

بررسی فعالیت همولیتیک کونوتوکسین های مجرای سم شکمپایان مخروطی خلیج فارس *Conus*

Conus frigidus و *coronatus*

چکیده

کونوتوکسین‌ها، پپتیدهای سمی اگزوکربن هستند که توسط سلول‌های اپیتلیالی مجرای سم شکم پایان مخروطی، سنتز می‌شوند. کونوتوکسین‌ها، نوروتوکسین و یا سیتوتوکسین می‌باشند. نوروتوکسین‌ها، عوامل تسکین‌دهنده درد در مدل‌های حیوانی بوده و سیتوتوکسین‌ها به‌عنوان عوامل ضد توموری معرفی می‌شوند. در این مطالعه فعالیت همولیتیک عصاره کونوتوکسینی دو گونه‌ی *Conus coronatus* و *Conus frigidus* آزمایش شد. نمونه‌برداری در ساحل پارک زیتون قشم، در سال ۱۳۹۳ انجام شد. مجراهای سم جداسازی و با استونیتریل هموژن شدند. مخلوط در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت به‌عنوان عصاره استخراجی بود. پپتیدهای بالا و پایین ده کیلو دالتون، به‌وسیله فیلتر فالكون MWCO ۱۰۰۰۰ میلی پور جداسازی شدند. غلظت‌های سریالی عصاره‌های تام کونوتوکسینی، عصاره‌های بالا و پایین ده کیلو دالتون جهت آزمون همولیتیک روی گلبول‌های قرمز خون انسانی و خون ماهی، در پلیت‌های ۹۶ خانه انجام شد. فعالیت همولیتیک عصاره تام، عصاره‌های بالا و پایین ده کیلو دالتون متفاوت بوده و اثرات لیز کنندگی فقط روی خون انسانی مشاهده گردید. عصاره‌های تام، در غلظت‌های پایین، فعالیت همولیتیکی نداشته و در غلظت معادل ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، درصد همولیتیک خون انسانی، در گونه *C. frigidus* و *C. coronatus* معادل ۶۲ درصد و ۳۸ درصد بود. عصاره‌های بالای ده کیلو دالتون اثرات همولیتیک بیشتری نسبت به عصاره‌های کمتر از ده کیلو دالتون داشتند. اثرات همولیتیک عصاره‌های کونوتوکسینی برحسب نوع خون متفاوت و فعالیت سیتوتوکسین عصاره‌ها در غلظت‌های بالا بود. لذا با توجه به حضور پپتیدهای نوروتوکسین ضد درد در این گونه‌ها، در صورت کاربرد دارویی منجر به آسیب به گلبول‌های قرمز خونی نمی‌شوند.

واژگان کلیدی: کونوتوکسین، شکم پای مخروطی، همولیتیک، *Conus*.

مقدمه

یکی از زمینه‌های پرچنگال فرآورده‌های زیستی فعال در نرم‌تنان، بررسی خواص فارماکولوژیک و فیزیولوژیک سموم شکم پایان مخروطی می‌باشد (Wu et al., 2010; Hu et al., 2011; Violette et al., 2012; Dutertre et al., 2013). بیش از ۴۰۰ مطالعه علمی طی ۳۰ سال گذشته بر روی اهمیت توکسین‌های جداسازی شده از شکم پایان (Cone snails (genus: conus) در پزشکی و زیست‌شناسی سلولی انجام شده است (Heghinian and Mari, 2014). شکم پایان مخروطی، متعلق به سوپر خانواده Conoidea شامل ۸۰۳ گونه شکارچی است (WoRMS, 2014) که دارای اثرات دارویی به دلیل حضور پپتیدهای کوچک ۱۵-۴۰ آمینواسیدی در سمشان می‌باشند (Aman et al., 2015). سائز کوچک کونوتوکسین‌ها (معمولاً کمتر از ۱۰ کیلو دالتون) منجر به سنتز آسان گردیده و پایداری ساختاری و اهداف اختصاصی

حلیمه رجبی^{۱*}

حسین ذوالقرنین^۲

محمد تقی رونق^۳

احمد سواری^۴

محمد شریف رنجبر^۵

۱، ۲، ۳، ۴. گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم

دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی،

خرمشهر، ایران

۵. گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه

هرمزگان، بندرعباس، ایران

*مسئول مکاتبات:

halimeh.rajabi@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۷۰۱۰۵۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۲

کد مقاله: ۱۳۹۷۰۱۰۵۲۲

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.

مولکولی، آن‌ها را ابزار مناسب مطالعات دارویی ساخته است (Eisapoor et al., 2016). بسیاری از این گروه‌های پپتیدی، دارای عملکردهای ضد درد هستند. اثرگذاری آن‌ها عمدتاً بر روی کانال‌های یونی کلیدی و یا گیرنده‌های مهم در مسیر درد می‌باشد. از میان کل کونوتوکسین‌های شناخته شده تاکنون، تنها حدود ۵ درصد در بین گونه‌های مختلف شکم پایان مخروطی مشترک هستند و تعداد بسیار اندکی در حدود ۰/۱ درصد از کونوتوکسین‌های شناخته شده از نظر دارویی بررسی شده‌اند (Davise et al., 2009; Lewis et al., 2012).

سم شکم پایان مخروطی در یک لوله طویل سنتز می‌شود که به وسیله حباب ماهیچه‌ای فشرده شده و به شکار از طریق دندان‌های رادولایی عمیق تزریق می‌گردد. این دندان‌ها مشابه سوزن‌های خاردار هستند و به‌طور معمول، دندان‌ها را در بخشی تحت عنوان ساک رادولایی ذخیره می‌شوند (Safavi-Hemami et al., 2011; Aman et al., 2015; Rajabi et al., 2016). شکم پایان مخروطی توانایی شنا کردن ندارند و باوجود این، تعداد قابل توجهی از آن‌ها، از ماهی‌ها تغذیه می‌کنند، در نتیجه حضور چنین ترکیبات سمی قوی با اثرگذاری قوی جهت بی‌حرکتی شکار و تأثیر بر سیستم عصبی شکار لازم است (Aman et al., 2015). این امر ممکن است به واسطه فعالیت همولیتیک یک کونوتوکسین حاصل گردد (Lattore, 1997). فعالیت همولیتیک در گروه گسترده‌ای از حیوانات سمی گزارش شده است و فاکتورهای مختلفی فعالیت همولیتیک را تحت تأثیر قرار می‌دهند. Chung و همکاران (۲۰۰۱) گزارش نمودند که فعالیت همولیتیک در ژله ماهیان به حضور کاتیون‌هایی مانند کلسیم و منیزیم وابسته است و همچنین فعالیت همولیتیک یک سم در زمان خالص‌سازی کاهش می‌یابد.

