



Original Research Paper

Biological and Biochemical characterization of collagen from *Scomberomorus commerson*'s skin as a biomaterial for medical applications

Tayyeb Ghadimi ^{1,2}, Noorahmad Latifi ^{1,2}, Hasan Amidi ², Siamak Farokh Forghani ^{1,2}, Abolfazl Abbaszadeh ², Reza Vaghardoost ², Soheila Naderi Gharahgheshlagh ^{1,2*}

¹ Burn Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Hazrat Fatemeh Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Key Words

Collagen
Biomaterials
Biomedical
Characterization
Scomberomorus commerson
Skin

Abstract

Introduction: Marine collagen, as a biomedical material, has been taken into consideration because of biodegradability, low immunogenicity, as well as being water soluble, safe, and easily-extractable. We extracted ASC (acid-soluble collagen) from *Scomberomorus commerson* fish skin found in Persian Gulf, Iran.

Materials & Methods: Physical and chemical characterizations using various techniques including thermo gravimetric analysis (TGA), X-ray diffraction, scanning electron microscopy (SEM), Fourier transformation infrared (FTIR), SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis), and MTT assay of the ASC.

Results: Results showed that the yield of collagen was 20.30%. SEM observation revealed that the structure of the ASC was fibrils with irregular dense sheet-like structures. SDS-PAGE analysis showed that *Scomberomorus commerson* ASC had α (α_1 and α_2) and β chains, presumably belonging to type I collagen. The content of amino acids and proline in ASC was 18 per 1,000 residues and 90.7 per 810.3 residues, respectively. Also, 27.06% of the ASC was composed of glycine. FTIR analysis and the spectrum X-ray diffraction demonstrated that the *Scomberomorus commerson* skin collagen had a triple-helix structure with the collagen denaturation temperatures of 45 °C and 291.89 °C. Cell activity and proliferation testing demonstrated that *S. commerson* collagen sample promotes cell growth and proliferation and its hydrophilicity leads to cell attachment.

Conclusion: In conclusion, the *Scomberomorus commerson* fish skin can perform as an affordable collagen source for medical biomaterials and pharmaceutical applications.

* Corresponding Author's email: soheila_naderi2@yahoo.com

Received: 9 November 2023; Reviewed: 11 December 2023; Revised: 8 February 2024; Accepted: 11 March 2024

(DOI):10.70102/AEJ.2025.17.1.12

مقاله پژوهشی

خصوصیات بیولوژیکی و بیوشیمیایی کلاژن پوست ماهی شیر *Scomberomorus commerson* خلیج فارس به عنوان یک ماده زیستی برای کاربردهای پزشکی

طیب قدیمی^{۱*}، نوراحمد لطیفی^{۱*}، حسن عمیدی^۲، سیامک فرخ‌فرقانی^{۱*}، ابوالفضل عباس‌زاده^۲، رضا وقردوست^۲،
سهیلا نادری‌قره‌قشلاق^{۱*}

^۱ مرکز تحقیقات سوختگی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

^۲ گروه جراحی پلاستیک و ترمیمی، بیمارستان حضرت فاطمه (س)، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: کلاژن دریایی، به عنوان یک ماده زیست پزشکی، به دلیل ایمنی‌زایی پایین، تجزیه‌پذیری زیستی و انحلال‌پذیری در آب، ایمن بودن و استخراج راحت، مورد توجه قرار گرفته است. در این مقاله، کلاژن محلول در اسید (ASC) از پوست شیر ماهی (*Scomberomorus commerson*) خلیج فارس ایران استخراج شد.

مواد روش‌ها: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کلاژن استخراج شده با استفاده از آزمون‌های مختلفی از جمله گرما وزن‌سنجی (TGA)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)، X-ray، ژل الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) و سنجش میزان سمیت سلولی مورد بررسی قرار گرفته شد.

نتایج: نتایج نشان دادند که میزان کلاژن استخراج شده ۲۰/۳٪ بود. مشاهدات SEM نشان داد که ساختار کلاژن استخراج شده فیبرهایی با ساختارهای ورقه مانند متراکم نامنظم است. تجزیه و تحلیل SDS-PAGE نشان داد که کلاژن پوست ماهی *S. commerson* دارای زنجیره‌های (α_1 و α_2) و β می‌باشد و کلاژن نوع I می‌باشد. مقدار اسیدهای آمینه و پرولین در ASC به ترتیب ۱۸ در residues ۱۰۰۰ و ۹۰/۷ در residues ۸۱۰/۳ بودند. هم‌چنین ۲۷/۰۶ درصد از کلاژن از گلیسین تشکیل شده بود. تجزیه و تحلیل FTIR و X-ray نشان دادند که کلاژن پوست *S. commerson* دارای ساختار مارپیچ سه گانه با دمای دناتوراسیون ۴۵ درجه سانتی‌گراد و ۲۹۱/۸۹ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. نتایج تست سمیت سلولی نشان داد که نمونه کلاژن *S. commerson* باعث رشد و تکثیر سلولی و آب دوستی آن منجر به اتصال سلولی می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری: در نتیجه، پوست ماهی *S. Commerson* می‌تواند به عنوان یک منبع کلاژن مقرون به صرفه برای بیومواد پزشکی و کاربردهای پزشکی و دارویی به کار رود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: soheila_naderi2@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۸ آبان ۱۴۰۲؛ تاریخ داوری: ۲۰ آذر ۱۴۰۲؛ تاریخ اصلاح: ۱۹ بهمن ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۲۱ اسفند ۱۴۰۲

(DOI): 10.70102/AEJ.2025.17.1.12

مقدمه

کلاژن، یک پروتئین فیبری که در همه حیوانات شناسایی شده است، یک جزء ضروری در بافت‌های حمایت‌کننده مهره‌داران و بی‌مهرگان است (۱). کلاژن نوع I رایج‌ترین کلاژن است که دارای ساختار مارپیچ سه گانه شامل دو زنجیره α (α_1 و α_2) و زنجیره β با حدود ۱۰۰۰ residues اسیدآمینه است (۲). توالی‌های ۳ گانه مکرر از Gly-X-Y عمدتاً در زنجیره‌های α یافت می‌شوند که پرولین و هیدروکسی پرولین عمدتاً جایگزین X و Y می‌شوند (۳، ۴). مطلوبیت کلاژن و کاربرد گسترده آن در زمینه‌های مختلف به عنوان یک ماده زیستی اساساً به ویژگی‌های بسیار زیاد آن مانند زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، در دسترس بودن آسان و تطبیق‌پذیری بالا بستگی دارد (۵، ۶). علاوه بر این، کلاژن می‌تواند یک معماری بسیار سازمان‌یافته سه‌بعدی (3D) از شبکه فیبرهای بافته شده را با خود تجمعی و پیوند متقابل تشکیل دهد. این شبکه‌ها در برابر تنش کششی در جهات مختلف مقاومت می‌کنند و از رشد سلول پشتیبانی می‌کنند (۷، ۸). بنابراین، اهمیت کلاژن به‌طور فزاینده‌ای به عنوان منبع کلیدی بیومواد در ناحیه‌های مختلف از محلول‌های کلاژن تزریقی گرفته تا داربست‌های بیومیمتیک برای کشت سلولی سه‌بعدی، مهندسی بافت، رهایش دارو و پزشکی احیاکننده شناخته شده است (۷، ۹). علاوه بر این، خواص مکانیکی و بیولوژیکی آن نیز آن را به عنوان یک ماده زیستی تقریباً ایده‌آل برای کاربردهای آرایشی، دارویی و بیوتکنولوژیکی تبدیل کرده است. استفاده اصلی زیست پزشکی کلاژن به عنوان حامل دارو و ژن، عوامل هموستاتیک، بخیه‌های جراحی، فرمولاسیون‌های پرکننده استخوان، مهندسی بافت و پانسمان زخم می‌باشد (۸، ۱۰). پیش‌بینی می‌شود که بیش از ۱۹۶ میلیون تن ماهی در سال ۲۰۲۵ فرآوری شود (۱۱). برای تبدیل ضایعات فرعی ماهی به مواد مغذی مهم به روش‌های موثری نیاز است. ۵۰ تا ۷۰ درصد مواد خام اولیه را محصولات جانبی تشکیل می‌دهند که بسته به روش پردازش، حاوی سر، احشاء، پوست، استخوان، فلس‌ها و باله‌های غنی از کلاژن می‌باشد (۷، ۹). پوست به عنوان بهترین محصول جانبی ماهی برای استخراج کلاژن معرفی شده است (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵). خواص فیزیکی و شیمیایی کلاژن ماهی مشابه و حتی برتر از کلاژن پستانداران است زیرا می‌توان آن را به راحتی استخراج و خالص کرد. دارای قابلیت جذب زیستی بالا، ویسکوزیته کم و خطر انتقال کم‌تر بیماری به دلیل تفاوت انتوزنتیکی بالای بین ماهی و انسان، در دسترس و غیرسمی بودن با خواص هموستاتیک معقول و حداقل می‌باشد (۱۵). *Scomberomorus commerson* (mackerel) که در زبان فارسی به نام شیرماهی نیز شناخته می‌شود، پرتعدادترین گونه ماهی با بالاترین

