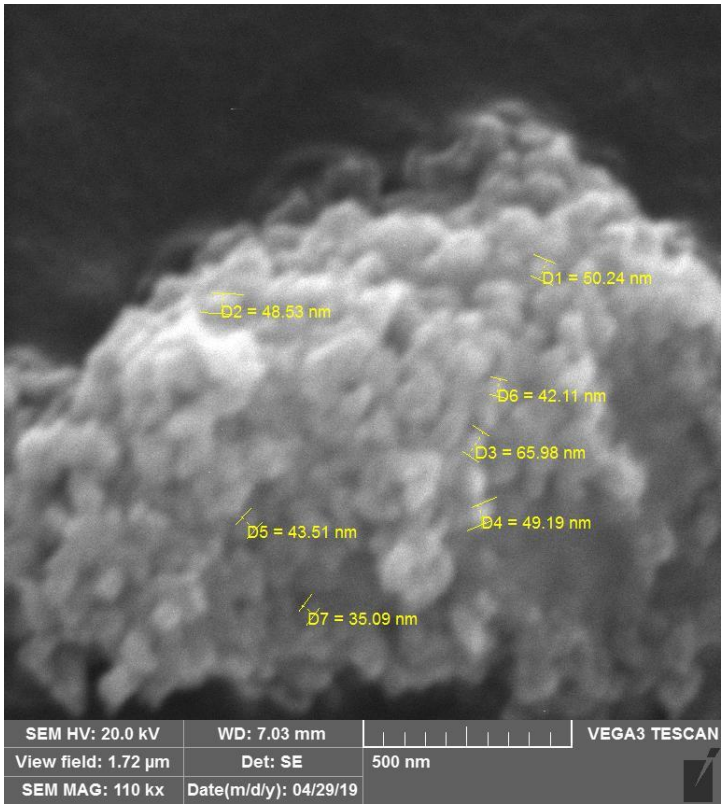
تصویر شمارهٔ ۲. طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه، پیک‌های مربوط به نانوذرات کیتوزان.

میکروسکوپ الکترونی روبشی: اندازه و مورفولوژی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی به‌ترتیب در تصاویر شمارهٔ ۳ و ۴ نشان داده‌شده است. جزئیات مربوط به بزرگ‌نمایی، ولتاژ و اندازهٔ نانوذرات در هر عکس قابل‌مشاهده است. ذرات کیتوزان به‌صورت بی‌شکل و در اندازه‌های مختلف دیده شدند. نانوذرات کیتوزان با شکل کروی و اندازههای کمتر از ۱۰۰ نانومتر مشاهده گردیدند.



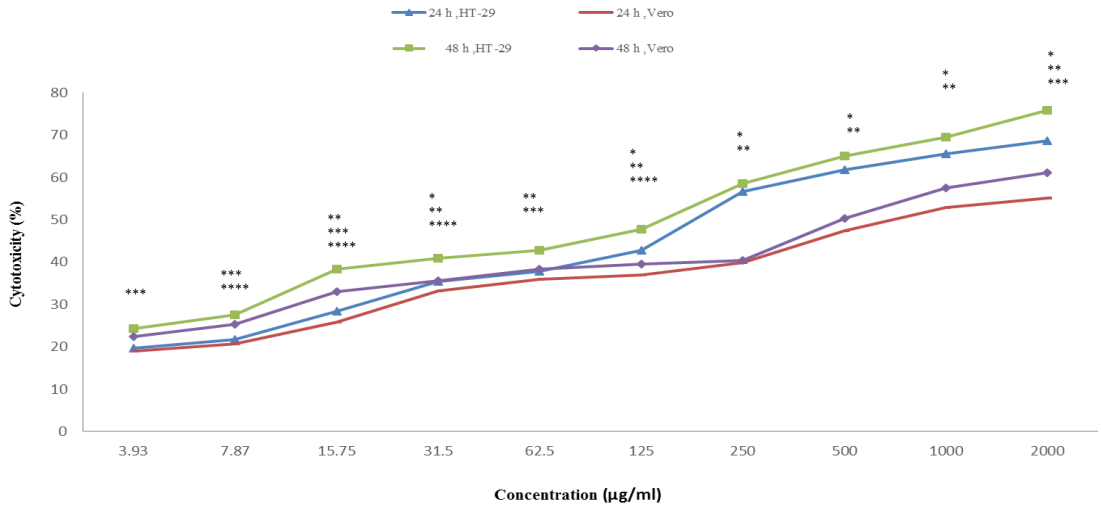
تصویر شمارهٔ ۳. تصویر میکروسکوپ روبشی مربوط به کیتوزان.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]