بسیاری از ترکیبات مستعد دارویی وجود دارند که به دلیل داشتن فعالیت همولیتیک به‌عنوان دارو مورد استفاده قرار نمی‌گیرند. فعالیت همولیتیک، نشان‌دهنده فعالیت سیتوتوکسیک است و بیشتر سیتوتوکسین‌ها دارای پتانسیل قابل توجهی به‌عنوان عوامل ضد سرطان هستند. البته باید توجه داشت که ترکیبات همولیتیک شدید، با لیز کردن گلبول‌های قرمز خون موجب خونریزی شدید و آنمی همولیتیک القاشده با دارو می‌شوند (Iwalewa et al., 2007) و این امر باعث می‌شود که فعالیت همولیتیک بالا کاربرد دارویی را محدود سازد. فعالیت همولیتیک یک سم، از طریق تخریب غشاء گلبول‌های قرمز و آزادسازی هموگلوبین موجب افزایش جذب نور در طول موج ۴۵۰ نانومتر می‌گردد. این افزایش شدت جذب نور می‌تواند به‌عنوان نشانه‌ای از میزان فعالیت لیز کنندگی سم باشد (Ghavami et al., 2008)، علاوه بر این به جهت استفاده عمومی از هر ترکیبی، سمیت آن می‌بایست به کمک روش‌های مختلفی روی رده‌های سلولی مختلف، مورد مطالعه قرار گیرد (Pacor et al., 2002; Biasi et al., 2015) که در این مطالعه از سلول‌های خونی انسانی و سلول‌های خونی ماهی (ماهی شانک: *Acanthopagrus latus*) به دلیل تفاوت ساختاری بین آن‌ها استفاده شد، بارزترین تفاوت ساختاری بین خون انسان و خون ماهی، وجود هسته سلولی در خون ماهی‌هاست که در خون انسانی دیده نمی‌شود؛ که در این تحقیق با توجه به اینکه نیاز به خون تازه هپارینه بوده و ماهی شانک به‌صورت زنده در دسترس بود، از خون این ماهی جهت مقایسه استفاده شد و بررسی فعالیت همولیتیک سم دو گونه از شکم پایان مخروطی روی این دو گروه سلول خونی انجام گردید. از آنجاکه پهنه آبی خلیج فارس از لحاظ تنوع زیستی در جایگاه مهمی قرار دارد، اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه‌ی اثرات توکسین‌های موجود در شکم پایان مخروطی خلیج فارس، انجام نشده است. همچنین علاقه‌مندی جامعه جهانی به این گونه‌ها به دلیل حضور ترکیبات دارویی تسکین‌دهنده درد با قدرتی بیش از مورفین (با توجه به اینکه در عصاره‌های استخراجی این دو گونه، اثرات ضد دردی مشهودی طی مطالعات این گروه مشاهده شده) و تلاش روزافزون جهت یافتن منابع دارویی جدید، از جمله مواردی است که به اهمیت تحقیق حاضر اشاره می‌کند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از ساحل پارک زیتون جزیره قشم (موقعیت جغرافیایی: ۲۶۰۵۵٫۶۳۱ N و ۰۵۶۰۱۵٫۲۰۹ E) و در جزر کامل انجام شد. نمونه‌ها همراه با آب دریا به آزمایشگاه منتقل و در شرایط استریل و روی یخ تشریح شدند. مجراهای سم جداسازی و در ۸۰- قرار داده شدند. برای استخراج

کونوتوکسین‌ها، مجراهای سم در یک میکرو تیوپ و روی یخ قرار گرفتند. سپس به آن‌ها آب مقطر استریل سرد و استونیتریل ۴۰٪، افزوده و به آرامی در دستگاه هموژنایزر Silent crusher, Heidolph ساخت آلمان، در $16000 \times \text{rpm}$ به مدت ۵ دقیقه هموژن شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با دور $10000 \times \text{g}$ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی که حاوی کونوتوکسین‌های مجرای سم بوده به میکرو تیوپ جدید منتقل شد و دوباره به رسوب حاصل استونیتریل خالص افزوده و پس از هموژن کردن، مجدد سانتریفیوژ شده و محلول رویی آن به همان میکرو تیوپ منتقل شد. انجام کار عصاره‌گیری در دو مرحله صرفاً جهت حصول اطمینان از حضور کونوتوکسین‌ها در عصاره تام بوده است. عصاره استخراج‌شده به مدت یک روز در دمای -80°C درجه قرار گرفته و پس از قرارگیری در ازن مایع، در دستگاه فریز درایر مدل Christ 2، α ساخت آلمان، جهت لیوفیلیز قرار گرفت. لیوفیلیز شدن به آرامی و به مدت ۲۴ ساعت، در دمای -56°C و فشار 0.04 اتمسفر انجام شد (Tayo et al, 2011).

سنجش پروتئین کل به روش برادفورد که یک روش تحلیل اسپکتروسکوپی است. انجام گردید. در این روش از محلول کوماسی بلو به‌عنوان معرف استفاده می‌شود. در شرایط اسیدی معرف، پروتئین بارنگ کوماسی بلو باند می‌شود و در نتیجه باعث تغییر رنگ قهوه‌ای معرف (با حداکثر جذب نوری در طول موج ۴۶۵ نانومتر) به رنگ آبی (با حداکثر جذب در ۶۱۰ نانومتر) می‌گردد. بیشترین اختلاف بین دو فرم رنگ کوماسی بلو در ۵۹۵ نانومتر بوده لذا طول موج بهینه برای اندازه‌گیری رنگ آبی در کمپلکس رنگ کوماسی-پروتئین است. تعداد مولکول‌های رنگی که به یک مولکول پروتئینی متصل می‌شوند، تقریباً با تعداد بار مثبت پروتئین متناسب است (Dunn, 1995).

