

# جداسازی و ارزیابی کلاژن از پوست ماهی (هوور دم‌دراز – *Thunnus tonggol*) به عنوان یک ماده بیولوژیک برای مهندسی بافت پزشکی

محمد هادی سمیعی<sup>۱</sup>، شهلا جمیلی<sup>۲\*</sup>، حبیب نیکوکار<sup>۳\*</sup>، وحید رزبان<sup>۴</sup>

## مقاله پژوهشی

**مقدمه:** کلاژن دارای کاربردهای فراوانی در زمینه داروسازی و پزشکی، تهیه محصولات بهداشتی و آرایشی و صنایع غذایی می‌باشد و در سال‌های اخیر توجه زیادی به جداسازی کلاژن از موجودات دریایی شده است، که علت آن عدم محدودیت استفاده از این نوع کلاژن در رژیم غذایی، عدم انتقال و کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های مسری و محدودیت‌های شرعی می‌باشد. هم‌چنین کلاژن ماهی، به لحاظ حلالیت فوق‌العاده زیاد آن در اسید رقیق در مقیاسه با کلاژن پستانداران و ماکیان منحصر به فرد است. هدف از این مطالعه بررسی جداسازی و ارزیابی کلاژن از پوست ماهی (*Thunnus tonggol*) به عنوان یک ماده بیولوژیک برای مهندسی بافت پزشکی بود.

**روش بررسی:** کلاژن با استفاده از اسید استیک از پوست ماهی جداسازی و با استفاده از روشهای SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis)، FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy)، اسپکتروفوتومتر UV و HPLC (High performance liquid chromatography)، نوع و میزان اسیدهای آمینه آن بررسی شد. در پایان رشد و سازگاری سلول‌های فیبروبلاست انسانی بر روی کلاژن جداسازی شده مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** کلاژن پوست ماهی، کلاژن نوع I است. تجزیه و تحلیل FTIR وجود آرایش مارپیچی کلاژن را نشان داد و اسپکتروفوتومتری UV نشان داد که کلاژن در ۲۳۵ نانومتر جذب دارد. میزان کلاژن استخراج شده از پوست ماهی هوور ۱۷/۳ درصد بود. در تجزیه و تحلیل اسیدآمینه کلاژن استخراج شده از پوست ماهی هوور، اسید آمینه گلیسین به عنوان اسید آمینه غالب بود. رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست انسانی بر روی کلاژن استخراج شده از پوست ماهی هوور مناسب بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد کلاژن ماهی می‌تواند یک منبع ارزان و در دسترس قابل استفاده در مهندسی بافت‌های پزشکی باشد.

**واژه‌های کلیدی:** کلاژن پوست ماهی، اسید آمینه، ماهی هوور، خلیج فارس

**ارجاع:** سمیعی محمد هادی، جمیلی شهلا، نیکوکار حبیب، رزبان وحید. جداسازی و ارزیابی کلاژن از پوست ماهی (هوور دم‌دراز – *Thunnus tonggol*) به عنوان یک ماده بیولوژیک برای مهندسی بافت پزشکی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۱؛ ۳۰ (۶): ۴۸-۴۹۳۲.

۱- گروه تخصصی علوم دریایی، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

۳- مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران.

۴- گروه پزشکی ملکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین پزشکی، مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی، پژوهشکده سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران.

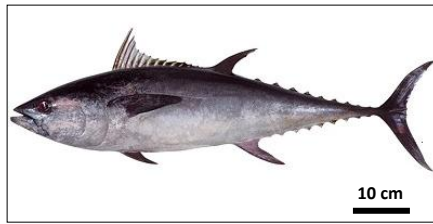
\* (نویسندگان مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۳۱۵۲۷۲۳۷، پست الکترونیکی: shahlabnik@ssu.ac.ir, shahlabnik45@yahoo.com, صندوق پستی: ۸۹۱۶۸۷۷۳۹۱

نام‌های زنجیره  $\alpha$  که در اطراف یکدیگر پیچیده می‌شوند تشکیل گردیده است. کلاژن‌ها بسیار غنی از اسیدهای آمینه پرولین و گلیسین هستند که هر دو در تشکیل مارپیچ سه رشته‌ای مهم می‌باشند. پرولین به دلیل ساختار حلقه‌ای، ساختار مارپیچی را در هر زنجیره  $\alpha$  تثبیت می‌کند، در حالیکه گلیسین به طور منظم در هر باقیمانده سوم در سراسر منطقه مرکزی زنجیره  $\alpha$  قرار دارد. گلیسین که کوچکترین اسید آمینه است (فقط یک اتم هیدروژن به عنوان یک زنجیره جانبی دارد)، به سه زنجیره  $\alpha$  مارپیچ اجازه می‌دهد که محکم بسته شوند تا ابر مارپیچ کلاژن نهایی تشکیل شود (۸،۹). تا کنون ۲۹ نوع کلاژن تشخیص داده شده و تمامی آن‌ها نوعی ساختار مارپیچی سه گانه را نمایش می‌دهند. کلاژن ماهی نوع I بوده و با توجه به حلالیت فوق العاده زیاد آن در اسید رقیق درمقایسه با کلاژن پستانداران و ماکیان متفاوت و منحصر به فرد است. در مقایسه با کلاژن نوع I گوساله، کلاژن نوع I مهره داران پست‌تر مشتق شده از ماهیان استخوانی و لامپری، میزان تشابه ساختاری زیادی را بین گونه‌ها با توجه به زنجیره های  $\alpha 1$  و  $\alpha 2$  نشان می‌دهد. پیش ماده‌های کلاژن با اثرگذاری بر ویژگی‌های رشد سلول‌ها و تنظیم جنبه‌های مختلف رفتار و عملکرد سلولی مانند الحاق سلولی، تکثیر و تمایز شناخته می‌شود. مطالعات گذشته روشن کرده است که ترکیب کلاژن ماهی مشابه کلاژن پستانداران است (۱۰-۸). با در نظر گرفتن بهره‌برداری تجاری، کلاژن موجود عمدتاً از حیوانات خشکی زی نظیر گاو، خوک، مرغ و گونه‌های از موش به دست می‌آید. کلاژن ماهی منبع مناسبی برای کاربردهای مختلف است. از کلاژن ماهی به عنوان یک پروتئین نسبتاً ارزان که به راحتی در دسترس بوده و به‌طور گسترده‌ای در مقیاس صنعتی و عمدتاً برای تولید مواد خوراکی استفاده می‌شود. داروسازی از جمله زمینه‌های در حال رشدی است که کلاژن با جنبه‌های مختلف نظیر محصولات آرایشی و درمانی در آن اهمیت ویژه‌ای دارد. علاقه و تقاضا برای استفاده از کلاژن در کاربردهای پزشکی بسیار مشاهده می‌شود و مواد مبتنی بر کلاژن به‌طور گسترده‌ای در پزشکی ترمیمی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد.

کلاژن یک پروتئین فیبری است که یک جزء مهم در ساختارهای حمایتی (غضروف‌ها، تاندون‌ها و ...) مهره داران و بی‌مهرگان است (۱). کلاژن فراوان ترین پروتئین در مهره داران است که نقش مهمی در حفظ یکپارچگی بیولوژیکی و ساختاری بافت‌ها دارد و به ساختار، شکل و ویژگی‌های مکانیکی مولکولی بافت‌های پیوندی مختلف بدن (به عنوان مثال پوست، استخوان‌ها، رباط‌ها، تاندون‌ها و غضروف‌ها) کمک می‌کند. تقریباً ۵۰٪ از کل کلاژن بدن انسان در پوست وجود دارد که بیشتر آن کلاژن نوع I است (۵-۲). کلاژن‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌های رشته‌ای هستند که در همه حیوانات چند سلولی یافت می‌شوند. آن‌ها توسط سلول‌های بافت همبند و هم‌چنین انواع سلول‌های دیگر ترشح می‌شوند. این پروتئین‌ها به عنوان یک جزء اصلی در پوست و استخوان و فراوان ترین پروتئین در پستانداران هستند که حدود ۲۵٪ و در بالاترین مقدار حدود ۳۰٪ از کل پروتئین موجود در بدن حیوانات را تشکیل می‌دهند. کلاژن سازگاری بیولوژیکی عالی، تجزیه بیولوژیکی و تجدید زیست خوب و آنتی‌ژنیسیته ضعیفی را نشان داده است. چنین ویژگی‌ها و دانش‌هایی منجر به تولید انبوهی از دستگاه‌های زیست پزشکی مبتنی بر کلاژن، از جمله سیستم‌های انتقال دارو، بخیه‌های جراحی و کاربردهای مهندسی بافت می‌شود. علاوه بر این، کلاژن دارای ساختار و ترکیب اسید آمینه به خوبی حفظ شده بین گونه‌ها است، که در هنگام استفاده از کلاژن‌های غیر انسانی در زمینه زیست پزشکی به خواص ذکر شده کمک می‌کند (۶-۴). استفاده از کلاژن دریایی با توجه به خواص منحصر به فرد آن در مقایسه با کلاژن حاصل از پستانداران مانند نداشتن خطر انتقال بیماری‌ها، محدودیت‌های مذهبی کمتر، فرآیند مقرون به صرفه‌تر، وزن مولکولی کم، سازگاری زیستی و جداسازی آسان و جذب بهتر توسط بدن انسان، در حال رشد سریع است (۷). ویژگی اصلی یک مولکول کلاژن معمولی ساختار مارپیچ بلند، محکم و سه رشته‌ای آن است که از سه زنجیره پلی‌پپتیدی، به

