

اثر ضد باکتریایی و سمیت سلولی نانوذرات کیتوسان و گیاه شیرین بیان بر رده سلول‌های سرطانی کبد (HepG2)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۳۰

کد مقاله: ۳۷۹۱۸۱

سیده سارا ساداتی^۱، فاطمه کریمی^۱، کیانا قربانی^۱،

مهسا شاه بنده^۲، مهسا امین صالحی^۳، مرضیه آزادفلاح^{۴*}

چکیده

امروزه گیاهان دارویی کاندیدهای خوبی جهت درمان بسیاری از بیماری‌ها هستند. سرطان کبد به‌عنوان یکی از فراوان‌ترین سرطان‌ها در دنیا شناخته شده است. همچنین گیاه شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان به علت داشتن خواص ضد میکروبی در علم پزشکی مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی و ضد سرطانی عصاره ریشه گیاه شیرین بیان، نانوذرات کیتوسان و اثر هم‌افزایی آن‌ها در غلظت‌های مختلف مورد سنجش قرار گرفت. در سنجش ضد میکروبی، باکتری سودوموناس آئروژینوزا در برابر تیمار با عصاره، نانوذرات و استفاده هم‌زمان این دو کاهش رشد را نشان دادند. بیشترین اثر مهاری در استفاده هم‌زمان نانوذرات کیتوسان به همراه عصاره شیرین بیان مشاهده شد. مقدار MIC در رقت $32 \mu\text{g/mL}$ و مقدار MBC بین $128 \mu\text{g/mL}$ تعیین گردید. همچنین عصاره هیدروالکلی شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان در غلظت‌های مختلف بر رشد سلول‌های سرطانی کبد رده HepG2 و سلول‌های فیروبلاست رده L929 به‌عنوان سلول‌های نرمال در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با آنالیز MTT مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تأثیر تیمارها وابسته به دوز و زمان متغیر است و با افزایش زمان از میزان زیستایی سلول‌ها در هر دو تیمار نانوذرات و عصاره گیاه کاسته شده است. بیشترین تأثیر مهاری در استفاده هم‌زمان عصاره ($1/5 \text{ mg/ml}$) و نانوذرات کیتوسان ($0/2 \text{ mg/ml}$) پس از ۷۲ ساعت بدست آمد که درصد زیستایی سلول‌ها به ۸ درصد کاهش یافته بود. همچنین IC_{50} برای سلول‌های سرطانی در زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد. با توجه به نتایج می‌توان ادعا کرد عصاره ریشه گیاه شیرین بیان و نیز نانوذرات کیتوسان در غلظت‌های مختلف دارای اثر مهاری بر رشد باکتری‌ها و نیز سلول‌های سرطانی کبد است، لذا مطالعات بیشتر می‌تواند آینده‌ای نوید بخشی را به همراه داشته باشد.

واژگان کلیدی: گیاه شیرین بیان، نانوذرات کیتوسان، سرطان کبد، عصاره متانولی

۱- پژوهشگر تیم پژوهشی لنترن، شرکت البرز نانو تجهیزایان، البرز، ایران

۲- کارشناسی ارشد باشگاه پژوهشگران و نخبگان جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، مرکزی، ایران

۳- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران

۴- دکتری مهندسی مواد دانشگاه بین‌المللی امام خمینی قزوین، قزوین، ایران (نویسنده مسئول)

۱- مقدمه

کارسینوما هیپاتوسلولار (HCC) یک نوع سرطان کبد است که در اثر ابتلای فرد به هپاتیت C، B، سیروز ایجاد می‌شود. در این کارسینوما مانند سرطان‌های دیگر با تغییر اساسی در فیزیولوژی سلول منجر به تکثیر بی‌رویه سلول‌های و تمایز سلولی می‌شود. با وجود روش‌های درمانی متفاوت مانند جراحی، شیمی درمانی، ایمنی درمانی و رادیوتراپی درمان سرطان هنوز به‌عنوان یک چالش مهم مطرح است (کولیک، ۲۰۱۹: ۴۷۷). امروزه ضرورت دستیابی به ترکیبات طبیعی و اثرات جانبی کم و ارزان برای درمان بیماری‌های سرطان بیشتر احساس می‌گردد. مطالعات اخیر نشان داد که می‌توان از ترکیبات گیاهان دارویی به‌عنوان بهترین منبع برای بدست آوردن دارو استفاده کرد. همچنین نانوذرات به‌قدر کافی کوچک هستند که می‌توانند از مویزهای موجود در بدن و نیز غشاهای زیستی عبور کرده و روی فیزیولوژی هر نوع سلول در بدن مؤثر باشند (شاکر، ۲۰۱۳: ۱۶۰۱).

گیاه دارویی شیرین بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* گیاه بومی مناطق مدیترانه است و در اکثر نقاط کشور ایران می‌روید. شیرین بیان یکی از مهمترین گیاهان دارویی جهان هست که ریشه و ساقه زیرزمینی آن حاوی ترکیبات متفاوتی نظیر اسانس‌ها (تری‌ترپی‌ها)، ترکیبات فنلی (چالکون‌ها، کوئرستین و ایزوفلاونوئیدها)، فیتواسترول و ساپونین‌های گلیکوزیدی (گلیسیریزیک اسید) می‌باشند. گلیسیریزیک اسید و محصولات هیدرولیز آن دارای اهمیت زیادی در اثرات دارویی نظیر ضدسرطان، ضدآماس، آنتی باکتریال و ضدحساسیت است (پاستورینو، ۲۰۱۸: ۲۳۲۳). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که گیاه شیرین بیان در درمان دیابت، التیام زخم و نیز در حفاظت کبدی و کلیوی در مقابل سموم مختلف مؤثر است (بهمنی، ۲۰۱۵: ۶۸۳) (ال استفی، ۲۰۱۸: ۱).

کیتوسان پلی ساکارید کاتیونی است که از فرآیند استیل زدایی قلیایی کیتین در حضور هیدروکسید پتاسیم بدست می‌آید. ساختار آن شبیه سلولز است. کیتوسان به‌عنوان یک بیوپلیمر طبیعی که دارای خواص شیمیایی و زیستی منحصر به فردی است از جمله خصوصیات بارز آن‌ها می‌توان به سازگاری زیستی بالا، زیست تخریب پذیری قابل قبول در کنار سمیت پایین، همچنین خواص ضد میکروبی آن‌ها می‌توان اشاره کرد (بخشی، ۲۰۲۰: ۱۰۷۲)، (صالحی، ۲۰۱۶: ۱۵۲) و (معظمی، ۲۰۲۱). اخیراً با پیشرفت فناوری و ساخته شدن آن به صورت نانوذرات سطح تماس آن‌ها افزایش یافته و خاصیت ضد میکروبی آن تا بیش از ۹۹ درصد افزایش پیدا کرده است. لذا توجه زیادی را به‌خصوص در زمینه صنایع پزشکی و دارویی به خود جلب کرده است (چاندرااسکاران، ۲۰۲۰: ۱۱۷۳). علیرغم کاربردهای گسترده و اطلاعات کافی درباره ترکیبات فتوشیمیایی گیاه شیرین بیان و خواص بیولوژیکی نانوذرات کیتوسان، اما تحقیقات خاصی در جهت تأثیر هم‌زمان آن‌ها بر روی سلول سرطانی صورت نگرفته است. بنابراین این پژوهش باهدف بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان و تأثیر هم‌زمان هر دو آن‌ها بر روی سلول‌های سرطانی HepG2 انجام شد. همچنین تست‌های میکروبی نیز بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا سنجیده شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- عصاره گیری از ریشه شیرین بیان

ریشه شیرین بیان از پژوهشکده گیاهان دارویی کرج تهیه و استخراج عصاره هیدروالکلی آن به روش روتاری انجام شد. جهت عصاره گیری ابتدا ریشه خشک شده توسط آسیاب برقی به صورت پودر در آورده شد و داخل استوانه ریخته و سپس حلال شامل اتانول ۹۰ درصد و ۱۰ درصد آب مقطر به آن افزوده شد که حلال کامل پودر را دربر گرفت. سپس محلول در آن و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد و پس از عبور از کاغذ واتمن، به صورت متوالی در دستگاه روتاری استریک قرار داده شد که نهایتاً با جداسازی الکل از محلول، مایع بدست آمده خشک شده و پودر حاصل به‌عنوان عصاره ریشه گیاه شیرین بیان حاصل شد. عصاره خشک شده برای تهیه غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۵) در اتانول و DMSO جهت آنالیزهای میکروبی و ضدسرطانی حل شد.

