بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه آزاد اسلامی
واحد علوم و تحقیقات

رساله دکتری رشته بیولوژی جانوران دریایی "Ph.D."

موضوع:

استخراج ، خالص سازی و آنالیز سمConotoxin از گونه*Conus textile* خلیج فارس و مطالعه اثرات ضد دردی آن در مدل حیوانی

استادان راهنما:
دکتر دلاور شهباززاده
دکتر پرگل قوام مصطفوی

استادان مشاور:
دکتر علی ماشینچیان مرادی
دکتر غلامحسین وثوقی

نگارنده:
نسیم تبارکی

سال تحصیلی ۱۳۹۲-۱۳۹۱

Islamic Azad University

Sciences and research branch

"Ph.D." Thesis

Research title:

Extraction, purification and analysis of conotoxin of *Conus textile* captured from Persian Gulf and the investigation of analgesic effects of conotoxins in an animal model

Advisors:

Dr. Delavar Shahbazzadeh

Dr. Pargol Ghavam Mostafavi

Consulting advisors:

Dr. Ali Mashinchian Moradi

Dr. Gholamhossein Vosughi

By:

Nasim Tabaraki

Summer 2013

تشکر و سپاس

خدایی را که هر چه دارم از اوست. به امید آنکه توفیق یابم جز خدمت به خلق او نکوشم.

از استاد گرامی و صبور، **جناب آقای دکتر شهباززاده** ، که زحمت راهنمایی این رساله را متقبل شدند و استفاده از امکانات آزمایشگاه ونوم در انستیتو پاستور ایران را برای اینجانب فراهم نمودند، کمال تشکر را دارم.

از استاد با کمالات و شایسته؛ **جناب آقای دکتر باقری** ، که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و انجام این پروژه بدون راهنمایی های ایشان مقدور نبود نهایت سپاس و قدردانی را دارم.

از استاد فرزانه و دلسوز؛ **سرکار خانم دکتر قوام مصطفوی** که زحمت راهنمایی این رساله را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از **جناب آقای دکتر ماشینچیان مرادی و آقای دکتر وثوقی** به دلیل یاریها و راهنماییهای ایشان بسیار سپاسگذارم.

و با تشکر خالصانه خدمت دوستان عزیزم و همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نمودند.

باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

تقدیم به

همسرعزیزم

که نشانه لطف الهی در زندگی من است. به پاس قدر دانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از سلامت و امنیت و آرامش برای من فراهم آورده است.

پدر و مادر عزیز و مهربانم

که در سختی‌ها و دشواری‌های زندگی همواره یاوری دلسوز و فداکار و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده‌اند.

عنوان | فهرست مطالب | شماره صفحه

چکیده ۱
مقدمه ۲

فصل اول: کلیات تحقیق

۱-۱- خلیج فارس ۵
۱-۱-۱-۱ - ماهی پهن برقی ۶
۱-۱-۱-۲- ماهی ونوموس ۶
۱-۱-۱-۳- سنگ ماهی ۷
۱-۱-۱-۴- مار ماهی ۷
۱-۱-۱-۵- ماهی پف کننده ۸
۱-۱-۱-۶- گربه ماهی ۸
۱-۱-۱-۷- عروس دریایی ۹
۱-۱-۱-۸- صدف مخروطی ۱۰
۱-۱-۱-۹- ستاره دریایی تاج خاردار ۱۱
۱-۲- حلزون های مخروطی ۱۲
۱-۲-۱- ۱- حلزون مخروطی *Conus textile* ۱۴
۱-۲-۱-۲- حلزون مخروطی *Conus vexillum* ۱٤
۱-۲-۱-۳- حلزون مخروطی *Conus striatus* ۱۵
۱-۲-۱-۴- حلزون مخروطی *Conus flavidus* ۱۵

۱-۲-۱-۵- حلزون مخروطی *Conus inscriptus* ۱۵
۱-۲-۱-۶- حلزون مخروطی *Conus tessulatus* ۱۶
۱-۲-۱-۷- حلزون مخروطی *Conus coronatus* ۱۶
۱-۲-۱-۸- حلزون مخروطی *Conus quercinus* ۱۷
۱-۳- ونوم حلزون های مخروطی ۱۷
۱-۴- کانال های یونی ۲۰
۱-۵- درد ۲۱
۱-۶- مکانیسم اثر ضد دردی کونوتوکسین ها ۲۴۲٤
۱-۷- زیکونوتاید ۲۵
۱-۸- مورفین ۲۶
۱-۹- انواع تست های سنجش درد در مدل حیوانی ۲۷
۱-۱۰- الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) ۳۰
۱-۱۱- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ۳۱

فصل دوم: مروری بر تحقیقات پیشین

مروری بر تحقیقات پیشین ۳۴۳٤
۲-۱- مطالعات انجام شده در جهان ۳۵۳۵
۲-۲- مطالعات انجام شده در ایران ۳۷

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱- مواد وتجهیزات ۳۹
۳-۲- جمع آوری نمونه ها ٤۰
۳-۳- استخراج ونوم ۴۱
۳-۴- تعیین غلظت ونوم (پروتئین) استخراج شده ۴۲

۳-۵- الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) ٤٣
۳-۶- بررسی سمیت ونوم ٤٥
۳-۷- جداسازی پروتئین ها و پپتید های ونوم به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)..... ۴۵
۳-۸- بررسی فعالیت ضد درد ٤٨
۳-۸-۲-۱- ونوم استخراج شده ٤٨
۳-۸-۲-۲- پروتئین ها و پپتیدهای ونوم ۴۹
۳-۹- تعیین غلظت فراکشن ضد درد ۴۹
۳-۱۰- SDS PAGE فراکشن ضد درد ۵۰
۳-۱۱- بررسی اثرات هم افزایی بین فراکشن ها ۵۰
۳-۱۲- تجزیه و تحلیل آماری ۵۰

فصل چهارم: نتایج

۴-۱- تعیین غلظت ونوم..... ۵۲
۴-۲- نتایج SDS-PAGE ونوم استخراج شده ۵۳
۴-۳- نتایج بررسی سمیت ونوم ۵۳
۴-۴- نتایج HPLC به منظور جداسازی پپتیدها و پروتئین های ونوم ۵۴
۴-۵- نتایج اثرات ضد درد در آزمون فرمالین ۵۵
۴-۶- تعیین غلظت فراکشن ضد درد ۶۰
۴-۷- نتایج SDS-PAGE فراکشن ضد درد ۶۰
٤-۸- نتایج اثرات هم افزایی بین فراکشن ها ۶۰
۴-۹- مقایسه آماری نتایج مرفین و ونوم ۶۱

فصل پنجم: بحث

۵-۱- بحث ٦٦

۵-۲- نتیجه گیری ۷۲
۵-۳- پیشنهادات ۷۴
منابع فارسی ۷۵۷٤
Reference..... ۷۶
Abstract ۷۹

عنوان **فهرست جدول ها** **شماره صفحه**

جدول ۲-۱- کونوتوکسین های دارویی ۳۷

جدول ۳-۵-۱- میزان مواد تشکیل دهنده ژل متمرکز کننده ۵٪(حجم ۲ ml)..... ٤٥

جدول ۳-۵-۲- میزان مواد تشکیل دهنده ژل تفکیک کننده ۱۵٪(حجم۷/۵ ml) ٤٤

جدول ۳-۷-۲-۱- روش اول جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* با HPLC..... ٤٧

جدول ۳-۷-۲-۱- روش دوم جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* با HPLC..... ٤٧

جدول ۳-۷-۲-۱- روش سوم جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* با HPLC..... ٤٧

جدول ۳-۷-۲-۱- روش چهارم جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* با HPLC ٤٨

جدول ۳-۷-۲-۱- روش پنجم جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* با HPLC..... ٤٦

جدول ۳-۷-۲-۱- روش ششم جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* با HPLC..... ٤٨

جدول ۳-۷-۲-۱- روش هفتم جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* با HPLC ٤٩

جدول٤-۵-۱- میانگین شمارش علائم درد در موش پس از تزریق ونوم و مورفین..... ٥٦

جدول٤-۵-۲-۱- اثرات ضد درد فراکشن های جدا شده توسط HPLC..... ٥٤

جدول٤-۸- اثرات هم افزایی فراکشن های جدا شده توسط HPLC در کاهش درد ٦٢

جدول ٤-۹-۱- اختلاف در پاسخ به درد بین گروه ها در درد حاد ٦٢

جدول ٤-۹-۲- اختلاف در پاسخ به درد بین گروه ها در درد مزمن..... ٦٣

جدول ٤-۹-۳- اختلاف در پاسخ به درد بین فاز حاد و مزمن..... ٦٥

عنوان	فهرست شکل ها	شماره صفحه

شکل ۱-۱-۱-۱- ماهی پهن برقی ٦
شکل ۱-۱-۱-۲- ماهی ونوموس ١٤
شکل ۱-۱-۱-۳-سنگ ماهی ۷
شکل ۱-۱-۱-٤- مار ماهی ۸
شکل ۱-۱-۱-٥- ماهی پف کننده ۸
شکل ۱-۱-۱-٦- گربه ماهی ۹
شکل ۱-۱-۱-۷- عروس دریایی ۱۱
شکل ۱-۱-۱-۸- صدف مخروطی ۱۱
شکل ۱-۱-۱-۹- ستاره دریایی تاج خاردار ۱۲
شکل ۱-۲- ساختار کیسه و مجاری ونوم حلزون ۱۳
شکل ۱-۲-۱-۱- مشخصات ظاهری *Conus textile* ١٤
شکل ۱-۲-۱-۲- مشخصات ظاهری *Conus vexillum* ١٥
شکل ۱-۲-۱-۳- مشخصات ظاهری *Conus striatus* ١٥
شکل ۱-۲-۱-٤- مشخصات ظاهری *Conus flavidus* ١٦
شکل ۱-۲-۱-٥- مشخصات ظاهری *Conus inscriptus* ١٦
شکل ۱-۲-۱-٦- مشخصات ظاهری *Conus tessulatus* ١٧
شکل ۱-۲-۱-۷- مشخصات ظاهری *Conus coronatus* ١٧
شکل ۱-۲-۱-۸- مشخصات ظاهری *Conus quercinus* ١٨
شکل ۱-٦- مکانیسم اثر ضد درد کونوتوکسین ها ٢٥
شکل ۳-۲- محل نمونه برداری *Conus textile* ٤٢
شکل ۳-۳- آناتومی *Conus textile* ٤٢
شکل ۳-۸-۲-۱- تزریق فرمالین به پای موش ٥٠
شکل ٤-۱-۱- نمودار استاندارد روش BCA ٥٣
شکل ٤-۲- SDS-PAGE ونوم *Conus textile* ٥٤

شکل ۴-۴- کروماتوگرام حاصل از آنالیز ونوم *Conus textile* در ۲۱۴ نانومتر ٥٤
شکل۴-۵-۱- هیستوگرام اثرات ضد دردی ونوم *Conus textile* در موش ٥٧
شکل ٤-٥-١-٢- اثرات ضد درد ونوم *Conus textile* وابسته به دوز ٥٨
شکل ٤-٥-٢- فراکشن ضد درد جدا شده با HPLC ٥٩
شکل ٤-٧- SDS PAGE فراکشن ضد درد.....٦١

چکیده

شناسایی گونه های سمی خلیج فارس و آشنایی با ترکیب و خواص سم آن ها با توجه به اهمیت موضوع از نظر پزشکی، حائز اهمیت می باشد.

حلزون های دریایی جنس کونوس نزدیک به ۷۰۰ گونه می باشند. ونوم آنها غنی از پپتید های جدید می باشد که کونوتوکسین نامیده می شوند. هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثر ضد درد حلزون *Conus textile* خلیج فارس در موش و مقایسه آن با اثر مرفین می باشد. حلزون های مخروطی از عمق ۷ متری جزیره لارک صید و به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل شد و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- نگهداری شدند. مجاری ونوم جدا و در آب دیونیزه هموژنایز شدند. مخلوط بدست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سوپ رویی به عنوان ونوم استخراج شده در نظر گرفته شده و پس از لیوفیلیزه در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. جهت بررسی ونوم استخراج شده از ژل SDS-PAGE و تعیین الگوی پروتئینی از روش HPLC استفاده شد. برای بررسی اثر ضد درد در موش از آزمون فرمالین استفاده شد. الکتروفورز ونوم نشان داد که وزن پروتئین ها و پپتیدهای آن ۲۵۰-۶ کیلو دالتون می باشد. کروماتوگرام ونوم وجود بیش از ۴۴ فراکشن بزرگ و کوچک را مشخص نمود. ونوم و فراکشن تخلیص شده در دوز ng ۱۰ بیشترین اثر ضد درد را نشان دادند. در بررسی سمیت ونوم در موش تا غلظت ۱۰۰mg/kg هیچ مرگ و میری مشاهده نشد. تعیین مشخصات ونوم حلزون می تواند منجر به کشف و تولید داروهای مسکن کارآمدتر گردد.

کلمات کلیدی: حلزون های مخروطی، *Conus textile*، ونوم، HPLC، ضد درد

مقدمه

جنس *Conus* متعلق به شاخه نرم تنان، رده شکم پایان و خانواده کونیده، شامل بیش از ۷۰۰ گونه زنده است که به زیر گونه های متعدد و متفاوتی تقسیم می شوند.

حلزون نرم تن خوار *Conus textile* متعلق به این جنس از آب های خلیج فارس صید شد و اثرات ضد درد ونوم آن در موش مورد بررسی قرار گرفت.

Conus textile مانند همه اعضای جنس کونوس، برای صید طعمه نیزه های زهر آلود فلج کننده ای به سوی قربانی پرتاب می کند. ونوم این حلزون درون مجاری ونوم تولید می شود و نقش کیسه ونوم که کیسه ای بزرگ و عضلانی است، نامشخص است.

حلزون های مخروطی شکار خود را از طریق سیگنال های شیمیایی تولید شده در آب تشخیص می دهند. پس از تشخیص طعمه، یکی از هزاران نیزه (رادولا) خود را از کیسه رادولا با ونوم پر کرده به درون خرطوم می فرستند و از آنجا به سوی طعمه پرتاب می کنند. زمانی که شکار توسط ونوم بی حرکت می شود، حلزون مخروطی معده خود را منبسط کرده و آن را می بلعد.

ونوم هر حلزون مخروطی حاوی بیش از ۱۰۰ پپتید است که دارای اثرات بیولوژیکی بوده و کونوتوکسین نامیده می شوند.

هر گونه از این حلزون ها بر اساس نوع تغذیه دارای پپتید های متفاوتی نسبت به دیگر گونه ها می باشد.

مساله تحقیق

این پروژه با هدف استخراج و آنالیز ونوم *Conus textile* در آب های خلیج فارس صورت می پذیرد.

این حلزون در آب های گرمسیری و نیمه گرمسیری و گاهی در آب های معتدل سراسر جهان یافت می شود. این حلزون دارای یک کیسه سم و مجاری سم می باشد که به یک خرطوم متصلند و دارای ساختارهای نیزه مانندی می باشد که حاوی سم هستند و در مواقعی که احساس خطر می کند و همچنین جهت صید طعمه این نیزه ها را به سوی هدف پرتاب می کند. سم این نیزه ها بسیار خطرناک و برای انسان نیز کشنده است. این بررسی به منظور آنالیز زهر *Conus textile* صورت می گیرد تا اجزای پروتئین های سمی آن شناسایی گردد و اثرات بیولوژیک هر یک از آنها مورد بررسی قرار گیرد. با بررسی پروتئین های موجود در ونوم این حلزون می توان به پروتئین ضد درد که به نظر می رسد از پروتئین های اصلی باشد دست یافت و پس از خالص سازی، اثرات بیولوژیک آن را مورد بررسی و آنالیز قرارداد.

استخراج سم از مجاری سم حلزون انجام خواهد شد. فراکشن گیری از سم با استفاده از ستون کروماتوگرافی HPLC فازمعکوس صورت می گیرد. فراکشن های حاصله جمع آوری شده و سپس از

لحاظ ضد درد بودن مورد آزمایش قرار می گیرند. پیک های بدست آمده از ستون مورد سنجش ضد درد قرار گرفته و پروتئین به شدت ضد درد بدست خواهد آمد.

اهمیت و ضرورت انجام تحقیق

تاکنون تحقیقی در این زمینه در ایران صورت نگرفته است. به منظور شناسایی گونه های سمی خلیج فارس و آشنایی با ترکیب و خواص زهر آنها و همچنین با توجه به اهمیت موضوع به لحاظ پزشکی و ایجاد مشکلات در سلامت صیادان، شناخت دقیق ماهیت سم *Conus textile* حائز اهمیت می باشد. برطبق گزارشات بدست آمده سم این حلزون سبب ایجاد فلج و سپس به سرعت باعث مرگ فرد می شود. این که چه عواملی در ونوم این حلزون وجود دارد که سبب عوارض بالینی و مرگ در انسان می شوند کاملاً شناخته شده نیست. تحقیقات انجام شده در دنیا که عمدتاً بر روی ونوم این حلزون صورت گرفته، نشان داده است که زهر این حلزون دارای خواص ضد دردی و همولیتیک می باشد.

