

# بررسی فعالیت همولیتیک کونوتوکسین‌های مجرای سم شکمپایان مخروطی خلیج فارس *Conus frigidus* و *coronatus*

## چکیده

حليمه رجبی<sup>۱\*</sup>

حسین ذوالقرنین<sup>۲</sup>

محمد تقی رونق<sup>۳</sup>

احمد سواری<sup>۴</sup>

محمد شریف رنجبر<sup>۰</sup>

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.rajabii@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۷۰۱۰۵۲۲

تاریخ دریافت: ۱۶/۰۲/۱۳۹۶

تاریخ پذیرش: ۲۲/۰۹/۱۳۹۶

کد مقاله: ۱۳۹۷۰۱۰۵۲۲

این مقاله برگفته از طرح پژوهشی است.

کونوتوکسین‌ها، پیتیدهای سمی اگزوکرین 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 به عنوان عوامل ضد توموری معرفی می‌شوند. در این مطالعه فعالیت همولیتیک عصاره کونوتوکسینی دو گونه‌ی *Conus coronatus* و *Conusfrigidus* آزمایش شد. نمونه‌برداری در ساحل پارک زیتون قشم، در سال ۱۳۹۳ انجام شد. مجرای‌های سم جداسازی و با استونیتریل هموژن شدند. مخلوط در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت به عنوان عصاره استخراجی بود. پیتیدهای بالا و پایین ده کیلو دالتون، به وسیله فیلتر فالکون MWCO ۱۰۰۰ میلی پور جداسازی شدند. غلظت‌های سریالی عصاره‌های تام کونوتوکسینی، عصاره‌های بالا و پایین ده کیلو دالتون جهت آزمون همولیتیک عصاره تام، عصاره‌های قرمز خون انسانی و خون ماهی، در پیتیدهای 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* اثرات همولیتیک بیشتری نسبت به عصاره‌های کمتر از ده کیلو دالتون داشتند. اثرات همولیتیک عصاره‌های کونوتوکسینی بر حسب نوع خون متفاوت و فعالیت سیتوتوکسین عصاره‌ها در غلظت‌های بالا بود. لذا با توجه به حضور پیتیدهای نوروتوکسین ضد درد در این گونه‌ها، در صورت کاربرد دارویی منجر به آسیب به گلبلوی‌های قرمز خونی نمی‌شوند.

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

## مقدمه

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

مولکولی، آن‌ها را ابزار مناسب مطالعات دارویی ساخته است (Eisapoor *et al.*, 2016). بسیاری از این گروه‌های پیتیدی، 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 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 به‌وسیله حباب ماهیچه‌ای فشرده شده و به شکار از طریق دندانهای رادولایی عمیق تزریق می‌گردد. این دندان‌ها مشابه سوزن‌های خاردار هستند و به طور 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 با وجود این، تعداد قابل توجهی از آن‌ها، از ماهی‌ها تنذیه می‌کنند، درنتیجه حضور چنین ترکیبات سمی قوی با اثرگذاری قوی جهت بی‌تحرکی شکار و تأثیر بر سیستم عصبی شکار لازم است (Aman *et al.*, 2015). این امر ممکن است به‌واسطه فعالیت همولیتیک یک کونوتوکسین حاصل گردد (Lattore, 1997). فعالیت همولیتیک در گروه گستردگان 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 سلطان هستند. البته باید توجه داشت که ترکیبات همولیتیک شدید، با لیز کردن گلbul‌های قرمز خون موجب خونریزی شدید و آنمی همولیتیک القا شده 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 گلbul‌های 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 Pacor *et al.*, 2002; Biass *et al.*, 2015 ترکیبی، سمتی آن می‌بایست به کمک روش‌های مختلفی روی رده‌های سلولی مختلف، موردمطالعه قرار گیرد (Acanthopagrus latus) به دلیل تفاوت ساختاری بین آن‌ها استفاده شد، بازترین 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 به صورت 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 پنهانه آبی خلیج فارس از لحاظ تنوع زیستی در جایگاه مهمی قرار دارد، اما تاکنون مطالعه‌ای درزمنه‌ی 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 باقدرتی 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: N ۳۱°۰۵'۶۰" E ۵۵°۰۹'۲۰") در جزیره کامل انجام شد. نمونه‌ها همراه با آب دریا به آزمایشگاه منتقل و در شرایط استریل و روی بخ تشريح شدند. مجراهای سم جداسازی و در ۸۰- قرار داده شدند. برای استخراج

