

## 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 FTIR 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  $\theta$  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.

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

لعیا ابراهیمی<sup>۱</sup>، عنایت بریزی<sup>۲</sup>، مریم منتصری<sup>۱</sup>، منصور رهسپار<sup>۳</sup>، سعید حسین زاده<sup>۱\*</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>۳</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 حسین زاده

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 ضد میکروبی قوی در پوشش های مواد غذایی و احتمال آثار سمی سلولی آن ها 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 روش ها:** 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 ویژگی های این نانوذرات از روش های طیف سنجی پراش پرتو ایکس (XRD) و طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) استفاده گردید. به منظور بررسی اثر سمیت سلولی کیتوزان و نانو کیتوزان، دو رده سلولی HT-29 (لایه سرطان کولون) و Vero (لایه اپیتلیال 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 مایند صورت گرفت.

**یافته های پژوهش:** برای آنالیز آماری از واریانس یک طرفه و آزمون t مستقل با استفاده از نرم افزار SPSS vol.19 استفاده گردید. حداکثر مقادیر طیف سنج پراش اشعه ایکس نانوذرات کیتوزان در زاویه  $\theta$  2 در 20 درجه دیده شد. پیک ظاهر شده 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، در حالی که در طیف نانوذرات کیتوزان سنتز شده ارتعاش خمشی N-H در 1646 دیده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که سمیت سلولی کیتوزان در سلول های HT-29 و Vero با افزایش زمان و غلظت نانوذرات، افزایش یافته است.

**بحث و نتیجه گیری:** از آنجا که با افزایش زمان و افزایش غلظت نانوذرات، سمیت در سلول ها بیشتر مشاهده گردید؛ بنابراین، زمان و غلظت نانوذرات کیتوزان در ایجاد سمیت سلولی اهمیت دارد. با توجه به آثار سمی این نانوذرات بر روی سلول های سرطانی، این ذرات می تواند در درمان سرطان استفاده شود که نیازمند مطالعات بیشتری در این زمینه است.

**واژه های کلیدی:** کیتوزان، سمیت سلولی، رده سلولی HT-29 و Vero

**استناد:** ابراهیمی لعیا، بریزی عنایت، منتصری مریم، رهسپار منصور، حسین زاده سعید. بررسی اثر سمیت سلولی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان در محیط

آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، بهمن ۱۴۰۲؛ ۳۱(۶): ۳۶-۴۹.

## مقدمه

کیتوزان مشتق داستیله کیتین است. کیتوزان به علت دارا بودن ویژگی‌هایی مانند فعالیت ضد میکروبی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، به‌عنوان یک نگه‌دارنده در محصولات غذایی مورد توجه است (۱). بار مثبت گروه‌های آمینه کیتوزان با بار منفی غشای سلول‌های میکروبی وارد واکنش می‌شود و منجر به خروج پروتئین‌ها و دیگر اجزای درون‌سلولی میکروارگانیسم‌ها می‌گردد و این گونه اثر ضد میکروبی 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 دامنه اندازه زیر ۱۰۰ نانومتر ساخته شده‌اند (۴). از پلیمر طبیعی کیتوزان می‌توان نانوذرات کیتوزان تولید کرد که این ترکیبات فعالیت ضد میکروبی بالاتری نسبت به کیتوزان دارند (۵). کی و همکاران در سال ۲۰۰۴، فعالیت ضد میکروبی 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 ضد میکروبی بیان شده است؛ زیرا باعث تخریب ترکیبات سولفور و فسفر موجود در پروتئین و محتویات ماده ژنتیکی می‌شوند. از کیتوزان می‌توان به‌عنوان ماتریکسی برای جا دادن نانوذرات نقره در پوشش‌ها استفاده کرد و پوشش‌هایی با عنوان نانو کامپوزیت کیتوزان نقره تولید کرد که خاصیت ضد میکروبی دارند (۷).

با توجه به استفاده گسترده نانوذرات به‌عنوان یک ماده ضد میکروبی 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 دارای اهمیت است. در گذشته مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده است؛ به‌عنوان مثال، نان 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 نانو کیتوزان تولید شده کی و همکاران در سال ۲۰۰۵، باعث مهار رشد رده سلول MGC803 در آزمایشگاه گردید و به‌نظر رسید، نانوذرات کیتوزان آثار مفیدی در درمان سرطان در انسان داشته باشند (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 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 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 CP 800-200 در ۱۰۰ سی سی 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

