فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال هفتم، شماره اول، بهار ۱۳۹۸

مقاله پژوهشی

طراحی و ساخت سامانه هورمونی $LHRH-A_2$ در مقیاس نانو به صورت آهسته‌رهش و کاربرد آن در آبزیان

مهرناز نوری[۱]، بهرام فلاحتکار[۲]*، شاداب شهسواری[۳]

تاریخ دریافت: آذر ۹۵ تاریخ پذیرش: مرداد ۹۶

چکیده

هدف از این پژوهش تهیه سامانه آزادسازی هورمون بر پایه نانو است. در این مطالعه از پلیمر طبیعی کیتوزان برای ساخت نانوذرات و از $LHRH-A_2$ به عنوان هورمون مورد نیاز برای تکثیر مصنوعی ماهیان مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه نانوذرات از روش ژل شدن یونی استفاده شد. عوامل بررسی شده برای تعیین اندازه ذرات با استفاده از روش آماری دی‌اپتیمال تنظیم شد که شامل غلظت‌های مختلف هورمون، نسبت غلظت کیتوزان به تری‌پلی‌فسفات و pH محلول هورمون-کیتوزان بود. ریخت‌شناسی، بررسی اندازه و ساختار تشکیل دهنده، تشخیص مقاومت حرارتی و وزن‌سنجی حرارتی ذارت نانو انجام شد. اندازه بهینه نانوذرات ۱۰۸ نانومتر، پتانسل زتا ۱۶/۲ میکرو ولت، شاخص توزیع اندازه ذرات بهینه ۰/۲۷۴ تعیین شد. همچنین بررسی رهایش هورمون $LHRH-A_2$ از نانوذرات در محیط آزمایشگاه مقدار ۸۰/۱۴ درصد در طول ۴۸ ساعت را نشان داد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره، نانوذرات را با اندازه کوچک و ساختار کروی جدا از یکدیگر نشان داد. همچنین این سامانه دارای پایداری حرارتی بالا تا ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد بود که با توجه به عدم آزاد شدن سریع و ناگهانی می‌تواند به عنوان حاملی مناسب برای سامانه آهسته‌رهش هورمون‌رسانی در القای تکثیر گونه‌های مختلف ماهی از جمله ماهیان خاویاری از طریق تزریق به کار گرفته شود.

واژگان کلیدی: *$LHRH-A_2$، نانوکیتوزان، سیستم آهسته‌رهش، هورمون، رسیدگی جنسی.*

۱- کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
۲- استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
۳- استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.
* نویسنده مسئول: falahatkar@guilan.ac.ir

مقدمه

مطالعه غدد درون‌ریز و متابولیسم بر روی مهره‌داران از دهه ۱۹۵۰ سیر صعودی خود را طی کرده و تاثیر هورمون‌ها در رفتارهای تولیدمثلی در چند دهه اخیر مورد توجه خاص قرار گرفته است. در دهه ۱۹۲۰ تنها انگیزه مطالعه هورمون‌ها در ماهیان به تهیه انسولین از آن‌ها معطوف بود، ولی در حال حاضر اهمیت پرداختن به علم شناخت غدد درون‌ریز و متابولیسم ماهی‌ها در روند تکثیر و پرورش، کنترل تولیدمثل و تناوب نسل آبزیان به نحو مطلوبی جایگاه خود را یافته است (Matty, 1985). به این ترتیب، کسب دانش در رابطه با نوسانات هورمون‌های موثر در روند تولیدمثل در محیط‌های طبیعی، زمینه فراهم آوردن اطلاعات اولیه به منظور استفاده بهینه از این علم در جهت تکثیر و پرورش آبزیان را ایجاد می‌کند.

یکی از روش‌های کنترل تولیدمثل در آبزیان که پژوهشگران بسیار به آن توجه کرده‌اند و در برنامه کاری بسیاری از آن‌ها قرار گرفته است، استفاده از هورمون‌ها به منظور تکثیر مصنوعی ماهیان است. همچنین نوع هورمون‌ها، پروتکل‌های استفاده از آن‌ها و روش به دست آوردن گامت بسته به زیست‌شناسی تولیدمثل هر گونه متفاوت است. دست‌یابی کامل به کنترل غدد درون‌ریز و در نهایت، بلوغ نهایی و تخمریزی در ماهیان حائز اهمیت است و باعث مدیریت مناسب و درخور در بسیاری از گونه‌ها می‌شود (Mylonas and Zohar, 2001).

کنترل تولیدمثل در محیط اسارت در تولید آبزی‌پروری تجاری بسیار ضروری است. دستکاری در دوره نوری و دمای آب یا موارد دیگر باعث تسریع در تولیدمثل و بلوغ در بسیاری از ماهی‌ها می‌شود. چرخه تولیدمثل در ماهی‌ها به گامتوژنزیز و مرحله رسیدگی نهایی تفکیک می‌شود که هر دو به وسیله هورمون‌های تولیدمثلی در محور مغز- هیپوفیز- گناد کنترل می‌شوند. در تکثیر مصنوعی، رسیدگی نهایی اووسیت و اسپرم نیازمند هورمون‌های بیرونی است که استفاده از این هورمون‌ها یکی از راه‌های تولید تخم لقاح یافته محسوب می‌شود (Mylonas et al., 2010).

یکی از انواع هورمون‌هایی که برای القای تخمریزی ماهیان استفاده می‌شود Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) است. به دلیل تاثیر و

اهمیت این هورمون در سال ۱۹۷۳، LHRH به صورت مصنوعی ساخته شد. در سال ۱۹۷۵ با تغییر ششمین و دهمین آمینواسیدهای LHRH مصنوعی، آنالوگ آن ساخته شد (LHRH-A) که دارای آمینواسیدهای اسید پیروگلوتامیک، هیستیدین، تریپتوفان، سرین، تیروزین، دی آلانین، لوسین، آرژنین، پرولین و استیل آمین است. هورمون LHRH-A بسیار ارزان‌تر از LHRH تهیه می‌شود و اثرگذاری آن‌ها بر روی ماهیان یکصد برابر بیشتر از هورمون LHRH است (نظری، ۱۳۷۵). این هورمون نقش به سزایی بر روی هورمون‌های موثر در رسیدگی دارد که می‌تواند باعث موفقیت در رسیدگی نهایی و تخمریزی در ماهیان ماده شود (Nazari et al., 2010). از روش‌های مورد استفاده این هورمون تزریق یا ایمپلنت آهسته‌رهش است که بر روی زمان تخمریزی اثر دارد (Duncan et al., 2003) همچنین، غلظت مناسبی از LHRH-A در سیستم‌های تحویل آهسته‌رهش نشان داده است که می‌تواند باعث موفقیت و تحریک توسعه گنادها، کاهش استرس ناشی از چندین بار دستکاری و آماده شدن ماهی برای رسیدگی شود (Amini et al., 2012).