جهت بررسی وزن مولکولی عصاره‌های استخراجی نیز از ژل پلی آکریل امید استفاده شد. در این مطالعه، ژل پلی آکریل امید مطابق روش (Laemmli, 1970) تهیه گردید. نمونه‌ها با بافر لودینگ (حاوی SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)، جهت باردار کردن نمونه، گلیسرول و تریس جهت سنگین کردن نمونه، برموفنول بلو جهت رنگ‌آمیزی و مشاهده حرکت نمونه در ژل) مخلوط شدند و در دمای 95°C به مدت ۵ دقیقه جوشانده شدند تا پروتئین‌ها به‌طور کامل دناتوره شوند. سپس به درون چاهک تلقیح شدند و در ولتاژ ۹۰ به مدت سه ساعت قرار گرفتند. محلول‌های مورد استفاده برای ژل Resolving ۱۵٪ و ژل Stacking ۵٪، شامل: (آکریل امید میکس ۴۰٪، تریس ۱/۵ مولار، SDS ۱۰٪، APS ۱۰٪، TEMED) بود. در نهایت رنگ‌آمیزی ژل پلی آکریل امید با محلول کوماسی بلو انجام شد.

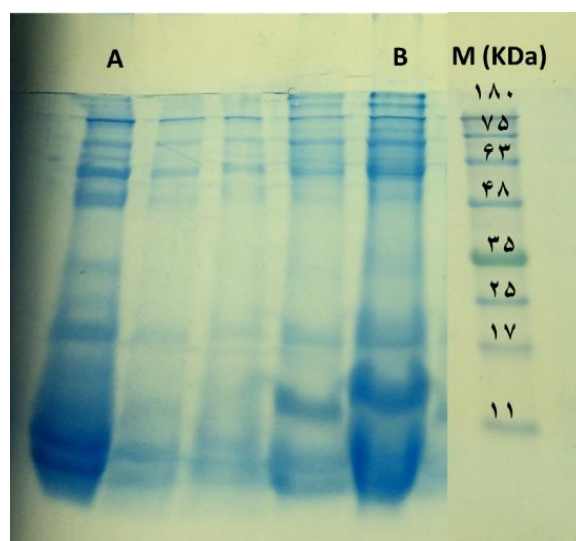
در پایان، تعیین میزان سمیت کونوتوکسین‌های استخراجی با تست همولیتیک و رویخون تازه هپارینه ماهی شانک و انسان انجام شد. پس از سانتریفیوژ نمودن خون و جداسازی پلاسما آن، از گلبول‌های قرمز خونی برای این کار استفاده می‌شود. لذا سانتریفیوژ خون و جداسازی پلاسما تا سه بار تکرار شد تا هیچ پلاسمایی در خون باقی نماند. سپس با استفاده از سرم فیزیولوژی، از رسوب گلبول‌های قرمز یک سوسپانسیون ۲٪ تهیه گردید. برای انجام تست همولیتیک، سوسپانسیون حاصل به ۸ خانه از یک میکرو پلیت ۹۶ خانه تخت (۱۰۰ میکرو لیتر برای هر خانه) منتقل و با هشت غلظت سریالی از کونوتوکسین‌های استخراج‌شده (غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲، ۳۱، ۱۶، ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار گردیدند. به‌عنوان کنترل مثبت و منفی از همان مقدار سوسپانسیون با تیمار ترایتون X-100 و سرم فیزیولوژی به ترتیب استفاده شد. پلیت ۹۶ خانه حاوی نمونه‌های مورد آزمایش و کنترل‌های مثبت و منفی در انکوباتور 37°C درجه به مدت دو ساعت قرار داده شد. پس از پایان این مدت سانتریفیوژ شده (۱۰ دقیقه در دور $3000 \times \text{rpm}$)، ۶۰ میکرولیتر از محلول رویی هر یک از خانه‌ها به پلیت دیگری منتقل گردید. میزان جذب نمونه‌ها (OD) در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا مدل Bio-Rad اندازه‌گیری گردید. درصد فعالیت همولیتیک نمونه‌ها در مقایسه با کنترل مثبت از رابطه ذیل محاسبه شد:

$$\text{درصد همولیتیک} = \frac{(\text{OD نمونه} - \text{OD کنترل منفی})}{(\text{OD کنترل مثبت} - \text{OD کنترل منفی})} \times 100$$

برای هر نمونه کونوتوکسین سه تکرار در نظر گرفته شد و داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان گردیدند و در نرم افزار SPSS ویرایش پانزدهم مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. پس از بررسی نرمالیت داده‌ها با آزمون Shapiro-wilk جهت مقایسات دوه‌دو از آزمون T غیر جفتی استفاده شد. $p < 0.05$ به عنوان کمترین سطح معنی داری در نظر گرفته شد (Kumar et al., 2014).

نتایج

ترسیم منحنی استاندارد برادفورد بر اساس مقادیر پروتئین مشخص و استاندارد BSA (Bovine Serum، محصول Bio-Rad)، انجام شد. بر اساس تعیین میزان جذب و غلظت‌های پروتئین استاندارد، معادله مربوطه به دست آمد. مقدار پروتئین کل حدود ۱۰/۸ میلی گرم بر میلی لیتر در گونه *C. coronatus* و حدود ۱۳/۱۷ میلی گرم بر میلی لیتر در گونه *C. frigidus* محاسبه شد. پس از تزریق عصاره‌های استخراجی از هر دو گونه شکم پای مخروطی به ژل پلی آکریل آمید ۱۵ درصد و رنگ بری آن، با توجه به مارکر پروتئینی مورد استفاده یک سری باند مشاهده گردید. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، باندهایی با وزن‌های مولکولی تقریبی ۶ تا ۱۸۰ کیلو دالتون مشاهده شد. از آنجایی که پپتیدهای کمتر از ۱۰ کیلو دالتون به راحتی در طول این ژل حرکت می‌کنند باند کاملاً مشخصی برای این دسته از پپتیدها تشکیل نمی‌شود و اغلب پس از رنگ آمیزی به صورت هاله پروتئینی (smear) دیده می‌شوند (شکل ۱).