در تحقیق حاضر شناسایی توکسین ضد درد و خالص سازی آن انجام می شود که نتایج این تحقیق در آینده می تواند در تولید آنتی سرم ضد سم حلزون و تولید داروهای ضد درد قوی مورد استفاده قرار گیرد.

اهداف تحقیق

۱- استخراج سم کونوتوکسین

۲- انجام آزمایش های پروتئومیکس (پروتئین شیمی) بر روی ونوم جدا شده شامل : SDS-PAGE، خالص سازی پروتئین های موجود در ونوم با استفاده از ستون های کروماتوگرافی HPLC فاز معکوس و غیره

۳- انجام آزمایش های فعالیت بیولوژیکی هر یک از فرکشن ها جدا شده حاصل از کروماتوگرافی

۴- شناسایی پروتئین ضد درد

۵- مقایسه اثر ضد درد ونوم *Conus textile* با مورفین

فرضیه تحقیق

ونوم موجود در این حلزون دارای اثرات ضددردی می باشد.

فصل اول :

كليات تحقيق

۱-۱- خلیج فارس

خلیج فارس دریایی نیمه بسته،واقع در بخش شمال غربی اقیانوس هند است که تنها از طریق تنگه هرمز به آبهای آزاد وصل می شود. این دریا یک حوضه تکتونیک است و از تاثیر متقابل قاره های آفریقا واروآسیا بوجود آمده است.

از زمان پیدایش خلیج فارس حدود ۷۰ میلیون سال می گذرد.

عوامل تکتونیکی ، هم چنین مهم ترین عامل در شکل دهی خلیج فارس محسوب می شود.

طول خلیج فارس حدود ۱۰۰۰کیلومتر و عرض آن حدود ۳۰۰-۲۰۰ کیلومتر و وسعت آن حدود ۲۴۰/۰۰۰ کیلومتر مربع می باشد.

خلیج فارس توسط تنگه هرمز از دریای عمان جدا شده است.

خلیج فارس بطور متوسط ۳۵ متر عمق دارد،البته عمق آن در بخش جنوب شرقی که به دهانه تنگه هرمز نزدیک است، بیشتر بوده و چیزی برابر ۱۰۰ متر است.

بخش شرقی آن یعنی سواحل کشورهای عربی خلیج فارس کم عمق بوده و عمق متوسط آب در حدود ۵ متر است. خلیج فارس در میان سرزمین های خشک و گرم احاطه شده است و مبادلات آبی آن که از طریق تنگه هرمز صورت می گیرد، دارای حجم اندکی بوده و هم چنین با توجه به عمق کم آن ، به میزان زیادی تحت تاثیرات فصلی و شرایط محیطی قرار می گیرد.

آب و هوای منطقه خشک و نیمه حاره ای است و تغییرات فصلی دما دراین منطقه چشمگیر بوده و از حدود صفر درجه در زمستان تا ۵۰ درجه در تابستان متغییر است.

بارندگی در منطقه خلیج فارس اندک و میزان آن در سواحل ایرانی در شمال، بطور نسبی بیشتر از بخش مرکزی و سواحل جنوبی آن است و میزان بارندگی سالیانه ۷۰ میلی لیتر تعیین شده است.

میزان تبخیر متوسط سالیانه خلیج فارس ۱۴۴ سانتی متر است .لذا به دلیل تبخیر شدید، بارندگی اندک و مقدار آب شیرین کم ورودی و هم چنین به علت حجم اندک آب تعویضی خلیج فارس با اقیانوس هند،میزان شوری آن بسیار بالاتر از سایر آبهای آزاد بوده ودر حدود۴۱ قسمت در هزار می باشد.

۱-۱-۱- موجودات خلیج فارس

جانداران خلیج فارس مانند تمام آبهای گرمسیری و نیمه گرمسیری از تنوع فراوانی برخوردار هستند. در خلیج فارس انواع مختلفی از ماهی ، نرم تنان ، سخت پوستان و دیگر موجودات یافت می شوند که برخی از گونه های آنها جزء جانوران سمی و خطرناک می باشند. از جانوران سمی خطرناک خلیج فارس می

توان به عروس دریایی، مارماهی، ستاره دریایی تاج خاردار، سنگ ماهی، گربه ماهی، ماهی پهن برقی و حلزون های مخروطی اشاره کرد. یکی از خانواده های نرم تنان خلیج فارس حلزون های مخروطی هستند که خود شامل جنس و گونه های سمی متعدد می باشد.

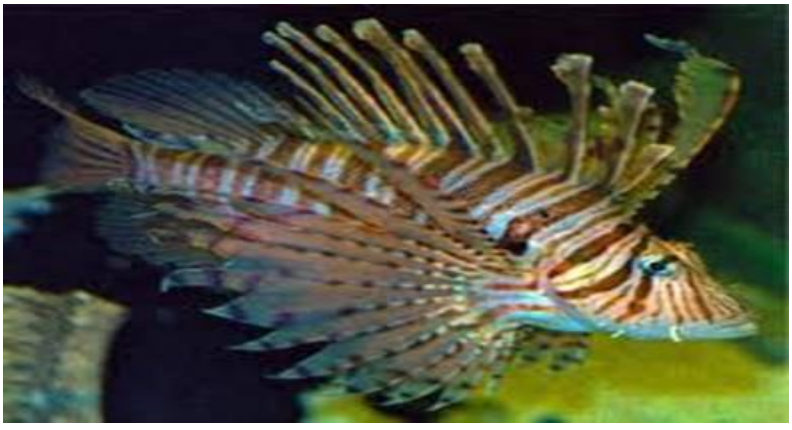
۱-۱-۱-۱- ماهی پهن برقی

این آبزی به هنگام خطر توسط دم استخوانی شلاق مانند خود از خود دفاع می کند. دم خاردار این ماهی موجب زخم شده و از محل جراحت سم وارد بدن می شود زیرا این جانداران اغلب سمی هستند.

شکل ۱-۱-۱-۱- ماهی پهن برقی

۱-۱-۱-۲- ماهی ونوموس

این ماهی مانند ماهیان مشابهی که دارای استخوان‌های سمی هستند در هنگام خطر به کمک استخوان‌های تیز سمی از خود دفاع می کند.



شکل ۱-۱-۱-۲- ماهی ونوموس

۱-۱-۱-۳- سنگ ماهی

نام این ماهی به دلیل شباهت ظاهری آن به سنگ است. روی قسمت پشت این ماهی ۱۳ باله تیغ مانند وجود دارد که زهر را از درون ۲ کیسه متصل به هر تیغه آزاد می کند. زهر این ماهی درد شدید همراه با شوک، فلج شدن و مرگ بافتی ایجاد می‌کند. این زهر به حدی دردناک است که گفته می‌شود قربانیان آن از شدت درد حاضر به قطع عضو آسیب دیده خود هستند. این ماهی در آب‌های دریای عمان یافت می شود که عموماً زیر صخره ها زندگی می کند بعنوان سمی ترین ماهی در دنیا شناخته شده است.

شکل ۱-۱-۱-۳- سنگ ماهی

۱-۱-۱-۴- مار ماهی

سم مار دریایی از مارهای خشکی قوی‌تر است ولی معمولا این ماهی به دلیل گوشه‌گیری به انسان نزدیک نمی‌شود و در صورت گزیدن سمی وارد نمی کند. در صورت ورود سم مار ماهی سم آن بسیار خطرناک است.

شکل۱-۱-۱-۴-مارماهی

۱-۱-۱-۵- ماهی پف کننده

این ماهی دارای سمی است که قادر است تا ۳۰ نفر را از پا درآورد. نکته تاسف بار در مورد این ماهی این است که تا کنون هیچ پادزهری برای سم آن شناخته نشده است تنها توصیه‌ای که می‌توان در مورد قربانیان این سم داشت این است که به فرد در تنفس یاری شود تا به طریقی این سم از بدن او خارج شود. زهر این ماهی مرگ سریع را به همراه دارد به گونه‌ای که موجب فلج شدن زبان، لب‌ها، سرگیجه، تهوع، افزایش ضربان قلب، مشکلات تنفسی و فلج عضلانی می‌شود. قربانیان در اثر خفگی ناشی از فلج شدن ماهیچه های دیافراگم می‌میرند. بیشتر مرگ‌ها در اثر زهر این ماهی در نتیجه طبخ این ماهی توسط افراد ناآگاه و آموزش ندیده رخ می‌دهد.

شکل ۱-۱-۱-۵-ماهی پف کننده

۱-۱-۱-۶- گربه ماهی

گربه ماهی در کناره های دهان، سبیل برآمده‌ای دارد. اکثر مواقع در رودخانه‌های گلی و لجنی و سواحل گرمسیری و آبهای معتدل یافت می شود. بدون توجه به خوشمزه بودن گوشت این ماهی باید دانست که این ماهی برای انسان بسیار سمی است. در موارد خطر این ماهی سم خود را از طریق سبیلک هایش به دشمن منتقل می کند که بسیار سمی است. گاه این سم تا چند روز در روی بدن ماهی باقی می ماند. این سم حتی با پخته شدن ماهی هم از بین نمی رود و فرد را مسموم می‌کند. این ماهی‌ها مهاجم نیستند، افرادی توسط این موجود گزیده می‌شوند که هنگام شنا یا ماهیگیری روی آن پا می گذارند. در اثر نیش این ماهی درد شدید و التهاب در اطراف محل گزیده شده ایجاد می‌شود که باید محل گزیده شده را در آب گرم و تمیز که گرمای آن قابل تحمل باشد فرو برد و شستشو داد (مالش نداد) تا درد آن کاهش یابد. برداشتن نیش به وسیله انبرک و باز گذاشتن محل گزش و ضد عفونی کردن محل زخم توصیه می‌شود. پس از کمک‌های اولیه حتما به پزشک مراجعه شود.

شکل ۱-۱-۱-۶-گربه ماهی

۱-۱-۱-۷- عروس دریایی

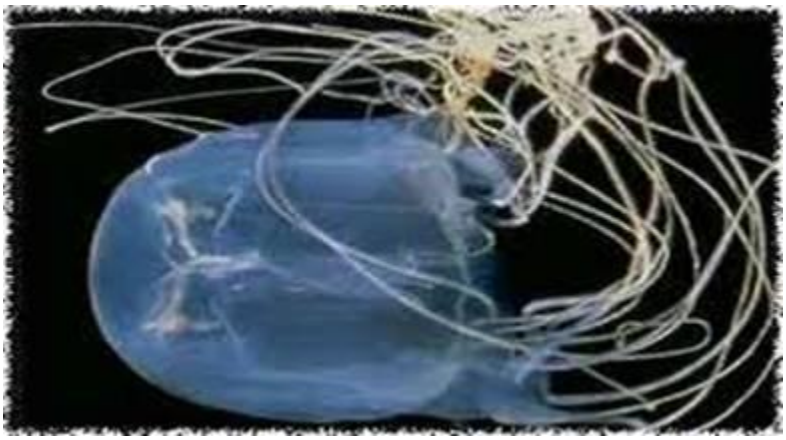
عروس دریایی یکی از خطرناکترین موجودات دریایی است. تعداد افراد کشته شده در سال توسط عروس دریایی سمی بیش از کوسه است. عروس دریایی بالغ هر ساله پیش از مرگ در دهانه رودها تخم ریزی می‌کند. تخم های این جانور برای استحکام بیشتر در خورها به صخره ها می چسبند. این موجود شکار خود را بصورت حملات مرسوم به چنگ نمی آورد بلکه بالای سر طعمه قرار می‌گیرد تا با شاخک‌های خود به طعمه حمله کند. یک میگوی مبارز می تواند یک عروس دریایی را از هم بدرد بنابراین عروس دریایی نیاز دارد تا بلافاصله در مواجهه با چنین مواردی دشمن خود را از بین ببرد و این کار توسط سمی بسیار قوی انجام می شود. شته های این موجود تا ۶۰ عدد به طول ۵ سانتیمتر نیز می رسند. این رشته ها به حدود ۵۰۰۰ میلیون سلول سوزش آور مسلح است. این اجزا در زمان مواجه با ماهی، نرم تنان و انسان وارد عمل می شوند. تماس یک شاخک ۳ متری می تواند منجر به مرگ انسان شود.

دانش نوین نشان داده است که عروس دریایی با چهار چشم اطراف را می نگرد. اینکه چگونه چشمهای عروس دریایی که در بدن آن واقع شده بدون ارتباط با مغز کار می کنند هنوز در هاله ای از ابهام قرار دارد ولی واقعیت این است که با این چهار چشم موجود قادر است تا کوچکترین چیزها و تغییرات را نیز متوجه شود. این موجودات معمولا سعی می کنند که از انسان‌ها فرار کنند ولی به جهت شفافیت گاه به اشتباه انسان با آنها مواجه می شود.

عروس دریایی دارای چنگال هایی به بلندی ۱ تا ۳ متر و بدنش ژلاتین مانند است. این جانور دریایی قادر به سوراخ کرن پوست بدن انسان است و در تمام نقاط دنیا مضر است. نیش عروس دریایی دارای مواد مختلف است که بعضی از آن‌ها باعث واکنش آلرژی می شوند. سمی ترین آنها عروس دریایی استوایی

است. این جانور نمی‌تواند شکار خود را تعقیب کند و همچنین به علت برخورداری از اندامی ژله مانند نمی‌تواند با هیچ جانداری درگیر شود و به همین علت باید بتواند در صورت نزدیک شدن شکار و یا یک جاندار مزاحم، تنها با یک تماس آن را از پای درآورد و به همین علت به چنین سم مرگباری مجهز شده‌است. زهر آن‌ها در سلول‌های نیشی قرار دارد که به پوست می‌چسبند.

عروس دریایی و دیگر جانوران زیر شاخه هیدروئیدها سلول‌های گزنده‌ای به نام کنیدوسیت دارند. این سلول‌ها، رشته تو خالی کوچکی را با شتابی باورنکردنی به سوی هر چیزی پرتاب می‌کنند سپس زهری را از راه آن رشته به درون هدف وارد می‌کنند. خارتنان دریائي با خارهاي تيز پوشيده شده‌اند. اين خارها مي‌توانند بعد از تماس با پوست شكسته و در آن جايگزين شوند. در نتيجه درد شديد و مداوم ايجاد مي‌شود و زخم بعداً عفوني خواهد شد مگر اينكه خارها بيرون آورده شوند. اگر خارها در دست‌ها يا پاها فرو رفته است، اين كار بايد توسط يک شخص ماهر و به‌وسيله‌ی سوزن خياطي انجام شود. در صورتي كه فرورفتگي خار عميق باشد بايد با پزشک خود مشورت كنيد. علائم گزش عروس دریایی بروز احساس درد شدید در محل گزش ، تهوع، استفراغ، اسهال، تورم غدد لنفاوی، دردهای شکمی و کمری، تب، سرد شدن بدن و تعریق می باشد، که در موارد حاد تنگی نفس، کما، مرگ را نیز شامل است. قرمزی دائم و خارش بعد از ۲ یا ۳ روز می تواند علائم عفونت میکروبی محل گزیده شده باشد.



شکل ۱-۱-۱- ۷- عروس دریایی

۱-۱-۱-۸- صدف مخروطی

این نرم تنان از نوع حلزون هستند و دندان‌هایی مانند نیشتر دارند که از طریق آنها سم را وارد بدن می‌کنند و موجب درد ، تورم و بی حسی و گاه سبب مرگ می شوند.

شکل ۱-۱-۱-۸- صدف مخروطی

۱-۱-۱-۹- ستاره دریایی تاج خاردار

استخوان‌های تیز این جانور با ماده سمی پوشیده شده که در صورت انتقال به هر زخمی می تواند ایجاد تهوع و آماس نماید. همچنین احتمال دارد که در موقع فرو رفتن در بدن، این استخوان‌های تیز بشکنند و در بدن باقی بمانند. احتمال زیست این ستاره در عمان بیش‌تر از خلیج فارس است.

شکل ۱-۱-۱-۹- ستاره دریایی تاج خاردار

۱-۲- حلزون های مخروطی

حلزون های مخروطی متعلق به جنس Conus (خانواده Conidae) در انواع مختلفی نزدیک به ۷۰۰ گونه زندگی می کنند و جزء کشنده ترین موجودات دریایی محسوب می شوند. قبل از سال ۲۰۰۹، همه گونه های حلزون های مخروطی در خانواده Conidae قرار می گرفتند. در سال ۲۰۰۹، تاکر و تناریو یک سیستم طبقه بندی متشکل از ۳ خانواده و۸۲ جنس را مطرح کردند که تمام گونه های زنده حلزون های مخروطی را شامل می شدند.