سامانه‌های تزریقی آهسته‌رهش به دلیل امتیازاتی از جمله کاربرد ساده، دارورسانی موضعی به نحو موثر، دوره طولانی مدت دارورسانی، کاهش دوز مصرفی دارو، کاهش مقدار آثار جانبی، پذیرش راحت در بدن، مدت زمان ماندگاری بیشتر در خون و همچنین دریافت دارو با کیفیت و دقت بیشتر، نسبت به سامانه‌های دیگر بسیار مورد اهمیت و توجه هستند (فرخزاد و همکاران، ۱۳۸۸). استفاده سیستم‌های دارورسانی نانوذرات یک استراتژی مناسب و امیدوار کننده در صنعت دارویی است و به نظر می‌رسد مزایای آن‌ها بیشتر از سیستم‌های دارورسانی معمولی و متداول باشد (Kumari et al., 2010). تهیه نانوذرات به عنوان حامل، یکی از زمینه‌های پژوهشی مورد توجه در سامانه‌های نوین دارورسانی است و انتخاب یک نانوذره به نحوی‌که با بدن موجود زنده سازگاری مناسبی داشته باشد و برای آن مضر نباشد، ضروری است. بدین منظور، باید در تهیه این نانوذرات از موادی استفاده شود که در بدن زیست‌تخریب‌پذیر باشند و پس از انجام عمل دارورسانی تجزیه شوند و بدون داشتن اثر جانبی مضر از بین بروند. پلیمر طبیعی کیتوزان یکی از مناسب‌ترین موادی است که تاکنون برای این منظور شناسایی و مطالعه

شده است. کیتوزان یک زیست‌پلیمر خطی است که توسط خرچنگ‌ها، میگوها، ماهی‌های مرکب و برخی مخمرها تولید می‌شود. این پلیمر از دسته پلیمرهای چند کاتیونی دارای گروه‌های آمین محلول در آب است که توانایی باز کردن موقتی اتصالات محکم را دارد (Felt et al., 1999). این ماده به عنوان یک آمینو پلی‌ساکارید طبیعی، دارای ساختمان بی‌نظیر و قابلیت‌های چند منظوره است و به طور وسیعی در زمینه دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله ویژگی‌های بارز این ماده می‌توان به سازگاری زیستی بالا، زیست‌تخریب‌پذیری قابل قبول در کنار سمیت پایین، همچنین خواص ضدمیکروبی و ضدحساسیت اشاره کرد (Kas,1997; Ilium, 1998; Kurita, 1998; Hirano, 1999; Kurita, 2006; Jayakumar et al., 2007; Mourya and Inamdar, 2008; Rinaudo, 2008). کیتوزان از راه واکنش استیل زدایی کیتین که دومین زیست‌پلیمر از نظر فراوانی در طبیعت است، به دست می‌آید. کیتوزان علاوه بر گروه‌های هیدروکسیل دارای گروه‌های آمین آزاد است که می‌تواند منجر به تولید مشتقات مختلف از آن شود (Ilium, 1998; Felt et al., 1998).

در ساخت داروها از ترکیبات نانوذرات به منظور کاهش سمیت و مضرات و همچنین اثرات جانبی داروها استفاده می‌کنند. رهایش دارو از نانوذرات به تخریب‌پذیری پلیمر وابسته است که به وسیله طبیعت ترکیب پلیمری و وزن مولکولی کنترل می‌شود. با توجه به این که ماهی‌هایی که در اسارت پرورش می‌یابند، در باروری و تخمریزی اختلالاتی را نشان می‌دهند (Zohar and Mylonas, 2001) و این امر باعث عدم موفقیت در بازده مناسب تولید تخم می‌شود، به همین منظور باید روش‌هایی مورد استفاده قرار گیرد تا باعث القای رسیدگی جنسی در ماهیان شوند. در برخی مولدین ماده، تحت شرایط پرورشی، رسیدگی نهایی اووسیت و به تبع آن جدا شدن اووسیت‌ها از همدیگر (اوولاسیون) و تخمریزی دیده نمی‌شود (Zohar, 1989). در مولدین نر نیز تحت این شرایط حجم اسپرم (مایع منی) کم می‌شود و کیفیت آن کاهش می‌یابد (Billard et al., 1995).

نوع هورمون‌ها، پروتکل‌های استفاده از آن‌ها و روش استحصال گامت بسته به نوع تولیدمثل هر گونه متفارت است و دستیابی کامل به کنترل غدد درون‌ریز و در نهایت، بلوغ نهایی و تخمریزی ضروری است و باعث

مدیریت مناسب در مولدین بسیاری از گونه‌ها می‌شود (Mylonas and Zohar, 2001).

از سیستم‌های انتقال دارو (Drug Delivery Systems) به منظور بهبود خواص دارویی و درمانی داروها استفاده می‌شود و غالبا به صورت یک مخزن، دارو را درون خود نگه می‌دارند. این سیستم‌ها دارو را به مقدار معین و در محل خاص آزاد می‌کنند و در نتیجه بر متابولیسم توزیع دارو در بدن موجود زنده موثر هستند و نسبت به سامانه‌های دیگر بسیار مورد اهمیت و توجه هستند (Farrokhzad et al., 2010). بنابراین مطالعه حاضر به منظور تهیه سامانه نانوکیتوزانی- هورمونی $LHRH-A_2$ به عنوان سیستمی آهسته‌رهش برای انجام هورمون‌رسانی و راهکاری مناسب جهت ارتقای کیفیت تکثیر مصنوعی ماهیان انجام شده است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش که در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام گرفت، از عصاره غده هیپوفیز کپور (Carp Pituitary Extract, CPE) به عنوان هورمون و از کیتوزان با وزن مولکولی ۷۰ کیلودالتون و درجه استیلاسیون ۹۵ درصد (Sigma Aldrich، آمریکا) به عنوان حامل هورمون استفاده شد. غلظت نانوکیتوزان، تری‌پلی‌فسفات (Fluka، آمریکا) و کلرید طلا (Sigma Aldrich، آمریکا) متغیرهای آزمایش در نظر گرفته شدند. به منظور سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون نانوذرات به دست آمده از کیتوزان، سانتریفیوژ (Hettich، آلمان) و برای خشک کردن نانوذرات به دست آمده فریزدرایر (Dorsatech، ایران) به کار گرفته شدند. دستگاه تفرق نور دینامیک (Zetasizer PSS0012-22، Malvern، انگلستان) برای اندازه‌گیری متوسط اندازه نانوذرات، شاخص پراکندگی (Poly Dispersity Index; PDI) و اندازه بار ذرات استفاده شد. برای بررسی مورفولوژی نانوذرات به دست آمده میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) (VEGAII، TESCAN، چک) و ساختار تشکیل دهنده نانوذرات از طیف‌سنجی مادون قرمز با دستگاه اسپکتروفتومتر (Nicolet، آمریکا) و همچنین برای بررسی رهایش هورمون از کیسه دیالیز با اندازه ۱۲ کیلودالتون (SigmaAldrich، آمریکا) به کار گرفته شد.