آمریکای شمالی پوست خوک، منبع عمده ماده اولیه برای تولید کلاژن نوع اول می‌باشد. پوست خوک به شکل منجمد در بسته‌های بزرگ به کارخانه‌های تولید کلاژن برده می‌شود. در اروپا نیز مقادیر زیادی پوست خوک برای تولید کلاژن نوع اول به کار می‌رود، زیرا که بازده تولید کلاژن نوع اول از آن بالا بوده و نیاز به مدت زمان کمتری برای آماده کردن مواد اولیه برای استخراج و مشکلات کمتری در ارتباط با فاضلاب کارخانه می‌باشد (۱۳). با توجه به اهمیت موضوع، تاکنون مطالعات فراوانی توسط محققان بر روی کلاژن انواع ماهی‌ها و بسیاری از موجودات دریایی از گونه‌های مختلف به عنوان منشاء زیست توده برای جداسازی کلاژن، از یک دیدگاه اساسی یا به عنوان ماده اولیه برای تولید بیوپلیمر و همچنین بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن‌ها صورت گرفته‌اند. در این مطالعات، ماهی و محصولات جانبی آن را به دلیل کم بودن ریسک انتقال بیماری، دسترسی آسان، نبودن محدودیت‌های دینی و محتوای بالای کلاژنی به عنوان یک منبع امن معرفی کرده‌اند (۳۵-۲۷، ۱۳، ۱۱، ۶، ۳). ماهی تن دم‌دراز (تصویر ۱) یکی از ارزشمندترین و مهم‌ترین ماهیانی است که در مناطق گرمسیری تا نیمه گرمسیری اقیانوس هند و آرام زندگی می‌کند. صید ماهی تن در آب‌های ساحلی کشورهای مختلف از جمله اندونزی، پاکستان، مالزی، عمان، یمن، هند و تایلند و ایران انجام می‌شود. در ایران صید صنعتی در خلیج فارس و دریای عمان صورت می‌پذیرد که از نظر اقتصادی برای صنایع شیلات بسیار مهم است. ایران رتبه دوم در صید ماهی تن و گونه‌های مختلف تن ماهیان از اقیانوس هند را دارد. میزان صید ماهی تن و گونه‌های مختلف تن ماهیان در ایران از ۵۴ هزار تن در سال ۱۹۹۷ به ۲۵۱ هزار تن در سال ۲۰۱۶ (حدود ۴ برابر) افزایش یافته است. توجه به نقش اصلی فعالیت‌های شیلات در کشورهایی که در سواحل آب‌های آزاد واقع شده‌اند، در توسعه پایدار صنعت شیلات بسیار مهم است. از این نظر، ایران نمونه خوبی است که در حاشیه خلیج فارس و دریای عمان واقع شده و به اقیانوس هند دسترسی دارد (۳۶).

همچنین کلاژن در پزشکی برای تهیه انواع کرم‌ها، گاز و باندهای ویژه پانسمان و ترمیم زخم و در داروسازی برای تهیه کپسول‌های دارویی و قرص‌ها مصرف می‌شود (۱۶-۱۱). به طور کلی، پوست و استخوان گاو و خوک، به عنوان منابع اصلی استخراج کلاژن و ژلاتین هستند. در سال‌های اخیر توجه زیادی به جداسازی کلاژن از موجودات دریایی شده که علت آن عدم محدودیت استفاده از آن در رژیم غذایی و کم بودن خطر ابتلا به بیماری‌های مُسری که شامل جنون گاوی، آنفولانزای خوکی و مرغی و همچنین بیماری‌های گوارشی شایع در گاوها، خوک‌ها و بوفالوها می‌باشد (۱۷). علیرغم غربالگری دقیق بیماری‌های قابل انتقال، خطر انتقال و وقوع بیماری جنون گاوی، منجر به ایجاد تشویش در بین مصرف‌کنندگان کلاژن و ژلاتین گاو شده است. همچنین شیوع بیماری‌هایی مانند آنسفالوپاتی اسفنجی شکل قابل انتقال (TSE)، بیماری پا و دهان (FMD) در خوک‌ها و گاوها و آنفولانزای خوکی و آنسفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی (BSE) در بعضی کشورها جهان از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۰-۱۸، ۱۱، ۸). همچنین محدودیت‌های مذهبی علی‌الخصوص در اسلام، یهودیت و هندوها، استفاده و کاربردهای کلاژن مبتنی بر پستانداران را محدود می‌کند (۲۵-۲۱، ۱۵، ۱۲). کلاژن به دست آمده از ماهی ممکن است یک گزینه ایمن باشد، زیرا احتمال انتقال بیماری‌ها هنوز نگران کننده نیست. علاوه بر این، محصولات جانبی فرآوری ماهی، مانند پوست، استخوان‌ها و فلس، به طور کامل در دسترس هستند، و استفاده از آن‌ها ضمن اینکه به حل مشکلات آلودگی محیط زیست مرتبط می‌پردازند، از بهره برداری پایدار از منابع دریایی از طریق ارزش سنجی باقیمانده اطمینان حاصل می‌کنند (۴). شاید جالب‌ترین کلاژنی که در آبزیان کشف شده است الاستودین بوده که از پروتئین باله کوسه ماهی می‌باشد. این پروتئین وزن مولکولی کمتری در مقایسه با اکثر کلاژن‌های محلول دیگر دارد و همچنین مقدار تیروزین و سیستئین بالایی دارد که غیرعادی می‌باشد. این دو اسید آمینه در تشکیل اتصال شرکت دارند، ولی این پدیده در کلاژن پستانداران دیده نمی‌شود (۲۶). در

تصویر ۱: ماهی تن دم‌دراز *Thunnus tonggol*

## روش بررسی

در مطالعه بنیادی حاضر، منابع کلاژنی شامل پوست ماهی هوور دم‌دراز از بازار ماهی فروشان بندرعباس تهیه، نمونه‌ها به صورت منجمد به آزمایشگاه مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد منتقل و تا شروع آزمایشات به همان حالت نگهداری گردید.

**مواد شیمیایی:** سود سوزآور (سدیم هیدروکسید)، بوتیل الکل (۱- بوتانول)، آکریل آماید، بیس آکریل آماید، سدیم کلراید، تریس (هیدروکسی متیل) آمینومتان، سدیم دوسیل سولفات، آمونیوم پرسولفات، گلیسرول، مرکاپتواتانول، بروم فنل بلو، کومایسی آر ۲۵۰ از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شده و متانول و اسید استیک گلاسیال از شرکت میرک آلمان و مارکر پروتئین از شرکت سینا ژن (SL7002) تهیه گردید. برای انجام آزمایش تمام مواد در سردخانه با دمای ۲۵- درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه به مدت یک هفته نگهداری شد. شرایط دمایی در تمام طول فرایند تحقیق ۴ درجه سانتی‌گراد و pH ثابت با مقدار ۷/۲ و کنترل شده می‌باشد.

**استخراج قلیایی مواد پروتئینی غیر کلاژنی:** تمامی مراحل با استفاده از روش ناگایی (۱۹) با اندکی تغییر انجام شد. ابتدا پوست ماهی تهیه و آماده‌سازی شده به میزان ۱۰۰ گرم با استفاده از آب مقطر سرد چندین بار شستشو داده شدند. سپس به آن NaOH ۰/۱ مولار با نسبت (W/V) ۱:۲۰ اضافه گردید. سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت توسط استیرر بهم زده شد. محلول نهایی را از صافی رد کرده و با آب مقطر سرد شستشو داده تا pH آن خنثی شود.

**چربی‌زدایی از بافت:** نمونه‌ها در محلول بوتیل الکل ۱۰٪ با نسب ۱:۱۰ به مدت ۲۴ ساعت مخلوط و بهم زده شدند. هر ۸ ساعت محلول تعویض گردید. بافت بدون چربی با آب مقطر سرد به طور کامل شستشو داده شد (۱۹).

**آماده سازی کلاژن محلول در اسید (Acid-ASC)**  
soluble collagen از پوست ماهی هوور دم‌دراز: برای استخراج کلاژن، بافت آماده شده در اسید استیک ۰/۵ مولار با نسبت (W/V) ۱:۲۰ به مدت ۷۲ ساعت روی همزن قرار گرفت. مخلوط از طریق دو لایه پارچه صافی، صاف گردید. سپس سوپرناتانت جمع‌آوری شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. باقی‌مانده به همان روش قبلی مجدداً استخراج گردید. سپس عصاره به دست آمده در سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۱ ساعت با سرعت ده هزار دور در دقیقه قرار گرفته و عصاره‌گیری گردید. هر دو سوپرناتانت به دست آمده در NaCl ۰/۹ مولار به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس به NaCl برای به دست آمدن یک غلظت نهایی از ۲/۶ مولار در ۰/۰۵ تریس با pH: 7 (هیدروکسی متیل آمینومتان) اضافه شد و ۳۰ دقیقه استیرر گردید. رسوب حاصل به وسیله سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۴۵ دقیقه با سرعت ده هزار دور دقیقه جمع‌آوری گردید. رسوب به دست آمده به مدت ۶ ساعت در اسید استیک ۰/۵ مولار حل شد و سپس به مدت ۴۸ ساعت در اسید استیک ۰/۱ مولار دیالیز (D117, D116) گردید و نهایتاً برای ۷۲ ساعت در آب مقطر سرد دیالیز گردید. هر ۶ ساعت آب دیالیز تعویض شد تا زمانی که به pH خنثی برسد. رسوب دیالیز شده به وسیله فریزدرایر در دمای منفی ۵۵ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵P به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید و به عنوان کلاژن محلول در اسید معرفی گردید (۱۹).