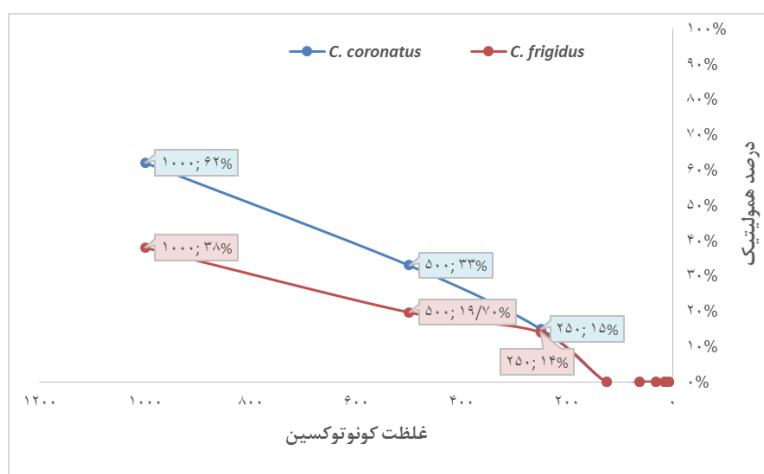


شکل ۱: پروفایل کونوتوکسینی عصاره‌های استخراجی از مجرای سم دو گونه شکم پای مخروطی خلیج فارس روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪

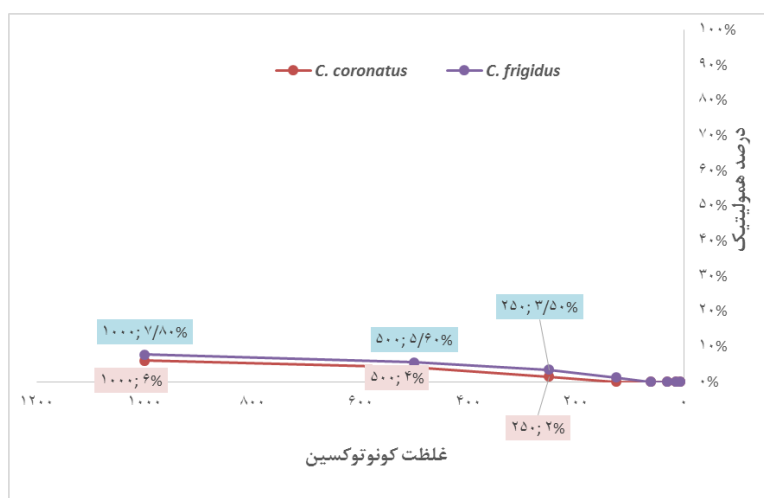
چاهک‌های A و B، به ترتیب مربوط به عصاره کونوتوکسینی گونه‌های *Conus frigidus* و *Conus coronatus* می‌باشد. چاهک M مربوط به مارکر پروتئینی است.

بر طبق مقادیر همولیتیک به دست آمده در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲، ۳۱، ۱۶، ۸ میکروگرم بر میلی لیتر کونوتوکسین‌های استخراجی از گونه *C. coronatus*، بر روی خون انسانی، در مقایسه با ۱۰۰ درصد همولیز تراپتون X100، در غلظت‌های بسیار بالا تنها فعالیت همولیتیک دیده شد و با افزایش غلظت کونوتوکسین‌ها، درصد همولیتیک نیز افزایش یافت. این امر در مورد کونوتوکسین‌های استخراجی از گونه *C. frigidus* نیز مشاهده گردید (شکل ۲). لکن این گونه در کل فعالیت همولیتیک ضعیف‌تری نسبت به گونه *C. coronatus* داشت که تقریباً

نصف آن بود. بیشترین میزان فعالیت همولیتیک روی خون انسان در دو گونه *C. coronatus* و *C. frigidus* به ترتیب معادل ۶۲ درصد و ۳۸ درصد بود؛ که میزان اثرات همولیتیک گونه *C. coronatus* در غلظت‌های بالای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بیش از اثرات همولیتیک گونه *C. frigidus* بر روی خون انسانی بود (شکل ۳) و اثرات همولیتیک عصاره کونوتوکسینی هر دو گونه بر روی خون انسانی به‌طور معنی‌داری بیش از خون ماهی بود (جدول ۱).



شکل ۲: فعالیت همولیتیک غلظت‌های سریالی از عصاره‌های کونوتوکسینی دو گونه شکم پای مخروطی خلیج فارس بر روی خون انسانی (فعالیت همولیتیک عصاره کونوتوکسینی گونه *Conus coronatus* در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بیش از گونه *Conus frigidus* است).

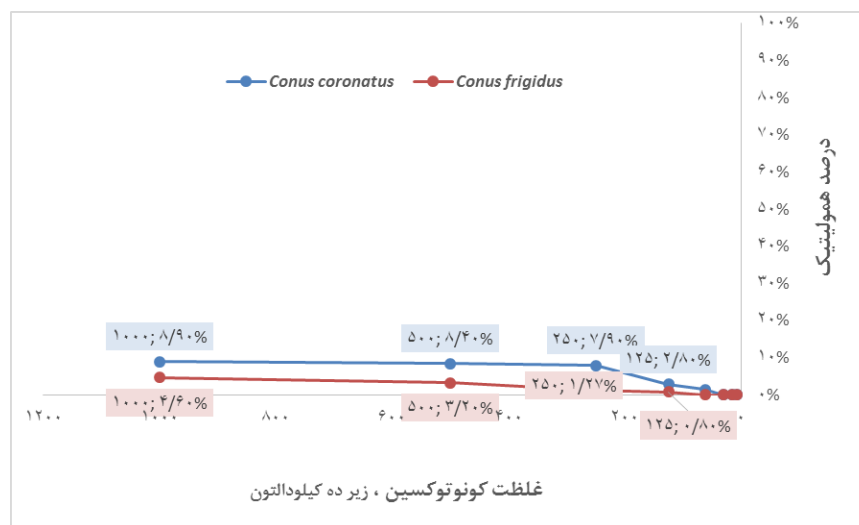


شکل ۳: فعالیت همولیتیک غلظت‌های سریالی از عصاره‌های کونوتوکسینی دو گونه شکم پای مخروطی خلیج فارس بر روی خون ماهی شانگ (تفاوت معنی‌داری بین فعالیت همولیتیک دو گونه شکم پای مخروطی بر روی خون ماهی وجود ندارد و در کل میزان فعالیت همولیتیک هر دو گونه پایین بود).