ارزش اقتصادی در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری از جمله جنوب ایران است و میزان صید آن در سال ۲۰۰۳ در حدود ۸/۱۴۹ تن بوده است (۱۶، ۱۷). *S. commerson* یک غذای دریایی با کلسترول پایین و پروتئین بالا است که به صورت ماهی بدون فلس در بازار ایران موجود است. محصولات شیلاتی به دلیل میزان بالای آب، اسیدهای آمینه آزاد و سایر مواد نیتروژن قابل تجزیه هستند (۱۸). از دست دادن تازگی اولیه به دلیل اکسیداسیون لیپید و فعال شدن آنزیم‌ها ایجاد می‌شود. حتی با سرد شدن، فساد به دلیل فعالیت میکروب‌ها و تولید متابولیت‌ها اتفاق می‌افتد. بنابراین، تکنیک‌های جدید مختلفی برای به تاخیر انداختن فرآیند فساد ماهی و محصولات شیلات مورد نیاز است (۱۹). پوست ماهی *S. commerson* منبع خوبی برای تولید مواد زیستی مبتنی بر کلاژن است که منجر به افزایش توان اقتصادی آبزی‌پروری ماهی mackerel و کاهش آلودگی محیط زیست مرتبط با دفع زباله می‌شود (۲۰). در مطالعات قبلی ویژگی‌های کلاژن و ژلاتین برخی گونه‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (۲۱، ۲۲، ۲۳). با این حال، هنوز هیچ مطالعه‌ای روی کلاژن استخراج شده از *S. commerson* خلیج فارس ایران انجام نداده است، هدف ما جداسازی کلاژن از ضایعات پوست ماهی *S. commerson* و بررسی ویژگی‌های ساختاری و بیولوژیکی آن‌ها، که در زمینه‌های زیست مواد و پزشکی کاربرد دارد، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد: مواد شیمیایی (همه آن‌ها از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شده‌اند) که در این مطالعه مصرف می‌شوند شامل (B-mercaptoethanol)، اسیداستیک، (Hydroxymethyl) Tris، بوتیل الکل (Butanol)، Coomassie Brilliant blue R-250 می‌باشد.

آماده‌سازی نمونه: پوست‌های شیرماهی *S. commerson* (طول بین ۵۰ تا ۷۰ سانتی‌متر و وزن متوسط ۸۰۰ گرم) از بازار محلی جمع‌آوری شد و چندین بار با آب دیونیزه شست‌و داده شد. در آزمایشگاه، به منظور جداسازی کلاژن نوع I، پوست‌های *S. commerson* با حفظ رطوبت سطح پوست مطابق با روش گزارش شده قبلی به قطعات کوچک بریده شدند (۲۴).

استخراج و خالص‌سازی کلاژن: ابتدا پوست شیرماهی (*S. commerson*) عاری از هر گونه گوشت و فلس و باله گردید و با آب مقطر شسته داده شد. پوست‌ها به قطعات کوچک (۵/۵×۰/۵ سانتی‌متر مربع) بریده شدند تا استخراج کلاژن افزایش یابد. استخراج اسیدی با برخی تغییرات براساس روش Naderi Gharagheshlagh و همکاران انجام شد (۲۴). ۰/۱ مولار NaOH (حجمی/وزنی ۱/۱۰) به نمونه‌های

پیتید و پروتئین ها است. این تکنیک طیف سنجی، دارای قابلیت عدم تخریب نمونه می باشد. در این طیف سنجی، گروه های عاملی موجود در ترکیبات مختلف، دارای قدرت جذب متفاوت اشعه های مادون قرمز در ناحیه های مختلف عدد موج را دارا می باشند. اطلاعات طیف سنجی مادون قرمز تحت عنوان ارتعاشات واحد ساختاری (گروه های عاملی) نمودار می شوند. باندهای آمید I و آمید II از باندهای غالب در ساختار پروتئین و پلی پتید می باشند. حساس ترین ناحیه در طیف باند آمیدی I با عدد موج $1600 - 11700 \text{ cm}^{-2}$ است که متعلق به ارتعاشات کششی پیوند C=O در اتصالات پپتیدی پلی پتید یا پروتئین می باشد. در مقایسه با آن باندهای آمید II متعلق به ارتعاشات پیوند CN می باشد. FTIR کلاژن طبق روش گزارش شده توسط Singh و همکاران انجام شد (۲۹). (طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه Nexus 470، شرکت Thermo Nicolet، ایالات متحده). دیسک های KBr حاوی ۲ میلی گرم نمونه در حدود ۱۰۰ میلی گرم برومید پتاسیم مرتبط با ابزار فوریه IR برای به دست آوردن طیف FTIR استفاده شد. طیف FTIR با وضوح 4 cm^{-1} در محدوده $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ در دمای اتاق انجام شد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): از پوشش یونی خودکار (JEOL JFC-1600) برای پوشش دادن نمونه با طلا و میکروسکوپ الکترونی روبشی (JEOL JSM-6380LA) با ولتاژ شتاب دهنده ۲۰ کیلوولت برای مشاهده ساختار کلاژن استخراج شده استفاده شد (۳۰).

وزن سنجی حرارتی (TGA): تجزیه حرارتی کلاژن تا دمای ۵۰۰ درجه سانتی گراد تحت اتمسفر نیتروژن با سرعت گرمایش یکنواخت ۲۰ درجه سانتی گراد در دقیقه با استفاده از آنالایزر ترموگراویمتری (Q600 V20.9TA Instruments، ایالات متحده آمریکا) انجام شد (۳۱).

پراش اشعه ایکس (X-ray): الگوهای پراش اشعه ایکس (XRD) کلاژن پوست ماهی *S. Commerson* بر اساس روش کار Alves و همکاران ارزیابی شد (۳۲). پراش سنج اشعه ایکس (Bruker D8 Discover، کارلسروهه، آلمان) برای به دست آوردن الگوهای تابش Cu-Ka و طول موج $1.5406 \text{ \AA}$ استفاده شد. اسکن در محدوده $2\theta = 5^\circ - 30^\circ$ درجه با یک گام 0.02° درجه و سرعت اسکن 2° درجه در دقیقه انجام شد.