این طبقه بندی بر اساس مرفولوژی صدف، تفاوت رادولا، آناتومی، فیزیزلوژی و مقایسه مولکول DNA آنها انجام شده بود. در حال حاضر برخی از کارشناسان ترجیح می دهند طبقه بندی سنتی که در آن همه گونه های حلزون های مخروطی زنده در خانواده Conidae قرار می گیرند را مورد استفاده قرار دهند. در

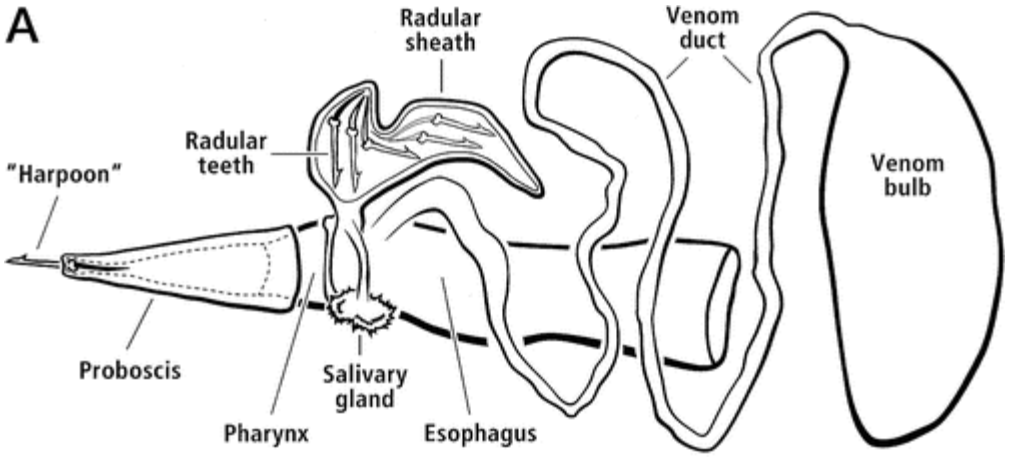
جامعه علمی، بحث درباره رده بندی این نرم تنان ادامه دارد و مطالعات مولکولی و فیلوژنی در تلاش برای روشن شدن این موضوع در حال انجام است.

نوع صدف ها مورد علاقهٔ کلکسیونرهای صدف های تزئینی هستند(Terlau *et al*., 1996). تعدادی از گونه های صدف های مخروطی ، ماهی صید می کنند و از آنجا که ماهی مهره دار بوده، زهر صدف های مخروطی که برای چنین شکاری سازش یافته است می تواند برای انسان نیز خطر آفرین باشد. به طور کلی، شکارهای صدف های مخروطی از خود آنها سریع تر حرکت می کنند و از این رو، زهرآنها برای کشتن و فلج چنین شکارهایی توسعه یافته است.

یک غده ی مارپیچ لوله ای کشیده (غده زهر)، تولید زهر می کند. یک برآمدگی ماهیچه ای در انتهای سر وجود دارد که از طریق انقباضات شدید، زهر را به انتهای دیگر فشار می دهد که بر پایه خرطوم پیوند دارد. خرطوم یک امتداد کشیده ماهیچه ای از منطقه ی دهانی است که می تواند به مقدار چشمگیری به پیش رفته و به جستجو بپردازد. رادولا که زبان دندان دار کیتینی در دیگر نرم تنان است، در صدف های مخروطی به شکل نیزه های دندانه دار توخالی تغییر یافته است . این نیزه ها در درون یک کیسه، نسبتاً آزاد هستند. یکی از آنها انتخاب شده و به نوک خرطوم هدایت می شود . آنها می توانند به صورت پیوسته جایگزین شوند.

مکانیسم حمله با گذاشتن نیزه نوک خرطوم در بدن شکار آغاز می شود. برآمدگی ماهیچه ای منقبض شده و زهر در طول خرطوم از غده ی زهری تا نیزه جلو رانده می شود(شکل ۱-۲).

حلزون های مخروطی در آبهای کم ژرفا، در بین توده های مرجانی، آبگیرها و در میان قلوه سنگها زندگی میکند. گاهی طول آنها تا ۱۰ سانتیمتر و حتی بیشتر نیز میرسد. دارای یک سیفون هستند که با یک رنگ نارنجی طرح زده شده است که موجب جلب شکار شده و تنها بخشی از آن، در زمانی که صدف در شن فرو رفته است، قابل دیدن است. این حلزون ها بر اساس نوع تغذیه به سه گروه عمده تقسیم می شوند. گونه هایی نظیر *Conus geographus* و *Conus striatus* از ماهیها و *Conus textile* و *Conus pennaceus* از نرم تنان و گونه های *Conus imperialis* و *Conus vexillum* از کرم های پرتار تغذیه می کنند(Baby *et al*., 2010).



شکل ۱-۲- ساختار کیسه و مجاری ونوم حلزون

۱-۲-۱- حلزون های مخروطی خلیج فارس

۸ گونه حلزون مخروطی متعلق به جنس *Conus* در آبهای خلیج فارس وجود دارند که شامل گونه های *Conus coronatus,Conus flavidus, Conus vexillum, Conus striatus, Conus inscriptus, Conus quercinus* and *Conus textile, Conus tessulatus* می باشند.

۱-۲-۱-۱- حلزون مخروطی ***Conus textile***

حلزون *Conus textile* یکی از گونه های سمی حلزون های دریایی است که متعلق به خانواده Conidae می باشد و Cloth of gold cone نیز نامیده می شود.

طول افراد بالغ این گونه معمولا cm ۹-۱۰ و بیشترین طول صدف به cm ۱۵ می رسد. رنگ صدف زرد-قهوه ای است. در فصل تولید مثل جنس ماده صدها تخم می گذارد که پس از ۱۶-۱۷ روز لارو از آنها خارج می شود. لارو ها در حدود ۱۶ روز در آب شناورند سپس در کف دریا ساکن می شوند. طول لاروها در این زمان در حدود mm ۱.۵ است. این حلزون ها پس از ۶ سال به حداکثر رشد خود می رسند.

این حلزون گوشت خوار است و بیشتر از نرم تنان تغذیه می کند.

بدلیل کند بودن حرکت در حلزون های مخروطی ،این موجودات برای صید طعمه های با حرکت سریع تر مانند ماهیها، از نیزه های میکروسکوپی حاوی سم (رادولا) استفاده می کنند.

شکل۱-۲-۱- ۱- مشخصات ظاهریConus textile

۱-۲-۱-۲- حلزون مخروطی *Conus vexillum*

این گونه از حلزون های مخروطی معمولا دارای صدف بزرگی می باشد و در مرداب ها و آبسنگ های مرجانی دیده می شود. رنگ افراد بالغ قهوه ای ولی نوزادان زرد رنگ هستند. این حلزون ها ممولا تخم های خود را درون کپسول هایی زیر صخره ها می گذارند.

شکل۱-۲-۱-۲- حلزون مخروطی *Conus vexillum*

۱-۲-۱-۳- حلزون مخروطی *Conus striatus*

رنگ صدف *Conus striatus* ترکیبی از رنگ های سفید، صورتی و قهوه ای است. این گونه از حلزون های مخروطی از ماهی ها تغذیه می کنند. طول آنها می تواند تا ۱۲ cm برسد.

شکل ۱-۲-۱-۳- حلزون مخروطی *Conus striatus*

۱-۲-۱-۴- حلزون مخروطی *Conus flavidus*

این حلزون مانند بقیه اعضای متعلق به جنس *Conus* ، شکارچی وسمی می باشد. بیشترین طول صدف cm ۶ ولی معمولا cm ۴ طول دارند. در طول روز بیشتر در میان آبسنگ های مرجانی دیده می شوند و از ماهی های کوچک مرجانی تغذیه می کنند. در ناحیه جزر و مدی تا عمق m ۱۰ زندگی می کنند.

شکل ۱-۲-۱-۴- حلزون مخروطی *Conus flavidus*

۱-۲-۱-۵- حلزون مخروطی *Conus inscriptus*

رنگ صدف این حلزون ترکیبی از رنگ های سفید، خاکستری و قهوه ای است. *Conus inscriptus* ماهی خوار است و قادر به نیش زدن انسان نیز می باشد. طول یک حلزون بالغ بین cm ۶.۵-۳.۲ است.

شکل ۱-۲-۱-۵- حلزون مخروطی *Conus inscriptus*

۱-۲-۱-۶- حلزون مخروطی *Conus tessulatus*

این گونه احتمالا دارای بزرگترین اندازه در بین گونه های شناخته شده از حلزون های مخروطی می باشد. زیستگاه آنها عمدتا اقیانوس هند، اقیانوس آرام و سواحل شرقی آفریقا است.

شکل ۱-۲-۱-۶- حلزون مخروطی *Conus tessulatus*

۱-۲-۱-۷- حلزون مخروطی *Conus coronatus*

صدف این حلزون ها دارای لکه های نامنظم قهوه ای تیره و روشن می باشد. طول صدف آنها گاهی تا بیش از

۴.۵ cm می رسد. در فارسی به آنها حلزون کله قندی گفته می شود. این حلزون ها در آبهای گرمسیری فراوان، در آبهای معتدله با فراوانی کمتر و در آبهای سرد کمیاب هستند. *Conus coronatus* از منطقه جزر و مدی تا عمق ۱۰ m یافت می شود و از کرمها تغذیه می کند.

شکل ۱-۲-۱-۷- حلزون مخروطی *Conus coronatus*

۱-۲-۱-۸- حلزون مخروطی *Conus quercinus*

این گونه از حلزون های مخروطی مانند بقیه اعضای جنس Conus ، شکارچی و گوشتخوار می باشد. طول صدف این حلزون تا ۵ cm می رسد.

۱-۲-۱-۸- حلزون مخروطی *Conus quercinus*

۱-۳- ونوم حلزون های مخروطی

ونوم، ترکیبی از پپتیدهای کوچک(کونوتوکسین) گوناگون است. کونوتوکسین ها معمولا۸۰ –۸ اسیدآمینه و گاهی بیش از ۱۰ پیوند دی سولفیدی دارند(Cruz *et al*., 1985a,b, Ramilo *et al*., 1992). فعالیت هر یک از خانواده های کونوتوکسین ها می تواند با نوع پیچش این توکسین ها (تعداد و آرایش پیونـدهای دی سولفیدی) و محدوده جرم مولکولی آنها مرتبط باشد(Balamurgan *et al*., 2007).

بعضی از این کونوتوکسین ها، کانال های تنظیم کننده ی جریان پتاسیم یا سدیم در دیوار ه سلولی اعصاب یا سلول های ماهیچه ای را تنظیم می کنند و بعضی دیگر به گیرنده های N– متیل – D – آسپارت اتصال یافته و اجازه می دهند که یون های کلسیم به درون سلول های اعصاب وارد شوند؛ بعضی نیز دارای آنتاگونیست های اختصاصی گیرنده های استیل کولین که در انقباض ماهیچه ای نقش دارند، هستند.

به طور کلی، ونوم صدف های مخروطی شامل نوروتوکسین هایی با وزن مولکولی کم می باشد که اثر آنها با بلاک کردن گیرند ه های ماهیچه ای و عصبی همراه است(Gray *et al*., 1981).

در یک تقسیم بندی کلی، زهر صدف های مخروطی را می توان به لحاظ عملکرد به دو گروه تقسیم کرد. اولین اثر، اثر سریع این زهرها است که باعث بیحرکتی سریع شکار مورد اصابت قرار داده شده می شوند و این اثر از طریق پپتیدهایی است که کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ را منع می کنند ونیز از پپتیدهایی که کانال های پتاسیمی را مسدود می کنند. این اثرات ترکیبی، موج دیپلاریزاسیون آکسون هایی که در مجاورت مکان تزریق زهر قرار داشته اند گردیده و اثری همانند برق گرفتگی را درشکار ایجاد می کنند.

اثر دوم به آهستگی روی داده و شامل منع کامل انتقال ماهیچه ای عصبی است که از طریق کونوپپتیدهایی که در مکان هایی به دور از مکان تزریق زهر (مانند اتصالات عصبی– ماهیچه ای) عمل می کنند و در نهایت سبب منع کامل انتقال عصب– ماهیچه ای می شوند، ایجاد می شود. صدف های مخروطی شکار کننده ی ماهی، پپتیدهایی دارند که کانال های کلسیمی پیش سیناپسی که آزادسازی انتقال دهنده های عصبی را کنترل می کنند را منع می سازند. همچنین این پپتیدها، گیرنده های نیکوتینی پس سیناپسی و نیز کانال های سدیمی که با پتانسیل عمل ماهیچه ای سروکار دارند را نیز منع می سازند.

۱–۳–۱– کونوتوکسین ها

کونوتوکسین ها از مجاری ونوم حلزون های مخروطی شکارچی متعلق به جنس کونوس که عمدتا در آبهای گرمسیری زندگی می کنند، بدست می آیند.

تخمین زده شده است که ونوم هر حلزون مخروطی شامل ۲۰۰–۵۰ جزء پپتیدی می باشد. هر نوع کونوتوکسین برای گیرنده های خاصی بطور اختصاصی عمل می کند.

سمیت ونوم مربوط تعداد محدودی از پپتید ها نیست بلکه در اثر سینرژی بین پپتید های متعددی که در جایگاه های مختلف عمل می کنند، سمیت حاصل می شود.

کونوتوکسین ها مکانیسم های فعالیتی گوناگونی دارند که بیشتر آنها شناخته نشده اند. به هر حال به نظر می رسد که بسیاری از این پپتیدها فعالیت کانال های یونی را تنظیم می کنند.

کونوتوکسین ها در یک تقسیم بندی کلی به گروه های زیر تقسیم می شوند:

α-conotoxin: آلفا کونوتوکسین ها اولین توکسین هایی هستند که از ونوم حلزون های مخروطی جدا شدند و به دلیل شباهت عملکرد آنها به آلفا کونوتوکسین های موجود در سم مار آنها را آلفا نامگذاری کردند. این کونوتوکسین ها بیشتر در ونوم حلزون های مخروطی ماهی خوار وجود دارند(Bazza *et al.*, 2005).

این توکسین ها دارای دو پیوند دی سولفیدی و ۳-۵ حلقه در خود هستند و گیرنده های نیکوتینی را مهار می کنند. آلفا کونوتوکسین های G1A ,G1 و G2 از *Conus geographus* و M1 از *Conus magus* پپتیدهای مشابهی هستند که G1A ,G1 وG2 دارای ۱۳ اسید آمینه و M1 دارای ۱۵ اسید آمینه می باشند. این آلفا کونوتوکسین ها باعث مهار پس سیناپسی در محل اتصال عصب-عضله شده و در نتیجه سبب فلج شدن و مرگ می شوند.

علائم مسمومیت با این توکسین ها شبیه به نارسایی تنفسی ناگهانی می باشد. مکانیسم فلج شدن با این سموم به این صورت است که آلفا کونوتوکسین ها با اتصال به زیر واحد های آلفای کانال های یونی استیل کولینی نیکوتینی از اتصال استیل کولین و آگونیست های آن مثل نیکوتین به این کانال های یونی ممانعت می کنند. این توکسین ها با جلوگیری از اتصال استیل کولین و آگونیست های آن باعث تغییر در ساختار گیرنده های کانال یونی مورد نیاز برای ورود سدیم ضروری برای قطبیت غشاء می شوند. بنابراین آلفا کونوتوکسین ها مانع عملکرد نوروترانسمیتر ها شده و سبب فلج شدن می شوند.

گروه دیگری از آلفا کونوتوکسین ها وجود دارند که دو پیوند دی سولفیدی و ۴-۷ حلقه در ساختارشان دیده می شود اما هدف این گروه گیرنده های نیکوتینی در محل اتصال عصب و عضله نمی باشد، در نتیجه باعث فلج نمی شوند. در عوض، آنها به گیرنده های نیکوتینی عصبی در مغز و اعصاب محیطی متصل می شوند. از این گروه می توان آلفا کونوتوکسین VC1.1 را نام برد که دارای ۱۶ اسید آمینه و دو پیوند دی سولفیدی می باشد. VC1.1 اولین آلفا کونوتوکسینی است که برای درمان شرایط دردناک نوروپاتیک در انسان توسعه یافته است.

δ-conotoxin: یکی از جالبترین خانواده های کونوتوکسین ها، دلتا کونوتوکسین ها هستند که در ونوم حلزون های مخروطی نرم تن خوار وجود دارند که ازغیر فعال شدن کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ ممانعت می کند. این کونوتوکسین ها کانال های سدیم را هدف قرار می دهند اما با عوامل شناخته شده ای مثل تترودوتوکسین و میوکونوتوکسین ها رقابت نمی کنند.

فرض بر این است که این پپتید ها در غشای چربی حل شده و به جای محیط آبی از طریق باز و بسته کردن کانال های سدیم با حمله از اطراف وارد عمل می شوند.

κ-conotoxin: به کانال های پتاسیمی وابسته به ولتاژ متصل شده و آنها را مهار می کنند. این کونوتوکسین ها در ماهی ها باعث بیش فعالی و به دنبال آن گسترش انقباض در بدن می شوند اما سبب فلج یا مرگ نمی شوند. تزریق کاپا کونوتوکسین ها همراه با دلتا کونوتوکسین ها باعث ایجاد سندرم تشنج ناگهانی در طعمه می شود که در ماهی ها کشنده و در موش بیش فعالی ایجاد می کند.

μ-conotoxin: دارای دو نوع آرایش سیستئین هستند. این کونوتوکسین ها کانال های سدیم وابسته به ولتاژ را در ماهیچه ها هدف قرار داده و مهار می کنند. میوکونوتوکسین ها برای تحقیق در مورد کانال های سدیم در بافت های تحریک پذیر ردیاب های مفیدی می باشند.