عملکرد و بازده کلاژن استخراجی: میزان کلاژن محلول در اسید بر اساس وزن خشک ماده اولیه محاسبه شد (۳۷).

$$\text{Yield \%} = \frac{\text{Weight of lyophilized collagen (g)}}{\text{Weight of initial dry skin}} \times 100$$

در تمامی تست‌ها، نمونه‌ها به صورت سه تایی در هر دسته مورد بررسی قرار گرفت.

اسپکتروفتومتری UV: جذب اتمی UV کلاژن در محدوده طول موج ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Unico مدل uv4802 انجام شد. کلاژن خالص در اسید استیک ۰/۵ مولار حل گردید. برای به دست آوردن غلظت مناسب ۰/۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر حل شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول در ۸۰۰ میکرولیتر از اسید استیک ۰/۵ مولار حل گردید. سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول همگن شده را داخل ظرف کووت (Cuvette) ریخته و برای تعیین طول موج جذب در دستگاه قرار داده شد (۶).

آزمون SDS-PAGE: برای انجام این آزمون از ژل پلی‌آکریل‌آمید ۳۰/۸ درصد استفاده گردید. در این مرحله از ژل پائین ۸٪ و از ژل بالای ۳/۵٪ استفاده شد. کلاژن ماهی هوور در اسیداستیک ۴٪ حل شده و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش ۹۵ درجه سانتیگراد گذاشته شدند و سپس نمونه‌ها به همراه مارکر پروتئین بر روی ژل و درون چاهک‌ها منتقل گردیدند (۳۸). نهایتاً با ولتاژ ۱۲۰ ولت به مدت ۳ ساعت الکتروفورز انجام شد. بعد از الکتروفورز، ژل با کوماسی آبی ۰/۱ درصد (وزن/حجم) در متانول ۵۰٪ با نسبت (حجم/حجم) و اسید استیک ۱۰ درصد با نسبت (حجم/حجم) و آب مقطر ۴۰٪ (حجم/حجم) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید. سپس ژل را برای از بین بردن رنگ‌های اضافی با محلول رنگبر شامل متانول ۱۰٪ (حجم/حجم) و اسید گلاسیال ۱۰ درصد با نسبت (حجم/حجم) و آب مقطر ۸۰ درصد (حجم/حجم) به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر، رنگ‌بری صورت پذیرفت.

طیف سنجی مادون قرمز FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy): یکی از تکنیک‌های مورد استفاده برای تعیین ساختار ثانویه پلی‌پپتید و پروتئین‌ها است. این تکنیک طیف‌سنجی، دارای قابلیت عدم تخریب نمونه می‌باشد. در این روش، گروه‌های عاملی موجود در ترکیبات

مختلف قدرت جذب متفاوت اشعه مادون قرمز با طول موج مختلف را دارا می‌باشند. اطلاعات طیف بینی مادون قرمز تحت عنوان ارتعاشات واحد ساختاری گروه‌های عاملی نمودار می‌شوند. باندهای آمید I و آمید II از باندهای غالب در ساختار پروتئین و پلی‌پپتید می‌باشند. حساس‌ترین ناحیه در طیف باند آمیدی I با عدد موج  $1700-1600 \text{ cm}^{-1}$  است که متعلق به ارتعاشات کششی پیوند  $\text{O}=\text{C}$  در اتصالات پپتیدی پلی‌پپتید یا پروتئین می‌باشد. در مقایسه با آن باندهای آمید II متعلق به ارتعاشات پیوند  $\text{C}-\text{N}$  می‌باشد (۳۹،۶). به منظور بررسی طیف‌سنجی مادون قرمز، تست FTIR بر اساس روش زو و همکاران (۴۰) انجام گرفت. طیف‌های FTIR در رزولوشن ۴ سانتی‌متر در محدوده  $4000-550$  سانتی‌متر در دمای اتاق مورد بررسی قرار گرفت. در این رابطه، قرص‌های  $\text{KBr}$  شامل ۲ میلی‌گرم نمونه در حدود ۱۰۰ میلی‌گرم برامید پتاسیم تهیه گردید. سپس قرص‌های حاصله در سل مخصوص دستگاه FTIR (مدل Perkin Elmer Spectrum Two مدل LS55) قرار داده شد و با استفاده از نرم‌افزار OPUS آنالیزهای مربوطه انجام شده و طیف مربوطه تهیه گردید.

#### تجزیه و تحلیل اسیدهای آمینه

برای تجزیه و تحلیل اسیدهای آمینه از روش Pico. Tag استفاده گردید (۶). با کمک این روش مشتق اسید آمینه phenylthiocarbonyl و تعیین مشتقی از اسیدهای آمینه با استفاده از فنیل ایزوتیوسیانات و فاز معکوس با کارایی بالای کروماتوگرافی مایع به ترتیب انجام گردید. در ابتدا کلاژن خشک جداسازی شده از پوست ماهی به میزان ۲۰-۱۰ میلی‌گرم در اسیدکلریدریک ۶ مولار حاوی ۱٪ فنول (v/v) حل گردید. سپس مخلوط تهیه شده در معرض گاز  $\text{N}_2$  قرار گرفت و قبل از هیدرولیز در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد برای یک شبانه روز، وکیوم گردید. بعد از هیدرولیز، نمونه‌ها خشک شدند و با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شدند. ۲۵ میکرولیتر از پروتئین خشک و مشتق‌گیری شدند یعنی ۱۰ میکرولیتر از مخلوط متانول، آب و تری‌متیل‌آمین با نسبت‌های ۱:۲:۲ اضافه شد. نمونه مخلوط گردید و سپس برای ۵ دقیقه خشک شد. پس از آن ۲۰ میکرولیتر از متانول، آب، تری‌متیل‌آمین و فنیل‌ایزوتیوسیانات با نسبت‌های ۱:۱:۱:۷ به آن اضافه گردید.

مهم به تعداد تیروزین و باقیمانده‌های تریپتوفان در پروتئین‌ها ارتباط دارد. اسپکتروفتومتری UV حداکثر جذب را در ۲۳۵ نانومتر نشان داد که این می‌تواند مربوط به گروه‌های CONH<sub>2</sub>، COOH- و C=O در زنجیره پلی‌پپتیدهای کلاژن باشد (تصویر ۲).

آزمون SDS-PAGE: کلاژن استخراج شده از پوست ماهی هور دم‌دراز به وسیله آزمون SDS-PAGE امتحان شد. نتایج حاصل از آزمون SDS-PAGE نشان داد که کلاژن ماهی هور دم‌دراز از دو زنجیره  $\alpha$  ( $\alpha 1$  و  $\alpha 2$ ) و  $\beta$  تشکیل شده است. همچنین نتیجه حاصل از این آزمون نشان داد که وزن مولکولی  $\alpha 1$  حدود ۱۳۵ کیلو دالتون و وزن مولکولی  $\alpha 2$  حدود ۱۲۵ کیلو دالتون است. (تصویر ۳).

**FTIR**: طیف FTIR در محدوده ۴۰۰۰-۵۵۰ در کلاژن محلول در اسید از ماهی هور دم‌دراز در تصویر ۴ ارائه شده است. گروه آمید A مربوط به فرکانس کشش N-H است. ارتعاش کششی آزاد N-H همراه با پیوند هیدروژن در محدوده  $3300-3440 \text{ cm}^{-1}$  اتفاق می‌افتد. باند آمید A در ۳۳۰۰ مشاهده شده است. گروه آمید B باند در ۲۹۲۹ در ارتباط با کشش نامتقارن از CH<sub>2</sub> مشخص شد. اوج جذب آمید I در ۱۶۳۳ مشاهده شده است که در ارتباط با ارتعاش کششی C=O از باند پیوند هیدروژن جفت شده با COO می‌باشد که به ساختار دوم پروتئین مربوط است. این ناحیه حساس به تغییرات ساختار ثانویه پروتئین است و اغلب برای تجزیه و تحلیل ساختار ثانویه پروتئین استفاده می‌شود. باند آمید II در ۱۵۳۹ پیدا شد و همچنین پیک باند آمید III در ۱۲۳۸ جذب گردیده که این باندها ساختار ماریپیچی را نشان می‌دهند. طیف‌های مادون قرمز ثبت شده برای فیلم‌های نازک ساخته شده از کلاژن ماهی هور باند‌های متداول برای کلاژن نوع I آمید A، آمید B، آمید I، آمید II و آمید III نشان داد. ویژگی آمید A معمولاً با ارتعاش کششی N-H مربوط است که در محدوده  $3300-3440 \text{ cm}^{-1}$  رخ می‌دهد. ماکزیمم پیک جذب شده از کلاژن ماهی هور در ۳۳۰۰ به دست آمده است. هنگامی که گروه N-H از یک پپتید شامل یک پیوند هیدروژنی باشد موقعیت، شروع به تغییر جهت به فرکانس‌های پائین می‌کند. تعداد موج‌های مشخصه جذب شده در پیوند آمید I

نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق حدود ۲۰ الی ۲۵ درجه سانتی‌گراد زیر وکیوم خشک گردید و سپس در ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات با pH=۴/۷ حل شده و سپس با فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر گردید. در پایان ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های فیلتر شده با استفاده از (Millipore) (WISPTM) loader (Corporation, Milford, MA, USA) اتوماتیک به داخل ستون Pico.Tag برای آنالیز آمینو اسید تزریق شدند.