تست زنده ماننی و تکثیر سلولی (MTT): با استفاده از روش MTT، سمیت سلولی و زنده ماندن سلولی کلاژن *S. Commerson* مورد بررسی قرار گرفت. پس از ۱، ۳ و ۵ روز، نرخ تکثیر فیبروبلاست در نمونه های کلاژن محاسبه شد (۳۳). کلاژن پوستی *S. commerson* ساخته شده در سائزهای یکسان پانچ شد، و به منظور استریل کردن

پوست ماهی اضافه شد و محلول حاوی پوست به مدت ۶ ساعت روی استیرر قرار گرفت تا پروتئین های غیر کلاژنی حذف شوند. محلول هر ۲ ساعت یک بار تعویض گردید و سپس پوست ها چندین بار با آب مقطر شستشو داده شدند تا NaOH آن خارج شود و pH تقریباً به ۷ برسد. پس از آن، نمونه های پوست در بوتیل الکل ۱۰٪ به نسبت ۱:۱۰ (حجمی/حجمی) به مدت ۲۴ ساعت به پوست اضافه شد تا بافت چربی پوست حذف گردد. سپس ۳ حجم اسیداستیک ۵٪/۵ مولار به نمونه ها اضافه شد و به مدت ۳ روز نمونه روی استیرر قرار گرفت، سپس محلول حاوی کلاژن به مدت ۱۰ دقیقه در 12000 g سانتریفیوژ شد. مواد رویی حاوی کلاژن محلول در اسید (ASC) جمع آوری و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس ۲/۶ مولار NaCl به آن اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در 10000 g سانتریفیوژ شد تا کلاژن رسوب کند. تمامی مراحل در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. در نهایت نمونه استخراج شده به مدت ۳ روز داخل کیسه های دیالیز قرار گرفت، سپس به مدت ۲ روز در دمای 40°C درجه سانتی گراد توسط فریز درایر خشک گردید.

بازده استخراج: بازده استخراج به عنوان نسبت بین محصول نهایی (وزن عصاره کلاژن خشک شده در فریز) و محصول اولیه (وزن مرطوب زیست توده محصولات جانبی) تعیین می شود (معادله (۱)) (۲۵):

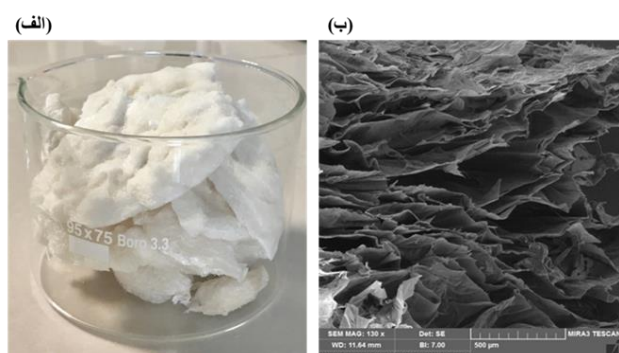
$$\text{Yield of collagen (wet) (\%)} = \frac{\text{weight of collagen (g)}}{\text{weight of wet skin}} \times 100$$

آزمون SDS-PAGE: الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید-SDS (SDS-PAGE) مطابق با روش Laemmli و همکاران انجام شد (۲۶) که از ژل ۷/۵٪ حاوی ۱۰٪ SDS در pH ۸/۸ استفاده می کند. نمونه های پروتئینی که دارای ۵۰ میکرولیتر کلاژن، ۱۰ میکرولیتر SDS ۱۰٪ و ۳ میکرولیتر ۲-مرکاپتوئتانول بودند، به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شدند. علاوه بر این، مخلوط ۵۰ میکرولیتر گلیسرول ۲۰٪ و ۵۰٪ برموفنیل بلو اضافه شد. از Coomassie brilliant blue R-250 برای رنگ آمیزی پروتئین ژل استفاده شد (۲۷).

تجزیه و تحلیل اسید آمینه: ترکیب اسید آمینه نمونه های کلاژن با روش Pico.Tag تعیین شد. این روش از فنیل ایزوتیوسیانات (PITC) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا فاز معکوس (HPLC) به ترتیب برای استخراج و تعیین مشتق فنیل تیوکاربامیل اسیدهای آمینه استفاده می کند. کلاژن های خشک در محلول ۶ مولار HCl به مدت ۲۴ ساعت در دمای 110°C درجه سانتی گراد حل شدند. تجزیه و تحلیل بیش تر به دنبال روش گزارش شده قبلی انجام شد (۲۸).

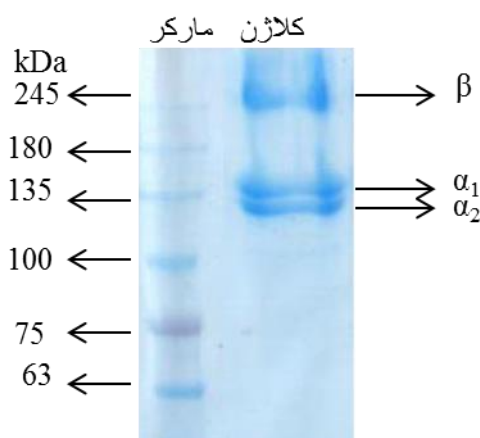
آزمون طیف سنجی مادون قرمز (FTIR): طیف سنجی مادون قرمز یکی از تکنیک های مورد استفاده برای تعیین ساختار ثانویه پلی

خصوصیات مورفولوژیکی: مورفولوژی کلاژن استخراج شده از پوست شیرماهی با چشم غیرمسلح و SEM مشاهده گردید. کلاژن یک اسفنج سفید نرم با منافذ روی سطح آن، به صورت ماکروسکوپی قابل مشاهده می باشد (شکل ۱ الف)). میکروگراف الکترونی کلاژن (شکل ۱ ب)) ساختارهای ورقه مانند متراکم نامنظمی را نشان می دهد که ماهیت فیبری کلاژن را بیان می کند. نتایج ما یک شبکه به هم پیوسته با اندازه منافذ ۱۰۰-۴۲۰ میکرومتر را تأیید کرد.



شکل ۱: کلاژن خشک پوست ماهی *S. Commerson*: (الف): زیر چشم غیرمسلح و (ب): میکروگراف SEM

تجزیه و تحلیل SDS-PAGE: تجزیه و تحلیل الکتروفورتیک نمونه کلاژن از پوست *S. Commerson* در شکل ۲ ارائه شده است. جزء اصلی کلاژن دو زنجیره α_1 و α_2 ، β (دایمرها) و مقادیر کمی از γ (تریمرها) بود. زنجیره های α_1 و α_2 در نمونه کلاژن دارای وزن مولکولی بین ۱۴۰۵-۱۲۵ کیلودالتون و ۲۴۵ کیلودالتون در زنجیره β بودند (شکل ۲). کلاژن نوع I از زنجیره های α_1 و α_2 تشکیل شده و کلاژن اصلی در پوست، استخوان و فلس ماهی است.