زیر گروه های مختلف کانال های سدیم وابسته به ولتاژ در بافت هایی مانند مغز و ماهیچه ها در پستانداران یافت می شوند. مطالعات بسیاری برای تعیین حساسیت این کانال ها و اختصاصی بودن میوکونوتوکسین ها نسبت به زیر گروه های آنها انجام شده است.

ω-conotoxin: پپتید هایی با ۳۰-۲۴ اسید آمینه و ۳ پیوند دی سولفیدی هستند که کانال های وابسته به ولتاژ کلسیم N-type را مهار می کنند و به دلیل اینکه این کانال ها با احساس درد مرتبطند (حساس به درد)، در سیستم عصبی، ω-conotoxin دارای اثر ضد دردی می باشد(Baby et al., 2010).

بهترین مثال از امگا کونوتوکسین ها GVIA از *Conus geographus* و MVIID, MVIIC, MVIIA از *Conus magus* می باشند.

این پپتید ها به عنوان پپتید های تکان دهنده نام گذاری شده اند زیرا تزریق آنها به درون مغز موش سبب تشنج و لرزش در موش می گردد.

۱-۴- کانال های یونی

کانال های یونی گروه خاصی از پروتئین ها هستند که یون های کوچک را مانند +Na + , K+ , Ca2 یا Cl- را هدایت می کنند. باز و بسته شدن کانال های یونی بستگی به ولتاژ غشاء یا اتصال مولکول ها (

لیگاند ها) به آن ها دارد. مکانیسم دقیق عمل آن ها هنوز به خوبی مشخص نشده است. این کانال ها دارای خاصیت انتخابی می باشند.
کونوتوکسین ها کانال های یونی را هدف قرار داده و هر کونوتوکسین ها تمایل به اتصال به یک نوع از این کانال ها دارد.

۱-۴-۱- انواع کانال های یونی

بر اساس نوع محرک کانال ها را به سه دسته تقسیم می شوند:
۱- کانال های یونی دریچه دار وابسته به ولتاژ
این کانال ها دارای حس گر ولتاژ هستند که تحت تاثیر میدان مغناطیسی دریچه کانال را باز و بسته می کنند و به دو زیر گروه تقسیم می شوند:
- کانال هایی که موجب برقراری جریان های رو به داخل یون ها می گردند
- کانال هایی که موجب جریان رو به خارج می گردند
از کانال های رو رو به داخل می توان کانال های کاتیونی پتاسیم و کلسیم و کلر و رو به خارج کانال پتاسیمی را نام برد.
۲- کانال های یونی دریچه دار وابسته به لیگاند
این کانال ها در ساختار پروتئینی خود دارای جایگاه ویژه ای برای اتصال مواد شیمیایی هستند و تغییر ایجاد شده در آرایش مولکولی پروتئین موجب باز شدن دریچه کانال می گردد مانند کانال های کاتیونی حساس به استیل کولین که بعد از اتصال به لیگاند باز شده و به کاتیون یون سدیم یا گیرنده های گلیسین، سروتونین یا گلوتامات اجازه عبور می دهند.
۳- کانال های یونی حساس به تغییر شکل مکانیکی
اغلب در سلول های عضلانی هستند و به کشش حساس اند و باز می شوند.

۱-۵- درد

درد تحریکی از گیرنده درد در سیستم عصبی پیرامونی و یا آسیب یا خرابی سیستم عصبی مرکزی یا پیرامونی می‌باشد.
بیشتر دردها بی‌درنگ پس از آن که محرک دردناک حذف میشود برطرف و بدن التیام می‌یابد، اما گاهی‌اوقات درد همچنان با وجود حذف محرک‌ها و بهبود ظاهری بدن ادامه می‌یابد.

۱-۵-۱- فیزیولوژی درد

هرگاه یکی از بافت‌ها تخریب شوند، درد ایجاد می‌شود و همین باعث می‌شود که فرد برای برطرف کردن محرک درد، واکنش مناسب را انجام دهد. حتی فعالیت‌های ساده‌ای نظیر نشستن طولانی‌مدت بر روی برجستگی‌های نشیمن‌گاه می‌تواند باعث تخریب بافتی شود. زیرا باعث کمبود جریان خون پوستی در نقاط تحت فشار ناشی از وزن بدن می‌شود. هنگامی که پوست در نتیجه کاهش خون‌رسانی دردناک می‌شود، شخص به‌طور طبیعی و ناخودآگاه تغییر وضعیت می‌دهد، ولی شخصی که فاقد حس درد است(مثلا پس از آسیب نخاعی) درد را حس نکرده و بنابراین تغییر حالت نمی‌دهد و این حالت باعث می‌شود که خیلی زود پوست در نقاط تحت فشار، دچار تخریب و پوسته‌ریزی شود.

۱-۵-۲- انواع درد

الف) درد حاد

درد حاد معمولا با بیماری و زخم همراه است. درد حاد می‌تواند یک لحظه ادامه داشته باشد مثل نیش حشره و یا هفته ها به طول بیانجامد مثل سوختگی. هنگامی که شخصی به درد حاد مبتلا می‌شود، دقیقا می‌داند که چه محلی آسیب دیده است. لغت حاد از کلمه یونانی اقتباس شده که به معنای سوزن که این موضوع به درد شدید اشاره می‌کند.

ب) درد مزمن

درد مزمن معمولا بیان کننده دردی است که بیش از ۶ ماه از زمان آن گذشته و پایان آن قابل پیش بینی نبوده و به جز اینکه به طور خیلی آهسته التیام یابد مانند سوختگی ها، یا مرگ. دیگر خصوصیات درد مزمن آن است که هویت علت آن مشخص باشد، اغلب درد مزمن، فرد را بی خاصیت و بدون کارایی کرده و برای فرد زندگی با چنین شرایطی مشکل است. بیماران تجارب مدامی نسبت به درد دارند یا به طور مداوم درد مزمن آنها عود کرده که اغلب بیماریشان به طور فزونی وقتشان را اشغال می‌کند.

ج) درد سطحی و عمیق

چنانچه درد از نواحی سطح پوست باشد، درد سطحی نامیده می‌شود، مانند درد سوزن و درد نیشگون. درد سطحی پس از تماس سوزن با دست، درد به وضوح احساس می‌شود و با متوقف کردن تحریک، بلافاصله از بین می‌رود، این درد، به درد اول معروف است، و در شدت تحریک بیشتر، معمولا پس از نیم تا یک ثانیه، دردی مبهم وسوزشی احساس شده، که با متوقف کردن تحریک به آهستگی محو می‌شود و به درد دوم معروف است.

چنانچه درد از نواحی ماهیچه ها، استخوان ها، بافت پیوندی و مفاصل باشد درد عمیق نامیده می‌شود. تشنج ماهیچه ای و سر درد از این نوع درد هستند. معمولا درد عمیق با طبیعت مبهم و سوزش همراه است.

۱-۵-۳- گیرنده‌ها و محرک‌های درد

گیرنده‌های درد در پوست و سایر بافت‌ها، انتها های عصبی آزاد هستند. این گیرنده‌ها در لایه های سطحی پوست و برخی بافت های داخلی خاص، نظیر پر پوست(ضریع استخوان)، دیواره شریان‌ها، سطح مفصلی و داس و چادرینه در حفره جمجمه منتشر هستند. تعداد انتها های عصبی درد در بسیاری از بافت های عمقی‌تر بدن بسیار کم است؛ با وجود این، هرگونه آسیب بافتی منتشر می‌تواند جمع شده و یک درد مزمن و کند در اکثر این نواحی ایجاد کند. محرک‌های درد در سه گروه مکانیکی، حرارتی و شیمیایی طبقه بندی می‌شوند. در کل، محرک های حرارتی و مکانیکی، درد تند ایجاد می‌کنند در حالی که درد کند به وسیله هر سه نوع محرک تولید می‌شود. برخی از مواد شیمیایی که درد ایجاد می‌کنند عبارتند از: برادی کینین، سروتونین، هیستامین، یون پتاسیم، اسیدها، استیل کولین و آنزیم‌های پروتئولیتیک. به علاوه، پروستاگلاندین‌ها و ماده P حساسیت انتهاهای آزاد عصبی را افزایش می‌دهند، ولی به‌طور مستقیم آنها را تحریک نمی‌کنند. مواد شیمیایی مخصوصا در ایجاد درد کند ناشی از آسیب بافتی نقش دارند.

محرک‌های شیمیایی، مکانیکی و حرارتی می‌توانند گیرنده‌های درد را که در اغلب نقاط بدن به وفور یافت می‌شوند، تحریک کنند. ایجاد درد در بافت‌ها اغلب به علت ساخته شدن موادی به نام پروستاگلاندین‌ها است که حساسیت گیرنده‌های درد را افزایش می‌دهد. آسپرین و سایر مواد ضد درد و غیر مخدر مانع تولید پروستاگلاندین‌ها شده، درد را تسکین می‌دهد.

درد، با سایر حس‌های پیکری تفاوت دارد؛ زیرا علاوه بر جنبه حسی محض، دارای یک بخش هیجانی و عاطفی است که به ساختار روانی هر فرد بستگی دارد و موجب واکنش‌های مختلف و تفاوت‌های انفرادی زیادی در تحمل افراد نسبت به درد می‌گردد. اکثر تارهای عصبی انتقال‌دهنده درد از نوع نازک و بدون میلین بوده و انتقال‌دهنده سیناپسی آنها یک نوروپپتید به نام ماده P است. گاهی محل احساس درد در بخشی غیر از محل تحریک گیرنده‌های درد است که به چنین حالتی "درد انتشاری" می‌گویند؛ مثلا دردهای احشایی ممکن است در قسمت‌هایی از پوست احساس شود. علت درد انتشاری، انتقال پیام‌های درد یک ناحیه به مرکز عصبی ناحیه دیگر است که به وسیله نورون‌های رابط نخاعی صورت می‌گیرد. در مواردی که یک اندام قطع می‌شود نیز تا مدتی درد و سایر حس‌های پیکری مربوط به آن اندام باقی می‌مانند. علت ادامه این حس‌ها، تحریک مراکز عصبی مربوط به آن اندام ها است.

۱-۵-۴- مسیرهای انتقال پیام‌های درد به دستگاه عصبی مرکزی

انتها های آزاد عصبی گیرنده‌های درد، دو مسیر جداگانه را برای انتقال سیگنال‌های درد به دستگاه عصبی مرکزی به‌کار می‌برند. این مسیرها عبارتند از:

الف. مسیر درد تیز و تند

ب. مسیر درد مزمن و کند.

به دلیل وجود سیستم دوگانه عصب‌دهی حس درد، یک محرک دردناک که به طور ناگهانی عمل می‌کند، اغلب دو حس درد ایجاد می‌کند؛ یک درد تیز و تند که به وسیله رشته‌های AS به مغز منتقل می‌شود و یک ثانیه یا بیشتر متعاقب آن، یک درد کند و مزمن که به وسیله مسیر رشته‌های C منتقل می‌شود. درد تیز باعث می‌شود که فرد به سرعت خود را از عامل درد زا دور کند و درد کند باعث می‌شود که شخص رنج تحمل‌ناپذیری را تجربه کند و در پی برطرف کردن علت درد باشد. رشته‌های درد پس از آنکه با ریشه‌های خلفی به نخاع وارد شدند، با نورون های شاخ خلفی سیناپس برقرار می‌کنند. در این محل مجددا، دو نوع سیستم برای پردازش سیگنال های درد در مسیر ورود به مغز وجود دارد:

الف. ورود از راه نخاعی تالاموسی جدید

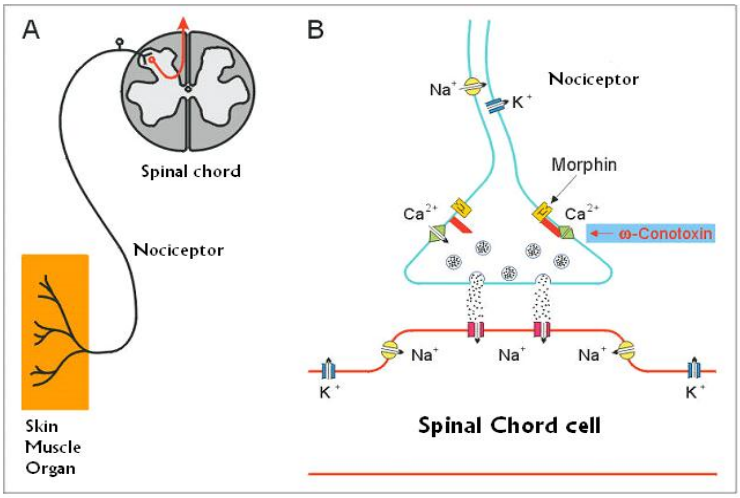
ب. ورود از راه نخاعی تالاموسی قدیمی

هر دو این مسیرها به ساقه مغز و متعاقبا به تالاموس ختم می‌شوند. سیگنال ها در تالاموس به سایر نواحی قاعده‌ای مغز و قشر حسی پیکری منتقل می‌شوند.

۱-۶- مکانیسم اثر ضد دردی کونوتوکسین ها

یون های کلسیم، سدیم و پتاسیم اعمال اساسی را درون سلول ها کنترل میکنند، برای مثال کلسیم به تنظیم انقباض سلول های ماهیچه ای کمک میکند. کانال های یونی ورود و خروج یون ها را بداخل و خارج سلول ها کنترل می کنند. برخی کونوتوسین ها به عنوان ضد درد عمل می کنند .

به دلیل مقابله با گیرنده های کانال های یونی در اعصاب ، بنابراین کانال های یونی نمی توانند باز شوند. بسته شدن کانال های یونی ورود یون ها را به تار عصبی مجاور متوقف میکند. در نتیجه هیچ ضربه الکتریکی عبور نکرده و بنابراین پیام درد ایجاد نمی شود.



شکل ۱-۶- مکانیسم اثر ضد درد کونوتوکسین ها

۱-۷- زیکونوتاید

زیکونوتاید یا امگا کونوتوکسین MVIIA از *Conus magus* گرفته می شود و در حال حاضر به صورت سینتتیک از پپتید های امگا توکسین وجود دارد. این ماده در دسامبر ۲۰۰۴، به تصویب سازمان غذا و داروی امریکا رسید. مکانیسم عمل این ماده به این صورت است که کانال های کلسیمی را در یک ناحیه از نخاع بلوکه می کند و به این طریق از رسیدن برخی از سیگنال های درد به مغز جلوگیری می نماید. این عملکرد مانع آزاد شدن پیش ماده های درد زا مثل گلوتامات، پپتید CGRP و ماده P در مغز و نخاع شده و در نتیجه درد مهار می شود. دانشمندان با آزمایش این ترکیب روی حیوانات پی بردند که زیکونوتاید در درمان انواع خاصی از درد ۱۰۰۰ بار قوی تر از مرفین است.

نکته جالب توجه دیگر این است که موثر بودن زیکونوتاید در کاهش درد های نوروپاتیک است که مرفین قادر به تسکین آنها نیست.

بدن بیمارانی که طولانی مدت مرفین دریافت می کنند نسبت به این دارو مقاوم شده و برای تسکین درد باید دوز مصرفی را به طور مرتب بالاتر ببرند در حالی که زیکونوتاید در بدن بیمار حتی پس از مصرف دراز مدت مقاومت دارویی ایجاد نمی کند.

این کونوپپتید ابتدا در افراد مبتلا به ایدز و سرطان های پیشرفته مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج این آزمایش ها به قدری موفقیت آمیز بود که دانشمندان این پپتید را برای دیگر درد های شدید و مزمن نیز به کار بردند.

زیکونوتاید احتمالا یکی از ترکیبات منحصر به فرد شیمیایی است که از بدن یک حلزون مخروطی بدون تغییر بدست آمده است. داروسازان معمولا با طراحی مولکول هایی مشابه اما با کیفیت دارویی بهتر، سعی در بهبود این ترکیبات طبیعی دارند بطوریکه این داروها بتوانند به راحتی توسط بدن جذب شوند.
در رابطه با زیکونوتاید پس از این که صدها نفر از دانشمندان در تلاش برای طراحی یک ترکیب مناسب تر با این فرمول بودند، در نهایت به این نتیجه رسیدند که ترکیب کونوتوکسین اولیه بدست آمده از *Conus magus* بهترین گزینه است.
حدود ۷۰۰ گونه حلزون مخروطی وجود دارد که ونوم هر گونه از آنها بطور متوسط حاوی ۱۰۰ کونوتوکسین می باشد، بنابراین تقریبا ۷۰۰۰۰ کونوتوکسین برای تحقیق و کشف داروهای جدید وجود دارد.
این ماده که در حال حاضر به صورت سینتتیک تولید می شود توسط یک پمپ که در نخاع قرار داده می شود به درون مایع مغزی نخاعی تزریق می گردد.