طراحی آزمایش

آنالیز آماری بر پایه سطح پاسخ دی‌اپتیمال جهت ایجاد مناسب‌ترین مدل برای پیش‌بینی اندازه ذرات مورد استفاده قرار گرفت. طراحی آزمایش برای بررسی تاثیرات سه متغیر مستقل شامل غلظت محلول کیتوزان (CS Concentration)، غلظت محلول تری‌پلی‌فسفات (TPP Concentration) و غلظت محلول کلرواوریک اسید ($HAuCl_4$ Concentration) بر روی متغیرهای وابسته مانند اندازه ذرات، پتانسیل زتا، شاخص توزیع اندازه ذرات و درصد میزان داروی بارگذاری شده در سه سطح (جدول ۱) از طریق نرم‌افزار Design of Experiment و بر اساس آرایه دی‌اپتیمال به کار برده شد (جدول ۲) و بهینه‌سازی از راه سطح پاسخ در ۱۷ آزمایش دارویی مورد آزمون و خطا انجام گرفت. هر کدام از آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و در هر بار اندازه نانوذرات تعیین و سپس مقدار بهینه در ۱۷ آزمایش مشخص شد (جدول ۳).

تشکیل نانوذرات کیتوزان

تهیه نانوذرات کیتوزان با استفاده از روش ژل شدن یونی

در این مطالعه نانوذرات کیتوزان با استفاده از روش ژل شدن یونی (Ionic Gelation) تهیه شدند و اثر متغیرهای فرآیند بر اندازه نانوذرات بررسی شد. بر این اساس ابتدا نانوذرات کیتوزان طبق روش ژل شدن یونی کیتوزان با سدیم یون‌های سدیم تری‌پلی‌فسفات که گزارش شده است، تهیه شد (Fan et al., 2012). بر این اساس محلولی با غلظت ۰/۱mg/mL از کیتوزان در استیک اسید ٪۲ و محلولی با غلظت ۰/۵۵mg/mL سدیم از تری‌پلی‌فسفات ساخته شد (Fernandez-Urrusuno et al., 1999). سپس محلول تری‌پلی‌فسفات به شکل قطره قطره به محلول کیتوزان در حضور تووین ۸۰ (برای جلوگیری از حالت توده شدگی) اضافه شد و با همزن مغناطیسی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ایجاد پیوند هم زده شد. در نتیجه یک محلول کلوئیدی به دست آمد. نانوسوسپانسیون‌های کلوئیدی به مدت ۴۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. این

جدول ۱: سطوح متغیرهای فرآیند نانوذرات در نرم‌افزار Design of Experiment

متغیرهای مستقل	محدوده سطوح
غلظت محلول کیتوزان (mg/mL)	۰/۱-۲
غلظت تری‌پلی‌فسفات (mg/mL)	۰/۱-۱
غلظت محلول کلرو اوریک اسید (mg/mL)	۰/۵-۲
اندازه ذرات (nm)	حداقل
پتانسیل زتا (μV)	۲۰-۳۰
شاخص توزیع اندازه ذرات	حداکثر
درصد میزان هورمون بارگذاری شده	حداکثر

جدول ۲: طراحی آزمایش‌ها برای تهیه نانوذرات کیتوزان براساس آرایه دی‌اپتیمال

آزمایش	غلظت کیتوزان (mg/mL)	تری‌پلی‌فسفات (mg/mL)	کلرواوریک اسید (mg/mL)
۱	۰/۰۲	۰/۱۰	۰/۵۰
۲	۰/۰۳	۰/۵۵	۰/۵۰
۳	۰/۰۲	۱/۰۰	۲/۰۰
۴	۰/۰۲	۰/۵۵	۱/۲۵
۵	۰/۰۳	۱/۰۰	۱/۲۵
۶	۰/۰	۰/۵۵	۱/۲۵
۷	۰/۰۱	۰/۵۵	۲/۰۰
۸	۰/۰۲	۰/۵۵	۱/۲۵
۹	۰/۰۳	۰/۱۰	۱/۲۵
۱۰	۰/۰۱	۰/۵۵	۰/۵۰
۱۱	۰/۰۱	۱/۰۰	۱/۲۵
۱۲	۰/۰۲	۰/۱۰	۲/۰۰
۱۳	۰/۰۲	۰/۵۵	۱/۲۵
۱۴	۰/۰۲	۱/۰۰	۰/۵۰
۱۵	۰/۰۲	۰/۵۵	۱/۲۵
۱۶	۰/۰۱	۰/۱۰	۱/۲۵
۱۷	۰/۰۳	۰/۵۵	۲/۰۰

جدول ۳: مقدار بهینه غلظت مواد مورد استفاده برای آزمایش نهایی تولید نانوذرات کیتوزان- هورمون $LHRH-A_2$

محلول‌ها	غلظت (mg/mL)
کیتوزان	۰/۱۰
تری‌پلی‌فسفات	۰/۵۵
کلرواوریک اسید	۰/۵۰

ذرات جدا شده برای بررسی اندازه و شکل دوباره به حالت سوسپانسیون تبدیل شدند و محلول نانوذرات ایجاد شده با استفاده از دستگاه فریزدرایر لیوفیلیزه شد (شهسواری و همکاران، ۱۳۹۳).