کونوتوکسین‌ها، مجراهای سم در یک میکرو تیوب و روی یخ قرار گرفتند. سپس به آن‌ها آب مقطر استریل سرد و استونیتریل  $40\%$ ، افزوده و به‌آرامی در دستگاه هموژنایزر Silent crusher، Heidolph در ساخت آلمان، در  $16000 \times rpm$  به مدت ۵ دقیقه هموژن شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با دور  $10000 \times g$  در دمای  $4^\circ C$  درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی که حاوی کونوتوکسین‌های مجرای سم بوده به میکرو تیوب 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 تیوب منتقل شد. انجام کار عصاره‌گیری در دو مرحله صرفاً جهت حصول اطمینان از حضور کونوتوکسین‌ها در عصاره قائم بوده است. عصاره استخراج شده به مدت یک روز در دمای  $-80^\circ C$  درجه قرار گرفته و پس از قرار گیری در ازت مایع، در دستگاه فریز درایر مدل Christ, 2 alpha ساخت آلمان، جهت لیوفیلیز قرار گرفت. لیوفیلیز شدن به‌آرامی و به مدت ۲۴ ساعت، در دمای  $-56^\circ C$  و فشار  $0.4 \text{ mbar}$  اتمسفرانجام شد (Tayo *et al*, 2011).

سنجهش پروتئین کل به روش تحلیل اسپکتروسکوپی است. انجام گردید. در این روش از محلول کوماسی بلو به عنوان معرف استفاده می‌شود. در شرایط اسیدی معرف، پروتئین بارنگ کوماسی بلو باند می‌شود و درنتیجه باعث تغییر رنگ قهوه‌ای معرف (با حداکثر جذب نوری در طول موج  $465 \text{ nm}$ ) به رنگ آبی (با حداکثر جذب در  $610 \text{ nm}$ ) می‌گردد. بیشترین اختلاف بین دو فرم رنگ کوماسی بلو در  $595 \text{ nm}$  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 مناسب است (Dunn, 1995).

جهت بررسی وزن مولکولی عصاره‌های استخراجی نیز از ژل پلی آکریل آمید مطابق روش (Laemmli, 1970) تهیه گردید. نمونه‌ها با بافر لوکیگ (حاوی Sodium Dodecyl Sulfate SDS) جهت باردار کردن نمونه، گلیسرول و تریس جهت سنگین کردن نمونه، برموفنول بلو جهت رنگ آمیزی و مشاهده حرکت نمونه در ژل (مخلوط شدن و در دمای  $95^\circ C$  درجه به مدت ۵ دقیقه جوشانده شدن تا پروتئین‌ها بهطور کامل دناتوره شوند. سپس به درون چاهک تلقیح شدن و در ولتاژ  $90^\circ$  به مدت سه ساعت قرار گرفتند. محلول‌های مورداستفاده برای ژل Resolving Stacking  $15\%$  و ژل  $5\%$  شامل: (آکریل آمید میکس  $40\%$ ، تریس  $1/5 \text{ Molar}$ ، SDS  $10\%$  APS  $10\%$  TEMED) بود. درنهایت رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با محلول کوماسی بلو انجام شد.