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 سنتز 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 advance, Bruker) روی ۴۰ KeV و ۴۰ mA با پرتو  $\text{CuK}\alpha 1$  با تابش  $\lambda = 1.54$  در زاویه  $2\theta$ ، در درجه‌ای با دامنه ۲۰ تا ۸۰ تنظیم شده بود. طیف‌سنجی مادون قرمز 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 سنتز شده 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 سنتز شده 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 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 گانگون و همکاران (۲۰۱۳) استفاده شد (۱۴). برای خارج کردن سلول‌ها از حالت انجماد و خارج کردن دی‌متیل سولفو کساید موجود در محیط انجماد، سلول‌ها پس از ذوب شدن به لوله فالكون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل شدن به لوله فالكون حاوی RPMI 1640 (شرکت Shell Max، ایران) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو (شرکت Gibco، آمریکا)، یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین

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  $37^{\circ}\text{C}$  گرم‌خانه‌گذاری (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 فالكون استریل منتقل گردید و با سرعت  $1000 \times \text{rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت، شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نوبار 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 فالكون استریل منتقل گردید و با سرعت  $1000 \times \text{rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی حذف گردید. رسوب به دست آمده در ۱

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 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 فنل رد و ۱۰ میکرولیتر MTT (۱۲ میلی‌مولار) موجود در کیت ریخته و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه 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 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس جذب نوری چاهک‌های میکروپلیت در طول موج 570-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 به‌عنوان 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 آپتوتوز 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 ماده مدنظر و درصد‌های سمیت سلولی به‌دست آمده از تست MTT در نرم‌افزار قرار داده شد و غلظتی که باعث مهار رشد

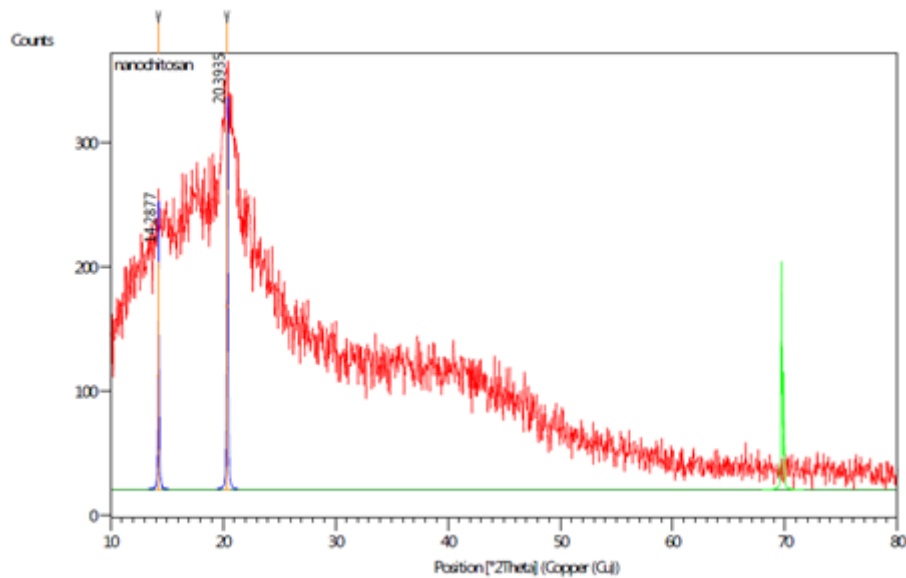
میلی‌لیتر محیط کشت کامل تازه شناور شد؛ سپس سلول‌ها شمارش گردید و ۱۰۴ سلول در هر یک از تیمارها استفاده شد. برای ادامه کار، سلول‌ها با ترکیبات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان در غلظت‌های مختلف برای بررسی سمیت سلولی تیمار گردید. نانوذرات کیتوزان در غلظت‌های ۴۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر تا ۱/۵۶ میکروگرم/میلی‌لیتر که 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 همه تیمارهای ذکر شده در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بر روی دوره 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

بررسی آپتوتوز سلولی با استفاده از روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم برآید: برای تشخیص تشکیل سلول‌های آپتوتوز شده، رنگ‌آمیزی با ترکیب اتیدیوم برآید و آکریدین اورنج انجام گردید.

آماده‌سازی سلول‌ها برای میکروسکوپ الکترونی روشی: سلول‌ها به تعداد  $1.04 \times 10^5$  در ۲ میلی‌لیتر در پلیت شش‌خانه 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 گلو تار آلدهید ۳ درصد (شرکت Dae jung، کره) به مدت ۲ ساعت، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس گردیدند. دی‌یدراسیون توسط الکل (شرکت Merck، آلمان) ۵۰ درصد،

کیتوزان: الگوی طیف<sup>۱</sup>-سنج پراش اشعه ایکس مربوط به نانوذرات کیتوزان در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. در تصویر شماره ۱، پیک در زاویه  $2\theta$  مساوی ۲۰ درجه مربوط به نانوذرات کیتوزان است.