ساخت ذرات نانوکیتوزان طلایی

ساخت ذرات نانوکیتوزان طلایی به روش Turkevich (۱۹۸۵) که از طریق اضافه کردن کلرواوریک اسید (کلرید طلا) به محلول کیتوزان بود، به دست آمد. در ادامه محلول به دست آمده در دمای ۸۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد حرارت و با شوکر مغناطیسی تکان داده شد تا محلول قرمز یاقوتی به دست آید (Turkevich, 1985).

اضافه کردن هورمون به نانوذرات

برای این که ذرات نانوکیتوزان با هورمون $LHRH-A_2$ (Luteinizing Hormone Releasing Hormone Analogue II، Ningbo، چین) به خوبی ترکیب شوند فرآیند هموژنیزه کردن تحت فشار بالا صورت گرفت. برای این منظور غلظت ۴mg/kg هورمون در آب مقطر به صورت محلول درآمد. سپس کل محلول به دست آمده به کیتوزان طلایی اضافه شد. بعد از هم زدن محلول با همزن مغناطیسی در سرعت ۴۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه، محلول به دست آمده در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Calvo et al., 1997). در ادامه و بعد از یک روز، محلول به دست آمده دوباره با شتاب ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع روی ذرات ته نشین شده به وسیله نمونه‌گیر برداشته شد و سپس مقدار هورمون $LHRH-A_2$ توسط دستگاه طیف‌سنج (اسپکتروفتومتر) اشعه ماورا

بنفش در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (and Bassler, 1962 Silverstein).

اندازه‌گیری ابعاد، پتانسیل زتا، پایداری و بررسی‌شکل نانوذرات

تعیین اندازه و پتاسیل زتای نانوذرات با استفاده از دستگاه پراکنش نور دینامیک انجام شد. محلول‌ها در سلول آنالیز قرار داده شدند و آزمایش با زاویه تشخیص ۹۰ درجه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. این آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و اندازه نانوذرات مشخص شد (شهسواری و همکاران، ۱۳۹۳).

برای بررسی شکل‌شناسی نانوذرات، از میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده شد. نانوذرات با استفاده از نوار دو پهلو روی پایه فلزی مخصوصی جای گرفتند و با یک لایه نازک از طلا تحت شرایط خلا پوشش داده شدند. در این حالت به وسیله ردیابی الکترون‌های ثانویه ساطع شده از نمونه، تصویر نانوذرات گزارش شد (دوستگانی و همکاران، ۱۳۸۶).

برای اندازه‌گیری مقدار هورمون آزاد موجود در محلول، نانوسوسپانسیون برای مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ شد. بعد از آن مایع روی ذرات ته نشین شده به وسیله نمونه‌گیر جدا شد و مقدار هورمون آزاد موجود در آن توسط دستگاه طیف‌سنجی اشعه ماورا بنفش (اسپکتروفتومتر) در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Silverstein and Bassler, 1962).

برای بررسی ساختار تشکیل دهنده نانوذرات در این محلول از طیف‌سنجی مادون قرمز با دستگاه اسپکتروفتومتر شد. قرص مورد استفاده در دستگاه به صورت مخلوط کردن نمونه آماده شده با پتاسیم بروماید در فشار ۵۰۰ اتمسفر آماده و سپس اسکن شد (Silverstein andBassler, 1962).

مطالعه نحوه آزادسازی هورمون در محیط in vitro

برای بررسی رهایش هورمون در محیط ۲ میلی‌گرم از رسوبات لیوفیلیزه حاصل از نانوذرات پلیمر- هورمون در یک کیسه دیالیز با وزن ۱۲ کیلودالتون ریخته شد. سپس کیسه دیالیز در حجم مشخصی از محلول بافر فسفات قرار داده شد. بشر حاوی محلول بافر فسفات و کیسه دیالیز داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در فواصل زمانی معین شامل ۱، ۲، ۴، ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت، ۲ میلی‌لیتر از محلول محیط رهایش به عنوان نمونه برداشته و با بافر تازه جانشین شد. سپس

نمونه‌های برداشته شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر برای تعیین مقدار هورمون آزاد شده بررسی شدند (Sadeghi et al., 2013).

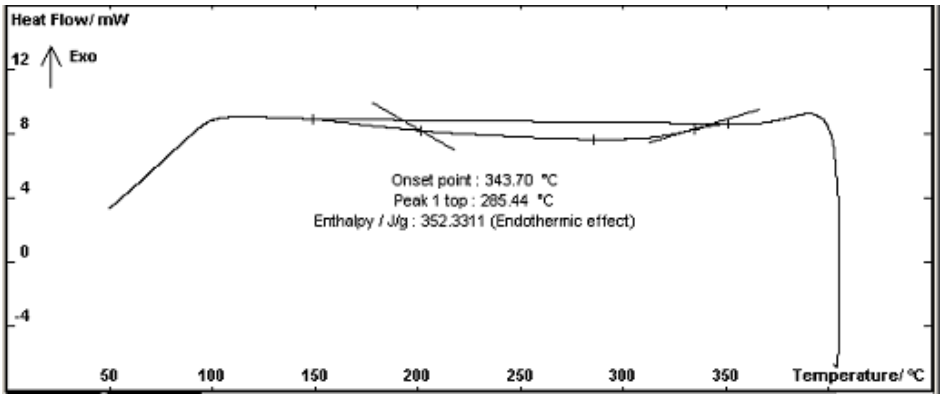
نتایج

تعیین اندازه ذره و پتاسیل زتای نانوذرات

نتایج نشان داد اندازه بهینه نانوذرات کیتوزان ۱۰۸ نانومتر، پتانسیل زتای ۱۶/۲ میکرو ولت، شاخص پراکندگی بهینه به دست آمده برابر با ۰/۲۷۴ بود.

وزن‌سنجی حرارتی

نتایج منحنی وزن‌سنجی حرارتی (DSC) نشان داد نانوذرات کیتوزان- هورمون در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد دارای دو پیک گرماگیر بودند. منحنی DSC این نانوذره پایداری خوب حرارتی تا ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد که دمای ذوب نانوذره است را نشان داد (شکل ۱).