شکل ۲: الگوهای SDS-PAGE کلاژن محلول در اسید از پوست *S. commerson* در مقایسه با مارکر پروتئین

به مدت ۱۲۰ دقیقه در معرض اشعه ماوراء بنفش قرار گرفت و سپس در یک صفحه ۹۶ چاهی قرار گرفت (۳۴). حدود $10^2 \times 5$ سلول فیبروبلاست 3T3 کاشته شده بر روی کلاژن فیلم *S. commerson* تحت شرایط استاندارد با استفاده از $200 \mu\text{L}$ محیط کشت، شامل DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, UK)، ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS) و ۱٪ پنی سیلین / استرپتومایسین (Gibco, UK)، به هر چاه اضافه شد. گروه کنترل مانند چاهک های دیگر سلول داشت اما کلاژن نداشت (۳۵). در آزمون MTT برای گروه کنترل، ۵۰۰۰ سلول در چاهک بدون داربست قرار داده شد. متعاقباً در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند تا اتصال سلول ها به کلاژن نمونه *S. commerson* را تقویت کند. پس از ۱، ۳، ۵ روز، محلول MTT (0.5 mg/ml) در PBS به نمونه های سنجش اضافه شد و آن ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. مایع رویی خارج و پس از انکوباسیون دور انداخته شد. ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO ایزوپروپانول به ازای هر چاهک در حجم مساوی برای حل کردن محصول واکنش فورازان آبی اضافه شد. نمونه ها پس از کمی تکان دادن ارزیابی شدند. صفحه خوان Elisa برای اندازه گیری جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر در فواصل زمانی ۱، ۳ و ۵ روز استفاده شد. درصد بقای سلولی کلاژن فیلم شیرماهی با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\% \text{Cell viability} = \text{Ns} / \text{Nc} \times 100$$

تعداد سلول های زنده با Ns (میانگین نمونه های O.D.s) و Nc (میانگین O.D.s کنترل) نشان داده می شود. هر نمونه ۳ بار مورد بررسی قرار گرفت (۳۶).

چسبندگی سلولی: SEM برای تجزیه و تحلیل چسبندگی سطحی از سلول های فیبروبلاست 3T3 بر روی نمونه کلاژن استخراج شده استفاده شد. سلول های کشت شده روی نمونه کلاژن با گلو تار آلدئید ۲/۵٪ (w/v) تثبیت شدند و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محیط CO_2 ۵٪ انکوبه شدند و سپس با PBS ۰/۱ مولار دو بار شستشو داده شدند. سپس نمونه های ثابت پس از آبیگری با الکل به مدت یک شب خشک شدند (۳۶، ۳۷).

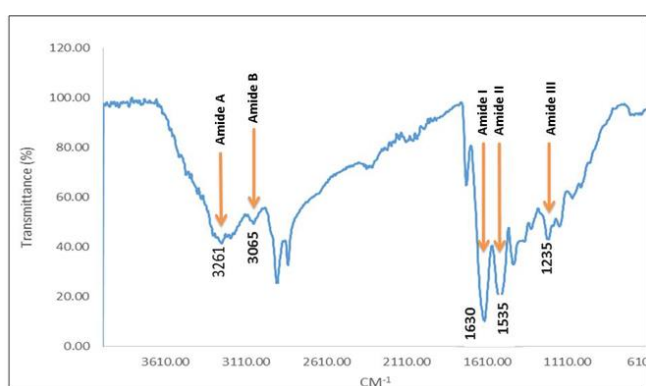
تحلیل های آماری: تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون T توسط Prism انجام شد. مقادیر P مربوطه کم تر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بازده ASC از پوست *S. commerson*: بازده کلاژن محلول در اسید (ASC) از پوست شیرماهی *S. Commerson* ۳۰/۲٪ بود.

استخراج شده در دمای ۲۹۱/۸۹ درجه سانتی گراد بود. تخریب حرارتی برای کلاژن پوست تا دمای ۵۰۰ درجه سانتی گراد با وزن باقی مانده حدود ۹۷/۹۳٪ ادامه یافت.

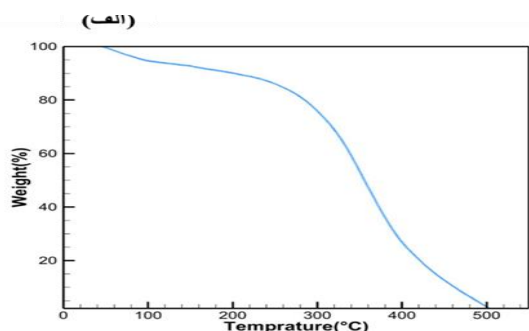
پراش اشعه ایکس (XRD): شکل ۴ (ب) پراش اشعه ایکس (XRD) کلاژن استخراج شده از پوست *S. commerson* را نشان می دهد. زوایای پراش (2θ) کلاژن *S. commerson* حدود ۷/۶ درجه و ۱۹/۴ درجه بود. ساختار طیف کلاژن که دو پیک را ارائه می دهد به خوبی مشخص شده است. حداقل مقادیر فواصل مکرر (d) با استفاده از معادله Bragg $d(\text{\AA}) = \lambda / 2 \sin \theta$ ($\lambda = 1.54 \text{\AA}$) محاسبه گردید (۳۹). د پیک اول و دوم به ترتیب ۱۱/۶۱ و ۴/۵۷ Å بود.



شکل ۳: طیف FTIR کلاژن پوست ماهی *S. commerson*

تست فعالیت و تکثیر سلولی (MTT): تجزیه و تحلیل آماری تست MTT در شکل ۵ (الف) نشان می دهد که کلاژن پوستی شیر ماهی (*S. commerson*) تفاوت معنی داری با گروه ندارد. نتایج حاصل از تست MTT در روز اول نشان می دهد که میزان چسبندگی و زنده ماندن سلول های فیروبلاست در گروه کلاژن شیرماهی نسبت به گروه کنترل بیش تر است.

چسبندگی سلول: همان طور که در شکل ۵ (ب) نشان داده شده است، پس از ۴۸ ساعت از کاشت سلول، تصاویر SEM رشد و تکثیر سلول های فیروبلاست را روی داربست ها نشان می دهد که مشخص شد سلول ها به داربست می چسبند.



شکل ۴: (الف) TGA کلاژن پوست ماهی *S. commerson*، (ب) XRD کلاژن پوست ماهی *S. commerson*

ترکیب اسید آمینه کلاژن به دست آمده از پوست *S. commerson*:

کروماتوگرافی برای جداسازی، شناسایی و تعیین کمیت اسیدهای آمینه کلاژن پوست ماهی *S. Commerson* استفاده شد (۳۸). کلاژن نوع I شیرماهی شامل ۱۸ اسید آمینه می باشد که در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: ترکیب اسیدهای آمینه کلاژن محلول در اسید *S. commerson*

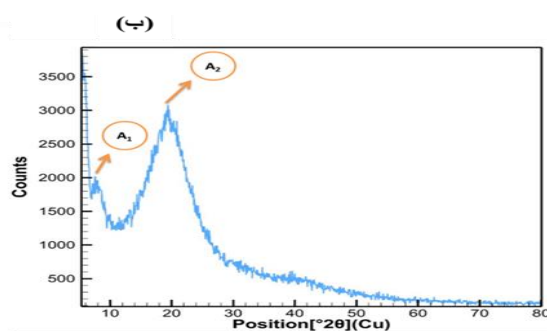
Residues/1000 total	Amino acid
۸۵/۳	Alanine
۶۸/۲	Arginine
۴۴/۵	Aspartate
۰	Cysteine
۸۰/۲	Glutamate
۲۰۴/۴	Glycine
۶/۹	Histidine
۱۸/۰	Valine
۱۱/۹	Isoleucine
۱۹/۷	Leucine
۲۹/۸	Lysine
۱۴/۳	Methionine
۲۳/۵	Phenylalanine
۵۵	Hydroxyproline
۹۰/۷	Proline
۳۰/۴	Serine
۲۲/۸	Threonine
۴/۷	Tyrosine
۸۱۰/۳	Total