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

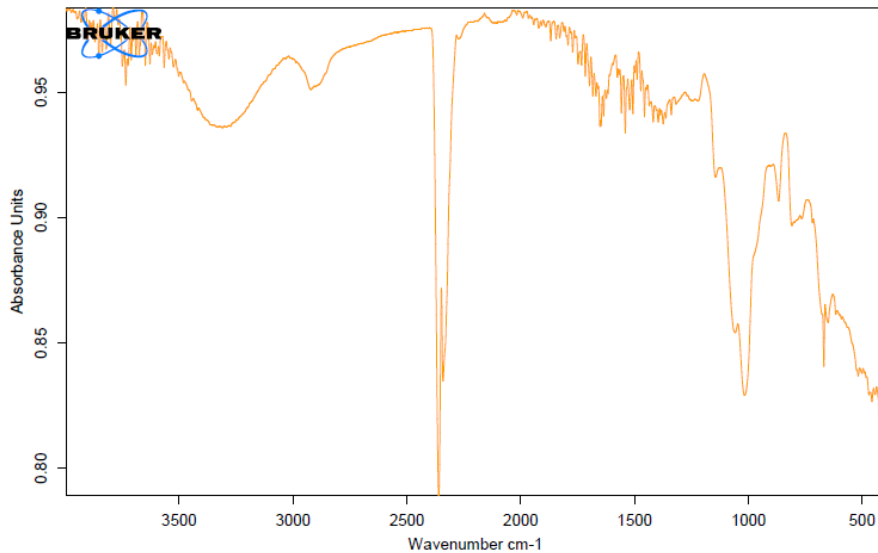
خمشی گروه عاملی N-H در عدد موجی  $1542\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده است و در  $1652\text{ cm}^{-1}$  شاهد پیک جذبی گروه عاملی کربونیل (C=O) خواهیم بود، در حالی که در طیف نانوذرات کیتوزان سنتز شده، ارتعاش خمشی N-H در  $1646\text{ cm}^{-1}$  مشاهده می گردد؛ همچنین دو پیک  $1026\text{ cm}^{-1}$  و  $1058\text{ cm}^{-1}$  مشاهده شده در نمودار طیفی کیتوزان به ارتعاشات کششی C-O نسبت داده می شود. طیف تری پلی فسفات سدیم پیک مشخصه ای در  $1259\text{ cm}^{-1}$  نشان می دهد که به ارتعاش کششی P=O مربوط است. اعداد موجی  $1121\text{ cm}^{-1}$  و  $1068\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب بیانگر مدهای ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن گروه عاملی O-P=O و PO<sub>3</sub> هستند. پیک ظاهر شده در عدد موجی  $856\text{ cm}^{-1}$  به ارتعاش کششی نامتقارن P-O-P اختصاص داده شده است.