۲-۲- تهیه نانوذرات کیتوسان

کیتوسان از شرکت البرز نانو تجهیز رایان تهیه شد. نانوذرات کیتوسان با استفاده از روش ژل شدن یونی^۱ آماده شدند. بر اساس این روش، ۱ گرم کیتوسان با وزن مولکولی متوسط در استیک اسید ۱٪ توسط همزن مغناطیسی با دور ۸۰۰ دور بر دقیقه حل شد. سپس pH ژل کیتوسان با استفاده از سدیم هیدروکسید ۱ مولار بین ۴/۸-۴/۶ تنظیم شد. به‌منظور آماده‌سازی نانوذرات کیتوسان، ابتدا محلول سدیم تری پلی فسفات (TTP) با حل کردن در آب دیونیزه (۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به دست آمد. سپس محلول TPP به‌آرامی و به‌صورت قطره قطره، با نسبت حجمی ۱ به ۳ به محلول کیتوسان در حال هم‌زدن اضافه شد. محلول در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه با دور ۸۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده شد و محلول نانوذرات کیتوسان تهیه شد، سپس با استفاده

1 ionic gelation

از دستگاه ساترفیوژ با دور ۶۰۰۰ دور بر دقیقه، رسوب از محلول جدا شد و چندین مرتبه با آب مقطر برای خروج یون‌های اضافی شستشو داده شد. نانوذرات در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای مراحل بعدی استفاده شد.

۳-۳- تهیه سوسپانسیون میکروبی

باکتری سودوموناس آئروژینوزا از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه خریداری و جهت بررسی تأثیر خاصیت آنتی‌باکتریایی عصاره ریشه گیاه شیرین بیان، نانوذرات کیتوسان و ترکیب این دو با هم مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه سوسپانسیون باکتریایی تعدادی از کلی‌های باکتری تازه کشت شده به محیط کشت مولر هیتون برات منتقل و سپس در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. سپس کدورت معادل ۰.۵ مک فارلند از سوسپانسیون میکروبی تهیه شد و سپس جذب نوری در محدوده ۰.۰۸ تا ۰.۱ در طول موج ۶۳۰ نانومتر انجام گردید.

۴-۲- بررسی اثر ضد میکروبی عصاره

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC ۱) و حداقل غلظت کشندگی (MBC ۲) عصاره‌ها به روش میکرودايلوشن^۳ انجام شد. به هفت چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای میزان ۱۰۰ μL از محیط مولر هیتون برات اضافه شد. سپس به چاهک اول ۱۰۰ μL از محلول رقیق شده عصاره اضافه شده و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ μL از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه کرده، بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام داده شد (غلظت اولیه عصاره ۱۰۰ μL است که با وارد کردن ۱ میلی‌لیتر از عصاره به لوله اول که حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت است غلظت ۵۰ μL به دست می‌آید). از چاهک آخر ۱۰۰ μL محیط کشت خارج کرده و مقدار ۱۰۰ μL از سوسپانسیون میکروبی حاوی ۱۰۷ واحد در میلی‌لیتر معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. اولین چاهکی که از رشد باکتری پس از قرار دادن در انکوباتور جلوگیری کرده است به‌عنوان (MIC) در نظر گرفته شد و برای اطمینان از چاهک‌های شفاف ۱۰ μL برداشته و به محیط مولر هیتون آگار منتقل کرده و پس از ۲۴ ساعت اولین رقتی که توانسته ۹۹/۹٪ رشد باکتری را مهار کند به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (11). به‌منظور تأیید نتایج حاصل، آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید.

از روش میکرودايلوشن^۴ جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تیمارها استفاده شد. به ۶ لوله آزمایش غلظت‌های ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ از عصاره ریشه گیاه شیرین بیان ریخته شد. ردیف ۷ به‌عنوان کنترل مثبت حاوی ۱۰۰ μg محیط کشت مولر هیتون برات به همراه ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ سوسپانسیون میکروبی و ردیف آخر کنترل منفی حاوی ۲۰۰ $\mu\text{g/mL}$ محیط کشت مولر هیتون برات در نظر گرفته شد. در خانه‌های ۱ تا ۶ هر ردیف ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ از غلظت مربوط به هر خانه اضافه شد. در تمام خانه‌ها به استثناء ردیف ۸، ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ از سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل cfu/mL $10^7 \times 1/5$ افزوده شد و سپس جذب هر لوله آزمایش با الیزا ریدر (AWARENESS Technology INC, Atafax 2100) در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. سپس لوله‌های آزمایش به مدت یک شبانه روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و مجدداً جذب آن خوانده شد. کمترین غلظت از مواد که باعث کاهش کدورت به میزان ۹۰ درصد شده بود، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد.

جهت تعیین رقت نانوذره کیتوسان مقدار ۱۰۰ μL از محلول ۲X نانوذره تهیه شده و به چاهک اول، ردیف اول افزوده شد. سپس با انتقال ۱۰۰ μL به ترتیب از چاهک ۱ تا چاهک ۱۰ به یکدیگر و در نهایت از چاهک ردیف ۱۰ مقدار ۱۰۰ μL دور ریخته شد و به این صورت ۱۰ رقت از نانوذره تهیه شد که هر رقت ۲ برابر بیشتر از غلظت بعد بود. انکوباسیون میکروپلیت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه انجام شد. بعد از ۴۸ ساعت کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط الیزا ریدر خوانده شد. کمترین رقت از نانو کیتوسان که در آن کدورتی دیده نمی‌شود به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. در نهایت نتایج به‌دست‌آمده با استانداردهای موجود در CLSI مقایسه شد.

سپس ۲۰ $\mu\text{g/mL}$ از محتویات چاهک‌های مربوط به MIC و سه لوله آزمایش مربوط به غلظت‌های بیشتر از تیمارهای مورد آزمایش که کدورت قابل تشخیصی در آن‌ها مشاهده نشد، بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار به‌صورت خطی کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد باکتری بر روی پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. غلظتی از تیمار مورد مطالعه که بر روی محیط کشت جامد مربوط به آن هیچ‌گونه رشدی از باکتری مشاهده نمی‌شود به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد.