FTIR: در این مطالعه کلاژن پوست *S. commerson* با استفاده

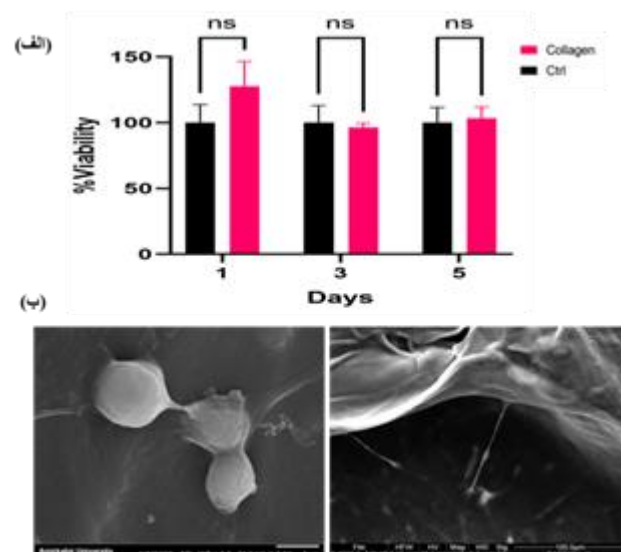
از طیف سنجی FTIR آنالیز شد. باندهای معمول کلاژن را همان طور که در کلاژن از منابع دیگر مشاهده می شود، می توان در طیف مشاهده کرد. شکل ۳ نشان می دهد که کلاژن دارای باندهای اصلی جذب آمید A (3261 cm^{-1}) و آمید B (3065 cm^{-1})، آمید I (1630 cm^{-1})، آمید II (1535 cm^{-1}) و آمید III (1235 cm^{-1}) می باشد.

آنالیز گرما وزن سنجی (TGA): در شکل ۴ (الف)، منحنی TGA

درصد کاهش وزن را با افزایش دما نشان می دهد. همان طور که در این شکل نشان داده شده است، تخریب حرارتی کلاژن در دو مرحله رخ می دهد. اولین مرحله تخریب حرارتی نمونه کلاژن در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد شروع شد. در مرحله اول، نمونه کلاژن کاهش وزن ۶ درصدی را نشان داد. دومین مرحله تخریب حرارتی نمونه کلاژن



شبکه ژل مهاجرت می کنند (۴۵). جزء اصلی کلاژن دو زنجیره (α_2) و (α_1) α ، β (دایمرها) و مقادیر کمی از γ (تریمرها) بود. زنجیره های α_1 و α_2 در نمونه کلاژن دارای وزن مولکولی بین ۱۴۰-۱۲۵ کیلودالتون و ۲۴۵ کیلودالتون در زنجیره β بودند. کلاژن نوع I از زنجیره های α_1 و α_2 تشکیل شده و کلاژن اصلی در پوست، استخوان و فلس ماهی است. الگوهای گزارش شده برای پوست گونه های مختلف ماهی، از جمله (۴۶) blacktip shark، (۴۷) Kamensky، (۴۸) leatherjacket، (۲۸، ۴۹) *Scomberomorus guttatus*، (۵۰) Tilapia، (۵۱) amur sturgeon و (۴۱) loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) مطابق با نتایج ما هستند. کلاژن نوع I شامل ۱۸ اسید آمینه منحصر به فرد است که به صورت زنجیره α سازماندهی شده اند که یک ترکیب مارپیچ سه گانه را تشکیل می دهند (۵۲). ترکیب اسید آمینه کلاژن پوست شیرماهی مشابهت بیش تری به کلاژن سایر ماهیان در مقایسه با کلاژن پستانداران داشت (۲۰). در نمونه ما، فراوان ترین آمینو اسید گلیسین با ۲۰۴/۴ در ۱۰۰۰ residue و بیش از ۲۵ درصد از کل اسیدهای آمینه را تشکیل می دهد. این با حضور گلیسین در هر سومین residue اسید آمینه مطابقت دارد. گلیسین جزء اصلی کلاژن است که مارپیچ سه گانه را تشکیل می دهد (۵۳). علاوه بر این، نمونه ما مقدار کم تری از هیستیدین، سرین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین، لیزین، تیروزین، فنیل آلانین، ترئونین دارا بود که مشابه سایر کلاژن ها می باشد (۴۴). هم چنین مقدار نسبتاً بالایی از آلانین، آرژنین، گلوتامات، هیدروکسی پرولین و پرولین بدون سیستمین مشابه سایر کلاژن ها شناسایی شد (۵۴، ۵۵). پرولین و هیدروکسی پرولین که با زیستگاه و گونه ها همبستگی دارند، دارای مقدار مشخص ۹۰/۷ و ۵۵ در هر ۸۰۵/۳ residues در کلاژن به دست آمده از پوست *S. Commerson* بود (۲۴). نواحی غنی از پرولین و هیدروکسی پرولین در مولکول ها به احتمال زیاد در تشکیل نواحی اتصال که با پیوند هیدروژنی تثبیت شده اند، دخیل هستند. بنابراین، این محتویات اسید آمینه (پرولین و هیدروکسی پرولین) مسئول یکپارچگی ساختاری و پایداری حرارتی ساختار مارپیچ سه گانه کلاژن هستند (۵۶). مقدار اسید آمینه کلاژن تحت تأثیر دمای زیستگاه، توزیع وزن مولکولی، گونه و جنس و هم چنین فرآیندهای استخراج قرار می گیرد (۵۷). چنین یافته هایی با یافته های مشاهده شده برای کلاژن استخراج شده از دیگر منابع گونه های دریایی مطابقت دارد (۵۷، ۵۸). پراش اشعه ایکس (XRD) جهت گیری و توزیع فیبریل کلاژن را در بافت های ماهی ارزیابی می کند (۳۹). ساختار طیف کلاژن استخراج شده که دو پیک را نشان می دهد که به خوبی مشخص شده است. این دو پیک مشخصه مولکول کلاژن هستند. اولین قله مربوط به ترکیب مارپیچ سه گانه و فاصله بین زنجیره های مولکولی است و قله دوم مربوط به فاصله بین



شکل ۵: (الف): نتایج و تجزیه و تحلیل آماری تست زنده ماندن سلولی به دست آمده از روش MTT، (ب): چسبندگی سلول فیبروبلاست بر روی داربست کلاژن

بحث

بازده ASC از پوست شیرماهی *S. Commerson* ۲۰/۳۰٪ بود. در مقایسه، بازده کلاژن پوست ماهی ornate threadfin bream ۲۴/۹٪، black drum ۲/۳٪ (۴۰)، ماهی loach ۲۲/۴۲٪ (۴۱)، گربه ماهی largefin longbarbel ۱۶/۸٪ (۴۲) و ماهی tilapia ۲۷/۲٪ از بود (۴۳). مطالعه ما نشان داد که پوست *S. commerson* می تواند منبع مناسبی از کلاژن باشد. مورفولوژی کلاژن سنتز شده از پوست ماهی با چشم غیرمسلح و SEM مشاهده شد. کلاژن یک اسفنج سفید نرم با منافذ روی سطح آن، به صورت ماکروسکوپی بود. میکروگراف الکترونی ساختارهای ورقه مانند متراکم نامنظمی را نشان داد که کلاژن را با ماهیت فیبری بیان می کند. نتایج ما یک شبکه به هم پیوسته با اندازه منافذ ۱۰۰-۴۲۰ میکرومتر را تأیید کرد که کلاژن ماهی را به عنوان حامل داروها و محصولات زیست فعال تأیید می کند (۲۰). مورفولوژی کلاژن پوست ماهی خاویاری sturgeon و مارماهی eel fish شبکه ای به هم پیوسته با اندازه منافذ ۱۲۰-۲۰ میکرومتر بود (۲۰، ۴۴). ویژگی های اساسی اسفنج کلاژن از جمله مورفولوژی دیواره، منافذ، اندازه و قابلیت متصل شدن نقش مهمی در ماتریس های تکثیر و مهاجرت سلولی، عوامل هیدراته کننده، زخم پوش ها و سایر مواد زیست پزشکی دارند. SDS-PAGE روشی برای تعیین الگوهای پروتئین و وزن مولکولی پپتیدهای کلاژن است. SDS-PAGE به جداسازی پروتئین و قطعات آن ها براساس اندازه کمک می کند به نحوی که پروتئین با اندازه بزرگ تر در ژل به دام می افتد و کوچک ترین قطعات از طریق