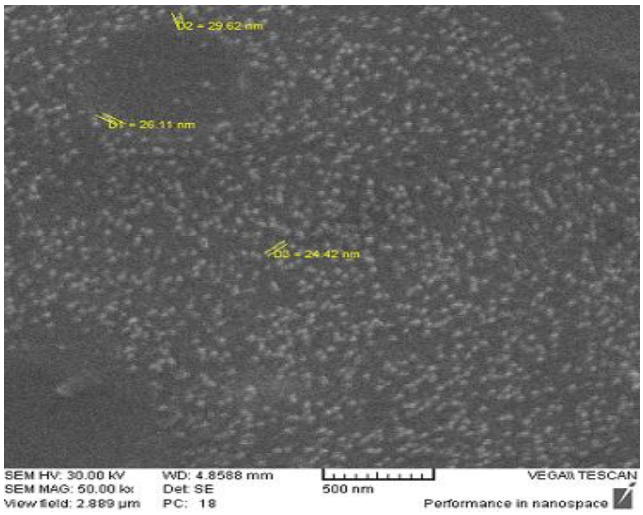
شکل ۱: آنالیز پایداری حرارتی نانوذرات کیتوزان- هورمون $LHRH-A_2$

بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره

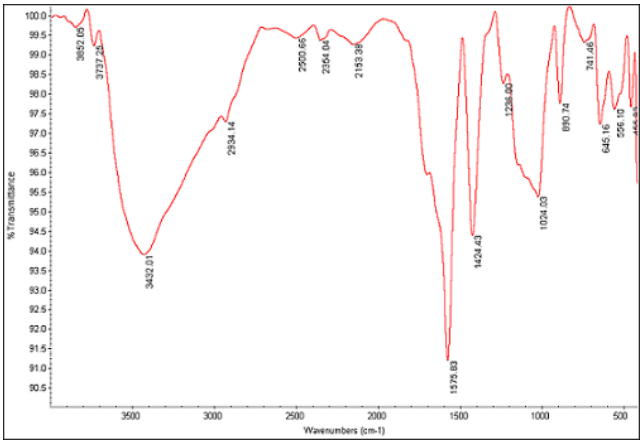
تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) به دست آمده از نمونه بهینه شده نشان داد نانوذرات کیتوزان-هورمون دارای یک ساختار فشرده سخت با شکل کروی صاف بودند و همان طور که در شکل ۲ دیده می‌شود اندازه سه نانوذره به صورت تصادفی مشخص شد که دارای ابعاد ۲۹/۶۲ نانومتر، ۲۶/۱۱ نانومتر و ۲۴/۴۲ نانومتر بودند، همچنین نانوذرات کروی به خوبی قابل شناسایی هستند (شکل ۲).

طیف‌سنجی مادون قرمز

جذب پهن در ناحیه cm^{-1} ۳۴۳۲ (از ۳۲۰۰ تا ۳۶۰۰) در شکل ۳ مربوط به ارتعاشات کششی گروه اسیدی آمینواسیدهایی است که طیف جذبی عامل آمینی و الکلی را پوشانده است. ارتعاش کششی گروه C-H آلیفاتیک در ناحیه ۲۹۳۴ ظاهر شد. از ناحیه ۲۱۰۰ تا ۲۵۰۰ ارتعاشات مربوط به هارمونی حلقه بنزن است. پیک شارپی در ناحیه ۱۵۷۵ ظاهر شده است که مربوط به گروه کربونیل C=O آمیدی و پیک موجود در ناحیه ۱۴۲۴ مربوط به پیوند C-N در کیتوزان است. پیک پهنی که در ناحیه ۱۰۲۴ تا ۱۲۳۴ مربوط به پیوندهای C-O اپوکسی (C-O-C) و پیوندهای C-O الکوکسی و پیک‌های ظاهر شده در ناحیه ۶۴۵ و ۷۴۱ مربوط به ارتعاشات خمشی پیوندهای C-H حلقه آروماتیک بنزن دو استخلافی است. با توجه به شکل ۳، پیک جدید حاصل از اتصال بین گروه هیدروکسیل هورمون و گروه آمینو کیتوزان قابل رویت است.



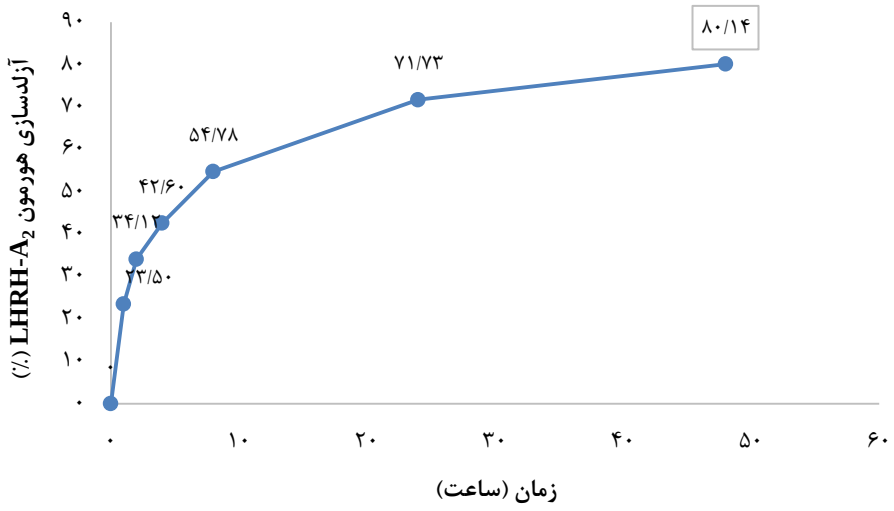
شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره نانوذرات کیتوزان- هورمون $LHRH-A_2$



شکل ۳: طیف سنجی مادون قرمز نانوذرات کیتوزان حاوی هورمون $LHRH-A_2$

نحوه آزادسازی هورمون در محیط in vitro

در این بررسی رهایش هورمون از نانوذرات کیتوزان بهینه شده در طی ۴۸ ساعت مورد مطالعه قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود ابتدای نمودار عدم آزادسازی سریع هورمون از نانوذرات کیتوزان را نشان می‌دهد و همچنین بیشترین آزادسازی هورمون از نانوذرات، ۸۰/۱۴ درصد در ۴۸ ساعت بود.