۱-۸- مورفین

سیر تورنر در سال ۱۸۰۵ مورفین را از تریاک بدست آورد. از او به عنوان استخراج کننده مورفین یاد شده است. مورفین ماده موثر و جز اساسی تریاک بوده و ۷ تا ۱۴ درصد آن را تشکیل می‌دهد.
از نظر خواص فارماکولوژی مورفین نیز مانند سایر ترکیبات تریاک یا ماده تضعیف کننده سیستم عصبی مرکزی می‌باشد و مصرف عمده آن برای اهداف پزشکی است از مورفین ، هروئین و هیدرومرفین که مسکن قویتری نسبت به خود مورفین هستند بدست می‌آید. تقریبا ۱۰ تا ۱۵ در صد از ترشحات گیاه خشخاش را مورفین تشکیل می‌دهند. مورفین بر دستگاه عصبی اثری پیچیده گذاشته و بعضی نقاط را تحریک و عمل بعضی دیگر را متوقف می‌کند بطور کلی می‌توان گفت مورفین اثر متوقف کننده و فرد نشاننده بر دستگاه اعصاب دارد و با تظاهراتی چون آرام بخشی ، خواب آلودگی ، تسکین درد ، پایین آمدن درجه حرارت بدن ، اثر ضد استفراغ و اثر فرونشانندگی بر دستگاه تنفس از طریق مراکز عصبی اما در عین حال مورفین اثرات تحریکی نیز بر دستگاه اعصاب مرکزی چون تهوع ، استفراغ زودرس ، تنگ شدن مردمک چشم ، و انقباض عضلات روده‌ها دارد.

۱-۸-۱- اثر ضد درد مورفین

مورفین دارای اثر ضد درد ویژه‌ای می‌باشد و تمام مشتقات آن نیز اعم از مصنوع نیمه مصنوع دارای این اثر انتخابی می‌باشند. مثلا تصور کنیم که سوزنی را در پوست فرو ببریم یا جسم داغی را روی پوست بگذاریم.

شخص احساس درد می‌کند و همزمان چهره‌اش وضعیت عاطفی خاصی به خود می‌گیرد که این عمل مربوط است به تحریک پوستی بوسیله انتهاهای اعصاب منتشره در پوست گرفته شده و از طریق نخاع به مغز می‌رود و در آنجا در نقاط بخصوصی با سایر نقاط مغز که به نحوی عواطف فرد را کنترل می‌کنند مرتبط می‌گردد. این تحریک موجب بروز حالت عاطفی خاصی می‌گردد. مورفین بر روی گیرنده پوستی درد تاثیر چندانی ندارد و شخصی که مورفین به او تزریق شده ناتوان از درک تحریک نیست درک این تحریک ممکن است حتی کاهش نیابد و تنها واکنش هایی که پس از احساس درد تظاهر می‌کنند از بین روند به این معنی که شخص اظهار می‌کند که درد هنوز موجود است اما او احساس راحتی می‌کند پس می‌توان نتیجه گرفت که درک تحریک های پوستی ، بینایی ، شنوایی و ارتعاشات با مورفین از بین نمی‌رود بلکه در واکنش عاطفی درک درد تغییر حاصل می‌شود.

مورفین به دلایل خاصل بر درد های مبهم بیشتر از درد های غیر مبهم حمله‌ای موثر است. اینکه که در مقادیر زیاد دردهای ناشی از انسداد مجاری ادرار یا گوارش را نیز تسکین می‌دهد برای ایجاد اثر ضد درد باید گفت که اثر بر سلسله اعصاب مرکزی است تغییری که مخدرها در آستانه درک درد ایجاد می‌کنند نمی‌تواند توجیه کننده اثر ضد درد آنها باشد. همچنین به علت آنکه در واکنش انتهای اعصاب محیطی و انتقال الکتریکی در اعصاب محیطی تغییری نمی‌شود از این عوامل نیز نمی‌توانند علت اثر ضد درد مورفین و سایر مخدرهای باشند. آنچه امروزه مطرح است نقاطی از تالاموس و سیستم لیمبیک می‌باشند که گیرنده‌های مخدرها در آنها است.

۱-۹- انواع تست های سنجش درد در مدل حیوانی

۱-۹-۱- آزمون Hot-Plate

Hot-Plate در واقع یک صفحه می باشد که به وسیله جریان الکتریسته داغ می شود. درآزمایش، تمامی موش ها قبل از تزریق روی یک صفحه که تا حد ۵۵° C داغ می شود ، قرار گرفته و زمان شروع (صفر) مشخص می شود. به محض شروع لیسیدن دست ها یا تغییر خاص در قدم گذاری موش ها ، میزان تحمل پایه حیوان ثبت می گردد . پس از آن برحسب گروه های آزمایش۱۰-۱۵ دقیقه بعد، سالین و دارو تزریق می شود. سپس ۳۰ ، ۴۵ و ۶۰ دقیقه بعد ، میزان تحمل آنها سنجیده شده و با میزان تحمل پایه مقایسه می گردد . حداکثر زمان درنظر گرفته شده برای سطح تحمل موش ها ۴-۴۰ ثانیه می باشد. این آزمون برای هر موش قبل و نیم ساعت بعد از تزریق داروها انجام می گرفت. نتایج بدست آمده آماری به شکل زمان تاخیر

در عکس العمل به درد و برحسب ثانیه ودرصد حداکثر اثر ممکن (Pain latency) از ٪MPE . بیان می شد (Maximun possible effect=MPE).

رابطه زیر محاسبه می گردید:

MPE = [(TL-BL)/Timecut-off – BL]×100**%**
MPE = Maximum Possible Effect
TL = Test Latency Time
BL = Base Latency Time

۱-۹-۲- آزمون اسید استیک

در این آزمون موش ها در چند گروه مورد جداگانه مورد آزمایش قرار گرفتند.
در هر موش ۵ دقیقه قبل از تزریق نمونه مورد نظر ۵۰µl اسید استیک ۱٪ به صورت داخل صفاقی تزریق می شود. تعداد پیچش و کشش های شکمی تا ۳۰ دقیقه بعد از تزریق ثبت می شوند(Han *et al.*, 2008).

۱-۹-۳- آزمون فرمالین

۵ دقیقه پیش از انجام آزمایش ۱۰ میکرولیتر فرمالین ۵٪ به صورت زیر جلدی به کف پای چپ حیوان سپس ۵ میکرولیتر ماده مورد نظر درون نخاع تزریق می شود.
دوره های زمانی ۵- ۰ دقیقه و سپس ۴۰-۲۰ دقیقه به عنوان زمان سنجش درد در نظر گرفته می شود. از آنجائی که لیسیدن پای عقبی به ندرت در طی رفتار طبیعی حیوان رخ می دهد، پاسخی که در صورت استفاده از پای عقبی ایجاد می شود، در مقایسه با پای جلوئی بیشتر به درد اختصاص دارد. مهم ترین ویژگی آزمون فرمالین این است که جوندگان دو پاسخ به درد را نشان می دهند که ظاهراً دو مکانیسم مختلف دارد. مرحله اول بلافاصله پس از تزریق فرمالین آغاز می گردد و تا ۵ دقیقه ادامه دارد. حیوان به مدت ۱۵ دقیقه رفتار خاصی نشان نداده و پس از ۱۵ دقیقه فاز دوم درد شروع می شود و حیوان دوباره شروع به لیسیدن کف پای عقبی می کند که حدود ۲۰ دقیقه به طول می انجامد (Han *et al.*, 2008).

۱-۹-۴- آزمون هیپرآلژزیای مکانیکی

جهت اندازه گیری هیپرآلژزیای مکانیکی، برای انجام این تست، حیوان در حالتی که شکمش از سطح زمین بالاتر باشد و احساس ناراحتی نکند گرفته می شود. سپس کف پای آن بر روی محل مخصوص دستگاه

قرار داده می شود. با فشردن پدال با کمک اهرم، فشاری افزاینده به پای حیوان وارد می آید و به محض عقب کشیدن پا و یا جیغ زدن حیوان، اعمال نیرو متوقف می شود. عدد نشان داده شده بر روی خط کش دستگاه ثبت می گردد(نصیری نژاد و صفارپور ۱۳۸۷، ۱۵).

۱-۹-۵- هیپرآلژزیای حرارتی

حیوان در محفظه مخصوص دستگاه قرار داده شده و پس ا ز ۱۰ دقیقه سازگاری با محیط، اشعه به کف پای آن تابانده می شود که باعث گرم شدن ناحیه شده، زمان توسط کرونومتر دستگاه ثبت می گردد. به محض حرکت دادن و یا بلند کردن پا، کرونومتر متوقف شده و زمان ثبت می شود(نصیری نژاد و صفارپور ۱۳۸۷، ۱۵).

۱-۹-۶- آزمون آلودینیای مکانیکی

برای انجام این آزمون، حیوان در محفظ های با کف مشبک که۳۰ سانتیمتر بالاتر از سطح زمین قرار دارند، گذاشته شده و هر مو به طور عمود با فشاری که باعث خم شدن آن شود با فواصل ۱۰ ثانیه، ۵ بار برای پای آسیب دیده مورد آزمایش قرار می گیرد. سه بار بلند کردن و یا حرکت دادن پا برای آن شماره از تار مو مثبت تلقی می شود(نصیری نژاد و صفارپور ۱۳۸۷، ۱۵).

۱-۹-۷- آزمون پس کشیدن دم (Tail Flick)

Tail Flick دستگاهی است که با تاباندن نور متمرکز بر سطح پشتی دم حیوان ایجاد درد حاد می کند و مدت زمانی که طول می کشد تا حیوان دم خود را از زیر دستگاه بیرون بکشد به عنوان زمان تاخیر پس کشیدن دم تعیین می گردد. هر چه این زمان طولانی تر باشد نشان دهنده این است که آستانه درد حیوان بالاتر میباشد. در دستگاه مزبور کلیدهایی برای تنظیم شدت نور و زمان قطع وجود دارد که زمان قطع نور برای موش ۱۰ ثانیه تنظیم می شود تا اگر حیوان دم خود را در این فاصله زمانی از زیر نور متمرکز بیرون نکشید برای جلوگیری از آسیب دم، تابش نور خود به خود قطع شود(نصیری نژاد و صفارپور ۱۳۸۷، ۱۵).
پس از اتمام آزمایشات و ثبت نتایج، برای هر حیوان، بر اساس مقطع زمانی، شاخص بی دردی فرمول زیر محاسبه می شود:

زمان پس کشیدن دم پس از تزریق منهای زمان پس کشیدن دم قبل از تزریق

۱-۱۰- الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE)

تکنیکی است که در آن مولکول های زیستی بر اساس اندازه جداسازی می شود . مولکول هایی چون انواع پروتئین ها ، DNA , RNA . ژل آگاروز برای درشت مولکول هایی مانند DNA بهترین گزینه است . SDS-PAGE برای پروتئین های کوچک تر بهتر است.

SDS یک دترجنت و مخفف sodium dodecyl sulfate می باشد. بعد از اضافه کردن آن و احاطه کردن پروتئین ها، پروتئین ها بار نسبتا همسان پیدا کرده و به صورت خطی در می آیند. بدین ترتیب جداسازی فقط بر اساس اندازه صورت می پذیرد. تعداد مولکول های SDS متناسب با تعداد آمینواسیدهای یک پروتئین است. هر مولکول SDS دو بار منفی به پروتئین می دهد . همچنین باعث می شود که نیروهایی که در تا شدن و تغییر شکل دادن پروتئین ها شرکت می کنند، از بین بروند.

ژل پلی اکریل آمید همانند ژل آگاروز بر اساس اندازه مولکول ها، جداسازی می کند. ژل اکریل آمید با پیوند های عرضی که دارد، مکانی را برای الک کردن مولکول هایی که در اثر جریان الکتریکی در حال عبور می باشند، به وجود می آورد . همه پروتئین هایی که دارای بار منفی هستند، توسط انتهای میدان الکتریکی که دارای بار مثبت می باشد، کشیده می شود، اما شبکه پلیمری در برابر حرکت آنها مقاومت می کند . پروتئین های کوچکتر سریعتر از مولکول های درشت تر در این شبکه حرکت می کنند . در نتیجه از مولکول های درشت تر پایین تر قرار می گیرند. پس جداسازی در روش SDS-PAGE فقط بر اساس اختلاف در اندازه مولکول ها می باشد .

پس از اینکه ژل Run شد، شما لازم است که پروتئین ها بر روی ژل شوند تا پروتئین ها از جای خود حرکت نکنند. اسید استیک ۲۵٪ یک فیکس کننده خوب است و باعث دناتوره شدن پروتئین می گردد.

ژل توسط یک رنگ مثل coomasie blue R250 رنگ می شود.

رنگ و تثبیت کننده را می توان در یک محلول که حلال آن متانول است به طور همزمان استفاده کرد .

رنگ در کل ژل پخش شده و با پروتئین ها کمپلکس می شود(staining). سپس با یک محلول که حاوی اسید استیک و متانول است ژل شسته می شود تا رنگ از ژل خارج شود و فقط رنگی که با پروتئین ها باند شده است باقی بماند(destain).

۱-۱۱- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC) یا کروماتوگرافی مایع با فشار بالا یک تکنیک کروماتوگرافی است که برای شناسایی، جداسازی و تخلیص اجزای یک مخلوط بکار می رود. این تکنیک در اواخر ۱۹۶۰ و اوایل ۱۹۷۰ معرفی شد. امروزه HPLC برای جداسازی و خالص سازی در زمینه های مختلف، مانند داروسازی، بیوشیمی و صنایع غذایی، بسیار مورداستفاده قرار می گیرد.

- اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC:

۱- مخازن حلال: که در آنها فاز متحرک و یا حلال های شستشو دهنده ستون ریخته شده است.
۲- موتور یا پمپ: چون ستونها نسبتا طویل و اندازه ذرات کم است. به این جهت قابلیت نفوذ کم می شود و برای این که حلال جریان داشته باشد باید فشار وجود داشته باشد. برای ایجاد فشار از پمپ یا موتور استفاده می کنیم. پمپ فشاری حدود 4500 psi می تواند ایجاد کند. و باید بتواند فشار ثابت ایجاد کند. حلال توسط پمپ با جریان ثابتی بر روی فاز ثابت حرکت داده می شود. حداکثر جریانی که فاز متحرک می تواند داشته باشد 2.5 ml/min است. بسته به نوع کاری که می خواهیم انجام دهیم میزان جریان فرق می کند، هر چه جریان کمتر باشد، فاصله پیک ها بیشتر است. چهار مخزن داریم مخزن A, B, C, D میزان فشار بستگی به جریان دارد وقتی جریان 0.8 ml/min است میزان فشار حدود 1500 psi می شود. میزان فشار بستگی به نوع ستون دارد حداکثر فشار مجاز 3500 Psi است. حداکثر تغییرات فشار 100 Psi است. حداکثر میزان جریان ، 2.5 ml/min است. پس پمپ، حلال را از مخزن می گیرد و با سرعت جریان ثابتی آن را بداخل دستگاه وارد می کند. در دمای آزمایشگاه به دو روش می توانیم کار کنیم:

الف- روش ایزوکراتیک: اگر نسبت های مختلفی از فاز متحرک را در یک مخزن بریزیم و از همان مخزن فاز متحرک را برداشت کنیم از روش ایزوکراتیک استفاده کرده ایم.
ب- روش گرادیانت gradient : اجزاء فاز متحرک در مخازن مختلف ریخته می شود. دستگاه قابلیت این را دارد که خودش نسبت های مختلف را از مخازن برداشت کند (طبق داده های ما)، مثلا می خواهیم ازمخزن A، 80% از مخزن B 8% و از مخزن C 12% بکشد و بعد نسبت ها را مخلوط کند. از این روش وقتی استفاده می کنیم که نسبت های مورد نظر را نمی دانیم و بخواهیم روش کار پیدا کنیم. ولی وقتی درصد فاز متحرک برای ما روشن شد می توانیم از روش ایزوکراتیک استفاده کنیم. فاز متحرک با

جریان ثابتی بر روی ستون حرکت داده می شود حداکثر جریان در این آزمایش ml/min0.8 یا ۱ است. بعد از فعال کردن هر پمپ شدت جریان را از کم به زیاد، کم کم بالا می بریم تا حدود ml/min 0.8 یا ۱ و می گذاریم حدود ۱۵ یا ۳۰ دقیقه با جریان بالا کار کند و بعد شدت جریان را به تدریج پایین می آوریم تا صفر و بعد پمپ را عوض می کنیم یا دستگاه را خاموش می کنیم، شدت جریان که بالا برود فشار هم بالا می رود. بعد از اتمام کار ستون را با حلال های شستشو دهنده تمیز می کنیم. حلال های شستشو را در مخازن ریخته و پمپ ها را به ترتیب فعال می کنیم اول دستگاه را با آب و متانول شسته و سپس با متانول خالص شستشو می دهیم.

– تزریق کننده: از سرنگ های مختلف با ظرفیت های مختلف استفاده می کنیم. حجم تزریق ۳۰ میکرولیتر است. نمونه ابتدا وارد قسمتی بنام پیش ستون می شود که محافظ ستون است، طول پیش ستون در حدود یک سانتی متر است، جنس آن از فولاد ضد زنگ است و ماده پرکننده آن از جنس ماده پرکننده ستون است. اگر ماده ما ناخالصی داشته باشد یا با ماده داخل ستون واکنش ایجاد کند در این قسمت اتفاق می افتد و به ستون آسیبی نمی رسد.