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

### یافته های پژوهش

طیف<sup>۱</sup>-سنج پراش اشعه ایکس مربوط به نانوذرات

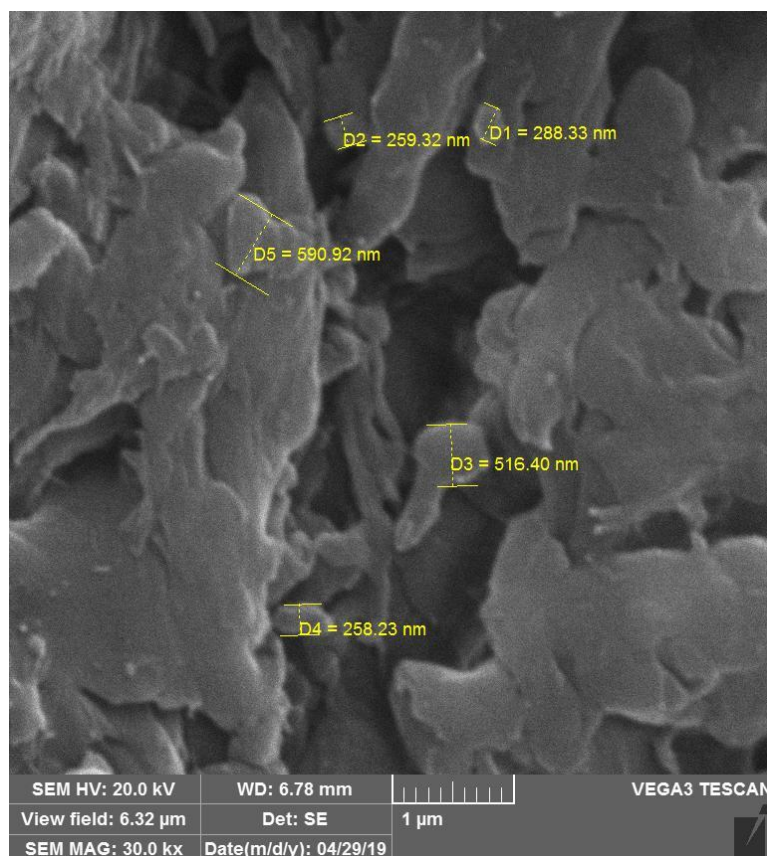
طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه مربوط به نانوذرات کیتوزان: نانوذرات کیتوزان با استفاده از روش ژله ای شدن یونی به وسیله کیتوزان و تری پلی فسفات سدیم آماده گردیدند. در تصویر شماره ۲، نمودار مربوط به نانوذرات کیتوزان نشان داده شده است. در نمودارهای طیفی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان پیک جذبی پهنی در ناحیه  $3300\text{ cm}^{-1}$  دیده می شود که نشانگر هم پوشانی مد ارتعاش کششی پیوندهای N-H و O-H است. پیک جذبی که در محدوده عدد موجی  $2900\text{ cm}^{-1}$  مشاهده می گردد، به ارتعاش کششی C-H نسبت داده می شود، در حالی که پیک جذبی مشاهده شده در  $1375\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش خمشی پیوند C-H است. پیک ظاهر شده در عدد موجی  $1530\text{ cm}^{-1}$  به ارتعاش کششی N-O-P مربوط است. در نمودار طیفی کیتوزان، ارتعاش



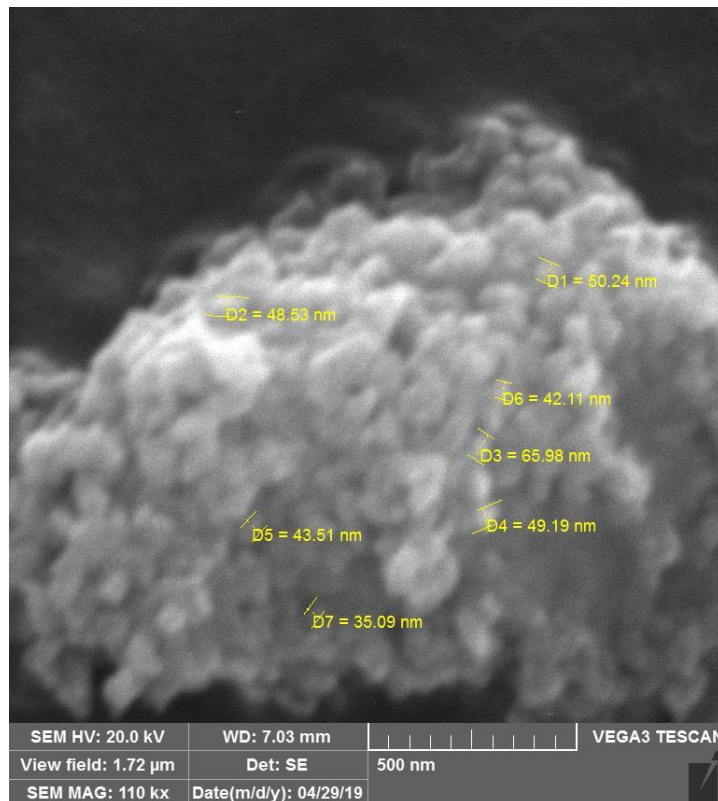
تصویر شماره ۲. طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، پیک‌های مربوط به نانوذرات کیتوزان.

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

میکروسکوپ الکترونی روبشی: اندازه و مورفولوژی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان 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