شکل ۴: درصد آزادسازی هورمون $LHRH-A_2$ از نانوذرات کیتوزان نسبت به زمان

بحث

در مطالعه حاضر سامانه نوین هورمون‌رسانی بر پایه نانوذرات کیتوزان-هورمون $LHRH-A_2$ ساخته شد و پس از آزمایش، نتایج بهینه برای ادامه کار مورد استفاده قرار گرفت. برای مشخص شدن بهینه نانوذرات از آرایه دی‌اپتیمال استفاده شد. سپس متغیرهای وابسته شامل اندازه ذرات، پتانسیل زتا، شاخص توزیع اندازه ذرات و درصد میزان هورمون بارگذاری شده اندازه‌گیری شدند. نتایج بهینه، اندازه نانوذرات ۱۰۸ نانومتر، پتانسیل زتا ۱۶/۲ میکرو ولت و شاخص توزیع اندازه ذرات برابر با ۰/۲۷۴ و میزان هورمون بارگذاری شده ۸۵ درصد را نشان داد. مطالعه رهایش هورمون از نانوذرات صورت گرفت و عدم هر گونه رهایش انفجاری را نشان داد که نشان دهنده برهم‌کنش مناسب بین ذرات است. ویژگی ریخت‌شناسی نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانوذرات کیتوزان-هورمون دارای یک ساختار فشرده سخت با شکل کروی صاف هستند.

کوچک بودن نانوذرات به عنوان حاملی مناسب توسط دوستگانی و همکاران (۱۳۸۶) بررسی شد و به نتایج مشابهی دست یافتند. در این بررسی که بر روی تعیین شرایط بهینه تهیه نانوذرات از پلیمر طبیعی کیتوزان انجام شد، آن‌ها نشان دادند که شرایط بهینه برای تهیه نانوذراتی با ابعاد کمتر از ۲۰۰ نانومتر عبارت از غلظت ۱mg/mL محلول کیتوزان در pH ۵، نسبت ۳ به ۱ مقدار کیتوزان به سدیم تری‌پلی‌فسفات و وزن مولکولی برابر با ۲۰۰۰۰۰ دالتون بود. متوسط اندازه نانوذرات تهیه شده در شرایط بهینه در حدود ۱۵۰ نانومتر بود که با توجه به این که نانوذرات مصرفی در کاربردهای دارویی هر قدر کوچک‌تر باشند (کمتر از ۲۰۰ نانومتر) مناسب‌تر هستند، بنابراین نانوذرات کیتوزان تهیه شده در شرایط بهینه می‌تواند به عنوان حاملی مناسب برای مصارف دارورسانی به‌کار روند (دوستگانی و همکاران، ۱۳۸۶). استفاده از نانوذرات کیتوزان در صنعت دارویی توسط اصغری و همکاران (۱۳۹۲) بررسی شد. این مطالعه بر روی بهینه‌سازی نانوذرات کیتوزان انجام شد و نتایج نشان داد که اندازه نانوذرات و پتانسیل زتا را می‌توان با تغییر شرایط، از جمله استفاده از نسبت‌های مختلف وزنی و حجمی کیتوزان و تنظیم pH کنترل کرد و نتایج

مشابه نشان داد که این نانوذرات کیتوزان می‌توانند پتانسیل استفاده در انتقال دارو را به عنوان حامل داشته باشند (اصغری و همکاران، ۱۳۹۲). شهسواری و همکاران (۱۳۹۳) مطالعه‌ای بر روی طراحی و ساخت سامانه دارویی آهسته‌رهش آسیکلوویر در مقیاس نانو انجام دادند و نانوذرات بهینه با مشخصه اندازه ذرات ۳/۲۴±۱۳۲ نانومتر، پتانسیل زتای ۸۷/۲±۳۲ میکرو ولت، شاخص توزیع اندازه ذرات برابر با ۰/۰۵±۰/۱۵۹ و میزان داروی بارگذاری شده ۴/۳۵±۸۵ درصد را به دست آوردند. همچنین مطالعه رهایش آسیکلوویر در محیط آزمایشگاه، میزان ۸۱/۱۷ درصد در طول ۴۸ ساعت را نشان داد که این موضوع حاکی از کارایی و تاثیر بالای داروی مورد استفاده در مدت زمان طولانی‌تر بود و در نهایت نشان داد نانوذرات کیتوزان- آسیکلوویر تهیه شده در شرایط بهینه با اندازه کوچک و ساختار کروی شکل و همچنین پایداری حرارتی بالا می‌توانند به عنوان حاملی مناسب برای مصارف دارورسانی به کار روند (شهسواری و همکاران، ۱۳۹۳). در مطالعه حاضر نیز مشخص شد رهش آهسته هورمون تا ۴۸ ساعت به دلیل بالا بودن مقدار هورمون در زمان طولانی‌تر در خون، می‌تواند بر روی نرخ جواب‌دهی مولدین و کارایی تکثیر اثر بیشتری داشته باشد.

همان طور که ذکر شد یکی از انواع هورمون‌هایی که برای القای تخمریزی ماهیان استفاده می‌شود هورمون $LHRH\text{-}A_2$ است. غلظت مناسبی از این هورمون در سامانه‌های آهسته‌رهش نشان داده است که باعث موفقیت و تحریک توسعه گنادها، کاهش استرس ناشی از چندین بار دست‌کاری و آماده شدن ماهی برای بلوغ می‌شود (Amini et al., 2012). به همین منظور در مطالعه‌ای، نظری و مدانلو (۱۳۸۷) کاربرد هورمون $LHRH\text{-}A_2$ را در تکثیر مصنوعی تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) بررسی کردند. نتایج نشان داد کاربرد هورمون $LHRH\text{-}A_2$ در غلظت‌های ۳/۵، ۷، ۸ و ۱۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهیان مولد ماده، می‌تواند منجر به رسیدگی نهایی و تخمک‌گذاری مولدین شود. نتایج نشان می‌دهد با توجه به کاهش تعداد ماهی صید شده برای استحصال غده هیپوفیز و همچنین کاربرد آسان و کارایی بالای هورمون $LHRH\text{-}A_2$، می‌توان از آن به عنوان یک جایگزین مناسب برای غده هیپوفیز در تکثیر مصنوعی تاس‌ماهی ایرانی استفاده کرد (نظری و مدانلو، ۱۳۸۷). همچنین محمدیان و

همکاران (۱۳۹۳) مقایسه‌ای را بر روی تاثیر تزریق ۳ مرحله‌ای هورمون $LHRH-A_2 + PG$ ($LHRH-A_2$ + عصاره هیپوفیز ماهی کپور معمولی) با تزریق ۲ مرحله عصاره هیپوفیز بر عملکرد تولیدمثلی ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) انجام دادند و نتایج نشان داد که بیشترین نرخ تخمریزی در گروهی که ۸ میکروگرم بر کیلوگرم هورمون $LHRH-A_2$ در تزریق مرحله اول، ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره غده هیپوفیز در مرحله دوم و ۳ میلی‌گرم عصاره غده هیپوفیز در مرحله نهایی دریافت کرده بودند، مشاهده شد. این گروه دارای بالاترین نرخ جواب‌دهی (۹۵ درصد) در مولدین ماده بنی بود، به طوری که نرخ تخمریزی در این گروه با تمام گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت (محمدیان و همکاران، ۱۳۹۳). در مطالعه حاضر نیز از هورمون $LHRH-A_2$ به عنوان هورمونی که می‌تواند باعث موفقیت در رسیدگی نهایی مولدین شود، استفاده شد.