– ستون: طول ستون های دستگاه حدود ۳۰–۱۰ سانتی متر است. و جنس آن از فولاد ضدزنگ است. پرمصرف ترین ستون C18، آکتا دسیل سیلان است، ستونها را پس از اتمام کار باید با محلول های شستشو دهنده تمیز کرد. اگر از بافر فسفات استفاده کردیم ستون را با آب و متانول و بعد با متانول خالص شستشو می دهیم. فاز ثابت بصورت ذرات ریزی در داخل ستون قرار گرفته است که بر اثر چسبیدن و پخش شدن اجزاء نمونه و عبور فاز متحرک جداسازی انجام می شود. نمونه ابتدا وارد پیش ستون و بعد وارد ستون می شود، پیش ستون را پس از مدتی باید عوض کرد، ODS اکتا دسیل سیلان گروه های الکیل غیرقطبی زیادی دارد، فاز متحرکی که استفاده می کنیم قطبی است. فاز متحرک و ماده پرکننده ستون از نظر قطبیت باید عکس هم باشند. در HPLC امکان استفاده از فاز نرمال و معکوس هست. اگر فاز ثابت قطبی و فاز متحرک غیرقطبی باشد سیستم را فاز نرمال و در صورتی که ستون غیرقطبی و حلال قطبی باشد. سیستم را فاز معکوس می گویند. مشتقات آلکیل سیلان و فنیل سیلان ایجاد ستون های غیر قطبی می کنند و معمولا ستون غیر قطبی و فاز متحرک قطبی است بنابراین از فاز معکوس استفاده می شود. جنس ستون ها از فولاد ضد زنگ است.

– ردیاب ها: ردیاب ها باید حساس باشند و اثر مخرب بر روی اجسام نداشته باشند. پاسخ آنها تا حدود وسیعی برای غلظت باید خطی باشد. انواع ردیاب ها:

a– مهمترین آنها ردیاب ماوراء بنفش است که برای اجسامی که در ناحیه مرئی جذب داشته باشند مورد استفاده قرار می گیرد. در این ردیاب جذب انجام می شود و باعث کاسته شدن انرژی می شود که این کاسته شدن قابل اندازه گیری است. میزان کاسته شدن انرژی متناسب است با غلظت، باید طول موج را مشخص کنیم. حلال نباید در طول موج انتخابی جذب داشته باشد.

b– ردیاب ضریب شکست، این ردیاب حساس به حرارت است. از تغییرات یا تفاوتی که بین ضریب شکست سیستم حلال به تنهایی و سیستم حلال همراه نمونه ایجاد می شود استفاده می کنیم.

c– ردیاب فلورسانس حساس تر ماوراء بنفش از است ولی کم مصرف می باشد چون موادی که خاصیت فلورسانس داشته باشند کم هستند.

d– ردیاب الکتروشیمیایی که عملکرد آن بر مبنای واکنش های اکسید و احیا می باشد.

– ثبت کننده: در اثر حرکات قلم پیک هایی رسم می شود که به مجموعه آنها کروماتوگرام می گویند. به طریق کیفی پیک ها را براساس زمان بازداری یا نگهداری می شناسند. زمان بازداری فاصله زمانی از لحظه تزریق تا رسیدن به نقطه اوج یک پیک است. برای محاسبه کمی سطح هر نوار جذبی را حساب می کنیم، سطح هر نوار جذبی متناسب با مقدار جسم است که بوسیله سطح سنج با دستگاه ثبت کننده بدست می آید. بعد از رسم منحنی استاندارد، غلظت مجهول را از روی رسم منحنی بدست می آوریم.

فصل دوم:

مروری بر تحقیقات پیشین

۲-۱- مطالعات انجام شده در جهان

در حدود ۷۰۰ گونه کونوس در دنیا شناخته شده است که همه آنها دارای ونوم می باشند.

مطالعات انجام شده بر روی بعضی گونه ها از کونوس های سمی نشان میدهد که آنها دارای یک کیسه ونوم و مجرای عبور سم هستند که به یک خرطوم منتهی می شود.

در سال ۲۰۰۵ آنالیز بیوشیمیایی و بیان ژن کونوتوکسین های C. textile مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که ترشح کونوتوکسین های مختلف در بخش های متفاوت مجاری ونوم انجام می شود(Garrett et al., 2005).

کوری آنتی ونوم های دریایی را بررسی کرده است. با وجود گونه های دریایی سمی بسیار مانند ماردریایی ،ژلی فیش ها،حلزون و اختاپوس و ماهیان سمی، آنتی ونوم ها فقط برای مار دریایی، stonefish و ژلی فیش Chironex fleckeri موجود هستند (Zeikus *et al*., 1987, Currie, 2003,Terlau& Olivera, 2004).

مطالعه ای که روی پروتئین ونوم کونوس های مختلف انجام شده است، مشخص کرد که سم C. Geographus در کمتر از ۵ دقیقه و سم حاصل از C. textile در ۲۵-۲ دقیقه سبب مرگ موش های مورد آزمایش میشود. این نتیجه بیان گر این است که C. Geographus خطرناک ترین گونه از حلزون های مخروطی است (Cruz et al., 2003).

در تحقیقی که روی ونوم حاصل از C. textile انجام شد، کونوتوکسینTXIX از این ونوم جداسازی شد که دارای اثر کاهشی بر نفوذ Ca +2 پیش سیناپسی است(Rigby et al., 1999).

در تحقیقی که سال ۲۰۱۰ روی اثرات ضد دردی ω کونوتوکسین(CTX-MVIIA)، انجام شد ، نمونه جدیدی ازCTX-FVIA از Korean conus بدست آمد که اثرات ضد دردی و کاهش در فشار خون را نشان داد. اگر چه کونوتوکسین CTX-FVIA و CTX-MVIIA هر دو فشار خون را به سرعت کاهش می دهند اما CTX-FVIA سریعتر و به میزان بیشتر فشار خون را کاهش می دهد (Lee et al.,2010).

یک گروه از محققان دانشگاه ملبورن یک ترکیب شیمیایی سمی را از ونوم یک کونوس استرالیایی به ثبت رسانده اند. این ترکیب که ACV1 نامیده شد یک مسکن است که به از بین رفتن دردهای مزمن کمک می کند. این کونوتوکسین از مورفین قوی تر است و اعتیاد آور نیز نیست.ACV1 توسط بلوکه کردن انتقال درد در طول سیستم عصبی محیطی، درد را متوقف می کند.

این ترکیب ضد درد برای درمان دردهایی که در نتیجه صدمه دیدن عصب ، دردهای پس از جراحی، درد عضو خیالی در افرادی که عضوی از آنها قطع شده، زخم های پا در افراد دیابتی و دردهای مراحل پیشرفته ایدز و سرطان استفاده خواهد شد(Bazza *et al*., 2005).

در حدود ۱۰۰ کونوتوکسین شناخته شده اند که ω–MVIIA (زیکونوتاید) در حال حاضر برای درمان درد های مزمن عرضه شده است(Han *et al*., 2008).

تعدادی از آنها در جدول ۲-۱ نشان داده شده اند.

جدول ۲-۱- کونوتوکسین های دارویی

Conopeptide	**Indication**	**Molecular target**	**Clinical stage**
ω-MVIIA	Intractable pain	N-type calcium channels/antagonist	Phase IV (market)
Conantokin-G	Intractable epilepsy	NMDA receptor/antagonist	Phase I
A-Vc1.1	Neuropathic pain	nAChR/antagonist	Phase II
CGX-1204	Muscle relaxer	nAChR/antagonist	Pre-clinical

زیکونوتاید یک پپتید ۲۵ آمینواسیدی است که از سم حلزون *Conus magus* جدا شده است. این سم با اتصال و منع کانالهای کلسیم در پیش سیناپس ها عمل می کند و از این رو، آزاد سازی انتقال دهنده های عصبی را مانع می شود. این ترکیب تحت نام تجاری پریالت (Prialt) تکانه های عصبی را در منطقهٔ کلیدی نخاع بلاک میکند. پریالت، ۵۰ بار قوی تر از مورفین است و فاقد عوارض مورفین است. زیرا پیام

های درد را متوقف می کند ولی به دستگاه اعصاب مرکزی اجازه میدهد تا به کار خود ادامه دهد(Stix, 2005).

۲-۲- مطالعات انجام شده در ایران

در ایران تا کنون بر روی ونوم حلزون های مخروطی هیچ تحقیقی صورت نگرفته است.

فصل سوم:

مواد و روش ها

۳-۱- مواد وتجهیزات

۳-۱-۱- محلولهای مورداستفاده

Glacial Acetic Acid, Merck, Germany
Methanol, Merck, Germany
Ethanol, Merck, Germany
Comassie brilliant blue R-250 stain (0.05% w/v) Sigma, USA
Formalin, Merck, Germany
ACN(Acetonitrile), Merck, Germany
TFA(Trifluoroacetic acid), Merck, Germany
HPLC Grade Water
BSA (Bovine Serum Albumin)
Smart BCA protein assay kit, Intron Biotechnology, cat.No.21071
Acrylamide 30%
Sodium dodecyl sulfate(SDS) 10%
Ammonium persulfate (APS) 10%
Tris-buffer (PH=8.8(
Loading buffer(3x), (sigma(
Destain (70% water, 20% ethanol, 10% acetic acid(
Ladder(marker), (sigma), 6500-200000 dalton
Tetramethylethylenediamine (TEMED)
Morphine, Daru Pakhsh Company, Iran

۳-۱-۲- وسایل و ظروف یک بار مصرف

- لوازم تشریح
- سمپلر ۱۰،۱۰۰ و۱۰۰۰میکرولیتر
- سرسمپلر(racked, non-sterile)
- میکروتیوپ ۰/۵ و ۱/۵ میلی لیتری
- سرنگ انسولین Unolock
- پتری دیش

۳-۱-۳- تجهیزات و دستگاهها

شیکر(Labtron, Iran)
دستگاه دیونیزه کننده آب (Millipore, France)
میکروپلیت ریدر(EPOCH, Bio Tek, USA)
یخچال ۴ درجه سانتیگراد (LG, Korea)
فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد (LG, Korea)
سانتریفیوژ (Eppendorf, Germany)
سانتریفیوژ یخچال دار(sigma 3-18k)
تانک نیتروژن(MVE XC, 34/18 , USA)
استریو میکروسکوپ (BEL, Italy)
دستگاه هموژنایزر
دستگاه HPLC فاز معکوس(RP-HPLC, (Dr.lng.Herbert Knauer GmbH, Germany)
سرنگ همیلتون مخصوص دستگاه HPLC
دستگاه لیوفیلیزه (Alfa 1-2 LD plus Freeze dryer, Chaist- Germany)
ست مینی الکتروفورز Bio Rad
دستگاهGel Document XR (BIO-RAD ,USA)

۳-۲- جمع آوری نمونه ها

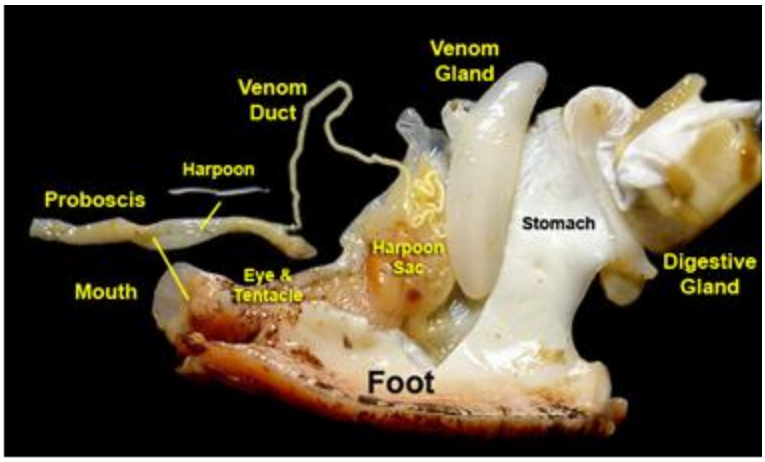
۲۰۰ عدد حلزون مخروطی با طولی حدود ۷-۴ cm از عمق ۷ متری جزیره لارک (N 26 52' 25.41″ و E 56 20' 01.02″) به روش دستی صید و بصورت زنده به تهران منتقل شد و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- نگهداری شدند(شکل ۳-۲).

شکل ۳-۲- محل نمونه برداری

۳-۳- استخراج ونوم

حلزون ها به کمک استریومیکروسکوپ تشریح و مجرای ونوم آنها جدا گردید (شکل ۲). سپس مجرای حاوی ونوم ۲۰ عدد حلزون در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه بصورت دستی هموژن شده و مخلوط حاصل در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید.سوپ رویی را به عنوان ونوم در نظر گرفته و پس از لیوفیلیزه شدن تا زمان استفاده در دمای ۲۰- نگهداری شد(Cartier, 1996).

هموژن کردن ونوم توسط دستگاه هموژنایزر سبب مخلوط شدن بافت مجاری با شیرابه ونوم شده و خلوص ونوم را کاهش می دهد، به این دلیل از روش هموژن دستی استفاده شد.



شکل ۳-۳- آناتومی *Conus textile*

۳-۴- تعیین غلظت ونوم (پروتئین) استخراج شده

برای تعیین میزان غلظت پروتئین از دو روش اسید بیسینکونینیک (BCA) و برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

۳-۴-۱- تعیین غلظت به روش BCA

روش BCA مشابه روش Lowry می باشد. هر دو این روشها بر پایه تبدیل Cu^{+2} به Cu^{+} در شرایط بازی استوار می باشند. این واکنش منجر به ایجاد رنگ بنفش تیره با حداکثر جذب در طول موج ۵۶۲ نانومتر می گردد.

در این مطالعه تعیین غلظت ونوم با استفاده از کیت Smart BCA protein assay kit intron و مطابق با دستور کیت انجام گردید. به طور خلاصه محلول working با مخلوط کردن دو محلول A و B و با نسبت یک به ۵۰ (۱:۵۰) تهیه گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه را با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول working در یک خانه از پلیت ۹۶ خانه مخلوط گردید. همچنین به منظور رسم نمودار استاندارد،۱۰ میکرولیتر از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) با غلظت های معلوم (۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰،...) و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول working درردیف دیگری از پلیت ۹۶ خانه مخلوط گردید. پلیت حاوی نمونه و استانداردها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون با استفاده از دستگاه میکروپلیت اسپکتروفتومتر (Epech Micro Plate

Reader) جذب خانه ها درطول موج ۵۶۲ نانومتر اندازه گیری شده و داده ها با نرم افزار Gene5 بررسی گردید.

۳-۴-۲- تعیین غلظت به روش برادفورد

در این روش ماده ای به نام کوماسی برلیان بلو ۲۵۰ G با پروتئین ها کمپلکس آبی رنگی تشکیل می دهد که در طول موج nm ۵۹۵ جذب دارد. ابتدا دستگاه اسپکتروفوتومتر با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول شاهد برادفورد صفر شد. در مرحله بعد ۲ میکرولیتر از نمونه مورد نظر به ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد اضافه و جذب نوری آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد.

۳-۵- الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE)

به منظور اطمینان از صحت استخراج ونوم از روش الکتروفورز پلی اکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد(Szewczyk& Summers, 1992). به این منظور، دو ژل تفکیک کننده و متمرکز کننده که هرکدام به ترتیب ۱۵٪ با pH=8.8 و ۵٪ با pH=6.8 می باشند، ساخته شد. مواد تشکیل دهنده- ژل متمرکز کننده در جدول۳-۵ ومواد تشکیل دهنده ژل تفکیک کننده در جدول ۳-۵ آمده است.

برای تهیه آکریل آمید ۳۰ درصد، ۲۹/۲ گرم اکریل آمید و ۰/۸ گرم بیس اکریل آمید را در۱۰۰ میلی لیتر آب حل می کنیم.

جدول۳-۵-۱- میزان مواد تشکیل دهنده ژل متمرکز کننده ۵٪(حجم ml ۲)

مواد	غلظت (میلی لیتر)
آب	۱/۴
اکریل آمید ۳۰٪	۰/۳۳
تریس (pH=۸/۸)	۰/۲۵
۱۰٪ SDS	۰/۰۲
۱۰٪ APS	۰/۰۲
TEMED	۰/۰۰۲

جدول۳-۵-۲- میزان مواد تشکیل دهنده ژل تفکیک کننده ۱۵٪(حجم ml ۷/۵)

مواد	غلظت (میلی لیتر)
آب	۱/۷
اکریلامید ۳۰٪	۷
تریس (pH=۸/۸)	۱/۹
٪ ۱۰ SDS	۰/۱۵
٪ ۱۰ APS	۰/۱۵
TEMED	۰/۰۰۶

۱۵ µl ونوم آماده شده، ۱۰µl آب با ۵ µl بافر لودینگ ۶ x مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس نمونه بر روی ژل در چاهک جداگانه به همراه مارکر پروتئین لود شدند. در مرحله بعد، ژل با رنگ کوماسی رنگ و سپس با محلول رنگبر، رنگبری شد. در انتها با دستگاه Gel doc از ژل رنگبری شده که باند های مربوط به ونوم درآن نمایان شده بود، عکس گرفته شد.

۳-۶- بررسی سمیت ونوم

برای تعیین سمیت ونوم، موش ها به گروه های ۶ تایی تقسیم شدند. ونوم با غلظت های مختلف بین ۱۰۰mg/kg- ۲۶ به صورت صفاقی تزریق شد. موش ها به مدت ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند.