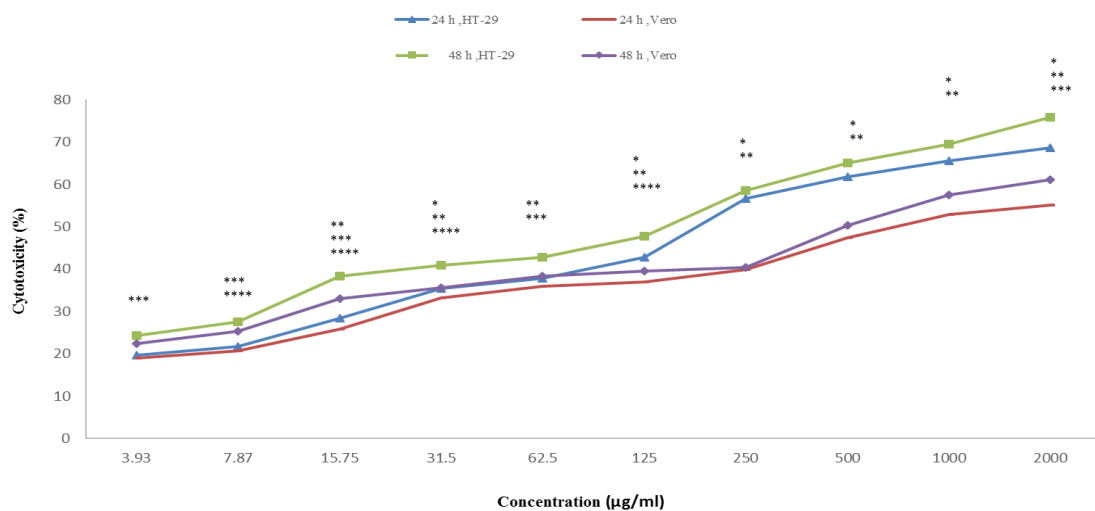
تصویر شماره ۳. تصویر میکروسکوپ روبشی مربوط به کیتوزان.



تصویر شماره ۴. تصویر میکروسکوپ روبشی مربوط به نانوذرات کیتوزان.

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 به ترتیب 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.

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 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 ۳/۹ میکروگرم/میلی‌لیتر به ترتیب در

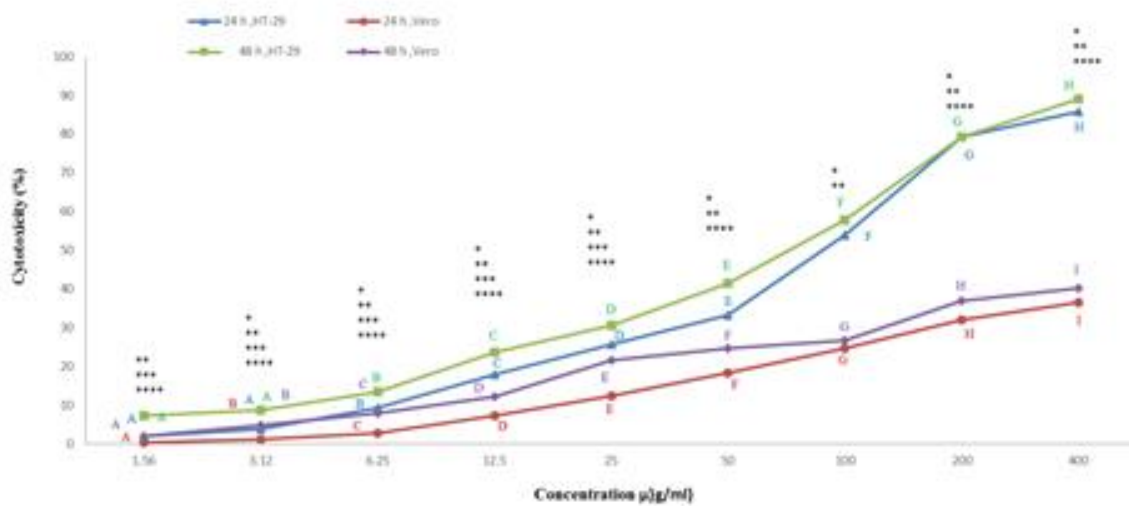




**تصویر شماره ۵.** تصویر شماره ۵. سمیت سلولی سلول‌های HT-29 و Vero در حضور کیتوزان. حروف لاتین مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف آماری معنی‌دار میان ستون‌ها است؛ علامت \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت میان دو سلول HT-29 و Vero است و علامت \*\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در زمان ۴۸ ساعت میان دو سلول HT-29 و Vero است؛ همچنین علامت \*\*\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در سلول HT-29 است و علامت \*\*\*\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در سلول Vero 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 کیتوزان در سلول‌های Vero در غلظت‌های ۴۰۰ و ۱/۵۶ میکروگرم/میلی‌لیتر به ترتیب 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.