**کشت سلولی و تجزیه و تحلیل نتایج کشت:** با استفاده از سلول‌های فیروبلاست انسانی اهدایی مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، در شرایط استاندارد کشت سلولی (۴۱) و با استفاده از محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) (محتوی FBS (fetal bovine serum) ۱۰ درصد در انکوباتور استاندارد کشت سلولی (درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO<sub>2</sub> پنج درصد)، مقایسه میزان تکثیر سلولی بین نمونه‌های کشت کنترل (سه نمونه) و کشت بر کلاژن ماهی هور دم‌دراز (سه نمونه) انجام و نتایج با کمک میکروسکوپ نوری و تکنسین با تجربه در کشت سلولی مقایسه گردید. محیط کشت هر ۲ تا ۳ روز تعویض شده و در دوره‌های مختلف زمانی نمونه‌ها فیکس شده و پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین، مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت.

### ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تایید شده است (کد اخلاق IR.SSU.REC.1397.86).

### نتایج

کلاژن از پوست ماهی هور دم‌دراز به روش ناگایی (۱۹) با اندکی تغییرات استخراج گردید. ارزیابی و میزان کلاژن استخراج شده از پوست ماهی هور دم‌دراز ۱۷/۳٪ بود. اسپکتروفتومتری UV: اسپکتروفتومتری کلاژن پوست ماهی هور دم‌دراز انجام شد (تصویر ۲). میزان جذب UV کلاژن محلول در اسید (ASC) در طول موج ۲۰۰-۳۵۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. بیشتر پروتئین‌ها حداکثر جذب اشعه ماورای بنفش در طول موج ۲۸۰ نانومتر دارند که این

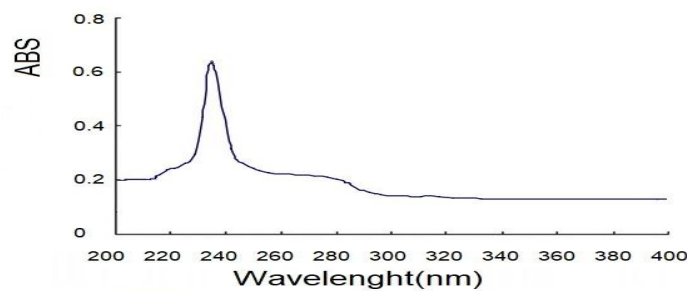


آمینو پرولین به عنوان یک اسیدآمینو منحصر به فرد در ASC می‌باشد که دارای مقدار مشخصی ۹۷/۲ باقی مانده بر ۱۰۰۰ می‌باشد. آلانین، گلوتامات، آرژینین و پرولین بیشترین میزان از اسیدهای آمینه را تشکیل می‌دهند که می‌تواند به عنوان مشخصات کلاژن به‌دست آمده در این مطالعه باشند. در کلاژن استخراج شده سیستم وجود نداشت و آمینو اسیدهای متیونین، تیروزین و هیستیدین کمترین میزان را دارا بودند. مجموع ایمونواسیدها (پرولین و هیدروکسی پرولین) نیز ۱۷۳ باقی مانده در ۱۰۰۰ بود.

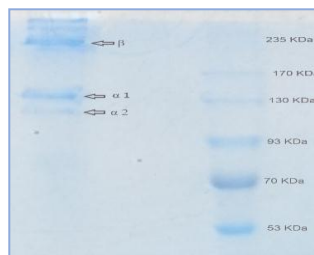
کشت سلول‌های فیبروبلاست: سلول‌های فیبروبلاست بر روی کلاژن جداسازی شده از ماهی هوور کشت داده شدند. اتصال سلولی و تکثیر سلولی زیاد سلول بر روی کلاژن ماهی (تصویر ۵)، نشان دهنده مناسب بودن کلاژن ماهی هوور برای رشد سلولی و استفاده در مهندسی بافت، یا زیست سازگاری می‌باشد. سلول‌ها به‌خوبی به سطح کلاژن متصل شده و پس از گسترش، شروع به تکثیر کردند. تا زمان تعویض مناسب محیط کشت و تامین فضای رشد، فیبروبلاست‌ها با سرعت و کیفیت مناسبی به رشد و تکثیر ادامه دادند.

جذب معمولاً در محدوده  $1800 - 1620 \text{ cm}^{-1}$  می‌باشد که به‌وسیله ارتعاش کششی از C=O در پلی‌پپتید پروتئین تولید می‌شود. این ناحیه به تغییرات دوم ساختار پروتئین حساس است و اغلب برای آنالیز ساختار دوم پروتئین استفاده می‌گردد. پیک جذبی امید I در ۱۶۳۳ به‌دست آمد. خم شدن N-H همراه با کشش C-N در محدوده ۱۶۵۰-۱۵۹۰ رخ می‌دهد و مربوط به باند امید II می‌باشد که در ۱۵۳۹ ملاحظه شد. پیک امید III در محدوده ۱۴۰۰-۱۲۰۰ در کمپلکس با عکس‌العمل‌های داخلی در کلاژن است که شامل ترکیباتی از C-N کششی و N-H در سطح همواری در ارتباط با امید و همچنین جذب‌های ارتعاشی ناشی از تکان CH<sub>2</sub> می‌باشد. طیف‌های مادون قرمز برای پروتئین استخراج شده از پوست ماهی هوور به صورت مشخص استخراج کلاژن را تأیید می‌کند.

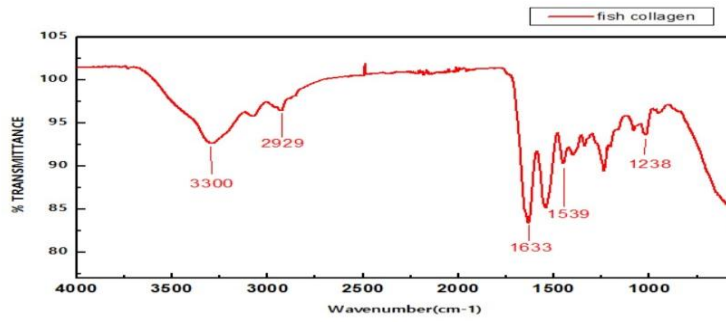
ترکیب اسیدهای آمینه کلاژن ماهی هوور دم‌دراز: ترکیب اسیدهای آمینه کلاژن ماهی هوور دم‌دراز بر اساس باقی مانده (residue) در ۱۰۰۰ در جدول ۱ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل اسیدآمینو مقدار بسیار بالایی از گلیسین را در کلاژن استخراج شده از پوست ماهی هوور نشان داد که حدود یک سوم از کل اسیدهای آمینه را شامل می‌شود. همچنین اسید



تصویر ۲: اسپکتروفتومتری UV کلاژن پوست ماهی هوور دم‌دراز (*Thunnus tonggol*)



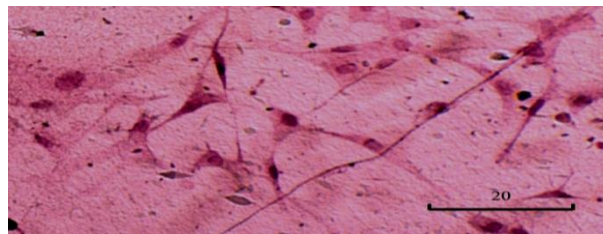
تصویر ۳: الگوی الکتروفورز (SDS-PAGE) کلاژن از پوست ماهی هوور دم‌دراز (*Thunnus tonggol*)



تصویر ۴: طیف FTIR کلاژن محلول در اسید از پوست ماهی هوور در بازه  $(\text{cm}^{-1})$  ۴۰۰۰-۵۵۰

جدول ۱: ترکیب اسیدهای آمینه در پوست ماهی هوور دم‌دراز به صورت میزان اسید آمینه در ۱۰۰۰ قسمت رسوب

آمینو اسید	میزان
Hydroxyproline	۶۹
Asparagine	۶۲
Threonine	۲۱
Serine	۲۷
Glutamine	۸۵
Proline	۱۰۴
Glycine	۳۰۹
Alanine	۹۵
Valine	۲۲
Methionine	۱۵
Isoleucine	۱۸
Leucin	۲۸
Tyrosine	۴
Phenylalanine	۲۱
Histidine	۹
Hydroxylysine	۶
Lysine	۳۲
Arginine	۷۳
Cystine	۰
<b>Total</b>	<b>۱۰۰۰</b>
Imino acids	۱۷۳



تصویر ۵: رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست انسانی بر روی کلاژن ماهی هوور با رنگ آمیزی H&E (اسکیل برابر ۲۰ میکرومتر).