- 1 Minimum inhibitory concentration
- 2 Minimum bactericidal concentration
- 3 Microdilution
- 4 Microdilution

۲-۵- تعیین زمان مرگ باکتری^۱

جهت بررسی زمان مرگ باکتری از غلظت ۰/۵ مک فارلند استفاده شد. لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت بدون اضافه کردن عصاره هیدروالکلی شیرین بیان، نانو ذرات کیتوسان و ترکیب عصاره هیدروالکلی شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان به عنوان کنترل منفی و با اضافه کردن آن‌ها در غلظت‌های MIC به عنوان کنترل مثبت با سوسپانسیون باکتری تلقیح شدند و در زمان‌های صفر، ۳۰ دقیقه، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۸، ۲۴ ساعت پس از تماس باکتری با عصاره هیدروالکلی شیرین بیان، نانو ذرات کیتوسان و ترکیب عصاره هیدروالکلی شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان در پایان هر زمان از لوله انکوبه شده با رقت مناسب (۱۰ برابر) نمونه کشت برداشته شده و در پلیت حاوی محیط کشت آگار خونی داده شدند. تعداد کلونی‌ها برای هر سویه و هر زمان بعد از ۱۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شمارش می‌شدند.

قرارگیری عصاره شیرین بیان، نانوذرات کیتوسان و ترکیب این دو باهم نانو در مجاورت سلول‌های سرطان کبد رده HepG2 و سلول‌های نرمال L929 رده‌های سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط RPMI1640^۲ به همراه ۱۰ درصد FBS و با آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در فلاسک (T25) در انکوباتور ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت و پوشیده شدن بستر فلاسک از سلول، لایه سلول‌های چسبیده به کف فلاسک با استفاده از محلول ۵ درصد تریسپین - EDTA جدا و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و پس از آن سوسپانسیون سلولی به میزان ۱۰^۵ μg/mL تهیه شد.

اثر سیاتوتوکسیک عصاره با استفاده از روش MTT^۳ که به عنوان شاخص بقای سلولی است، مورد سنجش قرار گرفت. ابتدا ۴۰ μL از سوسپانسیون سلولی درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و سپس به حجم هر چاهک ۱۶۰ μL از محیط ۱۰ درصد FBS افزوده شد. سوسپانسیون سلولی به عنوان کنترل منفی و دوکسوروبیسین با غلظت ۲۰۰ μg/mL به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوبه کردن، محیط رویی سلول‌ها خارج و به همه ردیف‌ها (به جز کنترل مثبت و منفی) عصاره رقیق شده با غلظت‌های ۰.۵، ۱، ۱.۵، ۲ و ۲۰ نانوذرات کیتوسان با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ به صورت جدا و نیز ترکیب این دو به ترتیب به ردیف‌های سوم تا ششم اضافه شد. پلیت به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت در انکوباتور CO₂ انکوبه شد و پس از انکوباسیون به همه چاهک‌ها MTT ۲۰ μl اضافه شد، و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محیط رویی را خارج کرده و ۲۰ μl DMSO به چاهک‌ها اضافه شد. سلول‌های L929 به عنوان سلول نرمال نیز مورد مطالعه قرار گرفتند. ابتدا سلول‌ها در ۱۰ درصد FCS قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت سلول‌ها در معرض عصاره الکی شیرین بیان، نانو ذرات کیتوسان و هم در حضور هر دو ترکیب باهم قرار گرفتند. هم‌زمان نمونه کنترل فاقد هریک از ترکیبات عصاره الکی شیرین بیان، نانو ذرات کیتوسان و ترکیب هم‌زمان عصاره الکی ریشه گیاه شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان در نظر گرفته شد. غلظتی از تیمار که درصد زنده‌مانی سلول‌ها را به ۵۰٪ کاهش دهد به عنوان IC₅₀^۴ در نظر گرفته شد.

میزان جذب نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الیزا ریدر (AWARENESS, TechnlogyINC, Atat) در طول موج ۲۱۰۰ (fax) قرائت شد و درصد حیات سلول‌ها در هر غلظت محاسبه گردید:

$$\frac{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت} - \text{میانگین جذب نوری در گروه آزمون}}{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت} - \text{میانگین جذب نوری در گروه کنترل}} \times 100$$

آنالیز آماری نتایج تجربی و تعیین IC₅₀ با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌راهه (ANOVA^۵) انجام گردید و مقدار $p \leq 0.05$ در هر تست به عنوان مرز معنی‌دار تلقی شد (شاه بنده، ۲۰۱۷: ۷۰۱) (شاملی، ۲۰۲۰).

مورفولوژی نانوذرات کیتوسان با کمک میکروسکوپ الکترونی MIRA 3 TESCAN شرکت بیم گستر تابان مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی گروه‌های عاملی نانوذرات کیتوسان به کمک آزمون مشخصه یابی FTIR انجام شد. دستگاه طیف‌سنج مورد استفاده، مدل AVATAR شرکت THERMO آمریکا بوده و به شیوه عبوری مورد استفاده قرار گرفت. برای شناسایی نمونه‌های جامد، پودر سنتز شده به نسبت ۱ به ۲۰۰ با پودر پتاسیم بروماید مخلوط شده و قرص‌های شفاف از آن‌ها با استفاده از دستگاه پرس برای انجام آزمون آماده شدند. به منظور بررسی فازی نانوذرات کیتوسان از آزمون پراش اشعه ایکس با طول موج Cu Kα (λ=1.54187Å) استفاده شد.

1 Time Killing

2 Roswell Park Memorial Institute 1640

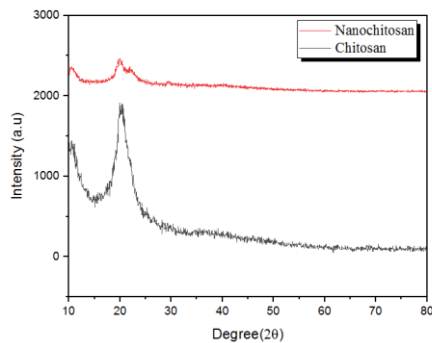
3 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

4 The Half Maximal Inhibitory Concentration

5 ANOVA way One

۳- بحث و نتایج

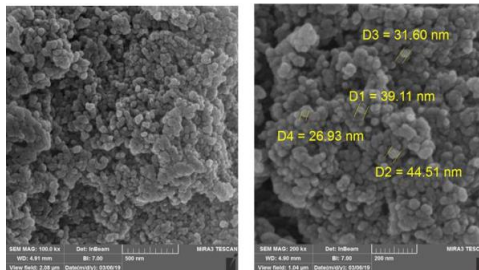
۳-۱- آنالیز الگوی پراش اشعه ایکس (XRD)



شکل ۱- الگوی پراش اشعه ایکس کیتوسان و نانو کیتوسان تولیدی XRD.

برای شناخت فازها و بررسی ساختار کریستالی پودر سنتز شده از آنالیز پراش اشعه ایکس دانشگاه صنعتی امیرکبیر استفاده شد. در شکل ۱ الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) برای نمونه نانوذرات کیتوسان نشان داده شده است. پیک‌های پراش در زوایای ۱۰ و $2\theta = 20$ درجه نشان دهنده ساختار کریستالی نانو کیتوسان است با کارهای دیگران مطابقت دارد و نشان دهنده سنتز صحیح این نمونه است. همچنین برای نانو کیتوسان مشاهده می‌شود که پیک‌ها پهن‌تر شده و شدت آن‌ها کمتر شده است و در واقع پهن شدن پیک به دلیل سایز ریزتر نانو کیتوسان ایجاد می‌شود (معظمی، ۲۰۲۱).

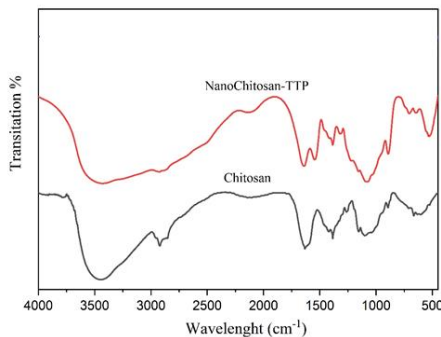
۳-۲- آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM)



شکل ۲- تصاویر FESEM مربوط به نمونه نانو کیتوسان.