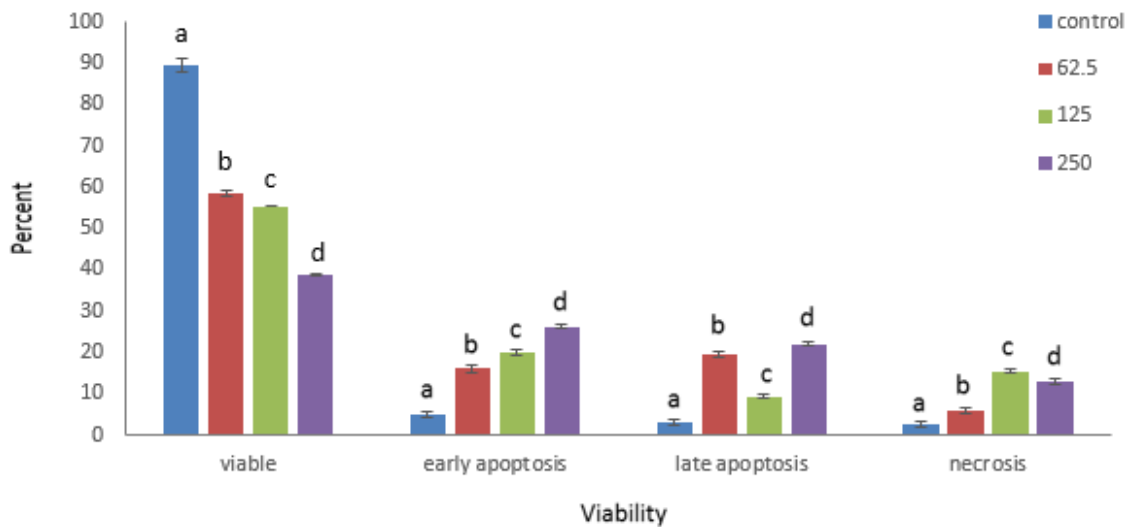
سمیت سلولی نانوذرات کیتوزان در سلول‌های HT-29 و 29: سمیت سلولی نانوذرات کیتوزان در سلول‌های HT-29 و Vero در تصویر شماره ۶ نشان داده شده است. سمیت سلولی نانوذرات کیتوزان در سلول‌های HT-29 و Vero با افزایش زمان و غلظت نانوذرات افزایش یافت. سمیت سلولی نانوذرات کیتوزان در سلول‌های HT-29 در غلظت‌های ۴۰۰ و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



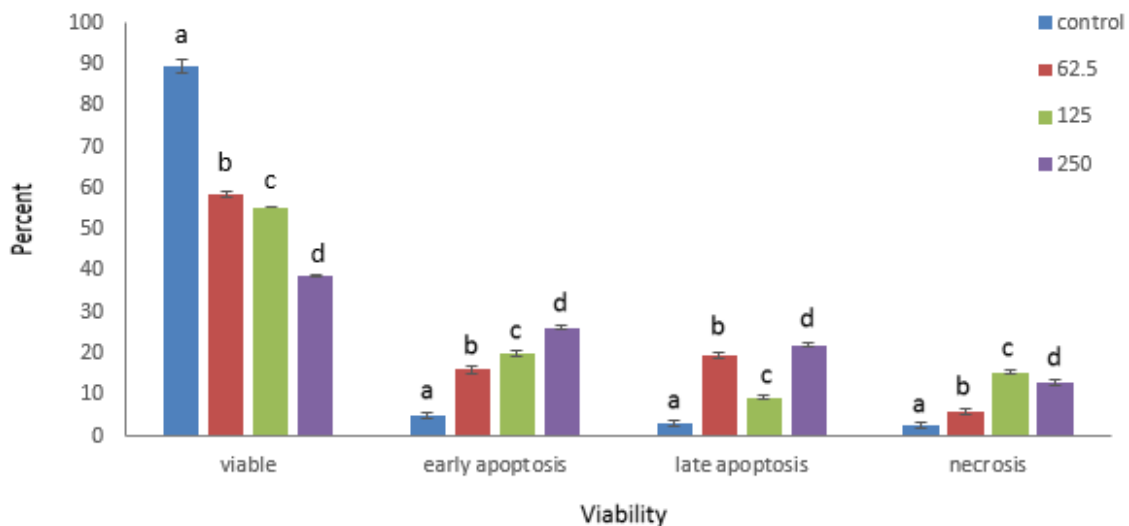
**تصویر شماره ۶.** سمیت سلولی سلول‌های HT-29 و Vero در حضور نانوذرات کیتوزان. حروف لاتین مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف آماری معنی‌دار میان ستون‌ها است؛ علامت \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت میان دو سلول HT-29 و Vero است و علامت \*\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در زمان ۴۸ ساعت میان دو سلول HT-29 و Vero است؛ همچنین علامت \*\*\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در سلول HT-29 است و علامت \*\*\*\* نشان‌دهنده 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 سلول‌های Vero در حضور کیتوزان 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 کیتوزان، میزان زنده‌مانی کاهش و میزان آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌ها در اندازه‌گیری با روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم برآمد افزایش یافت (تصویر شماره ۸).