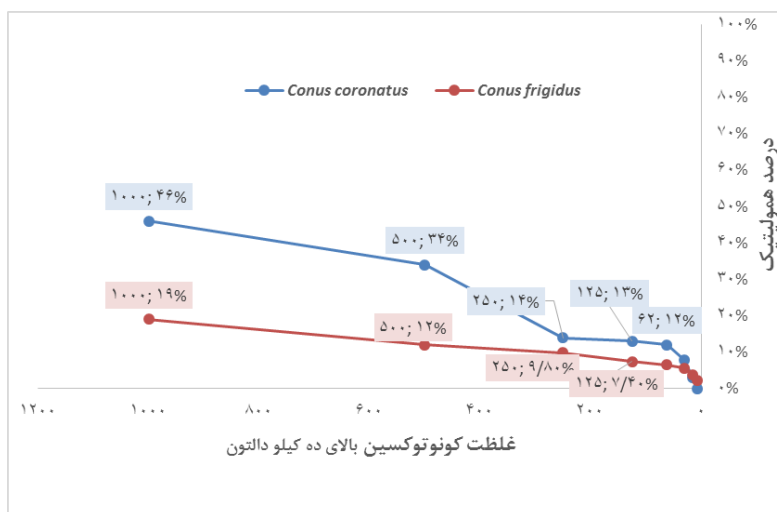
جدول ۱: مقایسه فعالیت همولیتیک غلظت های سریالی عصاره های تام کونتوکسینی دو گونه شکم پای مخروطی بر روی خون انسان و خون ماهی (علائم متفاوت در ستون هایی بارنگ یکسان، نشان دهنده اختلاف معنادار در بین درصد همولیتیک خون انسانی و خون ماهی است. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار، $p < 0.05$ بیان شده است).

غلظت (میلی گرم/میلی لیتر) درصد همولیتیک	۸	۱۶	۳۱	۶۲	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
خون انسان	%۰	%۰	%۰	%۰	%۰	A ۲/۳ $\pm$ %۱۵	A ۴/۲ $\pm$ %۳۳	A ۷/۸ $\pm$ %۶۲
خون ماهی	%۰	%۰	%۰	%۰	%۰	B ۱/۲ $\pm$ %۳/۵	B ۰/۸ $\pm$ %۵/۶	B ۲ $\pm$ %۷/۸
خون انسان	%۰	%۰	%۰	%۰	%۰	A ۳/۲ $\pm$ %۱۴	A ۲/۳ $\pm$ %۱۹/۷	A ۴/۹ $\pm$ %۳۸
خون ماهی	%۰	%۰	%۰	%۰	%۰	B ۰/۵ $\pm$ %۲	B ۰/۳ $\pm$ %۴	B ۲/۱ $\pm$ %۶

در بخش دیگر آزمایش، عصاره های کونتوکسینی به پیتیدهای بالا و پایین ده کیلودالتون تفکیک گردیده و سپس به صورت مجزا بر روی خون انسان مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که عصاره های بالای ده کیلو دالتون در هر دو گونه *C. coronatus* و *C. frigidus* دارای اثرات لیز کنندگی معناداری بر روی گلبول های قرمز خونی انسان، نسبت به عصاره های زیر ده کیلو دالتون بودند (شکل ۴ و ۵ جدول ۲).



شکل ۴: فعالیت همولیتیک غلظت های سریالی از عصاره های کونتوکسینی زیر ده کیلو دالتون دو گونه شکم پای مخروطی خلیج فارس بر روی خون انسانی (اختلاف معناداری در بین فعالیت همولیتیک دو گونه شکم پای مخروطی مشاهده نشد).



شکل ۵: فعالیت همولیتیک غلظت‌های سریالی از عصاره‌های کونوتوکسینی بالای ده کیلو دالتون دو گونه شکم پای مخروطی خلیج فارس بر روی خون انسانی (فعالیت همولیتیک عصاره کونوتوکسینی بالای ده کیلو دالتون هر دو گونه با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد و درصد همولیتیک عصاره کونوتوکسینی گونه *C. coronatus* به‌طور معنی‌داری بیش از گونه *C. frigidus* است).

جدول ۲: مقایسه فعالیت همولیتیک غلظت‌های سریالی عصاره‌های بالا و پایین کونوتوکسینی، دو گونه شکم پای مخروطی بر روی خون انسان.

غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)		درصد همولیتیک		۸	۱۶	۳۱	۶۲	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
<i>C. coronatus</i>	< ده کیلو دالتون	%۰	%۰	%۰	%۰	%۰	۱۲ ± ۰.۱۲	۱۳ ± ۰.۱۳	۱۴ ± ۰.۱۴	۳۴ ± ۰.۳۴	۴۶ ± ۰.۴۶
	> ده کیلو دالتون	%۰	%۰	%۰	%۰	%۰	%۰	۲۸ ± ۰.۲۸	۷۹ ± ۰.۷۹	۸۴ ± ۰.۸۴	۸۹ ± ۰.۸۹
<i>C. frigidus</i>	< ده کیلو دالتون	%۰	%۰	%۰	%۰	%۰	%۰	۷۴ ± ۰.۷۴	۹۸ ± ۰.۹۸	۱۲ ± ۰.۱۲	۱۹ ± ۰.۱۹
	> ده کیلو دالتون	%۰	%۰	%۰	%۰	%۰	%۰	۸ ± ۰.۰۸	۲۷ ± ۰.۲۷	۳۲ ± ۰.۳۲	۴۶ ± ۰.۴۶