اولین مرحله حرارتی نمونه کلاژن در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد شروع شد. در مرحله اول، نمونه کلاژن کاهش وزن ۶ درصدی را نشان داد که به دلیل از دست دادن فیزیکی آب جذب شده بود. مرحله دوم کاهش وزن که مربوط به شکستن پیوندهای شیمیایی کلاژن است، در دماهای بالاتر اتفاق می افتد. دومین مرحله تخریب حرارتی نمونه کلاژن استخراج شده در دمای ۲۹۱/۸۹ درجه سانتی گراد بود. تخریب حرارتی برای کلاژن پوست تا دمای ۵۰۰ درجه سانتی گراد با وزن باقی مانده حدود ۹۷/۹۳٪ ادامه یافت. یافته های ما مشابه گزارش TGA کلاژن محلول در اسید از ماهی Puffer (۳۱۵ °C) (۵۶) و ماهی سفید خزر (۲۲۰ °C) (۶۲) بود. تغییر در دمای بیشینه تخریب حرارتی کلاژن از گونه های مختلف می تواند به مقدار اسیدهای آمینه موجود، مقدار هیدروکسیلاسیون باقی مانده های پرولین، به ویژه سطح هیدروکسی پرولین آن ها، دمای اکوسیستم، و دمای بدن مربوط می باشد (۶۳، ۲۱). هنگامی که گروه های هیدروکسیل هیدروکسی پرولین ها در یک رشته به زنجیره بالایی امید کربوکسیل در زنجیره دیگر با استفاده از مولکول های آب جفت می شوند، شبکه های پیوند هیدروژنی ساخته می شود. علاوه بر این، مقدار بالایی از اسیدهای آمینه تثبیت کلاژن مورد نیاز است (۶۴). هیدروکسی پرولین یک اسید آمینه با ارزش موجود در کلاژن است که برای ارزیابی عملکرد و کارایی فرآیند استخراج استفاده می شود (۶۵). در این مطالعه، کلاژن دریایی محلول در اسید (ASC) از پوست شیرماهی *S. commerson* با بازده ۲۰/۳۰٪ استخراج شد. پتانسیل کلاژن برای کاربردهای پزشکی به عنوان مواد زیستی با ریزساختار متخلخل و نامنظم و زیست سازگاری نشان داده می شود. تجزیه و تحلیل FTIR و XRD کلاژن شیرماهی یکپارچگی ساختار مارپیچ سه گانه کلاژن نوع I را نشان داد. فعالیت سلولی و تست MTT نشان داد که نمونه کلاژن *S. commerson* باعث رشد و تکثیر سلولی می شود. مطالعات آینده می توانند نتایج ما را در ارزیابی کلاژن پوست *S. commerson* به عنوان محصول جانبی صید در جایگزین کلاژن پستانداران که یک ترکیب گران بها و دوستدار محیط زیست برای زیست پزشکی می باشد، مورد بررسی قرار دهند.

منابع

1. Samiei, M., Jamili, S., Nikukar, H. and Razban, V., 2022. Isolation, characterization and biocompatibility evaluation of collagen from Thunnus tonggol skin. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 21(2): 568-589.
2. Naderi Qaraqeshlaq, S., Jamili, Sh., Fatemi, M.J., Sharifi, A.M. and Nourani, M.R., 2018. The chemical structure of acid-soluble Collagen from the Skin of *Rutilus Kutum* of Caspian Sea and *Scomberomorus guttatus* of Persian Gulf. Journal of Animal Environment. 10(3): 241-250. (In Persian)

اسکلت ها است. زوایای پراش کلاژن *S. commerson* حدود ۷/۶ درجه و ۱۹/۴ درجه بود. که نتایج ما با نتایج ماهی قزل آلا، کپور ماهی و ماهی مرکب گزارش شده توسط Alves و همکاران، Veeruraj و همکاران، Fengxiang و همکاران مشابهت دارد (۳۲، ۳۹، ۴۴). تجزیه و تحلیل آماری تست MTT نشان می دهد که کلاژن پوستی شیرماهی (*S. commerson*) تفاوت معنی داری با گروه ندارد. نتایج حاصل از تست MTT در روز اول نشان می دهد که میزان چسبندگی و زنده ماندن سلول های فیبروبلاست در گروه کلاژن شیرماهی نسبت به گروه کنترل بیش تر است. این نتایج نشان داد که نمونه کلاژن *S. commerson* باعث رشد و تکثیر سلولی می شود. به نظر می رسد که خاصیت آب دوستی در کلاژن *S. commerson* منجر به اتصال سلولی می شود. از این رو کلاژن ویژگی های مطلوبی برای برقراری ارتباط فیزیولوژیکی بین سلول های مجاور دارد و این ویژگی را در مقاطع زمانی مختلف حفظ کرده است. Samiei و همکاران گزارش کردند که در روزهای ۳، ۷ و ۱۲ پس از کشت، رشد فیبروبلاست انسانی بر روی کلاژن پوست ماهی *Thunnus Tonggol* نسبت به شاهد قابل توجه تر بود (۱). Krismariono و همکاران، *Oshphronemus gouramy* نشان دادند که کلاژن فلس ماهی قابلیت زنده ماندن بالایی از کشت سلول های استئوبلاست را دارد (۳۹، ۵۹). هم چنین، مطالعه ما درصدی از سلول های فعال را که در طول فرآیند MTT تکثیر می شوند، نشان می دهد، بنابراین کلاژن شیر ماهی (*S. commerson*) فاقد هر گونه سمیت سلولی است که می تواند به عنوان یک ماده زیستی برای در زمینه مختلف پزشکی و مهندسی بافت به کار رود. تصاویر SEM نشان می دهند که چگونه سلول ها گسترش یافته و به سطح داربست کلاژن متصل می شوند و چگونه مهاجرت از طریق منافذ و تکثیر در لایه های داربست را آغاز کرده اند. سلول های فیبروبلاست ظرفیت اتصال زیادی به داربست ها داشتند که نشان می دهد داربست ها برای سلول های فیبروبلاست دارای سمیت نیستند. یافته های ما مطابق با مطالعه گذشته است که کشت سلول ها روی مقاطع عرضی داربست های کلاژن salmon را با استفاده از تصاویر SEM مورد بررسی قرار داده است. که داربست های کشت شده سلولی، چسبندگی سلولی قوی و افزایش جمعیت سلولی را در طول دوره انکوباسیون سه هفته ای نشان داده اند که توسط محتوای DNA هم مشخص شده است (۶۰). Kawase و همکاران نشان دادند که سلول های ورقه ای پرپیوستال که بر روی شبکه های پلیمری پوشش داده شده با کلاژن سالمون رشد کرده اند، در پاسخ به القای استخوان، فعالیت ALP (آلکالین فسفاتاز به عنوان سلول های رنگ آمیزی ارغوانی) را افزایش داده اند که با نتایج ما مطابقت دارد (۶۱). منحنی TGA درصد کاهش وزن را با افزایش دما نشان می دهد. تخریب حرارتی کلاژن در دو مرحله رخ می دهد.