Bayunova و همکاران (۲۰۰۶) با مطالعه بر روی ازون‌برون‌های (*Acipenser stellatus*) پرورشی که به آن‌ها $LHRH-A_2$ تزریق شده بود، دریافتند که میزان تستوسترون ۷ ساعت بعد از تزریق دوم (۱۷ ساعت قبل از تخمک‌گذاری) به بیشینه مقدار خود رسید و میزان آن بعد از تخمک‌گذاری به شدت کاهش یافت. Mylonas و همکاران (۲۰۱۰) با مطالعه بر روی مدیریت مولدین و دستکاری هورمونی در تولیدمثل ماهیان دریافتند که از ویژگی‌های مهم و اصلی که بر روی کیفیت گامت‌ها و در نهایت تخم اثر دارد، انتخاب یک رویه مناسب برای القای تخمریزی در مراحل رشد و نمو غدد جنسی در زمان تزریق هورمون، نوع هورمون مورد استفاده، استرس‌هایی که در آن زمان به ماهیان وارد می‌شود و در مورد کاشت مصنوعی، زمان رسیدگی و یا واکنش بین القای هورمون و رسیدگی ماهیان لازم است. Amini و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی اثر کاشت LHRH-a بر روی رسیدگی نهایی و تخمریزی در مولدین نارس تاس‌ماهی ایرانی به این نتیجه رسیدند که ماده‌های تیمار شده با ایمپلنت هورمونی LHRH-a در مقدارهای ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن باعث رسیدگی نهایی ماهیان می‌شود. طبق نتایج به دست آمده از بررسی‌های ذکر شده، هورمون $LHRH-A_2$ یکی از مناسب‌ترین هورمون‌هایی است که می‌تواند منجر به رسیدگی نهایی و تخمک‌گذاری مولدین شود و در نهایت سبب

ارتقای کمی و کیفی در استحصال و تولید تخم انواع ماهی شود و استفاده از آن به صورت نانوذرات توسط پلیمر کیتوزان امکان استفاده در امر دارو و هورمون‌رسانی را تسهیل می‌کند.

این مطالعه نشان داد که کیتوزان، آمینوپلی‌ساکاریدی طبیعی با عملکردی بالا و زیست‌تخریب‌پذیر است که با استفاده از روش ژل شدن یونی به عنوان روشی سریع و مطمئن برای تهیه نانوذرات از آن می‌توان بهره برد. این نانوذرات به صورت غشا عمل می‌کنند و سبب آهسته شدن رهش می‌شوند. رهش آهسته هورمون $LHRH\text{-}A_2$ در مدت زمان مشخص و به مقدار خاص، در کنترل تولیدمثل ماهیان اثرگذار است و باعث القا در رسیدگی نهایی، تخمک‌گذاری، تولید اسپرم و تخمریزی می‌شود. نتایج نشان داد که تهیه نانوساختارها به عنوان حامل‌هایی برای هورمون‌ها به دلیل کنترل و آهسته کردن رهش هورمون، اندازه ذره‌ای کوچک‌تر از سلول، قابلیت عبور از موانع زیستی جهت رسانش هورمون به محل هدف، افزایش ماندگاری هورمون در جریان خون و زیست‌سازگاری می‌توانند به عنوان یک سیستم بسیار موثر در نظر گرفته شوند که باعث افزایش کارایی هورمون در تکثیر مصنوعی ماهیان می‌شوند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولان و کارکنان محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و ستاد ویژه توسعه فناوری نانو و تمامی همکارانی که در اجرای این پروژه با کمک‌ها و زحمات بی‌دریغ‌شان پشتیبان ما بودند، به خصوص مهندس سکینه ابراهیمی که کمک‌های فراوانی در این پروژه انجام دادند، کمال تشکر را داریم.

منابع

دوستگانی ا.، واشقانی ابراهیمی ا. و ایمانی م. ۱۳۸۶. تعیین شرایط بهینه تهیه نانوذرات از پلیمر طبیعی کیتوزان. مجله علوم و تکنولوژی پلیمر، ۲۰(۵): ۴۶۴-۴۵۷.

شهسواری ش.، عابدین درکوش ف.، واشقانی ا. و ارجمند م. ۱۳۹۳. ساخت و طراحی سامانه دارویی آهسته‌رهش آسیکلوویر در مقیاس نانو. مجله دانش و تندرستی، ۹(۴): ۶۷-۶۰.

فرخ‌زاد ح.، موبدی ح.، برزین ج. و پورخلیل ع. ۱۳۸۸. بررسی اثر غلظت پلیمر بر رهایش داروی داکسی سایکلین هیکلیت از سامانه تشکیل شونده در محل بر پایه پلی (لاکتید- کو- گلیکولید). مجله علوم و تکنولوژی پلیمر، ۲۲(۶): ۵۰۵-۴۹۵.

محمدیان ت.، سیلاوی م.، حسینی ا.، روحانی س.، محمدی ا. و حیدری. ب. ۱۳۹۳. مقایسه تاثیر تزریق ۳ مرحله‌ای هورمون $LHRH-A_2$ + PG) $LHRH-A_2$ + عصاره هیپوفیز ماهی کپور معمولی) با تزریق ۲ مرحله‌ای عصاره هیپوفیز بر عملکرد تولیدمثلی ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*). مجله دامپزشکی ایران، ۱۰(۱): ۹۵-۸۵.

نظری ر. ۱۳۷۵. زیست‌شناسی و تکثیر ماهی کپور نقره‌ای. انتشارات معاونت تکثیر و پرورش آبزیان. ۹۳ص.