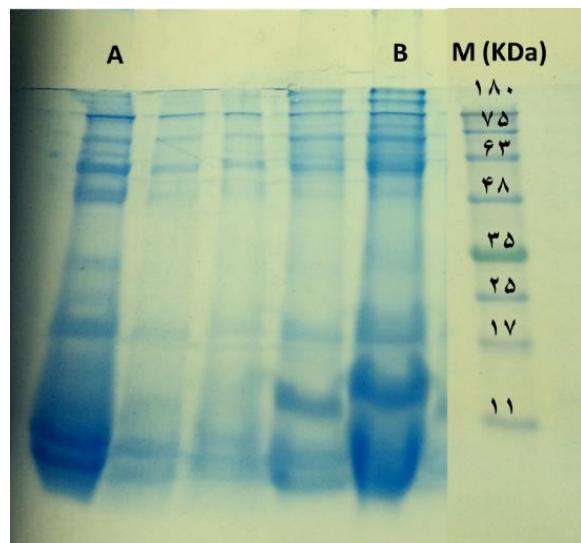
در پایان، تعیین میزان سمیت کونوتوکسین‌های استخراجی با تست همولیتیک و رویخون تازه هپارینه ماهی شانک و انسان انجام شد. پس از سانتریفیوژ نمودن خون و جداسازی پلاسمای آن، از گلbul‌های قرمز خونی برای این کار استفاده می‌شود. لذا سانتریفیوژ خون و جداسازی پلاسماتا سه بار تکرار شد تا هیچ پلاسمایی در خون باقی نماند. سپس با استفاده از سرم فیزیولوژی، از رسوب گلbul‌های قرمز یک سوسپانسیون  $2\%$  تهیه گردید. برای انجام تست همولیتیک، سوسپانسیون حاصل به ۸ خانه از یک میکرو پلیت  $96^\circ$  خانه تخت ( $100 \text{ μl}$  میکرو لیتر برای هر خانه) منتقل و با هشت غلاظت سریالی از کونوتوکسین‌های استخراج شده (غلاظت‌های  $10000, 1000, 1000, 500, 500, 250, 125, 62, 31, 16, 8 \text{ μl}$ ) تیمار گردیدند. به عنوان کنترل مثبت و منفی از همان مقدار سوسپانسیون با تیمار تراپیتون  $X-100$  و سرم فیزیولوژی به ترتیب استفاده شد. پلیت  $96^\circ$  خانه حاوی نمونه‌های مورد آزمایش و کنترل‌های مثبت و منفی در انکوباتور  $37^\circ C$  درجه به مدت دو ساعت قرار داده شد. پس از پایان این مدت سانتریفیوژ شده (۱۰ دقیقه در دور  $3000 \text{ rpm}$ ،  $60 \text{ μl}$  میکرو لیتر از محلول رویی هر یک از خانه‌ها به پلیت دیگری منتقل گردید. میزان جذب نمونه‌ها (OD) در طول موج  $450 \text{ nm}$  توسط دستگاه الایزا مدل Bio-Rad می‌گردید. 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 نرمالیته دادهها با آزمون Shapiro-vilk جهت مقایسات دوبعدی 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 برآفورد بر اساس مقادیر پروتئین مشخص و استاندارد Bovine Serum (BSA)، 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در گونه *C. coronatus* و حدود ۱۳/۱۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر 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 مورداستفاده 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 پیتیدهای کمتر از ۱۰ کیلو دالتون به راحتی در طول این ژل حرکت می‌کنند باند کاملاً مشخصی برای این دسته از پیتیدها تشکیل نمی‌شود و اغلب پس از رنگ‌آمیزی به صورت هاله پروتئینی (smear) دیده می‌شوند (شکل ۱).

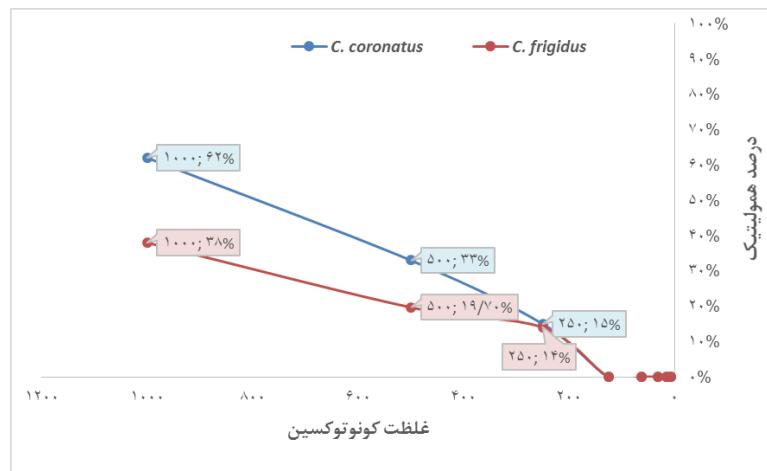


شکل ۱: پروفایل کونوتوکسینی عصاره‌های استخراجی از مجرای سم دو گونه شکم پای مخروطی خلیج فارس روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪

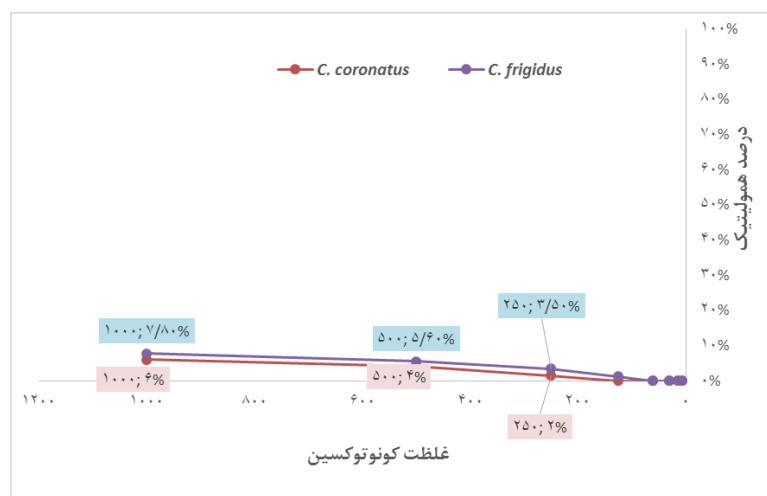
چاهک‌های A و B، به ترتیب مربوط به عصاره کونوتوکسینی گونه‌های *Conus frigidus* و *Conus coronatus* می‌باشد. چاهک M مربوط به مارکر پروتئینی است.

بر طبق مقادیر همولیتیک به دست آمده در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۳۱، ۲۵۰، ۱۲۵، ۱۶، ۳۱، ۶۲، ۱۶ میکرو‌گرم بر میلی‌لیتر کونوتوکسین‌های استخراجی از گونه *C. coronatus*، بر روی خون انسانی، در مقایسه با ۱۰۰ درصد همولیز ترایتون 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. frigidus* و *C. coronatus* 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 به طور معنی‌داری بیش از اثرات همولیتیک گونه *C. frigidus* بر روی خون انسانی بود (شکل ۳) و اثرات همولیتیک عصاره کونوتوكسینی هر دو گونه بر روی خون انسانی به طور معنی‌داری بیش از خون ماهی بود (جدول ۱).



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

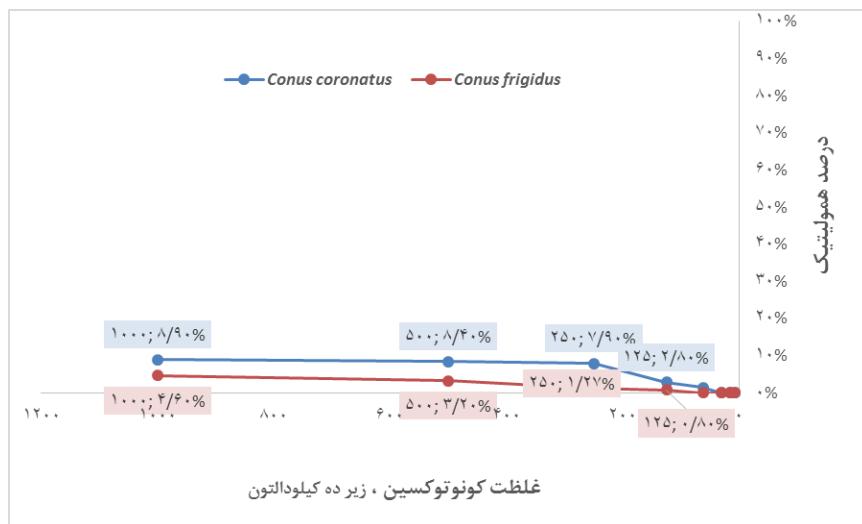


شکل ۳: فعالیت همولیتیک غلظت‌های سریالی از عصاره‌های کونوتوكسینی دو گونه شکم پای مخروطی خلیج‌فارس بر روی خون ماهی شانک (تفاوت معنی‌داری بین فعالیت همولیتیک دو گونه شکم پای مخروطی بر روی خون ماهی وجود ندارد و در کل میزان فعالیت همولیتیک هر دو گونه پایین بود).