۳-۷- جداسازی پروتئین ها و پپتید های ونوم به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

جهت جداسازی اجزای پروتئینی و پپتیدی ونوم از تکنیک کروماتوگرافی با کارایی بالا-فاز معکوس استفاده گردید.

۳-۷-۱- تهیه محلول های مورد نیاز برایHPLC

• تهیه محلول استونیتریل همراه با تری فلوئورواستیک اسید ۰/۱ درصد:

۱۲۵ میکرولیتر از محلول TFA را برداشته و با محلول ACN به حجم ۲۵۰ سی سی رسانده شد .

• تهیه محلول آب HPLC به همراه TFA ۰/۱ درصد:

۱۰۰۰ میکرلیتر TFA را با آب مقطر با رتبه HPLC به حجم ۱۰۰۰ سی سی رسانده شد .

۳-۷-۲- روش کار

در این مطالعه به منظور شناسائی و جداسازی پپتید ضد درد از ونوم *Conus textile* از دستگاه HPLC استفاده شد. سیستم HPLC مورد استفاده از اجزای زیر تشکیل شده بود: پمپ k-1000، دتکتور UV 2550 ، دراین سیستم، ۴ محلول اصلی متانول به عنوان محلول A، آب مقطر با درجه خلوص مورد نیاز برای HPLC به عنوان محلول B ، استونیتریل به همراه ۰/۱ درصد تری فلورواستیک اسید به عنوان محلول C ،آب دیونیزه به همراه ۰/۱ درصد تری فلورواستیک اسید به عنوان محلول D مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور بهینه سازی روش تخلیص جهت دستیابی به بهترین تفکیک بین فراکشن ها شیب های غلظتی متعددی مورد آزمایش قرار گرفتند(جدول ۳-۷-۲-۱ تا ۳-۷-۲-۷).

جدول ۳-۷-۲-۱- روش اول جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* بـا HPLC

Time (min)	0-5	5-125	125-130
% C	0	90	0
% D	100	10	100

جدول ۳-۷-۲-۲- روش دوم جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* بـا HPLC

Time (min)	0-5	5-50	50-55	55-60	60-65
% C	0	5-40	80	95	0
% D	100	95-60	20	5	100

جدول ۳-۷-۲-۳- روش سوم جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* بـا HPLC

Time (min)	0-5	5-55	55-60
% C	0	10-95	0
% D	100	90-5	100

جدول ۳-۷-۲-٤- روش چهارم جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* بـا HPLC

Time (min)	0-5	5-40	40-45
% C	0	95	0
% D	100	5	100

جدول ۳-۷-۲-۵- روش پنجم جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* بـا HPLC

Time (min)	0-5	5-125	125-135	135-140	140-145
% C	0	90	95	95	0
% D	100	10	5	5	100

جدول ۳-۷-۲-٦- روش ششم جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* بـا HPLC

Time (min)	0-5	5-55	55-60	60-65
% C	0	95	95	0
% D	100	5	5	100

جدول ۳-۷-۲-۷- روش هفتم جداسازی اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus textile* بـا HPLC

Time (min)	0-5	5-60	60-65
% C	0	90	0
% D	100	10	100

در تمام مراحل جداسازی سرعت جریان محلول ها یک میلی لیتر در دقیقه بود. میزان جذب خروجی ستون در طول موج ۲۱۴ نانومتر اندازه گیری گردید. پس از پایان گرادیانت خطی، ستون مجددا با محلول اول شستشو داده شد. در این مطالعه جداسازی در دمای اتاق انجام گرفت.

تمام فراکشن ها به طور دستی جمع آوری و لیوفلیزه گردید. نمونه های لیوفلیزه شده جهت تعیین مقدار و انجام آزمایشات بعدی در فریزر $-20^{\circ}C$ نگهداری گردید.

۳-۸- بررسی فعالیت ضد درد

۳-۸-۱- حیوانات آزمایشگاهی و شرایط نگهداری

حیوانات مورد آزمایش موش های نر سفید نژاد NMRI به وزن تقریبی ۳۰-۲۰ گرم بودند که از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند. قبل از انجام آزمایش موش ها در محیطی آرام و دور از استرس(۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری می شدند. درجه حرارت آزمایشگاه در طی آزمایش ها در حدود ۲۵درجه سانتی گراد بود. تمامی کارهای انجام یافته بر روی حیوانات منطبق بر دستور العمل کمیته اخلاق منطقه ای بود.

۳-۸-۲- تست فرمالین

۳-۸-۲-۱- ونوم استخراج شده

۱۱گروه موش ۷ تایی انتخاب شده و به ۳ دسته تقسیم شدند:

دسته اول: ۵ گروه از موش ها که دوزهای ng/25gr ۵، ۱۰، ۲۰، ۶۰ و ۱۰۰ ونوم به آنها تزریق شد و به عنوان گروه آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند.

دسته دوم: ۵ گروه از موش ها که دوزهای ng/ 25gr ۵، ۱۰، ۲۰، ۶۰ و ۱۰۰مرفین به آنها تزریق شد و به عنوان گروه کنترل مثبت مورد بررسی قرار گرفتند.

دسته سوم: یک گروه هفت تایی از موش ها که به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شده و به آنها سرم فیزیولوژی تزریق شد.

روش انجام آزمون فرمالین برای هر سه دسته به این ترتیب بود که ابتدا نمونه مورد نظر به حجم ۵ میکرولیتر درون نخاع حیوان تزریق شده، ۵ دقیقه بعد فرمالین به عنوان ماده درد زا به کف پای چپ موش تزریق می شد(شکل ۳-۸-۲-۱). حرکات و واکنش های حیوان شامل لیسیدن دست و پا، دندان قروچه و ضربه زدن پا به عنوان نشانه های درد مورد مشاهده و شمارش قرار گرفت.

شکل **۳-۸-۲-۱- تزریق فرمالین به پای موش**

۳-۸-۲-۲- پروتئین ها و پپتیدهای ونوم

برای بررسی فعالیت پروتئین ها و پپتید های تخلیص شده از ونوم، دوز ng ۱۰ از هر یک از فراکشن های جدا شده توسط HPLC در دقیقه های ۶.۷، ۱۱.۷، ۱۴، ۱۶.۹، ۱۸.۱، ۲۳.۲، ۲۵.۵، ۳۰، ۳۵.۵، ۳۷، ۵۳.۱، ۴۴.۵، ۴۸.۳، ۴۸.۷، ۵۷.۵ ، ۵۹ و ۶۰.۱، بر طبق روش آزمون فرمالین در موش مورد آزمایش قرار گرفت.

۳-۹- تعیین غلظت فراکشن ضد درد

برای تعیین میزان غلظت فراکشن ضد درد استخراج شده توسط HPLC از دو روش اسید بیسینکونینیک (BCA) و برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

۳-۱۰- SDS PAGE فراکشن ضد درد

۱۵ µl فراکشن آماده شده، ۱۰µl آب با ۵ µl بافر لودینگ ۶ x مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس نمونه بر روی ژل در چاهک جداگانه به همراه مارکر پروتئین لود شدند. در مرحله بعد، ژل با رنگ کوماسی رنگ و سپس با محلول رنگبر، رنگبری شد. در انتها با دستگاه Gel doc از ژل رنگبری شده که باند های مربوط به ونوم درآن نمایان شده بود، عکس گرفته شد.

۳-۱۱- بررسی اثرات هم افزایی بین فراکشن ها

جهت ارزیابی وجود اثرات هم افزایی بین فراکشن ها ، فراکشن های دقیقه های ۳۰، ۳۵.۵ و ۴۸.۷ با هم ترکیب شده و با دوز ۱۰ ng/5ml طبق روش آزمون فرمالین به نخاع موش تزریق شد. سپس نتایج این ترکیب با نتیجه هر پیک به صورت مجزا ، مقایسه گردید.

۳-۱۲- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه وتحلیل نتایج به دست آمده توسط نرم افزار SPSS ورژن ۲۰ ، با استفاده از تست های one sample T-test student و Fisher exact test انجام خواهد شد.

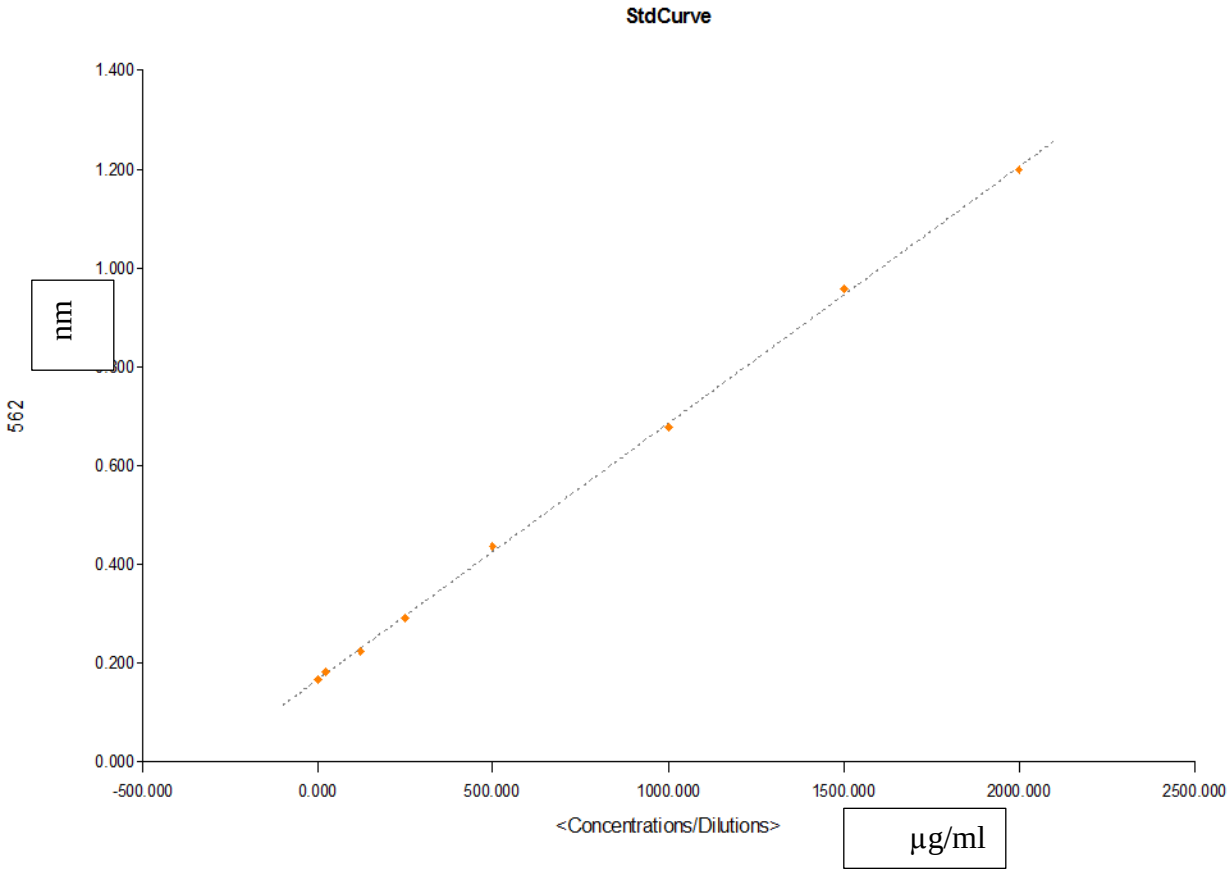
فصل چهارم:

نتایج

۴-۱- تعیین غلظت ونوم

۴-۱-۱- تعیین غلظت ونوم به روش BCA

میزان جذب نوری مربوط به ونوم با نمودار استاندارد مقایسه گردیده و تعیین مقدار شد. غلظت ونوم استخراج شده با استفاده از کیت BCA ، یک میکروگرم در میکرولیتر به دست آمد.



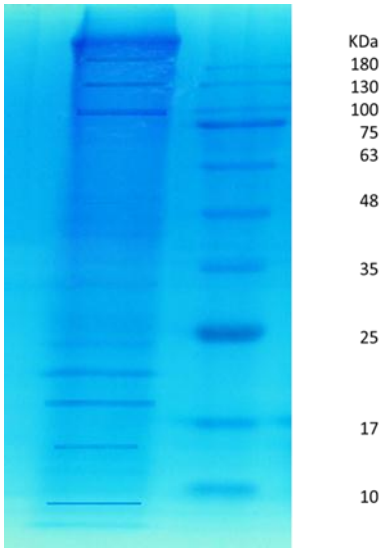
شکل ۴-۱-۱- نمودار استاندارد روش BCA

۴-۱-۲- تعیین غلظت ونوم به روش برادفورد

غلظت پروتئین در روش برادفورد با توجه به میزان جذب قرائت شده و با مطابقت آن با نمودار استاندارد برادفورد، یک میکروگرم در میکرولیتر برآورد شد.

۴-۲- نتایج SDS-PAGE ونوم استخراج شده

الکتروفورز ونوم استخراج شده پس از رنگ آمیزی با رنگ کوماسی بلو و رنگبری حضور حدود ۱۲ پروتئین و پپتید را مشخص نموده و نشان داد که اجزای تشکیل دهنده ونوم دارای محدوده وزنی ۲۵۰-۶ کیلو دالتون می باشند(شکل۴-۲).



شکل ٤-۲- SDS-PAGE ونوم *Conus textile*

۴-۳- نتایج بررسی سمیت ونوم

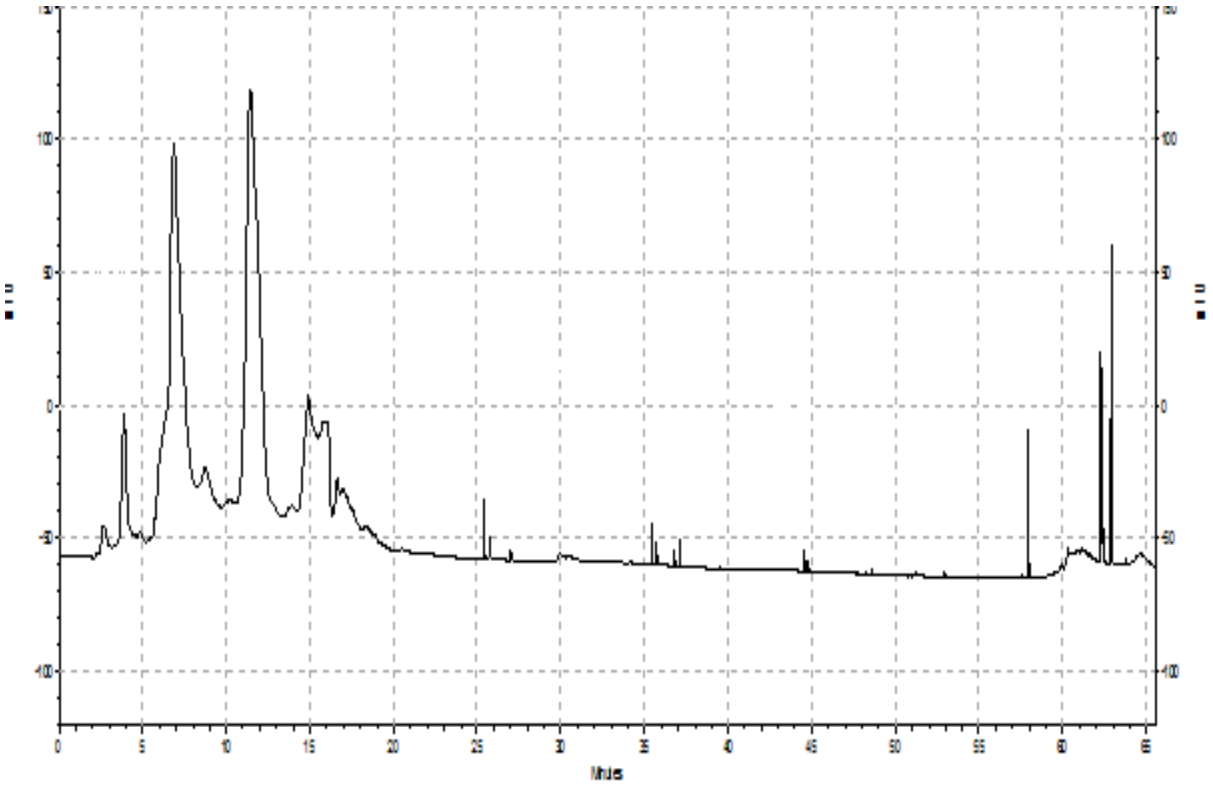
تا ۴۸ ساعت پس از تزریق هیچ مرگ و میری مشاهده نشد. نشانه هایی مانند افتادگی پلک ها و فلج شدن پاها مشاهده شد که بعد از چند ساعت بهبود حاصل شد.

۴-۴- نتایج HPLC به منظور جداسازی پپتیدها و پروتئین های ونوم

پس از بررسی شیب های غلظتی ذکر شده، بهترین تفکیک فراکشن ها در روش هفتم مشاهده شد. در این روش پس از تزریق نمونه به دستگاه و پیش از اعمال گرادیانت خطی، ستون به مدت پنج دقیقه، ۱۰۰٪ با محلول D شسته شد، سپس از دقیقه ۵ تا دقیقه ۶۰،گرادیانت خطی صفر تا ۹۰ درصد محلول C و گرادیانت خطی ۱۰۰ تا ۱۰ درصد محلول D، همزمان به مدت ۵۵ دقیقه اعمال گردید. از دقیقه ۶۰ تا ۶۵، محلولC به ۰ درصد و محلول D به ۱۰۰ درصد رسید.