شکل ۲ تصاویر FESEM مربوط به نمونه نانو کیتوسان در بزرگنمایی‌های ۲۰۰ هزار برابر و ۱۰۰ هزار برابر قابل مشاهده است که تأیید کننده تشکیل ذرات کروی کیتوسان با ابعاد نانومتری در محدوده ۲۰ تا ۵۰ نانومتر است.

۳-۳- آنالیز طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)



شکل ۳- آنالیز FTIR مربوط به کیتوسان و نانو کیتوسان.

در شکل ۳ آنالیز طیف سنجی مادون قرمز مربوط به نمونه کیتوسان و نانو کیتوسان مشاهده می‌شود. جذبی نمونه مربوط به کیتوسان و نانو کیتوسان پیک‌های پهن در محدوده 3422 cm^{-1} به ارتعاش کششی پیوند آب و گروه‌های هیدروکسیل و گروه‌های آمینی نسبت داده می‌شود. همچنین دو پیوند در محدوده 2920 cm^{-1} و 2859 cm^{-1} مربوط به ارتعاش نامتقارن CH_2 و CH_3 در هر دو کیتوسان و نانو کیتوسان هستند. پیوند مشاهده شده در محدوده 1655 cm^{-1} به پیوند C-N گروه C-NH_2 مرتبط است. همچنین پیوند در 1550 cm^{-1} نیز برای کیتوسان و نانو کیتوسان مشاهده می‌شود مربوط به ارتعاش خمشی NH_2 است که برای نمونه نانو کیتوسان شدت این پیوند افزایش یافته است که نشان دهنده درصد استیل زایی بالاست.

۳-۴- بررسی اثر عصاره گیاه شیرین بیان و نانو ذرات بر روی زیست پذیری سلول‌های HepG2

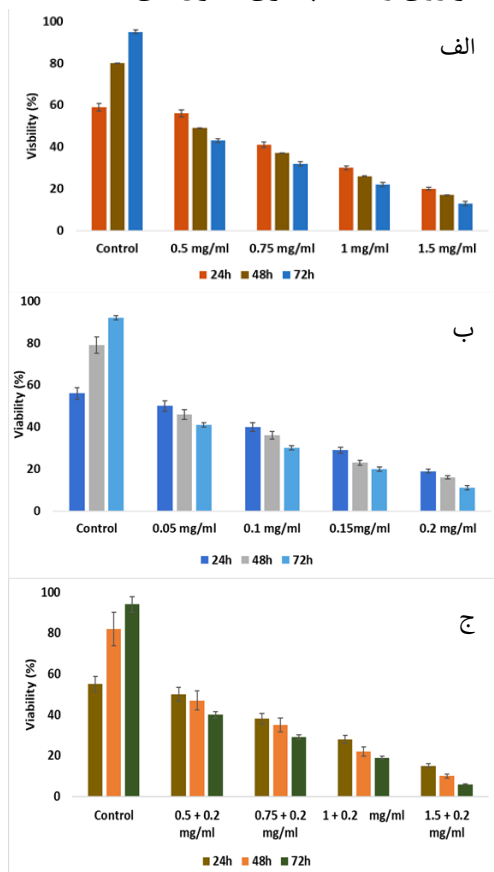
نتایج نشان می‌دهد اثر عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان بر مهار رشد سلول‌های HepG2 وابسته به غلظت و زمان متغیر است، به طوری که با افزایش غلظت و زمان درصد زیستایی سلول‌ها کاهش معناداری یافته است. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، در تیمار کنترل میزان رشد سلول‌ها در زمان ۷۲ ساعت بیشتر از ۸۰ درصد مشاهده شد. نتایج آنالیزها نشان می‌دهد که در زمان آنکوباسیون یکسان، با افزایش غلظت عصاره ریشه گیاه شیرین بیان (شکل ۴-الف) میزان زیست پذیری و رشد سلول‌ها کاهش یافته است. به طوری که در کمترین غلظت عصاره (0.5 mg/mL)، میزان رشد سلول‌ها $58/12 \pm 0/18$ درصد مشاهده شد، در صورتی که با افزایش غلظت ($1/5 \text{ mg/mL}$) میزان زیست پذیری سلول‌ها به $21/71 \pm 0/32$ کاهش یافت که دارای اختلاف معنی‌داری در سطح $0/05$ هستند. با توجه به شکل کاهش ۵۰ درصدی رشد سلول‌ها (IC_{50}) در مدت زمان ۴۸ ساعت و در غلظت $0/5 \text{ mg/mL}$ مشاهده شد. به طوری که شکل ۴-الف نشان می‌دهد از درصد تکثیر سلول‌های سرطانی رده HepG2 با افزایش زمان آنکوباسیون و غلظت کاسته شده است. بطوریکه در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت،

با افزایش غلظت به $1/5 \text{ mg/mL}$ میزان زیستایی سلول‌ها به ترتیب $19/17 \pm 0/21$ و $15/50 \pm 0/47$ درصد بدست آمد که دارای اختلاف معنی‌داری در سطح $0/05$ هستند (شکل ۴-الف).

همچنین همان‌طور که در شکل ۴-ب مشاهده می‌شود، نانوذرات کیتوسان دارای تأثیر مهاری بر رشد سلول‌ها هستند. به‌طوری‌که با افزایش غلظت نانوذرات از نرخ رشد سلول‌ها کاهش یافته است. به‌طوری‌که در کمترین غلظت نانوذرات ($0/2 \text{ mg/mL}$) و در زمان ۲۴ ساعت، میزان رشد سلول‌ها $55/30 \pm 0/22$ درصد مشاهده شد، در صورتی‌که با افزایش غلظت ($0/2 \text{ mg/mL}$) میزان زیست پذیری سلول‌ها به $23/01 \pm 0/46$ کاهش یافت که دارای اختلاف معنی‌داری در سطح $0/05$ هستند. همچنین IC_{50} سلول‌ها در غلظت $0/5 \text{ mg/mL}$ و در مدت‌زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۴-ب). همچنین بیشترین کاهش رشدی سلول‌ها در زمان ۷۲ ساعت و در غلظت $0/2 \text{ mg/mL}$ مشاهده شد.

همان‌طور که در شکل ۴-ج مشاهده می‌شود، ترکیب نانوذرات کیتوسان و عصاره شیرین بیان دارای تأثیر مهاری بر رشد سلول‌ها هستند. در واقع تأثیر هم‌زمان عصاره گیاه شیرین بیان و نانو ذرات کیتوسان با گذر زمان موجب کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های HepG2 شد؛ و با افزایش غلظت عصاره این اثر تشدید گردید. در اینجا غلظت نانوذرات ثابت در نظر گرفته شده است ($0/2 \text{ mg/mL}$) و غلظت عصاره متغییر هست، به‌طوری‌که با افزایش غلظت عصاره از نرخ رشد سلول‌ها کاهش یافته است. به‌طوری‌که در کمترین غلظت عصاره ($0/5 \text{ mg/mL}$) و در زمان ۲۴ ساعت، میزان رشد سلول‌ها $50 \pm 0/22$ درصد مشاهده شد، در صورتی‌که با افزایش غلظت ($1/5 \text{ mg/mL}$) میزان زیست پذیری سلول‌ها به $18 \pm 0/26$ کاهش یافت که دارای اختلاف معنی‌داری در سطح $0/05$ هستند. همچنین IC_{50} سلول‌ها در غلظت عصاره $0/5 \text{ mg/mL}$ و در مدت‌زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد (شکل ۴-ب). همچنین بیشترین کاهش رشدی سلول‌ها در زمان ۷۲ ساعت و در غلظت عصاره $1/5 \text{ mg/mL}$ و نانوذرات $0/2 \text{ mg/mL}$ مشاهده شد. علاوه بر این نتایج حاکی از آن است که عصاره گیاه شیرین بیان و نانو ذرات کیتوسان به‌طور هم‌زمان مؤثرتر از تأثیر جداگانه هر کدام بود. همچنین نانوذرات کیتوسان در مقایسه با گیاه شیرین بیان مؤثرتر است.