## بحث

میزان کلاژن جداسازی شده از پوست ماهی هوور دم‌دراز به مقدار ۱۷/۳ درصد بود که این میزان بیشتر از میزان کلاژن حاصل از پوست ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*) به میزان ۱۴/۵ درصد و پوست ماهی سفید (*Rutilus kutum*) به میزان ۱۵/۶ درصد (۶) و پوست ماهی *Brown stripe red snapper* به میزان ۹ درصد (۴۲)، *Sea, Dusky spinefoot*، *Yanti* و *Red stingery*، *Eagle ray*، *chu* و *Balloon fish* (۱۰) و ۵/۵ درصد (۴۳)، کیسه‌شنای *Yellowfin tuna* به میزان ۱/۰۷ درصد (۳۰) و از طرف دیگر کمتر از کلاژن ماهی *Malaysian catfish* به میزان ۱۸/۱۱ درصد (۴۲)، ماهی هوکی (*BlueGrenadier*) به میزان ۲۰ درصد و ماهی *Japanese sea-bass* به میزان ۵۱/۴ درصد و ماهی *Chub mackerel* به میزان ۴۹/۸ درصد و ماهی *Bullhead shark* به میزان ۵۰/۱ درصد و *Ocellate puffer fish* به میزان ۴۴/۷ درصد بود (۸). در این تحقیق طول موج جذب شده کلاژن ماهی هوور در ۲۳۵ نانومتر مشاهده گردید (تصویر ۲) که میزان آن با جذب کلاژن سایر ماهیان مانند: *Black Northern pike*، *Scomberomorus guttatus*، *Ictalurus* و *Walleye pollock*، *Balloon fish*، *pomfret* و *punctatus* و *Sphyrna lewin* نزدیک بود (۴۷-۴۳، ۱۰، ۱). اکثریت پروتئین‌ها بیشترین میزان جذب فرابنفش را در طول موج ۲۸۰ نانومتر دارا می‌باشند. فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین باندهای جذبی بین ۲۹۰-۲۵۰ نانومتر دارند (۴۸، ۴۷، ۲۳، ۱). به طور کلی، تیروزین و فنیل آلانین کروموفورهای حساسی هستند و نور UV ماوراء بنفش را در ۲۸۳ نانومتر و ۲۵۱ نانومتر جذب می‌کنند (۴۶، ۲۳). فنیل آلانین و تیروزین دارای باندهای جذبی بین ۲۵۰ و ۲۹۰ نانومتر هستند، در حالیکه کلاژن در این منطقه جذب آشکاری ندارد. جذب مجزا از کلاژن پوست ماهی هوور در نزدیکی ۲۳۵ نانومتر به دست آمد که میزان آن کمتر از ۲۸۰ نانومتر است و از خاصیت کلاژن حمایت می‌کند و در نتیجه پروتئین جداسازی شده کلاژن است. کلاژن جداسازی شده از پوست این ماهی با استفاده از روش الکتروفورز مورد بررسی قرارگرفت (تصویر ۳). الگوی الکتروفورز حاصل از کلاژن پوست ماهی نشان داد کلاژن حاصل از پوست ماهی به

عنوان یک پلیمر طبیعی از دو زنجیره متفاوت  $\alpha$  (۱۵ و ۲۵) تشکیل گردیده است. با توجه به این موضوع موقعیت ارتعاشی الکتروفورز آلفا ۱ متفاوت از آلفا ۲ می‌باشد و زنجیره آلفا ۱ دارای فضای ارتعاشی بیشتری بوده که نشان دهنده این است که وزن ملکولی آلفا ۲ از آلفا ۱ کمتر است. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه با یافته‌های سایر محققین مشابهت داشت (۵۴-۴۹، ۱، ۶، ۲۰، ۴۴، ۴۶). بررسی الگوی الکتروفورز کلاژن استخراجی از ماهی هوور دم‌دراز نشان‌دهنده عدم حضور پیوندهای دی‌سولفید در آن کلاژن است. به طور کلی کلاژن نوع I محتوی مقادیر کمتری از سیستئین (کمتر ۰/۲ درصد) و متیونین (۱/۳۳-۱/۲۴ درصد) می‌باشد که نقش اساسی را در تشکیل باندهای دی‌سولفید ایفا می‌نمایند. البته کلاژن‌های نوع III و VI محتوی مقادیری سیستئین قابل اکسید شدن خواهند بود (۵۵). در نتیجه بر اساس تجزیه و تحلیل انجام شده بر روی الگوهای الکتروفورز و ترکیبات واحدهای تشکیل دهنده می‌توان اعلام کرد که کلاژن پوست ماهی هوور از نوع کلاژن نوع I و به عنوان پروتئین اصلی آن می‌باشد و با مطالعات سایر محققین که نشان داده بخش اعظم کلاژن پوست کلاژن نوع I است در یک راستا می‌باشد (۶۰-۵۶، ۳، ۴، ۳، ۵۰). طیف مادون قرمز مشخصه هر مولکول است و گروه‌های خاصی از اتم‌ها باعث ایجاد باندهایی می‌شوند که صرف نظر از ساختار مولکول نزدیک به ۱ و در همان فرکانس وجود دارد. دقیقاً وجود این گروه‌های مشخص است که امکان دستیابی به اطلاعات ساختاری مفید را فراهم می‌کند. برای گروه‌های مختلف شیمیایی، طول موج جذب شده از ارتعاشات منحصر به فرد است و به نوع پیوند موجود (C=C، C-H، C=O، N-H) بستگی دارد (۶۱). مادون قرمز میانی (عدد موج ۴۰۰۰ تا ۴۰۰ سانتی‌متر در منفی ۱) محدوده‌ای است که بیشترین کاربرد را برای توصیف ترکیبات آلی دارد. تصویر ۴ طیف FTIR کلاژن محلول در اسید از پوست ماهی هوور در بازه ۴۰۰۰-۵۵۰ سانتی‌متر را نشان می‌دهد که مشابه و نزدیک به مطالعات سایر محققین بر روی کلاژن سایر انواع ماهی است (۶۳-۴۵، ۶، ۵۳، ۴۷، ۶۱). فرکانس کششی N-H با باند گروه امید A در ارتباط می‌باشد. باندهای یافت شده مربوط به ارتعاش کششی آزاد N-H و O-H و در محدوده ۳۴۰۰-۳۱۰۰ رخ

اسیدهای آمینه را دارا است. میزان گلیسین موجود در کلاژن پوست ماهی هوور نسبت به گلیسین سایر ماهیان Turbot (۳۳)، Salmon، African catfish و Baltic cod (۵۲) و Seabass، Bighead Carp و ماهی Japonica Nibea (۷) و Albacore Tuna (۶۵)، cuttle fish (۹) کمتر بوده است ولی نسبت به گلیسین ماهیان *Scomberomorus gttatus* و Catla catla and Cirrhinus mrigala (۶)، *Rutilus kutum* (۱۲)، Nile perch (۶۶) channel catfish (۴۷) و yellowfin tuna (۳۰) بیشتر بوده است و اما با نتایج سایر محققین، Sail fish (۶۷)، Dog Shark (۶۵) و Sea urchin (۶۸)، Minke whale (۵۹)، Silver Carp (۱۴) مشابهت داشت. Yan و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کرده‌اند که محتوای هیدروکسی پرولین پوست ماهی Walleye pollock به مقدار ۶۹ در ۱۰۰۰ باقی مانده است که مقدار آن با هیدروکسی پرولینی که در پژوهش کنونی از پوست ماهی هوور دم‌دراز به‌دست آمده است (۶۹ باقی‌مانده) مشابه می‌باشد. آلانین، گلوتامین، آرژنین و پرولین بیشترین میزان از اسیدهای آمینه را دارا می‌باشند که می‌تواند به عنوان یافته‌ها و مشخصات کلاژن در این مطالعه باشند. در کلاژن استخراج شده از پوست ماهی هوور، بر خلاف گونه Bighead Carp (۰/۲) و Pacific cod (۲) و Turbot skin (۴/۷) (۳۳) آمینو اسید سیستئین وجود نداشت. سیستئین به طور عمده نه در منابع آب شیرین و نه منابع دریایی شناسایی نشده است (۴۸) که نتیجه این تحقیق مشابه نتایج سایر محققین بر روی گونه‌های *Scomberomorus guttatus*، *Nibea Japonica*، *Seabass*، *Rohu*، *Dog Shark*، *Albacore Tuna*، *Rutilus Kutum*، *Pollock walleye* (۶،۷،۵۳،۵۴) می‌باشد. آمینواسیدهای هیدروکسی لایزین و تیروزین و هیستیدین کمترین میزان را در کلاژن دارا بودند. میزان ایزولوسین به‌دست آمده در کلاژن ماهی هوور پائین بود که میزان آن با *Nibea Japonica*، *Bighead*، *Albacor tuna*، *Baltic cod* (۵۲) و *Salmon* (۷) *Carp* (۶۵) *Rohu* مشابهت داشت. ایمینواسیدها (پرولین و محتوای بالای ایمینواسیدها به ویژه محتوای هیدروکسی پرولین بسیار با اهمیت می‌باشد زیرا بر خواص عملکردی کلاژن و