تصویر شمارهٔ ٤. تصویر میکروسکوپ روبشی مربوط به نانوذرات کیتوزان.

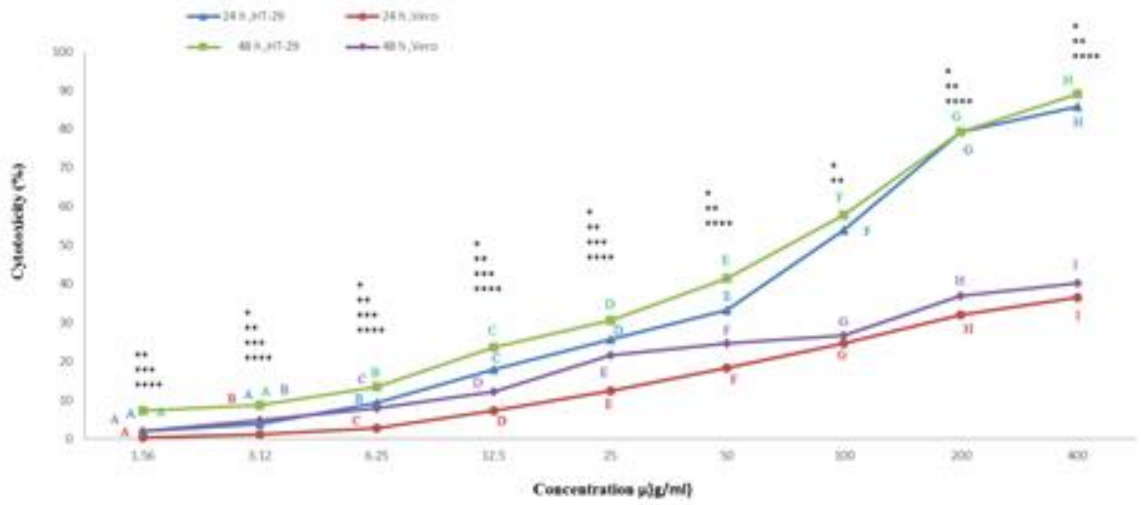
سمیت سلولی کیتوزان در سلول‌های HT-29 و Vero: سمیت سلولی کیتوزان (از غلظت ۲۰۰۰ تا ۳/۹ میکروگرم/میلی‌لیتر) در سلول‌های HT-29 و Vero در تصویر شمارهٔ ۵ نشان داده‌شده است. سمیت سلولی کیتوزان در سلول‌های HT-29 و Vero با افزایش زمان و غلظت نانوذرات افزایش یافت. سمیت سلولی کیتوزان در سلول‌های HT-29 در غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۳/۹ میکروگرم/میلی‌لیتر به‌ترتیب در زمان ۲۴ ساعت برابر با ۶۸/۶۸ و ۱۹/۳۶ درصد و در زمان ۴۸ ساعت برابر با ۷۵/۷۴ و ۲۴/۳۴ درصد محاسبه شد. سمیت سلولی کیتوزان در سلول‌های Vero در غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۳/۹ میکروگرم/میلی‌لیتر به‌ترتیب در زمان ۲۴ ساعت برابر با ۵۵/۱۴ و ۱۸/۹۲ درصد و در زمان ۴۸ ساعت برابر با ۶۱/۱۶ و ۲۲/۴۷ درصد محاسبه گردید.