۳-۵- بررسی اثر عصاره گیاه شیرین بیان و نانو ذرات بر روی زیست پذیری سلول‌های L929



نتایج نشان می‌دهد عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان بر مهار رشد سلول‌های نرمال L929 با افزایش غلظت و زمان تا حدی کاهش یافته است ولی خیلی کاهش معناداری نبوده است. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، در تیمار کنترل میزان رشد سلول‌ها در زمان ۷۲ ساعت بیشتر از ۸۰ درصد مشاهده شد. نتایج آنالیزها نشان می‌دهد که در زمان آنکوباسیون یکسان، با افزایش غلظت عصاره ریشه گیاه شیرین بیان (شکل ۵-الف) میزان زیست پذیری و رشد سلول‌ها تا حدی کاهش یافته است. به‌طوری‌که در کمترین غلظت عصاره ($0/5 \text{ mg/mL}$)، میزان رشد سلول‌ها $53 \pm 0/18$ درصد مشاهده شد، در صورتی‌که با افزایش غلظت ($1/5 \text{ mg/mL}$) میزان زیست پذیری سلول‌ها به $37 \pm 0/22$ کاهش یافت. با توجه به شکل کاهش ۵۰ درصدی رشد سلول‌ها (IC_{50}) در مدت‌زمان ۴۸ ساعت و در غلظت 1 mg/mL مشاهده شد. همچنین همان‌طور که در شکل ۵-ب مشاهده می‌شود، نانوذرات کیتوسان دارای تأثیر مهاری کمتری بر رشد سلول‌های نرمال هستند. به‌طوری‌که با افزایش غلظت نانوذرات؛ نرخ رشد سلول‌ها تا حدی کاهش یافته است. به‌طوری‌که در کمترین غلظت نانوذرات ($0/05 \text{ mg/mL}$) و در زمان ۲۴ ساعت، میزان رشد سلول‌ها $68 \pm 0/22$ درصد مشاهده شد، در صورتی‌که با افزایش غلظت ($0/2 \text{ mg/mL}$) میزان زیست پذیری سلول‌ها به $46 \pm 0/46$ کاهش یافت. همچنین IC_{50} سلول‌ها در غلظت $0/15 \text{ mg/mL}$ و در مدت‌زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۴-ب).

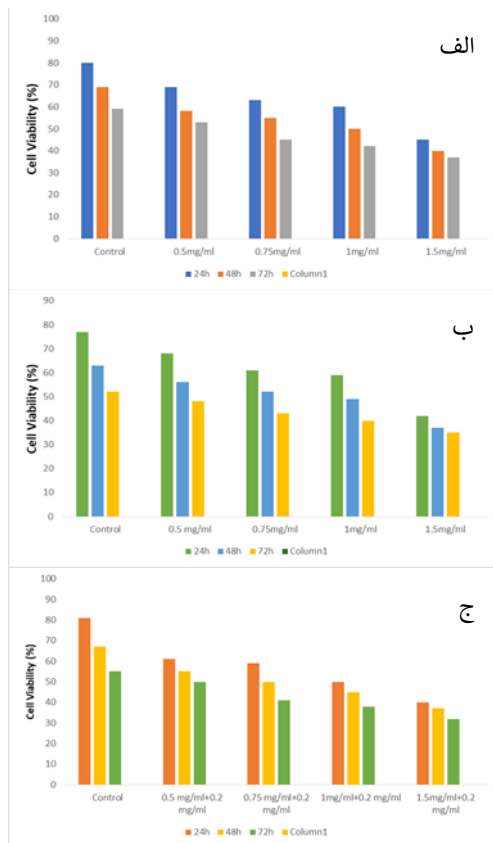
شکل ۴- (الف) درصد زنده بودن سلول‌های HepG2 بعد از در معرض قرار گرفتن با عصاره گیاه شیرین بیان، (ب) نانوذرات کیتوسان و (ج) عصاره گیاه شیرین بیان به همراه نانوذرات کیتوسان بعد از ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ($SEM \pm mean$) بیان شده است.

همان‌طور که در شکل ۴-ج مشاهده می‌شود، نسبت به تک به تک عصاره و نانوذرات، ترکیب نانوذرات کیتوسان و عصاره شیرین بیان دارای تأثیر مهاری موثرتری بر رشد سلول‌ها هستند. در واقع تأثیر هم‌زمان عصاره گیاه شیرین بیان و نانو ذرات کیتوسان با گذر زمان موجب کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های L929 شد؛ و با افزایش غلظت عصاره این اثر تا حدی بیشتر گردید. در اینجا غلظت نانوذرات ثابت در نظر گرفته شده است (۰/۲ mg/mL) و غلظت عصاره متغییر هست، به‌طوری‌که با افزایش غلظت عصاره از نرخ رشد سلول‌ها تا حدی کاهش یافته است. به‌طوری‌که در کمترین غلظت عصاره (۰/۵ mg/mL) و در زمان ۲۴ ساعت، میزان رشد سلول‌ها 0.24 ± 61 درصد مشاهده شد، در صورتی‌که با افزایش غلظت (۱/۵ mg/mL) میزان زیست‌پذیری سلول‌ها به 0.22 ± 40 کاهش یافت که دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ هستند. همچنین IC_{50} سلول‌ها در غلظت عصاره ۰/۵ mg/mL و در مدت‌زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد (شکل ۴-ج).

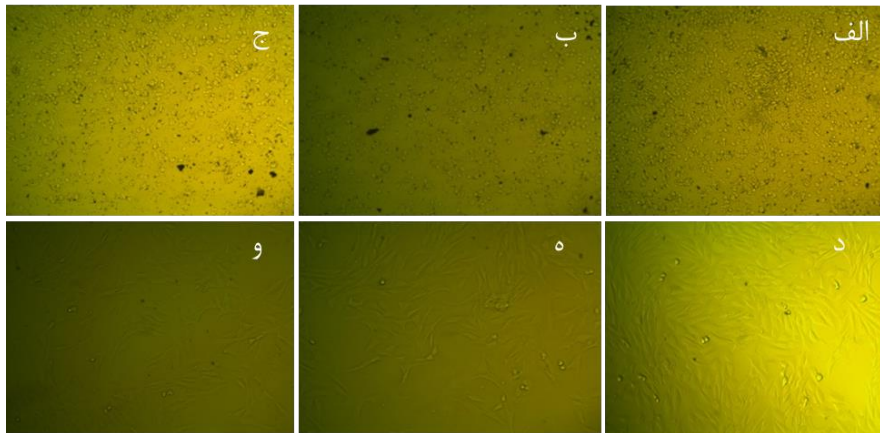
علاوه بر این نتایج حاکی از آن است که عصاره گیاه شیرین بیان و نانو ذرات کیتوسان به‌طور هم‌زمان مؤثرتر از تأثیر جداگانه هر کدام بود. همچنین نانوذرات کیتوسان در مقایسه با گیاه شیرین بیان مؤثرتر است. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، نتایج حاکی از آن است که نانوذرات کیتوسان در تمامی غلظت‌ها اثر منفی قابل‌توجهی بر سلول‌های L929 نداشت. نتایج آماری نشانگر آنست که عصاره الکلی بر روی سلول‌های نرمال اثری ندارد ولی بر روی سلول‌های سرطانی با توجه به دوز ماده موثر و زمان تأثیر، اثر مهارکنندگی دارد. علاوه بر این نتایج حاکی از آن است که عصاره گیاه شیرین بیان و نانو ذرات کیتوسان به‌طور هم‌زمان مؤثرتر از تأثیر جداگانه هر کدام بود. همچنین نانوذرات کیتوسان در مقایسه با گیاه شیرین بیان مؤثرتر است.