می‌دهد و هنگامی که گروه NH یک پپتید در یک پیوند هیدروژن درگیر شود، موقعیت به فرکانس پایینتر معمولاً در نزدیکی ۳۳۰۰ منتقل می‌شود (۶۴،۵۳،۱). موقعیت باند امید A در این مطالعه در ۳۳۰۰ پیدا شد که نشان می‌دهد پیوندهای NH در پیوندهای هیدروژنی نقش دارند. باند امید B کلاژن استخراجی در ۲۹۲۹ مشاهده گردید که مربوط به کشش نامتقارن CH<sub>2</sub> می‌باشد. سه باند اصلی نشانه کلاژن نیز مشاهده گردید که موقعیت باند امید I در ۱۶۳۳ مشاهده گردید که مربوط به ساختار ثانویه پروتئین می‌باشد و در ارتباط با ارتعاش کششی C = O است. باند امید II در ۱۵۳۹ مشاهده شده و باند امید III در ۱۲۳۸ مشاهده شد که نشان دهنده ارتعاش کششی C = O، ارتعاشات خمشی N-H و کشش C-H است. باند امید I که با ساختار ثانویه پروتئین و باند امید III در ارتباط است وجود ساختار مارپیچ را نشان می‌دهد و این نتایج وجود ساختار مارپیچی کلاژن استخراجی از ماهی هوور را نشان می‌دهد (۶،۵۳،۵۷،۶۱). پروفایل اسید آمینه کلاژن پوست ماهی هوور در جدول ۱ نشان داده شده است که به‌صورت باقی‌مانده در هر ۱۰۰۰ قسمت باقی‌مانده بیان می‌شود. نتایج نشان داد فراوان‌ترین اسید آمینه در پوست ماهی هوور گلیسین (۳۰۹ باقی‌مانده) و به دنبال آن پرولین (۱۰۴ باقی‌مانده)، هیدروکسی پرولین (۶۹ باقی‌مانده)، آلانین (۹۵ باقی‌مانده) و اسید گلوتامیک (۸۵ باقی‌مانده) است. گلیسین، هیدروکسی پرولین و پرولین اسیدهای آمینه مشخص کلاژن هستند که نشان‌دهنده محتوای بالای کلاژن در پوست ماهی است و کاملاً مشهود است که در کلاژن نوع I گلیسین، آلانین، پرولین و هیدروکسی پرولین به وفور یافت می‌شود. کمترین اسیدهای آمینه شایع در پوست ماهی هوور، تیروزین، هیستیدین و هیدروکسی لایزین بودند که هر ۳ اسیدهای آمینه جزئی در کلاژن هستند. این نتایج نشان می‌دهد که پوست هوور منبع خوبی برای استخراج کلاژن نوع I است (۳۳،۷). به‌طور کلی گلیسین موجود نزدیک به یک سوم کل رسوب را به خود اختصاص داده است و به عنوان اسید آمینه اصلی در کلاژن می‌باشد و میزان آن در سایر پروتئین‌ها ناچیز است (۷). در مطالعه و بررسی اسید آمینه‌های کلاژن استحصال شده از ماهی هوور مقدار زیادی از گلیسین را نشان می‌دهد که محتوای گلیسین کلاژن از پوست به‌طور تقریبی حدود ۳۰٪ کل

روش محلول در اسید از این منابع به استثنای استفاده گاه به گاه آن‌ها در تهیه پودر ماهی که هدر می‌رود استفاده نمود. علاوه بر آن رشد مناسب و سریعتر سلول‌های فیبروبلاست بر روی کلاژن پوست ماهی، نشانه مناسب بودن این نوع کلاژن بعنوان یک منبع ارزان و در دسترس برای کشت انواع سلول و استفاده برای مهندسی بافت‌های انسانی می‌باشد، گرچه مهندسی بافت‌های انسانی راه درازی تا ساخت بافت‌های فعال و متناسب بیماران در پیش دارد. فراهم ساختن بهترین و مناسب‌ترین پیش‌سازهای بافت از جمله انواع کلاژن مناسب و در دسترس کمکی در راه رسیدن به این هدف ارزشمند است. با وجود فراوانی منابع دریائی، حفاظت از منابع طبیعی دریا هم باید در نظر باشد. در عین حال منابع فراوانی به‌عنوان محصولات مازاد دریایی در حال حاضر در دسترس می‌باشند که در راه اهداف عالی مهندسی بافت و درمان بیماران صعب‌العلاج کاربرد دارند. نتایج زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری سلولی و استفاده از این نوع کلاژن در مهندسی بافت در مقاله بعدی ارائه خواهد شد.

### سپاس‌گزاری

نویسندگان از مراکز تحقیقاتی پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد، خصوصاً همکاری مرکز تحقیقات بیولوژی سلول‌های بنیادی و مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی و مهندسی بافت کمال تشکر و قدردانی را دارند. این مطالعه ماحصل طرح تحقیقاتی شماره ۵۹۲۸ مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد. **حامی مالی:** این مطالعه با حمایت گرانت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی در پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت و با همکاری مالی و معنوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام گردیده است. **تعارض در منافع:** وجود ندارد.

هم‌چنین پایداری حرارتی کلاژن تاثیرگذار می‌باشد. مقادیر ایمینواسیدهای کلاژن از پوست ماهی هوور ۱۷۳ قسمت در ۱۰۰۰ قسمت رسوب بوده که با ماهی Balloon fish (۴۳) به میزان ۱۷۹ بسیار نزدیک بود اما نسبت به میزان ایمینواسیدهای کلاژن ماهیان Pacific cod به میزان ۱۵۷ (۳۴) و Sphyrna lewini به میزان ۱۴۱/۹ (۴۶) و Salmon و Boltic cod به ترتیب به میزان ۱۶۱ و ۱۵۶/۵ (۵۲) بیشتر بود اما نسبت به ماهی Turbot skin به میزان ۲۳۳ قسمت در ۱۰۰۰ قسمت باقی‌مانده (۳۳) کمتر بود و هم‌چنین از پوست پستاندارانی مانند خوک و گاو پایین‌تر می‌باشد (۵۳). گروهی از محققین گزارش نموده‌اند که کلاژن ماهی دارای مقادیر ایمینواسیدهای کمتری در مقایسه با کلاژن پستانداران بوده و میزان ایمینواسیدهای کلاژن‌های جانوری با زیستگاه آن‌ها ارتباط دارد (۶۹،۳۰،۲۰). رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست بر روی کلاژن ماهی به عنوان یک بایوپلیمر طبیعی نشان داد که کلاژن ماهی مانند کلاژن پستانداران می‌تواند به عنوان یک محیط برای نگهداری و کشت انواع سلول بوده و علاوه بر آن می‌تواند به عنوان جایگزین کلاژن خوک و گاو که عمده‌ترین منابع تولید کلاژن می‌باشند مورد استفاده قرار بگیرد که نتایج این پژوهش با نتایج سایر محققین در یک راستا بود (۷۰،۴۱).

### نتیجه‌گیری

میزان مناسبی کلاژن (ASC) با موفقیت از پوست ماهی هوور دم‌دراز جدا شد و توسط آزمایشات متفاوت و روش‌های مختلف تحلیلی تایید گردید و کلاژن حاصل به عنوان کلاژن نوع I تایید شده است. نتایج بیانگر آن است که می‌توان از این کلاژن با کمترین هزینه به عنوان یک جایگزین برای کلاژن حیوانی، در صنایع آرایشی، پزشکی و دارویی با موفقیت استفاده کرد. مطالعات نشان می‌دهد که ارزش غذایی پوست ماهی نسبتاً زیاد است و می‌توان از طریق پردازش ضایعات پوست ماهی به