[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

تصویر شمارهٔ ۵. تصویر شمارهٔ ۵. سمیت سلولی سلول‌های HT-29 و Vero در حضور کیتوزان. حروف لاتین مشابه نشان¬دهندهٔ نبودِ اختلاف آماری معنی‌دار میان ستون‌ها است؛ علامت * نشان¬دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت میان دو سلول HT-29 و Vero است و علامت ** نشان¬دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در زمان ۴۸ ساعت میان دو سلول HT-29 و Vero است؛ همچنین علامت *** نشان¬دهندهٔ اختلاف معنی‌دار میان دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در سلول HT-29 است و علامت **** نشان¬دهندهٔ اختلاف معنی‌دار میان دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در سلول Vero است ($P<0.05$).

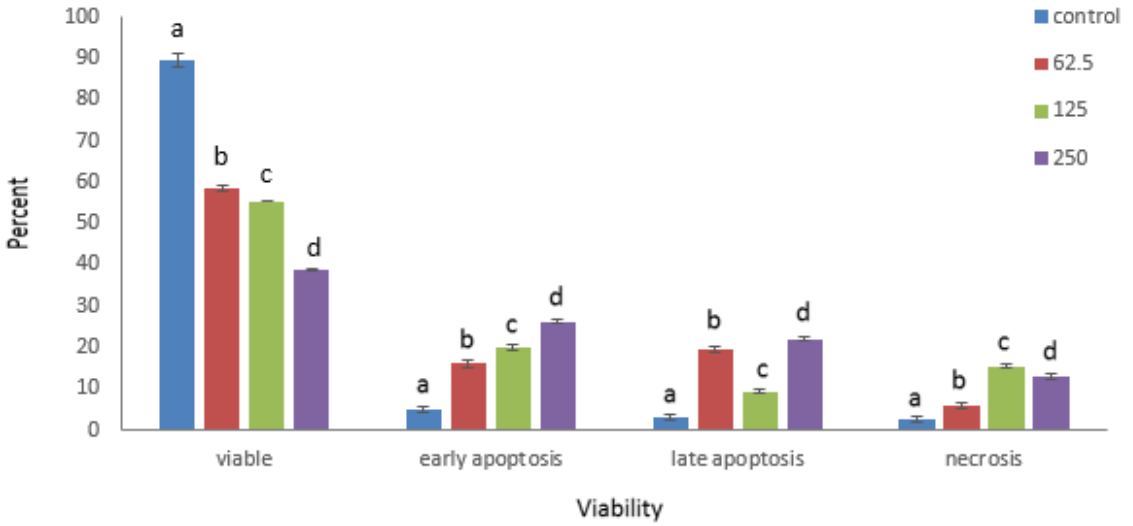
سمیت سلولی نانوذرات کیتوزان در سلول‌های HT-29 و Vero: سمیت سلولی نانوذرات کیتوزان در سلول‌های HT-29 و Vero در تصویر شمارهٔ ۶ نشان داده‌شده است. سمیت سلولی نانوذرات کیتوزان در سلول‌های HT-29 و Vero با افزایش زمان و غلظت نانوذرات افزایش یافت. سمیت سلولی نانوذرات کیتوزان در سلول‌های HT-29 در غلظت‌های ۴۰۰ و ۱/۵۶ میکروگرم/میلی‌لیتر به‌ترتیب در زمان 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 کیتوزان در سلول‌های Vero در غلظت‌های ۴۰۰ و ۱/۵۶ میکروگرم/میلی‌لیتر به‌ترتیب در زمان ۲۴ ساعت برابر با ۳۶/۴۵ و ۰/۲۹ درصد و در زمان ۴۸ ساعت برابر با ۴۰/۳۲ و ۱/۹۹ درصد محاسبه گردید.