۳-۶- تصاویر میکروسکوپی نوری

در شکل ۶ تصاویر میکروسکوپی نوری نمونه‌ها، اثر هم‌افزایی نانوذرات کیتوسان شیرین بیان در مجاورت با سلول‌های نرمال (سالم) و سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج فوق حاصل گردید. نتایج مورفولوژی نشان می‌دهد که سلول‌های سرطانی نسبت به غیر سرطانی تیمار شده با عصاره هیدرو الکلی شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان و ترکیب هم‌زمان آن‌ها تغییرات مورفولوژیکی داشته است. تأثیرات اثر عصاره وابسته به دوز و زمان، قابل مشاهده بود. تغییرات مورفولوژی در سلول‌های سرطانی به‌صورت مهار رشد سلول‌ها و تغییر چسبندگی سلول‌ها به سطح فلاسک و سلول‌ها به یکدیگر و کاهش سطح سلولی و پیگمانته شدن سلول همراه بود. این تغییرات مورفولوژیکی مشاهده شده بیانگر القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپوپتوزیس) در سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره هیدرو الکلی شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان و ترکیب هم‌زمان آن‌ها هست که در سلول‌های غیر سرطانی مشاهده نگردید.



شکل ۵- درصد زنده بودن سلول‌های L929 بعد از در معرض قرار گرفتن با (الف) عصاره گیاه شیرین بیان، (ب) نانوذرات کیتوسان و (ج) عصاره گیاه شیرین بیان به همراه نانوذرات کیتوسان در غلظت‌های مختلف بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SEM \pm mean) بیان شده است.



شکل ۶- مورفولوژی (الف-ج) سلول‌های HepG2 و (د-و) L929 در مجاورت عصاره شیرین بیان (الف و د)، نانوذرات کیتوسان (ب و ه) و عصاره گیاه به همراه نانوذرات کیتوسان (ج و و) در غلظت IC50

۳-۷- بررسی اثر حداقل غلظت ممانعت کنندگی

نتایج حاصل از اثر حداقل غلظت ممانعت کنندگی عصاره شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان و ترکیب شیرین هم‌زمان بیان و نانوذرات کیتوسان در جدول ۱ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات کیتوسان با میزان ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین میزان MIC بر روی سودوموناس آئروژینوزا و ترکیب عصاره شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان با میزان ۳۲ کمترین میزان MIC بر روی سودوموناس آئروژینوزا دارد. میزان MIC نانوذرات کیتوسان بر روی سودوموناس آئروژینوزا اختلاف معنی‌داری را نسبت به میزان MIC گیاه شیرین بیان و ترکیب هم‌زمان عصاره شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان نشان داد ($P < 0.05$). همچنین بین میزان MIC عصاره شیرین بیان بر روی سودوموناس آئروژینوزا اختلاف معنی‌داری را نسبت به میزان MIC ترکیب عصاره شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان نشان داد ($P < 0.05$).

جدول ۱- میزان حداقل غلظت ممانعت کنندگی عصاره گیاه شیرین بیان، نانوذرات کیتوسان، ترکیب عصاره شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان

نام ماده	رقت مؤثر بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا
گیاه شیرین بیان	۶۴ μg/ml
نانوذرات کیتوسان	۱۲۸ μg/ml
گیاه شیرین بیان + نانوذرات کیتوسان	۳۲ μg/ml

۳-۸- بررسی اثر حداقل غلظت کشندگی

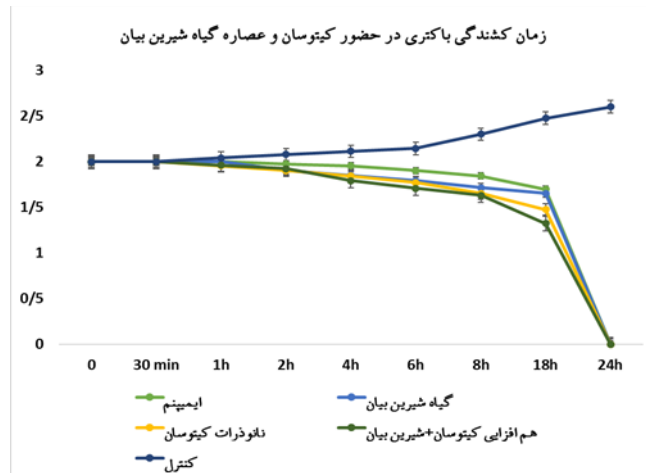
نتایج حاصل از اثر حداقل غلظت کشندگی عصاره هیدرو الکلی شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان و ترکیب عصاره هیدرو الکلی شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان در جدول ۲ آورده شده است. نتایج حاصل از اثر حداقل غلظت کشندگی نشان داد که میزان MBC در عصاره هیدرو الکلی شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان و ترکیب عصاره هیدرو الکلی شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان به ترتیب ۱۲۸، ۵۱۲، ۲۵۶ μg/ml بود. میزان MBC نانوذرات کیتوسان بر روی سودوموناس آئروژینوزا اختلاف معنی‌داری را نسبت به میزان MBC گیاه شیرین بیان و ترکیب عصاره شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان نشان داد ($P < 0.05$). همچنین بین میزان MBC عصاره شیرین بیان بر روی سودوموناس آئروژینوزا اختلاف معنی‌داری را نسبت به میزان MBC ترکیب عصاره شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان نشان داد ($P < 0.05$).

جدول ۲- میزان حداقل غلظت کشندگی عصاره گیاه شیرین بیان، نانوذرات کیتوسان، ترکیب عصاره شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان

نام ماده	رقت مؤثر بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا
گیاه شیرین بیان	۲۵۶ μg/ml
نانوذرات کیتوسان	۵۱۲ μg/ml
گیاه شیرین بیان + نانوذرات کیتوسان	۱۲۸ μg/ml

۳-۹- بررسی زمان مرگ باکتری

در شکل ۷ مطالعه زمان مرگ باکتری سودوموناس آئروژینوزا در تماس با عصاره هیدرو الکلی گیاه شیرین بیان، نانو ذرات کیتوسان و ترکیب هم‌زمان عصاره هیدرو الکلی گیاه شیرین بیان با نانوذرات کیتوسان روی مقدار MIC باکتری بررسی شد. نتایج نشان داد که بعد از ۶ ساعت جمعیت باکتری که در تماس با عصاره هیدرو الکلی گیاه شیرین بیان، نانو ذرات کیتوسان و ترکیب هم‌زمان عصاره هیدرو الکلی گیاه شیرین بیان با نانوذرات کیتوسان رو به کاهش است بعد از گذشت ۲۴ ساعت، جمعیت باکتری دچار مرگ کامل شدند.