- biogenic amines inhibition and quality preservation of red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets. Food Control. 56: 1-8.
19. **Khodanazary, A., 2019.** Quality characteristics of refrigerated mackerel *Scomberomorus commerson* using gelatin-polycaprolactone composite film incorporated with lysozyme and pomegranate peel extract. International Journal of Food Properties. 22(1): 2057-2071.
 20. **Atef, M., Ojagh, S.M., Latifi, A.M., Esmaili, M. and Udenigwe CC. 2020.** Biochemical and structural characterization of sturgeon fish skin collagen (*Huso huso*). Journal of Food Biochemistry. 44(8): e13256.
 21. **Ahmed, R., Haq, M. and Chun, B.S., 2019.** Characterization of marine derived collagen extracted from the by-products of bigeye tuna (*Thunnus obesus*). International Journal of Biological Macromolecules. 135: 668-676.
 22. **Pezeshk, S., Rezaei, M. and Abdollahi, M., 2022.** Impact of ultrasound on extractability of native collagen from tuna by-product and its ultrastructure and physicochemical attributes. Ultrasonics Sonochemistry. 89: 106-129.
 23. **Ampitiya, A., Gonapinuwala, S., Fernando, C. and De Croos, M., 2023.** Extraction and characterisation of type I collagen from the skin offcuts generated at the commercial fish processing centres. Journal of Food Science and Technology. 60(2): 484-493.
 24. **Naderi Gharagheshlagh, S., Fatemi, M.J., Jamili, S., Sharifi, A. and Nourani, M.R., 2020.** Isolation and characterization of acid soluble collagen from the skin of *Rutilus Frisii Kutum* (Kamensky) of the Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 19(2): 768-779.
 25. **Rodrigues, C.V., Sousa, R.O., Carvalho, A.C., Alves, A.L., Marques, C.F. and Cerqueira, M.T., 2023.** Potential of Atlantic Codfish (*Gadus morhua*) Skin collagen for skincare biomaterials. Molecules. 28(8): 3394.
 26. **Uk, L., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 680: 227-235..
 27. **Ghadimi, T., Naderi Gharagheshlagh, S., Latifi, N., Hivechi, A., Hosseinpour Sarmadi, V. and Farokh Forghani, S., 2023.** The Effect of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Collagen Incorporated with Exo-Polysaccharides Derived from *Rhodotorula mucilaginosa* sp. on Burn Healing. Macromolecular Bioscience. 23(9): 2300033.
 28. **Gharagheshlagh, S.N., Nourani, M.R., Jamili, S. and Javad, M., 2018.** Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the skin of *Scomberomorus guttatus* of Persian Gulf. J of Applied Tissue Engineering. 5(3).
 29. **Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S. and Kishimura, H., 2011.** Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Food chemistry. 124(1): 97-105.
 30. **Amini, N., Hivechi, A., Asadpour, S., Ebrahimzadeh, K., Kargozar, S. and Gholipourmalekabadi, M., 2020.** Fabrication and characterization of bilayer scaffolds made of decellularized dermis/nanofibrous collagen for healing of full-thickness wounds. Drug Delivery and Translational Research. 1: 14-23.
 31. **Perumal, R.K., Perumal, S., Thangam, R., Gopinath, A., Ramadass, S.K. and Madhan, B., 2018.** Collagen fucoidan blend film with the potential to induce fibroblast
 3. **Addad, S., Exposito, J.Y., Faye, C., Ricard-Blum, S. and Lethias, C., 2011.** Isolation, characterization and biological evaluation of jellyfish collagen for use in biomedical applications. Marine drugs. 9(6): 967-983.
 4. **Yang, Y.J., Jung, D., Yang, B., Hwang, B.H. and Cha, H.J., 2014.** Aquatic proteins with repetitive motifs provide insights to bioengineering of novel biomaterials. Biotechnology Journal. 9(12): 1493-1502.
 5. **Lim, Y.S., Ok, Y.J., Hwang, S.Y., Kwak, J.Y. and Yoon, S., 2019.** Marine collagen as a promising biomaterial for biomedical applications. Marine drugs. 17(8): 467.
 6. **Amini, N., Milan, P.B., Sarmadi, V.H., Derakhshanmehr, B., Hivechi, A. and Khodaei, F., 2022.** Microorganism-derived biological macromolecules for tissue engineering. Frontiers of Medicine. 16(3): 358-377.
 7. **Gorgieva, S. and Kokol, V., 2011.** Collagen-vs. gelatine based biomaterials and their biocompatibility: review and perspectives. Biomaterials applications for nanomedicine. 2: 17-52.
 8. **Ashraf, S.S., Hosseinpour Sarmadi, V., Larijani, G., Naderi Garagheshlagh, S., Ramezani, S. and Moghadamifar, S., 2023.** Regenerative medicine improve neurodegenerative diseases. Cell and Tissue Banking. 24(3): 639-650.
 9. **Shin, S., Ikram, M., Subhan, F., Kang, H.Y., Lim, Y. and Lee, R., 2016.** Alginate-marine collagen-agarose composite hydrogels as matrices for biomimetic 3D cell spheroid formation. RSC advances. 6(52): 46952-4665.
 10. **Furtado, M., Chen, L., Chen, Z., Chen, A. and Cui, W., 2022.** Development of fish collagen in tissue regeneration and drug delivery. Engineered Regeneration. 3(3): 217-231.
 11. **Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G. and Fen, S., 2021.** Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. Trends in Food Science & Technology. 110: 687-699.
 12. **Maschmeyer, T., Luque, R. and Selva, M., 2020.** Upgrading of marine (fish and crustaceans) biowaste for high added-value molecules and bio (nano)-materials. Chemical Society Reviews. 49(13): 4527-4563.
 13. **Heidari, M.G. and Rezaei, M., 2022.** Extracted pepsin of trout waste and ultrasound-promoted method for green recovery of fish collagen. Sustainable Chemistry and Pharmacy. 30: 100854.
 14. **Hossain, M.S., Ebrahimi, H., Ghosh, R., 2022.** Fish scale inspired structures-a review of materials, manufacturing and models. Bioinspiration & Biomimetics. 17(6). doi: 10.1088/1748-3190/ac7fd0
 15. **Rajabimashhadi, Z., Gallo, N., Salvatore, L. and Lionetto, F., 2023.** Collagen derived from fish industry waste: progresses and challenges. Polymers. 15(3): 544.
 16. **Eighani, M., Paighambari, S.Y., Herrmann, B. and Feekings, J., 2018.** Effect of bait type and size on catch efficiency of narrow barred Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*) in the Persian Gulf handline fisheries. Fisheries Research. 199: 32-35.
 17. **Owfi, F., Fatemi, M.R., Rabbaniha, M. and Coad, B., 2017.** Zoogeography and habitat overlapping of the Persian Gulf fishes in Indo-Pacific region. Journal of Animal Environment. 8(4): 125-132. (In Persian)
 18. **Cai, L., Cao, A., Li, Y., Song, Z., Leng, L. and Li, J., 2015.** The effects of essential oil treatment on the