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 به ترتیب برابر با ۸۹/۴۰، ۵۸/۴۷، ۵۵/۳۳ و ۳۸/۸۲ درصد شد. با افزایش غلظت کیتوزان، میزان زنده‌مانی کاهش و میزان آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌ها در اندازه‌گیری با روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم برآمد افزایش



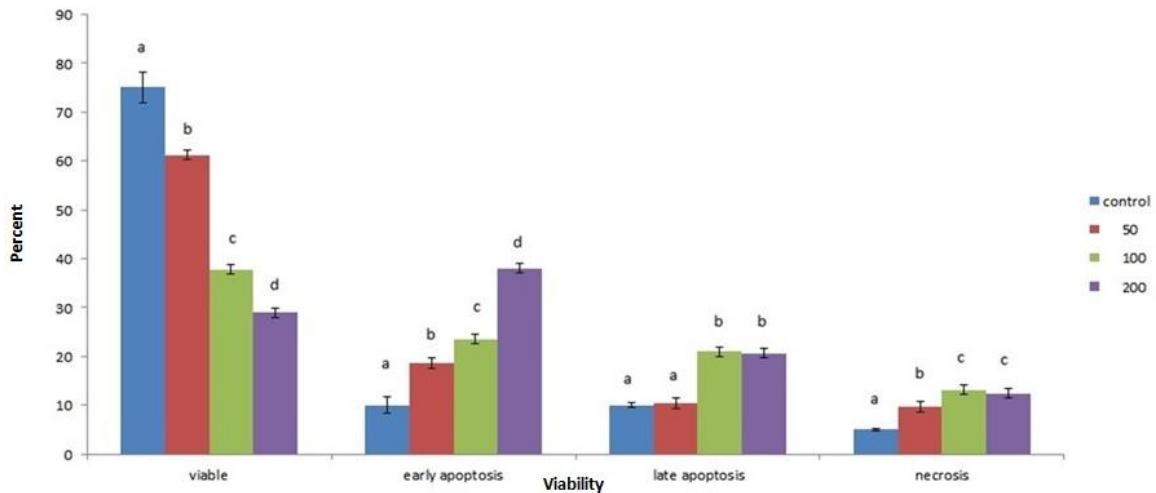
تصویر شماره ۷. میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های HT-29 در حضور کیتوزان. حروف لاتین مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف آماری معنی‌دار میان غلظت‌های مختلف است ( $P < 0.05$ )



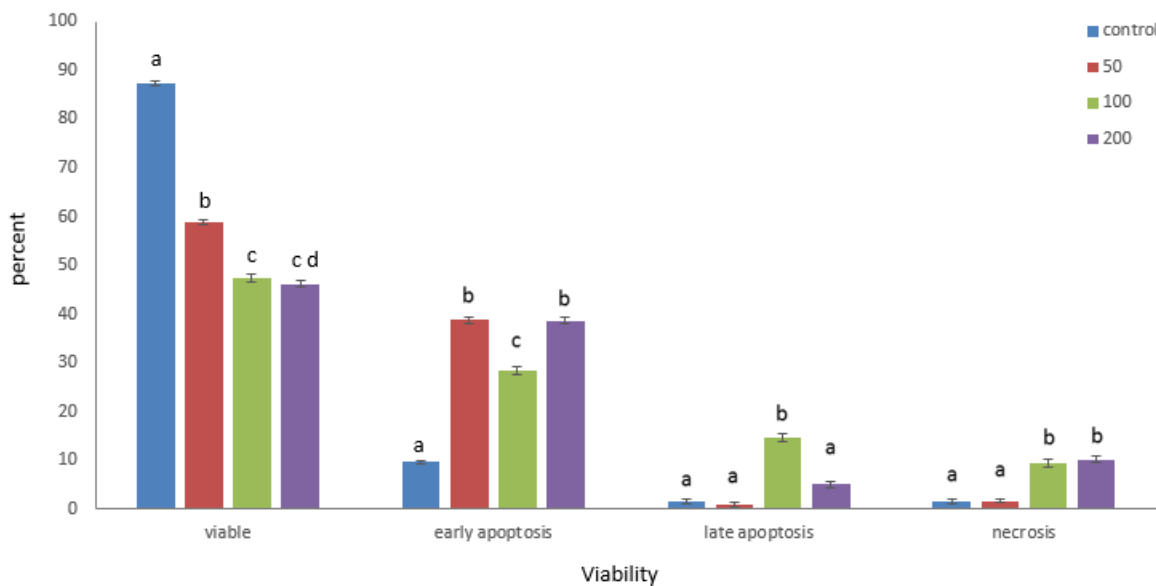
تصویر شماره ۸. میزان زنده‌مانی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز نهایی و نکروز سلول‌های Vero در حضور کیتوزان. حروف لاتین مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف آماری معنی‌دار میان غلظت‌های مختلف است ( $P < 0.05$ )

اورنج و اتیدیوم برمایند 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 برمایند افزایش یافت (تصویر شماره ۱۰).