## References:

- 1-Naderi Gharagheshlagh S, Nourani MR, Jamili S, Fatemi MJ, Sharifi AM. *Isolation and Characterization of acid-soluble Collagen from the Skin of Scomberomorus guttatus of Persian Gulf*. J of Applied Tissue Engineering 2018; 5(3).
- 2-Alves A, Marques A, Martins E, Silva T, Reis R. *Cosmetic Potential of Marine Fish Skin Collagen*. Cosmetics 2017; 4: 39.
- 3-Arumugam GKS, Sharma D, Balakrishnan RM, Ettiyappan JBP. *Extraction, Optimization and Characterization of Collagen From Sole Fish Skin*. Sustainable Chemistry and Pharmacy 2018; 9: 19-26.
- 4-Carvalho AM, Marques AP, Silva TH, Reis RL. *Evaluation of the Potential of Collagen from Codfish Skin as a Biomaterial for Biomedical Applications*. Mar Drugs 2018; 16(12): 495.
- 5- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, Osako K. *Type I Collagen from the Skin of Ornate Threadfin Bream (Nemipterus Hexodon): Characteristics and Effect of Pepsin Hydrolysis*. Food Chemistry 2011; 125(2): 500-7.
- 6- Naderi Gharagheshlagh S, Fatemi MJ, Jamili S, Sharifi AM, Nourani MR. *Isolation and Characterization of Acid-Soluble Collagen from the Skin of Rutilus Frisii Kutum (Kamensky) of the Caspian Sea*. Iranian Journal of Fisheries Sciences 2020; 19(2): 768-79.
- 7- Jafari H, Lista A, Siekapen MM, Ghaffari-Bohlouli P, Nie L, Alimoradi H, et al. *Fish Collagen: Extraction, Characterization, and Applications for Biomaterials Engineering*. Polymers 2020; 12(10): 2230.
- 8-Nagai T. *Collagen from Diamondback Squid (Thysanoteuthis Rhombus) Outer Skin*. Z Naturforsch C J Biosci 2004; 59(3-4): 271-5.
- 9-Nagai T, Yamashita E, Taniguchi K, Kanamori N, Suzuki N. *Isolation and Characterisation of Collagen from the Outer Skin Waste Material of Cuttlefish (Sepia Lycidas)*. Food Chemistry 2001; 72(4): 425-9.
- 10-Bae I, Osatomi K, Yoshida A, Osako K, Yamaguchi A, Hara K. *Biochemical Properties of Acid-Soluble Collagens Extracted from the Skins of Underutilised Fishes*. Food Chemistry 2008; 108(1): 49-54.
- 11-Bhagwat PK, Dandge PB. *Isolation, Characterization and Valorizable Applications of Fish Scale Collagen in Food and Agriculture Industries*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 2016; 7: 234-40.
- 12-Mahboob S. *Isolation and Characterization of Collagen from Fish Waste Material- Skin, Scales and Fins of Catla Catla and Cirrhinus Mrigala*. J Food Sci Technol 2015; 52(7): 4296-305.
- 13-Nagai T, Suzuki N. *Isolation of Collagen from Fish Waste Material — Skin, Bone and Fins*. Food Chemistry 2000; 68(3): 277-81.
- 14-Safandowska M, Pietrucha K. *Effect of Fish Collagen Modification on Its Thermal and Rheological Properties*. Int J Biol Macromol 2013; 53: 32-7.
- 15-Sionkowska A, Kozłowska J, editors. *Fish Scales as a Biocomposite of Collagen and Calcium Salts*. Key Engineering Materials 2014: 185-90.

- 16-Venkatesan J, Anil S, Kim SK, Shim MS. *Marine Fish Proteins and Peptides for Cosmeceuticals: A Review*. Mar Drugs 2017; 15(5): 143.
- 17-Yamada S, Yamamoto K, Ikeda T, Yanagiguchi K, Hayashi Y. *Potency of Fish Collagen as a Scaffold for Regenerative Medicine*. Biomed Res Int 2014; 2014: 302932.
- 18-European Food Safety A. *The European Union Summary Report on Surveillance for the Presence of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE) in 2019*. EFSA J 2020; 18(11): e06303.
- 19-Nagai T, Saito M, Tanoue Y, Kai N, Suzuki N. *Characterization of Collagen from Sakhalin Taimen Skin as Useful Biomass*. Food Technol Biotechnol 2020; 58(4): 445-54.
- 20- Nazeer RA, Kavitha R, Ganesh RJ, Naqash SY, Kumar NS, Ranjith R. *Detection of collagen through FTIR and HPLC from the body and foot of Donax cuneatus Linnaeus, 1758*. J Food Sci Technol 2014; 51(4): 750-5.
- 21-Beishenaliev A, Lim SS, Tshai KY, Khiew PS, Moh'd Sghayyar HN, Loh HS. *Fabrication and Preliminary in Vitro Evaluation of Ultraviolet-Crosslinked Electrospun Fish Scale Gelatin Nanofibrous Scaffolds*. J Mater Sci Mater Med 2019; 30(6): 62.
- 22-Dayton MT. *Porcine and Bovine Surgical Products: Jewish, Muslim, and Hindu Perspectives-Invited Critique*. Arch Surg 2008; 143(4): 370.
- 23-Fu W, Liu Z, Feng B, Hu R, He X, Wang H, et al. *Electrospun Gelatin/PCL and Collagen/PLCL Scaffolds for Vascular Tissue Engineering*. Int J Nanomedicine 2014; 9: 2335-44.
- 24-Lin P, Hua N, Hsu YC, Kan KW, Chen JH, Lin YH, et al. *Oral Collagen Drink for Antiaging: Antioxidation, Facilitation of the Increase of Collagen Synthesis, and Improvement of Protein Folding and DNA Repair in Human Skin Fibroblasts*. Oxid Med Cell Longev 2020; 2020: 1-9.
- 25-Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, Osako K. *Partial Characterization of Collagen from Pharaoh Cuttlefish (Sepia Pharaonis) Skin*. International Conference on Nutrition and Food Sciences 2012; 39: 47-51.
- 26-Nomura Y. *Properties and Utilization of Shark Collagen*. Developments in Food Science 2004; 42: 147-58.
- 27-Aewsiri T, Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M. *Chemical Compositions and Functional Properties of Gelatin from Pre-Cooked Tuna Fin*. International J Food Science & Technology 2008; 43(4): 685-93.
- 28-Claverie M, McReynolds C, Petitpas A, Thomas M, Fernandes SCM. *Marine-Derived Polymeric Materials and Biomimetics: An Overview*. Polymers 2020; 12(5): 1002.
- 29-Ge B, Wang H, Li J, Liu H, Yin Y, Zhang N, et al. *Comprehensive Assessment of Nile Tilapia Skin (Oreochromis niloticus) Collagen Hydrogels for Wound Dressings*. Mar Drugs 2020; 18(4): 178
- 30-Kaewdang O, Benjakul S, Kaewmanee T, Kishimura H. *Characteristics of Collagens from the Swim Bladders of Yellowfin Tuna (Thunnus Albacares)*. Food Chem 2014; 155: 264-70.
- 31-Li Y, Wang B, Li B. *The in Vitro Bioavailability of Anti-Platelet Peptides in Collagen Hydrolysate from Silver Carp (Hypophthalmichthys Molitrix) Skin*. J Food Biochem 2020; 44(6): e13226.



- 32-Lim YS, Ok YJ, Hwang SY, Kwak JY, Yoon S. *Marine Collagen as A Promising Biomaterial for Biomedical Applications*. Mar Drugs 2019; 17(8): 467.
- 33-Sun J, Zhang J, Zhao D, Xue C, Liu Z, Mao X. *Characterization of Turbot (Scophthalmus maximus) Skin and the Extracted Acid-Soluble Collagen*. Journal of Ocean University of China 2019; 18(3): 687-92.
- 34-Sun L, Li B, Song W, Si L, Hou H. *Characterization of Pacific Cod (Gadus Macrocephalus) Skin Collagen and Fabrication of Collagen Sponge as a Good Biocompatible Biomedical Material*. Process Biochemistry 2017; 63: 229-35.
- 35-Zhou H, Chen R, Wang J, Lu J, Yu T, Wu X, et al. *Biphasic Fish Collagen Scaffold for Osteochondral Regeneration*. Materials & Design 2020; 197: 108947.
- 36-Sistani MA, Adeli A, Mira SA. *A Value Chain Analysis on Tuna and Tuna-Like Species in Iran*. Iranian Journal of Fisheries Sciences 2021; 20(1): 195-208.
- 37-Radhika Rajasree SR, Gobalakrishnan M, Aranganathan L, Karthih MG. *Fabrication and Characterization of Chitosan Based Collagen/Gelatin Composite Scaffolds from Big Eye Snapper Priacanthus Hamrur Skin for Antimicrobial and Anti Oxidant Applications*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2020; 107: 110270.
- 38-Laemmli UK. *Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. Nature 1970; 227(5259): 680-5.
- 39-Kong J, Yu S. *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2007; 39(8): 549-59.
- 40-Xu R, Chen Y, Wan D, Wang J. *Identification of Four Sedum Plant Medicines by Fourier Transform Infrared Spectra*. Pharmacogn Mag 2012; 8(30): 107-10.
- 41-Li Q, Mu L, Zhang F, Sun Y, Chen Q, Xie C, et al. *A Novel Fish Collagen Scaffold as Dural Substitute*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2017; 80: 346-51.
- 42-Kiew PL, Mashitah MD. *Isolation and characterization of collagen from the skin of Malaysian catfish (Hybrid Clarias sp.)*. J Korean Soc Appl Biol Chem 2013; 56(4): 441-50.
- 43-Huang Y-R, Shiau C-Y, Chen H-H, Huang B-C. *Isolation And Characterization of Acid and Pepsin-Solubilized Collagens from the Skin of Balloon Fish (Diodon Holocanthus)*. Food Hydrocolloids 2011; 25(6): 1507-13.
- 44-Adibzadeh N, Aminzadeh S, Jamili S, Karkhane AA, Farrokhi N. *Purification and Characterization of Pepsin-Solubilized Collagen from Skin of Sea Cucumber Holothuria Parva*. Appl Biochem Biotechnol 2014; 173(1): 143-54.
- 45-Kozłowska J, Sionkowska A, Skopinska-Wisniewska J, Piechowicz K. *Northern Pike (Esox Lucius) Collagen: Extraction, Characterization and Potential Application*. Int J Biol Macromol 2015; 81: 220-7.
- 46-Lin YK, Liu DC. *Comparison of Physical-Chemical Properties of Type I Collagen from Different Species*. Food Chemistry 2006; 99(2): 244-51.
- 47-Liu H, Li D, Guo S. *Studies on Collagen from the Skin of Channel Catfish (Ictalurus Punctatus)*. Food Chemistry 2007; 101(2): 621-5.