(علائم متفاوت در ستون‌هایی بارنگ یکسان، نشان‌دهنده اختلاف معنادار در بین درصد همولیتیک خون انسانی متأثر از عصاره‌های کونوتوکسینی بالا و پایین ده کیلو دالتون است. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار، $p < 0.05$ بیان شده است)

بحث و نتیجه‌گیری

اقیانوس‌ها، منشأ ترکیبات طبیعی می‌باشند که در موجودات زنده انباشته شده است (Carte, 1996). در این میان، موجودات ناحیه جزر و مدی در نتیجه سازگاری با محیطی با شرایط سخت، تنوع قابل توجهی دارند (Kohn, 1990). از این میان می‌توان به شکم پایان مخروطی اشاره نمود که تاکنون حدود ۸۰۳ گونه از آن گزارش شده است (WoRMS, 2014). این موجودات به دلیل داشتن ترکیبات پپتیدی خاص خود بانام کونوتوکسین‌ها و با ویژگی ضد درد موردتوجه هستند (Davise et al., 2009; Lewis et al, 2012). کونوتوکسین‌ها، ابزارهای مهمی جهت مطالعات نوروفیزیولوژی هستند، زیرا توانایی تمایز بین ایزومرهای مولکولی اعضاء یک کانال یونی خاص را دارند (Terlau and Olivera, 2004; Hu et al, 2011; Aman et al, 2015). در این تحقیق استخراج کونوتوکسین‌ها از مجرای سم شکم پایان مخروطی صورت گرفت.

استخراج ترکیبات پپتیدی از دستگاه تولید سم روشی معمول در تحقیقات است، زیرا که سلول های مجرای سم، این پپتیدهای سمی را سنتز می کنند و به صورت هولوکراین وارد مجرا می شوند (Biaş et al, 2015). علاوه بر این روش دیگری برای استخراج کونوتوکسین ها وجود دارد و آن تحریک شکم پا برای شکار و جمع آوری سم تزریق شده است که در مطالعات مربوط به شناخت آنزیم های دخیل در فرایند بلوغ کونوتوکسین ها، به مقایسه سم استخراج شده در این روش و عصاره به دست آمده از دستگاه تولید سم پرداخته می شود (Biggs et al, 2010). برای تفکیک یک پروتئین خاص موجود در عصاره از سایر پروتئین ها، از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید استفاده می شود، که پروتئین ها را بر اساس وزن مولکولی شان از هم تفکیک می کند. در ساختار ژل از SDS استفاده می شود. SDS، یک شوینده آنیونی است که به واسطه داشتن گروه سولفات دارای بار منفی، باعث می شود همه پروتئین ها دارای بار خالص منفی شوند. ژل پلی آکریل آمید به صورت میکس یعنی در ترکیب با بیس آکریل آمید تهیه می شود. زنجیره های پلیمریزه شده از آکریل آمید به وسیله بیس آکریل آمید به هم متصل می شوند. بیس آکریل آمید یک عامل اتصال عرضی است که باعث ایجاد ساختار حفره مانند در ژل می گردد تا پروتئین ها در خلال عبور از ژل از هم تفکیک شوند (Sambrook and Russell, 2001). نتایج حاصل از ژل پلی آکریل آمید نشان دهنده حضور ۱۳ باند در گونه *C. coronatus* و ۱۱ باند در گونه *C. frigidus* بود. در تحقیقی که Tabaraki و همکاران، بر روی عصاره استخراجی از *C. textile* انجام دادند، ۱۲ باند جداگانه با رنج وزنی ۶ تا ۱۸۰ کیلو دالتون شناسایی کردند (Tabaraki et al, 2014). سلول هایی که مسئول ترشح مجموعه ای از کونوتوکسین های خاص هستند به طور همزمان آنزیم های مخصوص اعمال تغییرات پس از ترجمه ای همان کونوتوکسین را هم بیان می کنند که به دلیل وزن مولکولی بالاتر در بالای ژل دیده می شوند (Garrett et al, 2005)، زیرا که اکثر کونوتوکسین ها، دارای رنج وزنی پایین تری هستند. کونوتوکسین ها، از واحدهای پپتیدی کوچک ساخته شده اند که این زیر واحدها در ابتدا به صورت پیش سازهای غیرفعال بیان می شوند و پس از اعمال تغییرات پس از ترجمه ای به وسیله آنزیم های مختلف، این پیش سازها به فرم بالغ درآمده و از سطح سلول به داخل لومن ترشح می شوند. پس از ترشح زیر واحدهای پپتیدی به یکدیگر می پیوندند و پس از شکل گیری ساختارهای فضایی به کونوتوکسین های مختلف تبدیل می شوند.

کونوتوکسین ها بسته به گونه شکم پای مخروطی، دارای اثرات نوروتوکسیکی و همولیتیکی هستند؛ که هر دو می تواند در سمیت و مرگ شکار نقش داشته باشد (Kaas et al., 2012; Dobson et al., 2012). مثلاً سمیت و کشندگی عصاره کونوتوکسینی *C. textile* از ویژگی های نوروتوکسیکی آن منشأ نمی گیرد، بلکه از فعالیت همولیتیک آن است (Kobayashi et al., 1983; Lattore, 1997). نتایج همولیتیک در این مطالعه، نشان داد که کونوتوکسین های عصاره های هر دو گونه شکم پای مخروطی، در غلظت های مختلف فاقد فعالیت چشمگیری بوده و تنها در غلظت های بسیار بالا دارای فعالیت همولیتیک می باشند که اثرات آن ها بر روی خون انسان تنها دیده شد و اثری بر روی گلبول های قرمز خون ماهی شانک نداشتند. غلظتی از کونوتوکسین که باعث لیز شدن ۵۰ درصد از گلبول های قرمز انسانی در مقایسه با کنترل مثبت (ترایتون X100) شده است، (HD50) در گونه *C. coronatus* کمی بیش از ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بوده و در گونه دیگر یعنی *C. frigidus* احتمالاً در غلظت های بالاتر از آزمون انجام شده می باشد (شکل ۳). Shanmuganandam, 1995 بیان کرد که سم گونه های کرم خوار مانند *C. figulinus* فاقد پپتیدهای همولیتیک و پارالیتیک است؛ که با توجه به نوع تغذیه کرم خواری در گونه های مورد مطالعه اثرات همولیتیک پایین عصاره آن ها قابل توجیه است.