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 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 کیتوزان. 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 کیتوزان. 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 به‌طور معنی‌داری، حساس‌تر از سلول‌های Vero در حضور نانوذرات کیتوزان هستند ( $P \leq 0.05$ ).

### بحث و نتیجه‌گیری

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

تعیین IC50 حاصل از کیتوزان در دو رده سلولی HT-29 و Vero: مقدار IC50 در سلول‌های HT-29 برابر با ۷۹۴ 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 به‌طور معنی‌داری، حساس‌تر از سلول‌های Vero در حضور کیتوزان هستند ( $P \leq 0.05$ ).

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

توموری 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 HT-29 با IC50، 69/75 میکروگرم/میلی‌لیتر در عرض ۲۴ ساعت گردیدند. در مطالعه سلیمانی و همکاران (۱۳۹۶)، آثار ایمنولوژیک نانوذرات کیتوزان بر سلول‌های سرطان پستان در مدل حیوانی بررسی 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 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 مهارى وابسته به دوز روی تکثیر سلول‌های BEL-7402 داشته‌اند؛ همچنین در این مطالعه نیز اثر مهارى وابسته به غلظت نانوذرات کیتوزان بر تکثیر سلول‌های HT-29 مشاهده گردید. علی‌رغم اثر مهارى این نانوذرات بر مهار تکثیر سلول‌های توموری مختلف، آثار سمی کمتری روی سلول‌های کبدی دارند (۱۰). در مطالعه ما، آثار مهارى 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 مطالعه مالاتی و ایر (۲۰۱۸)، نارنجین روی سلول‌های Vero 40 درصد سمیت سلولی داشت؛ اما

شد. نتایج مطالعه 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 گلوکاتیون 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 مطالعه ما 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 وابسته به غلظت و زمان دارد که سمیت سلولی در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم بالاتر است. نانوذرات کیتوزان خاصیت ضد میکروبی و ضد

بر انجام آزمون‌های کشت سلولی، انجام آزمون آماری، ورود داده‌ها به نرم افزار، اصلاح مقاله. نویسنده چهارم: پیشنهاد طرح، انجام آزمون و آنالیز داده‌های نانوذرات، اصلاح مقاله، پاسخ به داوری‌ها. نویسنده پنجم: سرپرست تیم تحقیقاتی، پیشنهاد طرح، انجام آزمون آماری، اصلاح مقاله، پاسخ به داوری‌ها.

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 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 نشان‌دهنده آثار سمی کمتر این ترکیبات بر سلول‌های سالم بوده است. از آنجا که نانوذرات کیتوزان خاصیت ضدتوموری دارند، این نانوذرات در اندازه نانوذره، نفوذ و احتباس بیشتری به سلول‌های توموری دارند و می‌توانند آثار ضد توموری خود را اعمال کنند (۱۳). علی‌رغم اینکه مطالعه حاضر نشان‌دهنده تأثیرات ضدسرطانی این نوع نانوذرات در شرایط *in-vitro* است، بررسی نکردن آثار سمی این نوع نانوذرات در شرایط *in-vivo* از جمله کاستی‌های 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 می‌دهد، با توجه به آثار سمی بالایی که نانوذرات کیتوزان بر رده 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

بدین وسیله از کارکنان محترم گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز صمیمانه سپاس‌گزاری می‌شود.

### تعارض منافع

بدین وسیله اعلام می‌گردد که نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

### سهم نویسندگان

نویسنده اول: انجام کارهای عملی، جمع‌آوری داده‌ها، انجام آزمون آماری، نوشتن مقاله اولیه، تنظیم مقاله بر اساس فرمت مجله. نویسنده دوم: پیشنهاد طرح، انجام آزمون آماری، اصلاح مقاله، پاسخ به داوری‌ها. نویسنده سوم: نظارت

## References

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Zarei M, Ramezani Z, Ein-Tavasoly S, Chadorbaf M. Coating effects of orange and peganate 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Nam KS, Kim MK, Shon YH. Chemopreventive effect of chitosan oligosaccharide against colon carcinogenesis. *J Microbiol Biotechnol* 2007; 17: 1546-49.
- 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.
- 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.