- origin collagens and its potential applications. *Marine drugs*. 12(12): 5881-5901.
46. Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Shahidi, F., 2010. Isolation and properties of acid-and pepsin-soluble collagen from the skin of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *European Food Research and Technology*. 230: 475-483.
 47. Naderi Gharehgheshlagh, S., Fatemi, M.J., Jamili, S., Nourani, M.R., Sharifi, A.M. and Saberi, M., 2021. A dermal gel made of *Rutilus kutum* skin collagen-chitosan for deep burn healing. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 27: 317-328.
 48. Ahmad, M., Benjakul, S. and Nalinanon, S., 2010. Compositional and physicochemical characteristics of acid solubilized collagen extracted from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Hydrocolloids*. 24(6-7): 588-594.
 49. Fatemi, M.J., Garahgheshlagh, S.N., Ghadimi, T., Jamili, S., Nourani, M.R. and Sharifi, A.M., 2021. Investigating the Impact of collagen-chitosan derived from *Scomberomorus guttatus* and shrimp skin on second-degree burn in rats model. *Regenerative Therapy*. 18: 12-20.
 50. Li, J., Wang, M., Qiao, Y., Tian, Y., Liu, J. and Qin, S., 2018. Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochemistry*. 74: 156-163.
 51. Wang, H., Liang, Y., Wang, H., Zhang, H., Wang, M. and Liu, L., 2014. Physical-chemical properties of collagens from skin, scale, and bone of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 23(3): 264-277.
 52. Fallas, J.A., Gauba, V. and Hartgerink, J.D., 2009. Solution structure of an ABC collagen heterotrimer reveals a single-register helix stabilized by electrostatic interactions. *Journal of Biological Chemistry*. 284(39): 26851-26859.
 53. Firdayanti, W., Trilaksani, W. and Purwaningsih, S., 2023. Valorization of emperor fish (*Lethrinus lentjan*) skin for collagen isolation: effect of acetic acid ratio and extraction time. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing.
 54. Li, X., Deng, Y., Qiu, W., Feng, Y., Jin, Y. and Deng, S., 2022. Alteration of collagen thermal denaturation, structural and the abrogation of allergenicity in eel skin induced by ohmic heating. *Food Chemistry*. 391: 133272.
 55. Dara, P.K., Raghavankutty, M., Sebastian, N., Chatterjee, N.S., Mathew, S. and Ravishankar, C.N., 2020. Rheological, physico-chemical, and surface-active properties of gelatin extracted from bigeye tuna (*Thunnus obesus*) skin waste. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 29(5): 428-444.
 56. Iswariya, S., Velswamy, P. and Uma, T., 2018. Isolation and characterization of biocompatible collagen from the skin of puffer fish (*Lagocephalus inermis*). *Journal of Polymers and the Environment*. 26: 2086-2095.
 57. Nurilmala, M., Suryamarevita, H., Hizbullah, H.H., Jacob, A.M. and Ochiai, Y., 2022. Fish skin as a biomaterial for halal collagen and gelatin. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 29(2): 1100-1110.
 58. Carvalho, A.M., Marques, A.P., Silva, T.H. and Reis, R.L., 2018. Evaluation of the potential of collagen from codfish skin as a biomaterial for biomedical applications. *Marine drugs*. 16(12): 495.
 32. Alves, A.L., Marques, A.L., Martins, E., Silva, T.H. and Reis, R.L., 2017. Cosmetic potential of marine fish skin collagen. *Cosmetics*. 4(4): 39.
 33. Sadeghi-Avalshahr, A.R., Nokhasteh, S., Molavi, A.M., Mohammad-Pour, N. and Sadeghi, M., 2020. Tailored PCL scaffolds as skin substitutes using sacrificial PVP fibers and collagen/chitosan blends. *International journal of molecular sciences*. 21(7): 2311.
 34. Ziaei Amiri, F., Pashandi, Z., Lotfibakhshaiesh, N., Mirzaei-Parsa, M.J., Ghanbari, H. and Faridi-Majidi, R., 2021. Cell attachment effects of collagen nanoparticles on crosslinked electrospun nanofibers. *The International Journal of Artificial Organs*. 44(3): 199-207.
 35. Ilomuanya, M.O., Adebona, A.C., Wang, W., Sowemimo, A., Eziegbo, C.L. and Silva, B.O., 2020. Development and characterization of collagen-based electrospun scaffolds containing silver sulphadiazine and *Aspalathus linearis* extract for potential wound healing applications. *SN Applied Sciences*. 2: 1-13.
 36. Nezari, S., Sarli, M., Hivechi, A., Bahrami, H., Milan, P.B. and Latifi, N., 2023. Investigating the effect of poly (ϵ -caprolactone) nanofibers scaffolds with random, unidirectionally, and radially aligned morphologies on the Fibroblast cell? s attachment and growth behavior. *Turkish Journal of Chemistry*. 47(1): 54-62.
 37. Hivechi, A., Joghataei, M.T., Bahrami, S.H., Milan, P.B., Amoupour, M. and Latifi, N., 2023. Oxidized carboxymethyl cellulose/gelatin in situ gelling hydrogel for accelerated diabetic wound healing: Synthesis, characterization, and in vivo investigations. *International Journal of Biological Macromolecules*. 125-127.
 38. Jafari, H., Lista, A., Siekapen, M.M., Ghaffari Bohlouli, P., Nie, L. and Alimoradi, H., 2020. Fish collagen: Extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering. *Polymers*. 12(10): 2230.
 39. Fengxiang, Z., Anning, W., Zhihua, L., Shengwen, H. and Lijun, S., 2011. Preparation and characterisation of collagen from freshwater fish scales. *Food and Nutrition Sciences*. 2(8). doi: 10.4236/fns.2011.28112
 40. Ogawa, M., Moody, M.W., Portier, R.J., Bell, J., Schexnayder, M.A. and Losso, J.N., 2003. Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. *Journal of Agricultural and food Chemistry*. 51(27): 8088-8092.
 41. Wang, J., Pei, X., Liu, H. and Zhou, D., 2018. Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *International Journal of Biological Macromolecules*. 106: 544-550.
 42. Zhang, M., Liu, W. and Li, G., 2009. Isolation and characterisation of collagens from the skin of largescale longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). *Food chemistry*. 115(3): 826-831.
 43. Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R. and Hong, B., 2016. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT-Food Science and Technology*. 66: 453-459.
 44. Veeruraj, A., Arumugam, M. and Balasubramanian, T., 2013. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process biochemistry*. 48(10): 1592-1602.
 45. Silva, T.H., Moreira-Silva, J., Marques, A.L., Domingues, A., Bayon, Y. and Reis, R.L., 2014. Marine

59. **Krismariono, A., Wiyono, N. and Prahasanti, C., 2020.** Viability test of fish scales collagen from *Oshphronemus gouramy* on osteoblast cell culture. *Journal of International Dental and Medical Research*. 13(2): 412-416.
60. **Birgit, H., Anne, B., Sascha, H., Ines, S., Michael, M. and Michael, G., 2012.** Biomimetically Mineralized Salmon Collagen Scaffolds for Application in Bone Tissue Engineering. *Biomacromolecules*. 13(4): 1059-1066.
61. **Kawase, T., Okuda, K., Kogami, H., Nakayama, H., Nagata, M. and Yoshie, H., 2010.** Osteogenic activity of human periosteal sheets cultured on salmon collagen coated ePTFE meshes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 21: 731-739.
62. **Elmi, F., Elmi, M.M. and Amiri, F.N., 2017.** Thermodynamic parameters and influence of kinetic factors on the self-assembly of acid-soluble collagen nanofibrils. *Food Biophysics*. 12: 365-373.
63. **Xu, S., Yang, H., Shen, L. and Li, G., 2017.** Purity and yield of collagen extracted from southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) skin through improved pretreatment methods. *International journal of food properties*. 20(1): S141-S153.
64. **Oslan, S.N.H., Shapawi, R., Mokhtar, R.A.M., Noordin, W.N.M. and Huda, N., 2022.** Characterization of acid-and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of purple-spotted bigeye snapper. *Gels*. 8(10): 665.
65. **Jamilah, B., Hartina, M.U., Hashim, D.M. and Sazili, A., 2013.** Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin. *International food research journal*. 20(2).