- 48-Zhang F, Wang A, Li Z, He S, Shao L. *Preparation and Characterisation of Collagen from Freshwater Fish Scales*. Food and Nutrition Sciences 2011; 2(8): 818-23.
- 49-AlizadehNodeh M, Moradi Z, Nourani MRJJoATE. *Isolation and Purification of Collagen From the Skin of Black Pomfret (Parastromateus Niger) for Tissue Engineering Purpose*. J of Applied Tissue Engineering 2014; 1(1): 18-21.
- 50-Jeong H-S, Venkatesan J, Kim S-K. *Isolation and Characterization of Collagen from Marine Fish (Thunnus Obesus)*. Biotechnology and Bioprocess Engineering 2014; 18(6): 1185-91.
- 51-Liu D, Zhang X, Li T, Yang H, Zhang H, Regenstein JM, et al. *Extraction and Characterization of Acid- and Pepsin-Soluble Collagens from the Scales, Skins and Swim-Bladders of Grass Carp (Ctenopharyngodon Idella)*. Food Bioscience 2015; 9: 68-74.
- 52-Tylingo R, Mania S. *Isolation and Characterization of Acid Soluble Collagen from the Skin of African Catfish (Clarias gariepinus), Salmon (Salmo salar) and Baltic Cod (Gadus morhua)*. J Biotechnol Biomater 2016; 6(2): 1-6.
- 53-Yan M, Li B, Zhao X, Ren G, Zhuang Y, Hou H, et al. *Characterization of Acid-Soluble Collagen from the Skin of Walleye Pollock (Theragra Chalcogramma)*. Food Chemistry 2008; 107(4): 1581-6.
- 54-Zhang J, Duan R, Tian Y, Konno K. *Characterisation of Acid-Soluble Collagen from Skin of Silver Carp (Hypophthalmichthys Molitrix)*. Food Chemistry 2009; 116(1): 318-22.
- 55-Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. *Characterisation of Acid-Soluble Collagen from Skin and Bone of Bigeye Snapper (Priacanthus Tayenus)*. Food Chemistry 2005; 89(3): 363-72.
- 56-Fatemi MJ, Garahgheshlagh SN, Ghadimi T, Jamili S, Nourani MR, Sharifi AM, et al. *Investigating the Impact of Collagen-Chitosan Derived From Scomberomorus Guttatus and Shrimp Skin on Second-Degree Burn in Rats Model*. Regen Ther 2021; 18: 12-20.
- 57-Krishnamoorthi J, Ramasamy P, Shanmugam V, Shanmugam A. *Isolation and Partial Characterization of Collagen from Outer Skin of Sepia Pharaonis (Ehrenberg, 1831) from Puducherry Coast*. Biochem Biophys Rep 2017; 10: 39-45.
- 58-Muralidharan N, Jeya Shakila R, Sukumar D, Jeyasekaran G. *Skin, Bone and Muscle Collagen Extraction from the Trash Fish, Leather Jacket (Odonus Niger) and their Characterization*. J Food Sci Technol 2013; 50(6): 1106-13.
- 59-Nagai T, Suzuki N, Nagashima T. *Collagen from Common Minke Whale (Balaenoptera Acutorostrata) Unesu*. Food Chem 2008; 111(2): 296-301.
- 60-Yan M, Qin S, Li J. *Study on the Self-Assembly Property of Type I Collagen Prepared from Tilapia (Oreochromis Niloticus) Skin by Different Extraction Methods*. International Journal of Food Science & Technology 2015; 50(9): 2088-96.
- 61-Silva Junior ZS, Botta SB, Ana PA, Franca CM, Fernandes KP, Mesquita-Ferrari RA, et al. *Effect of*

- Papain-Based Gel on Type I Collagen--Spectroscopy Applied for Microstructural Analysis*. Sci Rep 2015; 5: 11448.
- 62- Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Study of Acid Soluble Collagen and Gelatin from Skins and Bones of Young and Adult Nile Perch (Lates Niloticus)*. Food Chemistry 2004; 86(3): 325-32.
- 63- Simpson BK, Nollet LM, Toldrá F, Benjakul S, Paliyath G, Hui Y. *Food Biochemistry and Food Processing*: John Wiley & Sons; 2012.
- 64- Kumar B, Rani S. *Technical Note on the Isolation and Characterization of Collagen from Fish Waste Material*. J Food Sci Technol 2017; 54(1): 276-8.
- 65- Hema G, Shyni K, Mathew S, Anandan R, Ninan G, Lakshmanan P. *A Simple Method for Isolation of Fish Skin Collagen-Biochemical Characterization of Skin Collagen Extracted from Albacore Tuna (Thunnus Alalunga), Dog Shark (Scoliodon Sorrakowah) and Rohu (Labeo Rohita)*. Annals of Biological Research 2013; 4(1): 271-8.
- 66- Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. *Characterisation of Acid Soluble Collagen from Skins of Young and Adult Nile Perch (Lates Niloticus)*. Food Chemistry 2004; 85(1): 81-9.
- 67- Tamilmozhi S, Veeruraj A, Arumugam M. *Isolation and Characterization of Acid and Pepsin-Solubilized Collagen from the Skin of Sailfish (Istiophorus Platypterus)*. Food Research International 2013; 54(2): 1499-505.
- 68- Nagai T, Suzuki N. *Partial Characterization of Collagen from Purple Sea Urchin (Anthocidaris Crassispina) Test*. International Journal of Food Science and Technology 2000; 35(5): 497-501.
- 69- Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. *Isolation and Characterisation of Acid and Pepsin-Solubilised Collagens from the Skin of Brownstripe Red Snapper (Lutjanus Vitta)*. Food Chemistry 2005; 93(3): 475-84.
- 70- El-Rashidy AA, Gad A, Abu-Hussein AE-HG, Habib SI, Badr NA, Hashem AA. *Chemical and Biological Evaluation of Egyptian Nile Tilapia (Oreochromis Niloticas) Fish*. Scale Collagen 2015; 79: 618-26.

## Isolation and Evaluation of Collagen from the Fish (*Thunnus Tonggol*) Skin: A Biological Material for Medical Tissue Engineering

Mohammad Hadi Samiei<sup>1</sup>, Shahla Jamili<sup>\*2</sup>, Habib Nikukar<sup>†3</sup>, Vahid Razban<sup>4</sup>

### Original Article

**Introduction:** Collagen bears many applications in pharmacy and medicine, health and cosmetic products as well as food industry. In recent years, much attention has been paid to separation of collagen from marine organisms arising from the fact that its use in the diet is not restricted and triggers no risk of contagious diseases as well as religious restrictions. Moreover, fish collagen is unique in terms of its extremely high solubility in dilute acid on a scale with mammalian and chicken collagen. The purpose of this study was to investigate the isolation and evaluation of collagen from fish skin (*Thunnus tonggol*) as a biological material for medical tissue engineering.

**Methods:** Acid-soluble collagen (ASC) was isolated from fish skin using acetic acid. The *Thunnus tonggol* skin collagen was extracted by acid and base methods and evaluated by PAGE-SDS, FTIR and UV spectrophotography and amino acid composition analysis.

**Results:** The results, predicated on SDS-PAGE and amino acid compositions, demonstrated that the fish skin collagen is of type I. Fourier transform infrared analysis also revealed helical compositions of both collagens. UV spectrophotometry in the *Thunnus tonggol* skin collagen indicated a maximum absorption of 235 nm. The amount of collagen extracted from the *Thunnus tonggol* skin turned out to be 17.3%. Through analysis of collagen amino acid extracted from the mentioned fish, glycine was predominant. The growth and proliferation of human fibroblast cells on the collagen extracted from the *Thunnus tonggol* skin was more than control.

**Conclusion:** The results revealed that the fish collagen is an accessible and advantageous material for medical usage and tissue engineering.

**Keywords:** Fish skin collagen, Amino acid composition, *Thunnus tonggol*, Persian Gulf.

**Citation:** Samiei M. H, Jamili S, Nikukar H, Razban V. **Isolation and Evaluation of Collagen from the Fish (*Thunnus Tonggol*) Skin: A Biological Material for Medical Tissue Engineering.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2022; 30(6): 4932-48.

<sup>1</sup>Department of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

<sup>3</sup>Medical Nanotechnology and Tissue Engineering Research (MeNTER) Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

<sup>4</sup>Department of Molecular Medicine, School of Advanced Medical Sciences and Technologies, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

\*Corresponding authors: Tel: 09131527237, Email: habibnik@ssu.ac.ir, Shahlajamili45@yahoo.com