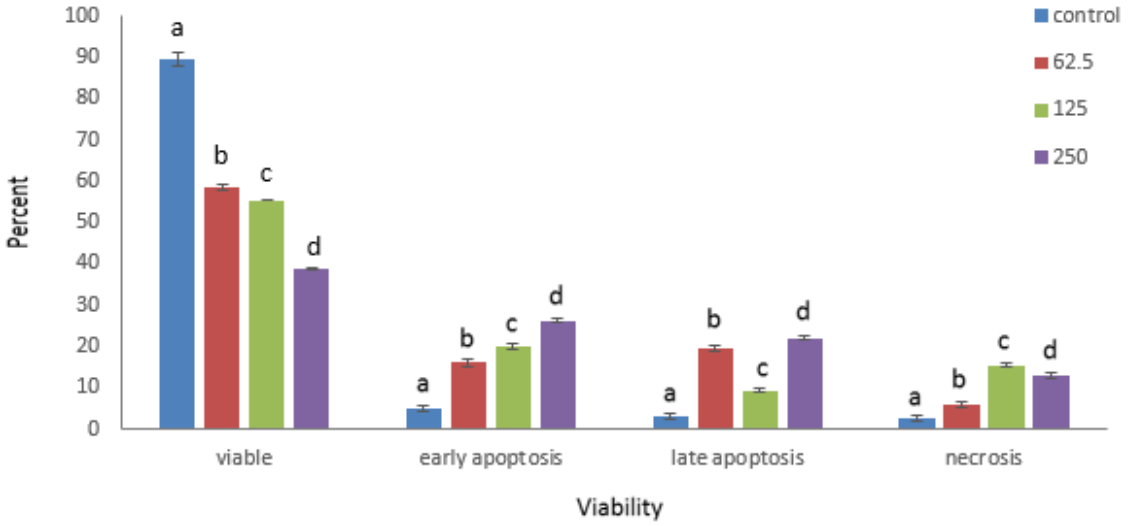
تصویر شمارهٔ ٦. سمیت سلولی سلول‌های HT-29 و Vero در حضور نانوذرات کیتوزان. حروف لاتین مشابه نشان¬دهندهٔ نبودِ اختلاف آماری معنی‌دار میان ستون‌ها است؛ علامت * نشان¬دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت میان دو سلول HT-29 و Vero است و علامت ** نشان¬دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در زمان ۴۸ ساعت میان دو سلول HT-29 و Vero است؛ همچنین علامت *** نشان¬دهندهٔ اختلاف معنی‌دار میان دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در سلول HT-29 است و علامت **** نشان¬دهندهٔ اختلاف معنی‌دار میان دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در سلول Vero است ($P<0.05$).

میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های HT-29 و Vero در حضور کیتوزان: میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های HT-29 در حضور کیتوزان در غلظت صفر، ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بررسی گردید و میزان زنده‌مانی به‌ترتیب برابر با ۸۹/۴۰، ۵۸/۴۷، ۵۵/۳۳ و ۳۸/۸۲ درصد شد. با افزایش غلظت کیتوزان، میزان زنده¬مانی کاهش و میزان آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌ها در اندازه‌گیری با روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم برماید افزایش یافت (تصویر شمارهٔ ۷). میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های Vero در حضور کیتوزان در غلظت صفر، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بررسی گردید و میزان زنده‌مانی به‌ترتیب برابر با ۸۸/۷۶، ۶۴/۱۱ و ۴۳/۹۶ درصد شد. با افزایش غلظت کیتوزان، میزان زنده¬مانی کاهش و میزان آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌ها در اندازه‌گیری با روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم برماید افزایش یافت (تصویر شمارهٔ ۸).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]