از طرفی فعالیت همولیتیک عصاره های کونوتوکسینی بالای ده کیلو دالتون به طور معناداری بیش از فعالیت همولیتیک عصاره های کونوتوکسینی پایین ده کیلو دالتون بر روی خون انسانی بود. با توجه به اینکه اکثر کونوتوکسین ها دارای محدوده ی وزن مولکولی کمتر از ده کیلو دالتون هستند، لذا به نظر می رسد عاملی غیر از کونوتوکسین ها در عصاره های بالای ده کیلو دالتون در لیز شدن گلبول ها نقش دارند. در مطالعه مشابهی که عصاره تام کونوتوکسینی نیمه خالص شده شکم پای مخروطی *C. lentiginosus* به وسیله DEAE (ستون کروماتوگرافی تبادل یونی سلولزی) بر روی خون جوجه انجام شد، نتایج نشان دهنده حضور پپتیدهایی با رنج وزن مولکولی ۴۰-۱۲۰ کیلو دالتون بود. این پپتیدها با غلظت حدود

۴۳۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، منجر به ۸ واحد همولیتیک (8HU) شدند (Kumar et al., 2014). لذا می‌توان گفت؛ فعالیت همولیتیک به نوع گونه و نوع خون مورد استفاده بستگی دارد و با افزایش غلظت توکسین، فعالیت لیز کنندگی افزایش می‌یابد که در ارتباط با تفاوت در ترکیبات کونوتوکسینی موجود در گونه‌های مختلف و همچنین تفاوت در ساختار غشاء سلولی گلبول‌های قرمز موجودات مختلف است (Gouiffes et al., 1988).

در کل می‌توان عنوان کرد که نوع گونه شکم پای مخروطی (Kobayashi et al., 1983; Lattore, 1997; Moller et al, 2013)، مرحله زندگی آن (بلوغ یا جنینی)، (Safavi-Hemami et al., 2011)، نوع رژیم غذایی (Shanmuganandam, 1995; Elliger et al, 2011)، آشیان اکولوژیک (Marsh, 1970) در تنوع ترکیبات کونوتوکسینی و اثرات متفاوت همولیتیک نقش دارند. با توجه به نتایج این مطالعه، می‌توان گفت؛ کونوتوکسین‌ها فعالیت همولیتیک پایینی داشته (شکل ۳) زیرا که عمده فعالیت لیز کنندگی در عصاره کونوتوکسینی بالای ده کیلو دالتون مشاهده گردید (جدول ۲) و با توجه به اینکه کونوتوکسین‌ها دارای وزن مولکولی پایین‌تر از ۱۰ کیلو دالتون هستند و می‌توان آن‌ها را از عامل لیز کننده گلبول‌های قرمز با توجه به وزن مولکولی پایین آن‌ها تفکیک نموده و در تولید دارو و درمان مورد استفاده قرارداد. با توجه به اینکه اثرات ضد دردی این کونوتوکسین‌ها با آزمون رفتاری ضد درد روی موش سوری (آزمون فرمالین و هات پلِت) اثبات شده است (رجبی و همکاران، ۱۳۹۵) می‌توان نتیجه گرفت که این عصاره‌ها کاندیدای مناسب دارویی بوده و می‌توانند در طراحی داروهای ضد درد مورد استفاده قرار گیرند. زیرا که ورود این ترکیبات به خون، آسیبی به گلبول‌های قرمز نخواهد زد.

منابع

- رجبی، ح.، ذوالقرنین، ح.، رونق، م. ت.، سواری، ا. و. رنجبر، م. ش.، ۱۳۹۵. مطالعه سیستماتیک مولکولی و اثرات ضد درد پپتیدهای استخراجی از حلزون‌های مخروطی جنس *Conus* در سواحل قشم، لارک، هرمز و بستانه. پایان‌نامه مقطع دکترای تخصصی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر.
- Aman, J., Olivera, B., Dearing, D., Horvath, M. and Torti, S. D., 2015. Conopeptide discovery through calcium imaging. University of Utah, PhD Thesis, 15 pp.
- Biass, D., Violette, A., Hulo, N., Lisacek, F. and Favreau, P., 2015. Uncovering intense protein diversification in a cone snail venom gland using an integrative venomomics approach. *Journal of proteome research*. 14: 628-638.
- Biggs, J. S., Watkins, M., Puillandre, N., Ownby, J. P., Lopez-Vera, E., Christensen, S., Moreno, K. J., Bernaldez J., Licea-Navarro A., Showers, Corneli, P. and Olivera B. M., 2010. Evolution of *Conus* peptide toxins: analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 56: 1-12.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Carté B. K., 1996. Biomedical potential of marine natural products. *Bioscience*. 46(4): 271-286.
- Cheng, G., Ueda, T., Eda, F., Arima, M., Yoshida, N., and Fukuda, T., 2001. "A549 cells can express interleukin-16 and stimulate eosinophil chemotaxis". *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 25(2): 212-218.
- Davise, J., Jones, A. and Lewis, R. J., 2009. Remarkable inter- and intra-species complexity of conotoxins revealed by LC/MS. *Peptides*. 30: 1222-1227.
- Dobson, R., Collodor, M., Gilles, N., Turtoi, A., Pauw, E. and Quinton, L., 2012. Secretion and maturation of conotoxins in the venom ducts of *Conus textile*. *Toxicon*. 60: 1370-1379.
- Dunn, B. M., 1995. Detection and assay methods *In* Current protocols in protein science. John Wiley and Sons, pp. 1-11.
- Dutertre, S., Jin, A. H., Kaas, Q., Jones, A., Alewood, P. F. and Lewis, R. J., 2013. Deep venomomics reveals the mechanism for expanded peptide diversity in cone snail venom. *Molecular and Cellular Proteomics*. 12: 312-329.