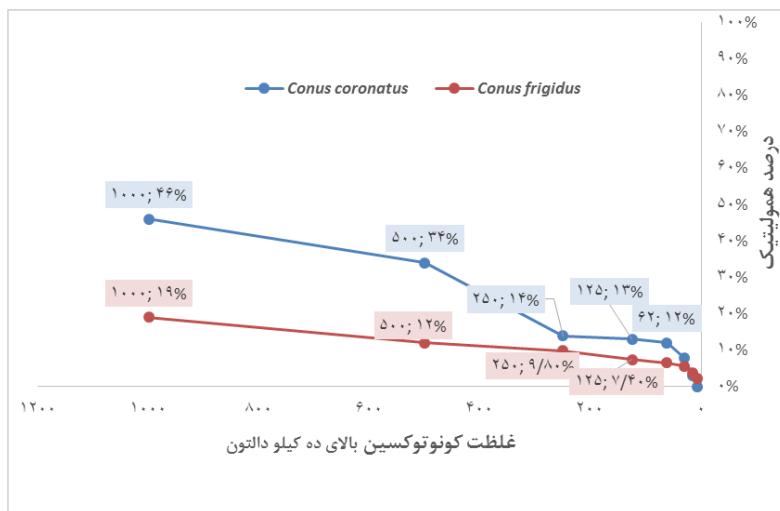
**جدول ۱: مقایسه فعالیت همولیتیک غلظت های سریالی عصاره های تام کونوتوکسینی دو گونه شکم پای مخروطی بر روی خون انسان و خون ماهی** (علائم مختلف در ستون هایی بارنگ یکسان، نشان دهنده اختلاف معنادار در بین درصد همولیتیک خون انسانی و خون ماهی است. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار،  $P < 0.05$  بیان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

درصد همولیتیک									غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)
خون انسان									A. <i>coronatus</i>
خون ماهی									B. <i>frigidus</i>
خون انسان									C. <i>coronatus</i>
خون ماهی									D. <i>frigidus</i>
۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲	۳۱	۱۶	۸		
A ۷/۸ ± ۶/۶	A ۴/۲ ± ۳/۳	A ۲/۳ ± ۱/۱۵	%.	%.	%.	%.	%.		
B ۲ ± ۷/۸	B ۰/۸ ± ۵/۶	B ۱/۲ ± ۳/۵	%.	%.	%.	%.	%.		
A ۴/۹ ± ۳/۸	A ۲/۳ ± ۱/۹/۷	A ۳/۲ ± ۱/۱۴	%.	%.	%.	%.	%.		
B ۲/۱ ± ۶/۶	B ۰/۳ ± ۶/۴	B ۰/۵ ± ۶/۲	%.	%.	%.	%.	%.		

در بخش دیگر آزمایش، عصاره های کونوتوکسینی به پیتیدهای بالا و پایین ده کیلو دالتون تفكیک گردیده و سپس به صورت مجزا بر بروی خون انسان مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که عصاره های بالای ده کیلو دالتون در هر دو گونه *C. frigidus* و *C. coronatus* 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 کونوتوکسینی 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							
		<ده کیلو دالتون							
A	$5/4 \pm 4/46$	A $4/2 \pm 8/34$	A $1/2 \pm 1/14$	A $2/3 \pm 1/13$	A $1 \pm 0/12$	0%	0%	0%	<i>C. coronatus</i>
	B $1 \pm 8/9$	B $0/8 \pm 8/4$	A $2 \pm 7/9$	B $0/2 \pm 2/8$	B 0%	0%	0%	0%	>ده کیلو دالتون
A	$2/5 \pm 1/19$	A $2/4 \pm 1/12$	A $7/2/4 \pm 9/8$	A $1/5 \pm 7/4$	0%	0%	0%	0%	<ده کیلو دالتون
	B $1 \pm 4/6$	B $1/2 \pm 3/2$	B $0/4 \pm 1/27$	B $0/1 \pm 0/8$	0%	0%	0%	0%	>ده کیلو دالتون

(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 به صورت میانگین  $\pm$  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 درنتیجه 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 پیتیدی خاص خود بامن کونوتوکسین‌ها و با ویژگی ضد درد مورد توجه 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).