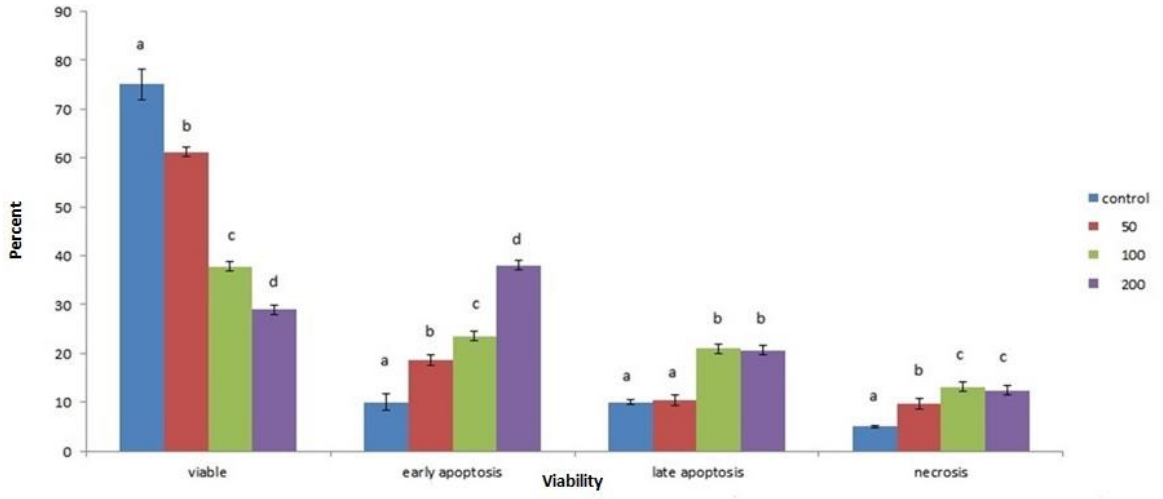
تصویر شمارهٔ ۷. میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های HT-29 در حضور کیتوزان. حروف لاتین مشابه نشان¬دهندهٔ نبودِ اختلاف آماری معنی‌دار میان غلظت‌های مختلف است ($P<0.05$)



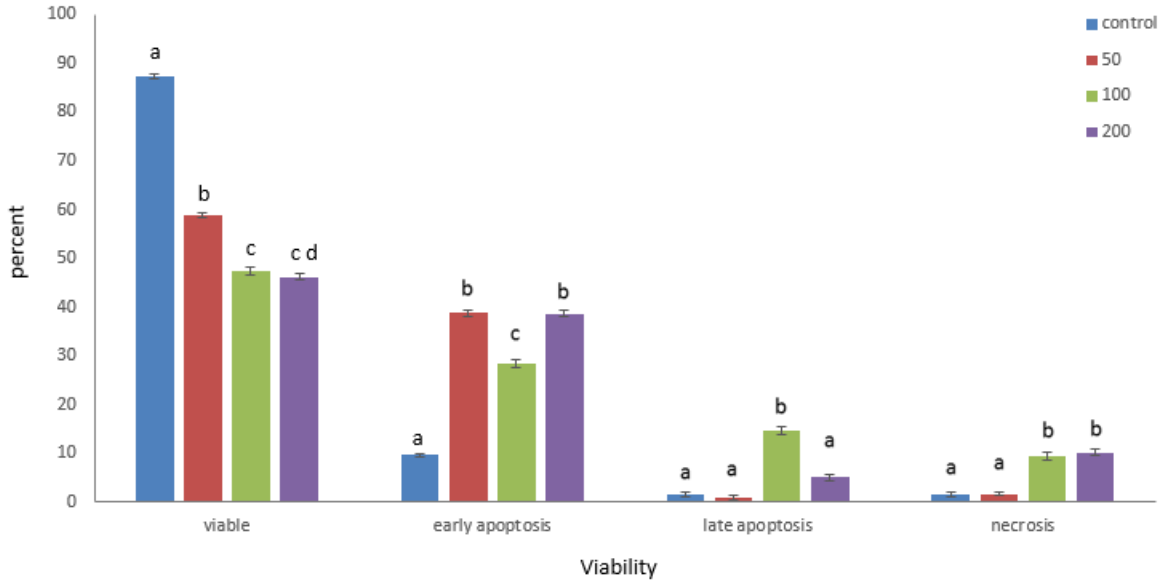
تصویر شمارهٔ ۸. میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های Vero در حضور کیتوزان. حروف لاتین مشابه نشان¬دهندهٔ نبودِ اختلاف آماری معنی‌دار میان غلظت‌های مختلف است ($P<0.05$)

میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های HT-29 و Vero در حضور نانوذرات کیتوزان: میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های HT-29 در حضور نانوذرات کیتوزان در غلظت صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بررسی گردید و میزان زنده‌مانی به‌ترتیب برابر با ۷۵/۰۵، ۶۱/۲۰، ۳۷/۷۴ و ۲۸/۹۲ درصد شد. با افزایش غلظت نانوذرات کیتوزان، میزان زنده¬مانی کاهش و میزان آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌ها در اندازه‌گیری با روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم برماید افزایش یافت (تصویر شمارهٔ 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 به‌ترتیب برابر با ۸۷/۳۰، ۵۸/۸۸، ۴۷/۴۱ و ۴۶/۲۰ درصد شد. با افزایش غلظت نانوذرات کیتوزان، میزان زنده¬مانی کاهش و میزان آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌ها در اندازه‌گیری با روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم برماید افزایش یافت (تصویر شمارهٔ ۱۰).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]



تصویر شمارهٔ ۹. میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های HT-29 در حضور نانوذرات کیتوزان. حروف لاتین مشابه نشان¬دهندهٔ نبودِ اختلاف آماری معنی‌دار میان غلظت‌های مختلف است (P<0.05).



تصویر شمارهٔ ۱۰ . میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های Vero در حضور نانوذرات کیتوزان. حروف لاتین مشابه نشان¬دهندهٔ نبود اختلاف آماری معنی‌دار میان غلظت‌های مختلف است (P<0.05).

تعیین IC50 حاصل از کیتوزان در دو ردهٔ سلولی HT-29 و Vero: مقدار IC50 در سلول‌های HT-29 برابر با ۱۸۸ میکروگرم/میلی‌لیتر و در سلول‌های Vero برابر با ۷۹۴ میکروگرم/میلی‌لیتر است. با توجه به کوچک‌تر بودن مقدار IC50 سلول‌های HT-29، این ردهٔ سلولی به‌طور معنی‌داری، حساس‌تر از سلول‌های Vero در حضور کیتوزان هستند (P≤0.05).

تعیین IC50 حاصل از نانوذرات کیتوزان در دو ردهٔ سلولی HT-29 و Vero: مقدار IC50 در سلول‌های HT-29 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 ردهٔ سلولی به‌طور معنی‌داری، حساس‌تر از سلول‌های Vero در حضور نانوذرات کیتوزان هستند (P≤0.05).

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به خاصیت ضدمیکروبی کیتوزان و استفادهٔ گسترده از آن در صنعت مواد غذایی، میزان سمیت این پلی‌ساکارید روی سلول‌های پوششی در کشت سلول بررسی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

شد. نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که میزان غلظت کیتوزان با سمیت ۵۰ درصد، بر سلول‌های HT-29، 188 میکروگرم/میلی‌لیتر و روی سلول‌های Vero 749 میکروگرم/میلی‌لیتر بود. نانز 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 گلوتاتیون می‌شود و فعالیت اورنیتین‌دکربوکسیلاز و سیکلواکسیژناز را در محیط 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 وابسته 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)، درحالی‌که در مطالعهٔ ما این‌گونه 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 وابسته به غلظت و زمان دارد که سمیت سلولی در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم بالاتر است.