- Eisapoor, S. S., Jamili, S. H., Shahbazzadeh, D., Mostafavi, P. G. H. and Pooshang Bagheri, K., 2016. A new, high yield, rapid, and cost effective protocol to deprotection of cysteine rich conopeptide, omega-conotoxinMVIIA. *Chemical Biology Drug Design*. 30: 1222-1227.
- Elliger, C. A., Richmond, T. A., Lebaric, Z. N., Pierce, N. T., Sweedler J. V. and Gilly, W. F., 2011. Diversity of conotoxin types from *Conus californicus* reflects a diversity of prey types and a novel evolutionary history. *Toxicon*. 57: 311-322.
- Garrett, J. E., Buczek, O., Watkins, M., Olivera, B. M. and Bulaj G., 2005. Biochemical and gene expression analyses of conotoxins in *Conus textile* venom ducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 328: 362-367.
- Ghavami, S., Asoodeh, A., Klonisch, T., Halayko, A. J., Kadkhoda, K. and Krocak, T. M., 2008. Brevinin - 2R1 semi - selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal_mitochondrial death pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*. 12(3), 1005-1022.
- Gouiffes, D., Juge, M., Grimaud, N., Welin, L., Sauviat, M. P., Barbin, Y., Laurent, D., Roussakis, C., Henichart, J. P., Verbist, J. F. and Bistramide, A., 1988. A new toxin from the urochordata *Lissoclinum bistratum* Sluiter: isolation and preliminary characterization. *Toxicon*. 26(12):1129-1136..
- Heghinian, M. and Mari, F., 2014. Discovery and biological characterization of conotoxin from the venom of *Conus brunneus* in *Drosophila melanogaster*. Florida Atlantic University, 18 pp.
- Hu, H., Bandyopadhyay, P. K., Olivera, B. M. and Yandell, M., 2011. Characterization of the *Conus bullatus* genome and its venom-duct transcriptome. *BMC Genomics*. 60: 1471-2164.
- Iwalewa, E. O., McGaw, L. J., Naidoo, V. and Eloff, J. N., 2007. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*. 6(25).
- Kaas, Q., Yu, R., Jin, A. H., Dutertre, S. and Craik, D. J. 2012. ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database. *Nucleic Acids Research*. 40, D325–D330.
- Kobayashi, J., Nakamura, H., Hirata, Y. and Ohizumi, Y. 1983. Tessulatoxin, the vasoactive protein from the venom of the marine snail *Conus tessulatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 74(3): 381-384
- Kohn, A. J., 1990. Tempo and mode of evolution in Conidae. *Malacologia*. 32: 55-67.
- Kumar, P., Venkateshvaran, K., Srivastava, P. P., Nayak, S. K., Shivaprakash, S. M. and Chakraborty, S.K. 2014. Pharmacological studies on the venom of the marine snail *Conus lentiginosus* Reeve, 1844. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 1(3): 79-85
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680–685.
- Lattore, R. A., 1977. The toxin action of *Conus textile*. *Acta Med Philipp*, 13:7-12.
- Lewis, R. J., Dutertre, S., Vetter, I. and Christie, M. J., 2012. Conus Venom Peptide Pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 64: 259–298.
- Marsh H., 1970. Preliminary studies of the venoms of some vermivorous Conidae. *Toxicon*. 8: 271-277.
- Moller, C., Vanderweit, N. and Mari, F., 2013. Comparative analysis of proteases in the injected and dissected venom of cone snail species *Toxicon*. 65: 59-67.
- Pacor, S., Giangaspero, A., Bacac, M., Sava, G. and Tossi, A., 2002. Analysis of the cytotoxicity of synthetic antimicrobial peptides on mouse leucocytes: implications for systemic use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 50(3), 339-348.
- Rajabi, H., Zolgharni, H., Ronagh, M. T., Savari, A. and Ranjbar, M. Sh., 2016. Histological study of the venom production organ in *Conus coronatus* and *Conus frigidus*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 4(1): 370-372
- Safavi-Hemami, H., Siero, W. A., Kuang, Z., Williampon, N. A., Karas, J. A., Pages, L. R., Macmillan, D., Callaghan, B., Kompella, S. N., Adams, D. J., Norton, R. S. and Purcell, A. W., 2011. Embryonic toxin expression

in the cone snail *Conus victoriae* – Primed to kill or divergent function? The Journal of Biological Chemistry. 286(25): 22546-22557.

Shanmuganandam, P., 1995. Studies on the venom of *Conus*, Linnaeus (Mollusca: Gastropoda) from the South East Coast of India. Unpublished Ph.D. Thesis, Annamalai University, India.

Sambrook, J. and Russell, D. W., 2001. Commonly used techniques in molecular cloning *In* Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Tabaraki, N., Shahbazzadeh, D., Moradi, A. M., Vosughi, G. and Mostafavi, P. G., 2014. Analgesic effect of Persian Gulf *Conus* textile venom. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 17: 793-797

Tayo, L. L., Lu, B., Cruz, L. J. and Yates., J. R. 2011. Proteomic Analysis Provides Insights on Venom Processing in *Conus textile*. Journal of Proteome Research 7. 9(5): 2292–2301.

Terlau, H. and Olivera, B. M., 2004. *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. Physiological Reviews. 84(1): 41-68.

Violette, A., Leonardi, A., Piquemal, D., Terrat, Y., Biass, D., Dutertre, S., Noguier, F., Ducancel, F., Scklin, R., Križaj, I. and Faweau, P., 2012. Recruitment of Glycosyl Hydrolase Proteins in a Cone Snail Venomous Arsenal: Further Insights into Biomolecular Features of *Conus* Venoms. Marine Drugs. 10: 258-280.

WoRMS., 2014. World Register of Marine Species. Available from [http:// www.marinespecies.org](http://www.marinespecies.org).

Wu, X., Shao, X., Guo, Z. Y. and Chi, C.W., 2010. Identification of neuropeptide Y-like conopeptides from the venom of *Conus betulinus*. Acta Biochimica Biophysica Sinica. 42: 502-505.