نظری ر. و مدانلو م. ۱۳۸۷. بررسی کاربرد هورمون $LHRH-A_2$ در تکثیر مصنوعی تاس‌ماهی ایرانی (قره‌برون). مجله شیلات، ۲(۴): ۳۶-۳۱.

Amini K., Siraj S.S., MojaziAmiri B., Mirhashemi Rostami S.A., Sharr A. and Hossienzadeh H. 2012. Evaluation of LHRH-a acute release implantation on final maturation and spawning in not-fully matured broodstocks of Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897). Iranian Journal of Fisheries Sciences, 11(3): 440–459.

Bayunova L., Canario A.M., Semenkova T., Dybin V., Svordlova D. and Trenkler I. 2006. Sex steroids and cortical levels in the blood of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas) during final maturation induced by LHRH-analogue. Journal of Applied Ichthyology, 22(11): 334–339.

Billard R., Cosson J., Perchec G. and Linhart O. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture, 129(1-4): 95–112.

Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J.L. and Alonso M.J. 1997. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. Journal of

Applied Polymer Science, 63(1): 125–132.

Duncan N.J., Alok D. and Zohar Y. 2003. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRHa on bulls eye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. Aquaculture, 218(1): 625–635.

Fan W., Yan W., Xu Z. and Ni H. 2012. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. Colloids and Surfaces B, 90(1): 21–27.

Farrokhzad H., Mobedi H., Barzin J. and Poorkhalil A. 2010. Evaluation of polymer concentration effect on doxycycline hyclate drug release from in situ forming system based on poly (lactide-co-glycolide). Iranian Journal of Polymer Science and Technology, 22(6): 495–505.

Felt O., Buri P. and Gurny R. 1998. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. Drug Development and Industrial Pharmacy, 24(11): 979–993.

Felt O., Furrer P., Mayer J.M., Plazonnet B., Buri P. and Gurny R. 1999. Topical use of chitosan in ophthalmology: Tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. International Journal of Pharmaceutics, 180(2): 185–193.

Fernandez-Urrusuno R., Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J.L. and Alonso M.J. 1999. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. Pharmaceutical Research, 16(10): 1576–1581.

Hirano S. 1999. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. Polymer International, 48(8): 732–734.

Ilium L. 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharmaceutical Research, 15(9): 1326–1331.

Jayakumar R., Nwe N., Tokura S. and Tamura H. 2007. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. International Journal of Biological Macromolecules, 40(3): 175–181.

Kas H.S. 1997. Chitosan: Properties, preparations and application to microparticulate systems. Journal of Microencapsulation, 14(6): 689–711.

Kumari A., Yadav S.K. and Yadav S.C. 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids and Surfaces B, 75(1): 1–18.

Kurita K. 1998. Chemistry and application of chitin and chitosan. Polymer Degradation and Stability, 59(1): 117–120.

Kurita K. 2006. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from

marine crustaceans. Marine Biotechnology, 8(3): 203–226.

Matty A.L. 1985. Fish Endocrinology. Croom Helm, London. 160P.

Mourya V.K. and Inamdar N.N. 2008. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. Reactive and Functional Polymers, 68(6): 1013–1051.

Mylonas C.C. and Zohar Y. 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 10: 463–491.

Mylonas C.C., Fostier A. and Zanuy S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology, 165(3): 516–534.

Nazari R.M., Modanloo M., Ghomi M.R. and Ovissipor M.R. 2010. Application of synthetic hormone LHRH-A_2 on the artificial propagation of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. Aquaculture International, 18(5): 837–841.

Rinaudo M. 2008. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. Polymer International, 57(3): 397–430.

Sadeghi M., Gudarzi A., Safari S., Shahsavari H. and Sadeghi H. 2013. Characterization and evaluation of semi-IPN hydrogels consisted of pectin and poly (acrylonitrile) for drug delivery systems. Asian Journal of Chemistry, 25(9): 4842–4846.

Silverstein R.M. and Bassler G.C. 1962. Spectrometric identification of organic compounds. Journal of Chemical Education, 39(11): 535–546.

Turkevich J. 1985. Colloidal gold. Part II. Gold Bulletin, 18(4): 125–131.

Zohar Y. 1989. Endocrinology and fish farming: Aspects in reproduction, growth, and smoltification. Fish Physiology and Biochemistry, 7: 395–405.

Zohar Y. and Mylonas C.C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: From hormones to genes. Aquaculture, 197: 99–136.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 7, No. 1, Spring 2019

Research Paper

Design of nanoparticle loaded LHRH-A_2 hormone controlled delivery system for using in aquatics

Mehrnaz Noori[1], Bahram Falahatkar[2]*, Shadab Shahsavari[3]

Received: December 2016 Accepted: August 2017

Abstract

The present study aims to develop a new nanoparticle-based system. The natural polymer chitosan for nanoparticles and luteinizing hormone releasing hormone analogue (LHRH-A_2) were used as a hormone which utilizes for fish artificial propagation. The ionic gelation method was applied to prepare the chitosan nanoparticles. The design in the present study was an experimental D-optimal response-surface method. The variables were the concentration of the hormone, the concentration ratio of chitosan/tripolyphosphate and hormone-chitosan solution pH. The nanoparticles were determined morphologically through the scanning electron microscopy (SEM). In order to check the size, the zeta and PdI particles, dynamic light scattering instrument, and infrared spectroscopy were used. Moreover, regarding the nanoparticles' structure formation and detection of thermal resistance, the differential scanning calorimetry was applied. The results displayed the nanoparticles optimal size was 108 nm, the zeta potential was 16.2µV and the particle size distribution index was 0.274. The result of the in vitro release of the prepared nanoparticles revealed that the percentage of released hormone from the nanochitosan was 80.14% within 48 hours. The SEM image showed the segregated and non-aggregated nanoparticles in sub-spherical smooth morphology. Furthermore, it is revealed that the high thermal stability of hormone nanoparticles at a temperature up to 400°C. This system can be used as a suitable injection carrier for slow-release hormone system in induction of various species of fish such as sturgeons.

Key words: *LHRH-A_2, Nanochitosan, Slow Release System, Hormone, Maturation*.

1- M.Sc. in Aquaculture, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.
2- Professor in Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.
3- Assistant Professor in Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

*Corresponding Author: falahatkar@guilan.ac.ir