استخراج ترکیبات پیتیدی از دستگاه تولید سم روشنی معمول در تحقیقات است، زیرا که سلول های مجرای سم، این پیتیدهای سمی را سنتز می کنند و به صورت هولوکرین وارد مجرای می شوند (Biass *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 آنزیمهای 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 آبیونی 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. frigidus* و ۱۱ باند در گونه *C. coronatus* (Tabaraki *et al.*, 2014) 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 آنزیمهای 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 پیتیدی کوچک ساخته شده اند که این زیر واحدها به فرم بالغ درآمده و از سطح سلول به داخل لومن ترشح می شوند. پس از ترشح زیر واحدهای پیتیدی 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 کشنگی عصاره کونوتوکسینی *C. textile* از ویژگی های نوروتوکسیکی آن منشأ نمی گیرد، بله 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 انسان تنها دیده شد و اثربر 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 (تراپیتون X100) شده است، (HD50) در گونه *C. coronatus* کمی بیش از ۵۰۰ میکرو گرم 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 پیتیدهای همولیتیک و پارالیتیک است؛ که با توجه به نوع تقدیه کرم خواری در گونه های موردمطالعه 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 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 پیتیدهایی با رنج وزن مولکولی ۱۲۰-۴۰ کیلو دالتون بود. این پیتیدها با غلظت حدود

۴۳۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر، منجر به ۸ واحد همولیتیک (8HU) شدن (Kumar *et al.*, 2014). لذا می‌توان گفت؛ فعالیت همولیتیک به نوع گونه و نوع خون مورداستفاده بستگی دارد و با افزایش غلظت توکسین، فعالیت لیز کنندگی افزایش می‌یابد که در ارتباط با تفاوت در ترکیبات 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) و نوع رژیم غذایی (Safavi-Hemami *et al.*, 2011) آن (بلوغ یا جنینی)، مرحله زندگی آن (بلوغ یا جنینی)، نوع رژیم غذایی (Elliger *et al.*, 1995; Shanmuganandam, 1995)، آشیان اکولوژیک (Marsh, 1970) در تنوع ترکیبات کونوتوکسینی و اثرات متفاوت همولیتیک نقش دارد.

با توجه به نتایج این مطالعه، می‌توان گفت؛ کونوتوکسین‌ها فعالیت همولیتیک پایینی داشته (شکل ۳) زیرا که عمدۀ 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 گلbul‌های قرمز با توجه به وزن مولکولی پایین آن‌ها تفکیک نموده و در تولید دارو و درمان مورداستفاده قرارداد. با توجه به اینکه اثرات خد دردی این کونوتوکسین‌ها با آزمون رفتاری خد درد روی موش سوری (آزمون فرمالین و هات پلیت) اثبات شده است (رجبی و همکاران، ۱۳۹۵) می‌توان نتیجه گرفت که این عصاره‌ها کاندیدای مناسب دارویی بوده و می‌توانند در طراحی داروهای خد درد مورداستفاده قرار گیرند. زیرا که ورود این ترکیبات به خون، آسیبی به گلbul‌های قرمز نخواهد زد.

## منابع

- رجبی، ح. ذوالقرنین، ح.، رونق، م. ت.، سواری، ا. و. رنجبر، م. ش.، ۱۳۹۵. مطالعه سیستماتیک مولکولی و اثرات خد درد پیتیدهای استخراجی از حلزون‌های مخروطی جنس Conus در سواحل قشم، لارک، هرمز و سستانه. 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 venomics 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 *Conuscalifornicus* 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 venomics reveals the mechanism for expanded peptide diversity in cone snail venom. Molecular and Cellular Proteomics. 12: 312–329.

- Eisapoort, 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 *Conuscalifornicus*reflects a diversity of prey types and a novel evolutionary history. Toxicon. 57: 311-322.
- Garrett, J. E., Buczak, 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 urochordataLissoclinumbistratumSluiter: 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 *Conusbrunneus* in *Drosophila melanogaster*. Florida Atlantic University, 18 pp.
- Hu, H., Bandyopadhyay, P. K., Olivera, B. M. and Yandell, M., 2011.** Characterization of the *Conusbullatus* 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 *Conustessellatus*. 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 *Conuslentiginosus* 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 vermicorousConidae. 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., Zolgharnen, H., Ronagh, M. T., Savari, A. and Ranjbar, M. Sh., 2016.** Histological study of the venom production organ in *Conuscoronatus* and *Conusfrigidus*.International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 4(1): 370-372
- Safavi-Hemami, H., Siero, W. A., Kuang, Z., Williamson, 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 *Conusvictoriae* – 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 Research7. 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 Fawreau, 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>.

**Wu, X., Shao, X., Guo, Z. Y. and Chi, C.W., 2010.** Identification of neuropeptide Y-like conopeptides from the venom of *Conusbetulinus*. ActaBiochimicaBiophysicaSinica. 42: 502-505.