شکل ۷- منحنی زمان مرگ برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا در زمان مختلف با غلظت MIC در تماس با عصاره هیدرو الکلی گیاه شیرین بیان، نانو ذرات کیتوسان و ترکیب هم‌زمان عصاره هیدرو الکلی گیاه شیرین بیان با نانوذرات کیتوسان

نتایج حاصل از این تحقیق در مورد تأثیر عصاره هیدرو الکلی گیاه شیرین بیان، نانوذرات کیتوسان و تأثیر هم‌زمانی آن‌ها بر روی رده‌ی سلولی HepG2 نشان داد که بعد از گذشت زمان‌های ۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت، درصد فعالیت زیستی سلول‌های HepG2 نسبت به رده‌ی سلولی L۹۲۹ کاهش پیدا می‌کرد. ترکیب عصاره هیدرو الکلی گیاه شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان در غلظت ۱/۵ mg/ml بیشترین مهار تکثیر سلولی نشان داده است و از لحاظ آماری نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است. عصاره گیاه شیرین بیان به علت داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بالا از جمله پلی‌فنل‌ها به‌عنوان یکی از گیاهان پرکاربرد در طب سنتی در درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته است. پلی‌فنل‌ها به واسطه گروه هیدروکسیل قدرت احیاء‌کنندگی بالایی دارند که می‌توانند با رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن واکنش دهند و آن‌ها را مهار کنند و باعث کاهش استرس اکسیداتیو و رفع آسیب به سلول‌ها و بافت‌های بدن ناشی از رادیکال‌های آزاد گردند (سینگ، ۲۰۲۰: ۹). هم‌چنین این ترکیبات فنلی می‌توانند با پروتئین‌های مختلف از جمله آنزیم‌ها واکنش داده و مانع از فعالیت آنزیم‌هایی مانند ایزوفورم‌های مختلف سیتوکرم P450، الکل دهیدروژناز، لیپواکسیژناز و گرانترین اکسیداز که در تولید گونه‌های اکسیژن فعال دخیل هستند شوند (ولنتا، ۲۰۰۳: ۵۱۷) (شان، ۲۰۱۷).

به‌علاوه شیرین بیان به علت حضور گلابرون (نوعی آنتی‌اکسیدان است) دارای خواص ضدالتهابی هم هست موجب مهار آنزیم سیکلو‌اکسیژناز شده که خود این آنزیم موجب مهار اسیدآرشدونیک و مانع تبدیل آن به هیستامین، سروتونین و پروستاگلاندین می‌گردد بدین ترتیب التهاب ایجاد شده را سرکوب می‌کند (بمباردو، ۲۰۱۸: ۳۳۵) (برناردی، ۲۰۰۹: ۱۱۰۴). گلیسریریک اسید موجود در ریشه شیرین بیان از طریق فعال‌سازی مسیر (Nrf2) که یک تنظیم‌کننده در برابر مواد اکسیداتیو است) موجب کاهش مسیر سیگنالینگ IL3-IL4-IL5, IL-16, IL- TNF- a و افزایش سیگنالینگ سایتوکاین‌های ضد التهابی مثل TNF- γ , IL-10, IL-12, IL-6 می‌شود در نهایت موجب کاهش رادیکال آزاد در فضای سلولی و کاهش روند التهاب می‌گردد (فاراتولو، ۲۰۱۹: ۱۸۶) (یانگ، ۲۰۱۷).

کیتوسان هم یک پلی ساکارید طبیعی است. این پلیمر در آب در PH اسیدی پلی کاتیونیک است و به سهولت با ترکیبات دارای بار منفی مثل پروتئین‌ها، پلی ساکاریدهای آنیونی، اسید چرب، فسفولیپیدها و DNA واکنش می‌دهد (چن، ۱۹۹۸: ۱۱۳۴). در واقع خاصیت ضد باکتریایی کیتوسان به ارتباط الکترواستاتیک بین گروه‌های آمینه (دارای بار مثبت) با غشای سلولی (بار منفی) باکتری‌ها است این تعامل باعث ایجاد تغییرات شایع در سطح سلول می‌شود و منجر به تغییر نفوذپذیری غشا می‌شود که به‌طور

متوالی باعث ایجاد عدم تعادل اسمزی و خروج مواد درون سلولی شده که منجر به مرگ سلول می‌شود (چاندراسکاران، ۲۰۲۰: ۱۱۷۳) (شهیدی، ۱۹۹۹: ۳۷) (وی، ۲۰۰۹: ۲۳۷۵).

مطالعات دیگری بیان می‌کند که ظرفیت شلاته‌کننده کیتوسان نسبت به یون‌های فلزی، تولید سم تحریک کرده و و از زنده ماندن باکتری‌ها جلوگیری می‌کند. کیتوسان در شرایط اسیدی فعالیت شلاته‌کننده خود را بیشتری برای یون‌های از جمله Fe^{2+} ، Mg^{2+} ، Ni^{2+} ، Co^{2+} و Cu^{2+} حفظ می‌کند. این یون‌های فلزی که با مولکول‌های دیواره سلولی باکتری در ارتباط هستند برای پایداری آن‌ها حیاتی هستند. بنابراین، شلاتاسیون با واسطه کیتوسان یک مکانیسم قابل تصور از اثر ضد باکتری کیتوسان است (چاندراسکاران، ۲۰۲۰: ۱۱۷۳).

تأثیر هم‌زمان عصاره هیدروالکلی گیاه شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان نشان داد که خاصیت انتی‌اکسیدانی گیاه شیرین بیان و خاصیت ضد باکتریایی نانو ذرات کیتوسان در کنار هم منجر به کاهش زنده مانده سلول‌های HepG2 شد.

نتایج حاصل از MIC و MBC نشان داد که باکتری سودوموناس آئروژینوزا کمترین مقاومت نسبت به ترکیب نانوذرات کیتوسان و عصاره گیاه شیرین بیان دارد. فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات کیتوسان هنوز مشخص نشده است. اما گمان می‌شود نانوذرات به علت اندازه بسیار کوچک خود خیلی بهتر و راحت‌تر می‌توانند با غشاء سلولی میان کنش برقرار کنند در نتیجه بخشی از مواد داخل سلول به بیرون تراوش می‌کند و از ورود مواد غذایی به داخل سلول جلوگیری است. همچنین نانوذرات کیتوسان با ورود به داخل سلول با DNA متصل می‌شود، از سنتز RNA و در نتیجه تولید پروتئین‌های حیاتی سلول جلوگیری می‌کنند مانع تکثیر سلول باکتری شود (ین، ۲۰۲۰: ۱۱۵۵۲۰).

از طرف دیگر عصاره گیاه شیرین بیان باعث آسیب‌های فیزیکی و شیمیایی به دیواره سلول باکتری می‌شود نهایتاً منجر به تراکم کروماتین، کوچک و جمع شدن سلول و قطعه قطعه شدن DNA می‌شود (گلداری، ۲۰۱۵: ۲۱۲۹).

همچنین نتایج حاصل از قابلیت کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه شیرین بیان، نانوذرات کیتوسان و ترکیب هم‌زمان عصاره الکی گیاه شیرین بیان با نانوذرات کیتوسان نشان داد که ترکیب عصاره الکی گیاه شیرین بیان با نانوذرات کیتوسان کاهش جمعیت باکتری سودوموناس آئروژینوزا نسبت به عصاره هیدروالکلی گیاه شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان روند سریع‌تری را نشان داد و جمعیت باکتری با افزایش زمان تماس باکتری با ترکیب هم‌زمان عصاره الکی گیاه شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان از ۴ ساعت به ۲۴ ساعت برای غلظت MIC به صفر می‌رسد. نانوذرات کیتوسان و گلیسیریزیک اسید موجود در عصاره هیدروالکلی گیاه شیرین بیان روی نفوذپذیری غشاء باکتری اثر دارد و با افزایش زمان تماس احتمال برخورد عصاره هیدروالکلی گیاه شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان با دیواره باکتری افزایش می‌یابد سرانجام منجر به کاهش جمعیت باکتری می‌شود (چاکوتیا، ۲۰۱۶: ۹۸) (لیو، ۲۰۰۴: ۱۴۷).