نانوذرات کیتوزان خاصیت ضدمیکروبی و ضد توموری دارند. در مطالعهٔ 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 HT- 29 با IC50، 69/75 میکروگرم/میلی‌لیتر در عرض ۲۴ ساعت گردیدند. در مطالعهٔ سلیمانی و همکاران (۱۳۹۶)، آثار ایمنولوژیک نانوذرات کیتوزان بر سلول‌های سرطان پستان در مدل حیوانی بررسی شد. نتایج آنان نشان‌دهندهٔ این بود که این نانوذرات ممکن است گزینهٔ مناسب و مؤثری برای درمان سرطان در آینده باشند (۱۲).

کی و همکاران (۲۰۰۵) نانوذرات کیتوزان با اندازهٔ ۶۵ نانومتر را تولید کردند. نتایج نشان داد که نانوذرات باعث مهار رشد ردهٔ سلول MGC803 در آزمایشگاه می‌شوند و ممکن است آثار مفیدی در برابر سرطان انسان داشته باشند. نانوذرات کیتوزان باعث مهار رشد سلول‌های MGC803 با IC50، 3/5 میکروگرم/میلی‌لیتر 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 مطالعهٔ ما، آثار مهاری وابسته به غلظت نانوذرات کیتوزان روی تکثیر سلول‌های Vero مشاهده گردید که نسبت به سلول‌های سرطانی بسیار 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 آلانین ترانس آمیناز به محیط خارج سلولی اثبات شد (۱۱). طبق مطالعهٔ مالاتی و ایر (۲۰۱۸)، نارنجین روی سلول‌های Vero 40 درصد سمیت سلولی داشت؛ اما

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

وقتی نارنجین با نانوذرات کیتوزان بارگذاری گردید، آثار سمی آن نیز بیشتر شد و به ۵۰ درصد رسید (۲۰). در مطالعهٔ حاضر، سمیت سلولی نانوذرات کیتوزان بر سلول‌های سرطانی بسیار بیشتر از سلول‌های سالم بود؛ زیرا IC50 در سلول سرطان کولون برابر با ۷۵/۶۹ میکروگرم/میلی‌لیتر و در سلول نرمال اپیتلیال کلیه برابر با ۹۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر بود که نشان‌دهندهٔ آثار سمی کمتر این ترکیبات بر سلول‌های سالم بوده است. ازآنجاکه نانوذرات کیتوزان خاصیت ضدتوموری دارند، این نانوذرات در اندازهٔ نانوذره، نفوذ و احتباس بیشتری به سلول‌های توموری دارند و می‌توانند آثار ضد توموری خود را اعمال کنند (۱۳). علی‌رغم اینکه مطالعهٔ حاضر نشان‌دهندهٔ تأثیرات ضدسرطانی این نوع نانوذرات در شرایط in-vitro است، بررسی نکردن آثار سمی این نوع نانوذرات در شرایط in-vivo ازجمله کاستی‌های این مطالعه است که باید در مطالعات آینده موردتوجه جدی قرار گیرند.

در این مطالعه برای بررسی سمیت سلولی از کیتوزان و نانوذرات کیتوزان استفاده گردید. نتایج نشان می‌دهد، با توجه به آثار سمی بالایی که نانوذرات کیتوزان بر ردهٔ سلولی طبیعی داشتند، برای استفاده در صنعت غذا توصیه نمی‌شوند؛ اما با توجه به آثار سمی آن‌ها روی سلول‌های سرطانی می‌توانند در درمان سرطان مؤثر باشند که نیازمند مطالعات بیشتری در این زمینه است.

سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله از کارکنان محترم گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه شیراز صمیمانه سپاس‌گزاری می‌شود.

تعارض منافع

بدین‌وسیله اعلام می‌گردد که نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

سهم نویسندگان

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 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

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. Aqu Animals Nut 2021; 7: 27-41. doi: 10.22124/janb.2021.20348.1151.
2. Sabbaghi M, Maqsood Y, Khamari M, Ziaei 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 Dunalilla 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 pegranate 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][HSO4] 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 MGC803 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, Zarrabi 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]