۴- نتیجه‌گیری

نتایج بررسی‌های انجام شده با درمان هم‌زمان و جداگانه نانوذرات کیتوسان و عصاره گیاهی شیرین بیان در مجاورت با سلول‌های سرطانی کبد HEPG2 با تست MTT نشان داد که اثر کشندگی نانوذرات کیتوسان در حضور عصاره گیاهی روی سلول‌های نرمال شیرین بیان به مقدار چشمگیری کاهش یافته و این نتیجه‌گیری مثبت و قابل قبول هست و همچنین مشخص شد که سلول‌های سرطانی کبد به خاطر اثر هم‌افزایی نانوذرات کیتوسان و عصاره گیاهی شیرین بیان تا حد زیادی از بین رفته و در بهبود بیماری بسیار مؤثر هست. اثر کشندگی وابسته به غلظت و زمان بر رده سلول‌های سرطانی هست و تغییرات مورفولوژی مشاهده شده بیانگر القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در سلول‌های سرطانی تیمار شده است و به نظر می‌رسد نانوذرات کیتوسان و عصاره الکی شیرین بیان هر دو خاصیت سمیت سلولی دارند لذا، کاربرد این نانوذرات می‌تواند در مطالعات مربوط به درمان سرطان کبد مفید واقع شود. همچنین در این طرح نانوکیتوسان به‌عنوان تسهیلگر عصاره گیاهی عمل کرده و باعث افزایش اثر آن شده است. از مزایای این طرح به ارزان بودن و دوستدار محیط زیست بودن مواد استفاده شده می‌توان اشاره کرد.

منابع

1. Al-Snafi AE. (2018). Glycyrrhiza glabra: A phytochemical and pharmacological review. IOSR Journal of Pharmacy 8(6), pp. 1-7.
2. Bahmani M, Sarrafchi A, Shahinfard N, Rafieian-Kopaei M, Shahsavari S, Baharvand-Ahmadi B, Taherikalani M, Ghafourian S. (2015). Pharmaceutical, phytochemical, and economical potentials of Glycyrrhiza glabra L: a review. Journal of chemical and pharmaceutical sciences 8(4), pp. 683-692.
3. Bakshi PS, Selvakumar D, Kadirvelu K, Kumar NS. (2020) Chitosan as an environment friendly biomaterial—a review on recent modifications and applications. International journal of biological macromolecules 150, pp. 1072-1083.
4. Bernardi A, Zilberstein AC, Jäger E, Campos MM, Morrone FB, Calixto JB, Pohlmann AR, Guterres SS, Battastini AM. (2009). Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in

experimental models of inflammation in rats. British journal of pharmacology 158(4), pp. 1104-1111.

5. Bombardo M, Malagola E, Chen R, Rudnicka A, Graf R, Sonda S. (2018). Ibuprofen and diclofenac treatments reduce proliferation of pancreatic acinar cells upon inflammatory injury and mitogenic stimulation. British journal of pharmacology 175(2). pp. 335-347.
6. Chandrasekaran M, Kim KD, Chun SC. (2020). Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: A review. Processes 8(9), pp. 1173.
7. Chakotiya, A.S. Tanwar, A. Narula, A. and Sharma, R.K. (2016). Alternative to antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*: Effects of *Glycyrrhiza glabra* on membrane permeability and inhibition of efflux activity and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and its in vitro time-kill activity. Microbial pathogenesis 98, pp.98-105.
8. Chen CS, Liao WY, Tsai GJ. (1998). Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. Journal of Food Protection 61(9). pp. 1124-8.
9. Eghdami, A. Salehi, M. A. & Babakhani, M. (2014). Determination of physicochemical properties of capsaicin and cytotoxic effect of capsicum extract in breast cancer (MCF7) cell line International Journal of Biosciences | IJB |. Int. J. Biosci 4, pp. 262–268.
10. Frattaruolo L, Carullo G, Brindisi M, Mazzotta S, Bellissimo L, Rago V, Curcio R, Dolce V, Aiello F, Cappello AR. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory activities of flavanones from *Glycyrrhiza glabra* L.(licorice) leaf phytocomplexes: Identification of licoflavanone as a modulator of NF- κ B/MAPK pathway. Antioxidants 8(6). pp.186.
11. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 16(6), pp. 2129-2144.
12. Kulik L, El-Serag HB. (2019). Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 156(2), pp. 477-491.
13. Liu H, Du Y, Wang X, Sun L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. International journal of food microbiology 95(2), pp. 147-155.
14. Moazami, M H, shahbandeh M & Amin salehi M. (2021). Antibacterial and cytotoxicity effect of (*Ficus carica*) against HepG2 cells. J. Plant Res.
15. Salehi E, Daraei P, Shamsabadi AA. (2016) A review on chitosan-based adsorptive membranes. Carbohydrate polymers. 152. pp. 419-432.
16. Shan XU, Cheng J, Chen KL, Liu YM, Juan LI. (2017). Comparison of lipoxygenase, cyclooxygenase, xanthine oxidase inhibitory effects and cytotoxic activities of selected flavonoids. DEStech Transactions on Environment, Energy and Earth Sciences.
17. Shahbandeh, M. & Eghdami, A. (2017). Investigation of the anti-proliferative and apoptotic effects of Aloe vera extracts on hl60 human acute myeloid leukemia and MCF-7 breast cancer cell lines. J. Appl. Biotechnol. Reports 4, pp. 701–706.
18. Shameli Rajiri, M. et al. (2020). Anticancer and therapeutic potential of *Delonix regia* extract and silver nanoparticles (AgNPs) against pancreatic (Panc-1) and breast (MCF-7) cancer cell. Toxicol. Environ. Health Sci.
19. Shahidi F, Arachchi JK, Jeon YJ. (1999). Food applications of chitin and chitosans. Trends in food science & technology 10(2), pp. 37-51.
20. Shaker MK, Abdella HM, Khalifa MO, El Dorry A. Epidemiological characteristics of hepatocellular carcinoma in Egypt: a retrospective analysis of 1313 case. Liver Int 2013; 33(10): 1601-06.
21. Singh V, Kumar A. Antioxidant Potential of *Glycyrrhiza glabra* L. roots: In-Vitro Evidences. Journal of Pharmaceutical Technology, Research and Management. 2020 May 20;8(1):9-13.
22. Soares GM, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte PM, Feres M. (2012). Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. Journal of applied oral science. 20, pp. 295-309.
23. Pastorino G, Cornara L, Soares S, Rodrigues F, Oliveira MB. (2018). Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review. Phytotherapy research 12. pp. 2323-2339.
24. Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. (2003). Hydroxyl radical and hypochlorous acid scavenging activity of small centaury (*Centaurium erythraea*) infusion. A comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). Phytomedicine. 10 (6-7): pp. 517-522.
25. Wei D, Sun W, Qian W, Ye Y, Ma X. (2009). The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. Carbohydrate research 23; 344(17). pp. 2375-82.

26. Yang G, Wang L, Yu X, Huang Y, Qu C, Zhang Z, Luo D, Lin J, Zhou L, Su Z, Zhang X. (2017). Protective effect of 18 β -glycyrrhetic acid against triptolide-induced hepatotoxicity in rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
27. Yin N, Du R, Zhao F, Han Y, Zhou Z. (2020). Characterization of antibacterial bacterial cellulose composite membranes modified with chitosan or chitooligosaccharide. Carbohydrate polymers 229. pp. 115520.