بر اساس کروماتوگرام حاصل از آنالیز نمونه در طول موج۲۱۴ نانومتر، بیش از ۴۴ پیک بزرگ و کوچک مشاهده گردید(شکل ۵). بیشتر فراکشن ها در دقایق اولیه کروماتوگرافی یعنی در غلظت های پایین

استونیتریل از ستون خارج شدند. پیک های جمع آوری شده با روش های برادفورد و BCA تعیین غلظت شده سپس لیوفلیزه گردیده و جهت استفاده در آزمایشات بعدی در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.



شکل ٤-٤- کروماتوگرام حاصل از آنالیز ونوم در ۲۱۴ نانومتر

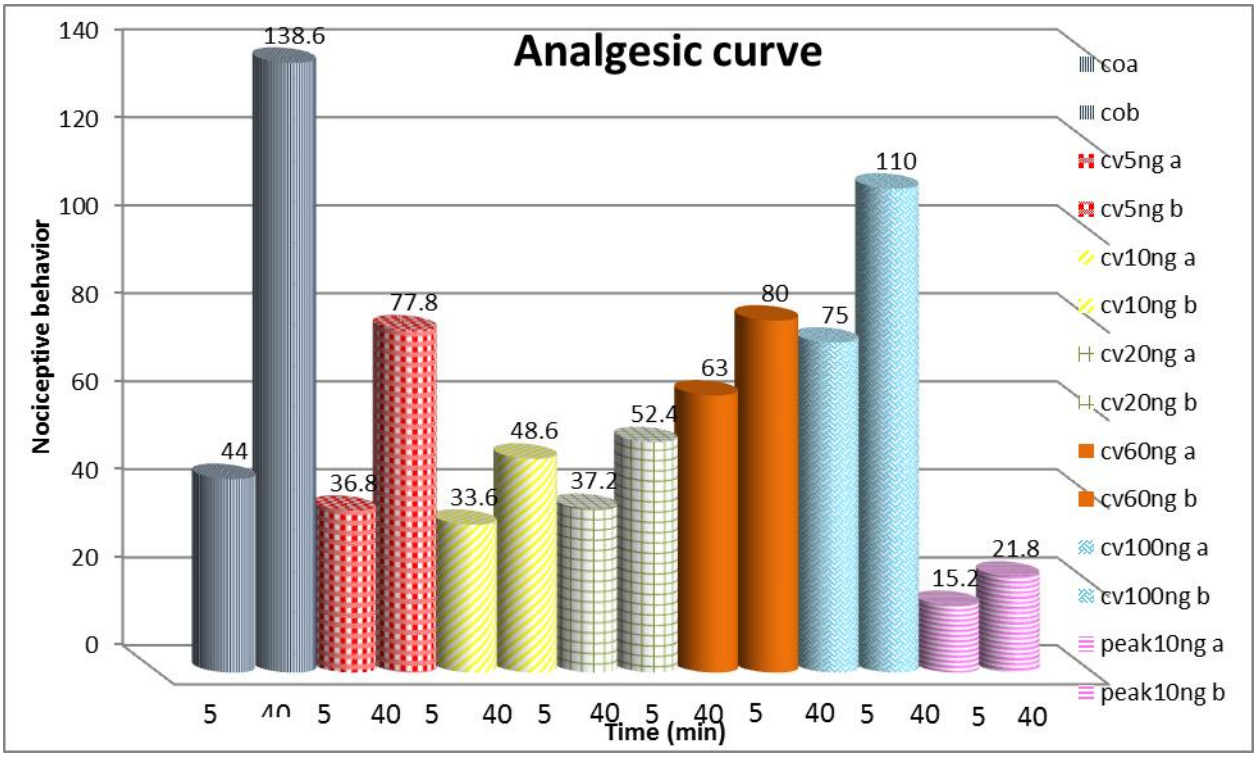
۴-۵- نتایج اثرات ضد درد در آزمون فرمالین

۴-۵-۱- اثرات ضد درد ونوم

میانگین شمارش نشانه های درد در دو زمان حاد(۵- ۰) دقیقه و مزمن(۴۰-۲۰) دقیقه در جدول (۴-۵-۱) نشان داده شده است. اعداد بدست آمده نشان داد که دوز ۱۰ ng از ونوم دارای بیشترین اثر ضد درد در هر دو فاز درد حاد و مزمن می باشد (شکل ۴-۵-۱).

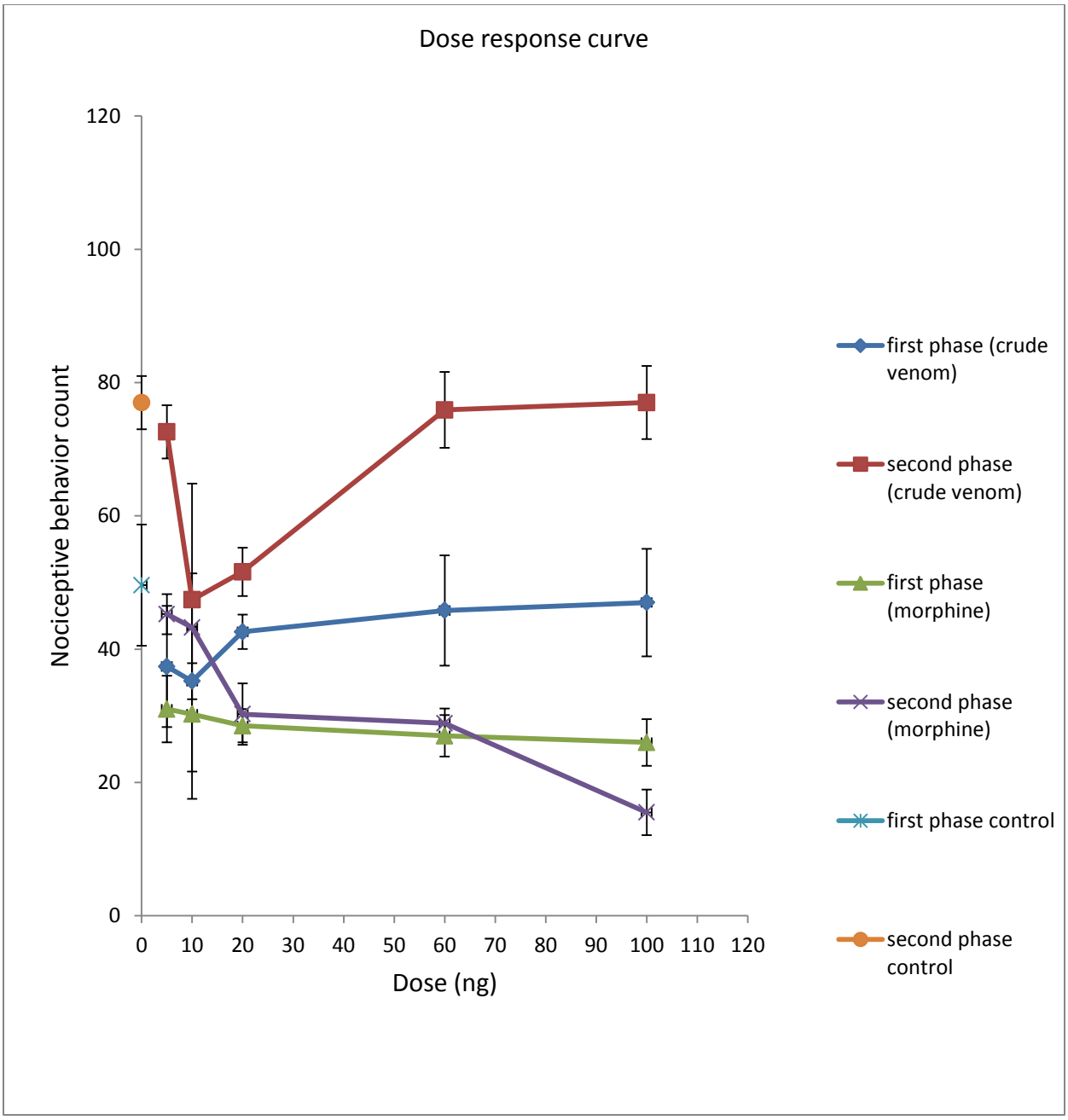
جدول ٤-٥-١- میانگین شمارش علائم درد در موش در آزمون فرمالین پس از تزریق ونوم و مورفین

دوز (ng)	انحراف استاندارد ± میانگین			
	ونوم		مورفین	
	درد حاد (۵ min)	درد مزمن (۴۰min)	درد حاد (۵ min)	درد مزمن (۴۰min)
5	37.4 ± 2.70	72.6±3.97	28.7±6.70	37.5 ± 9.7
10	35.2 ± 2.58	47.4± 3.64	30.25± 2.50	43.5 ± 4.65
20	42.6 ± 8.29	51.6± 5.68	28.5± 3.10	30.25 ± 2.21
60	45.8 ± 8.07	77.4 ± 5.50	27± 3.55	28.87 ± 3.42
100	70 ± 8.91	94 ± 11.93	22.5±7.7	14.75 ± 6.3
کنترل منفی	49.6 ± 9.09	77 ± 4	49.6 ± 9.09	77 ± 4



شکل ٤-٥-١- هیستوگرام اثرات ضد دردی دوزهای مختلف ونوم در موش

نتایج آزمون فرمالین برای دوز های مختلف نشان داد که اثر ضد درد ونوم استخراج شده از *Conus textile* وابسته به دوز می باشد(شکل ۴-۵-۱).



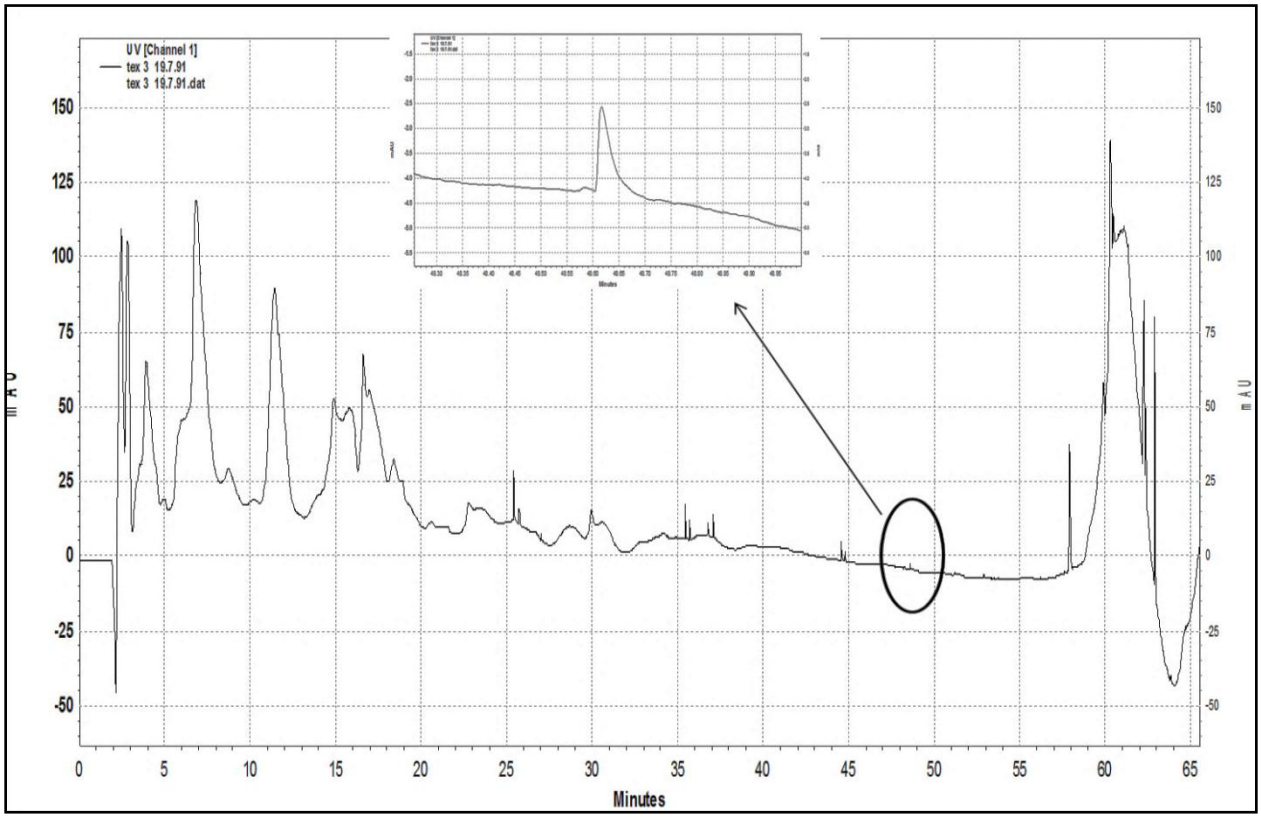
شکل ۴-۵-۱- اثرات ضد درد ونوم و مورفین وابسته به دوز

۴-۵-۲- پروتئین ها و پپتیدهای ونوم

تعدادی از فراکشن ها اثر ضد درد کمی را از خود نشان دادند(جدول ۴-۵-۲) اما بیشترین اثر مربوط به یک فراکشن مینور که در دقیقه ۴۸.۷ از ستون HPLC جدا شده است، می باشد(شکل ۴-۵-۲). این پپتید بهترین فعالیت ضد درد را در دوز ۱۰ng در هر دو فاز نشان داد که البته در فاز اول که مربوط به درد حاد است موثر تر می باشد.

جدول ۴-۵-۲- اثرات ضد درد فراکشن های جدا شده توسط HPLC

درصد کاهش درد مزمن	درصد کاهش درد حاد	زمان (دقیقه) خارج شدن فراکشن ستون
۵۷.۳	۱۶.۶	۶.۷
۳۷.۸	۶۲.۵	۱۱.۷
۴۰.۲	۴۳.۷	۱۴
۶۰.۹	۳۹.۵	۱۶.۹
۴۸.۷	۴۱.۶	۱۸.۱
۴۲.۶	۳۷.۵	۲۳.۲
۳۷.۸	۳۵.۴	۲۵.۵
۵۷.۳	۵۲	۳۰
۵۹.۷	۴۱.۶	۳۵.۵
۳۷.۸	۱۸.۷	۳۷
۲۴.۳	۱۶.۶	۴۴.۵
۶۵	۸۴.۳	۴۸.۷
۳۰.۴	۱۸.۷	۵۹
۲۶.۸	۱۶.۶	۶۰.۱



شکل ٤-٥-٢- فراکشن ضد درد جدا شده با HPLC

۴-۵-۳- مورفین

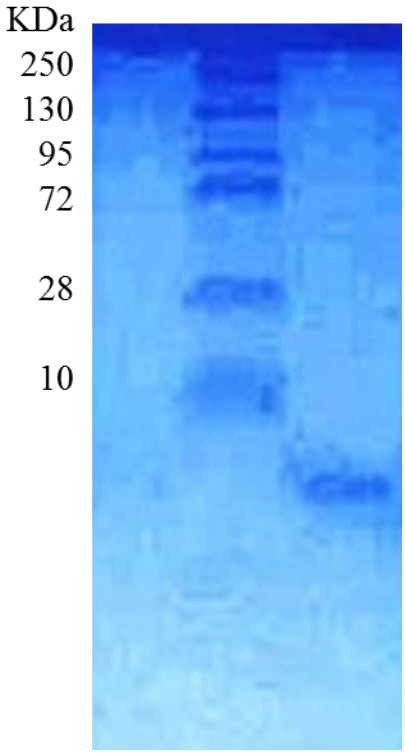
نتایج تزریق دوزهای مختلف مرفین نشان داد که با افزایش غلظت مرفین، اثر ضد درد آن نیز کاهش می یابد و دوز ۱۰۰ng دارای بیشترین تاثیر می باشد(جدول ۴-۵-۱). مرفین درد را در فاز دوم که مربوط درد التهابی است موثر تر کاهش می دهد.

۴-۶- تعیین غلظت فراکشن ضد درد

غلظت پپتید ضد درد توسط روش برادفورد با توجه به میزان جذب قرائت شده و با مطابقت آن با نمودار استاندارد برادفورد، ۰/۵ میکروگرم در میکرولیتر برآورد شد.

۴-۷- نتایج SDS-PAGE فراکشن ضد درد

پس از تغلیظ فراکشن جدا شده توسط HPLC ، نتایج الکتروفورز آن روی ژل ۱۵٪ پلی اکریلامید نشان داد که پپتید ضد درد تخلیص شده دارای وزنی در حدود ۶ کیلو دالتون می باشد(شکل ۴-۷).



شکل ۴-۷- SDS PAGE فراکشن ضد درد، چاهک سمت راست پپتیدضددرد و چاهک سمت چپ مارکر پروتئین

٤-۸- نتایج اثرات هم افزایی بین فراکشن ها

مقایسه نتایج کاهش درد حاد و مزمن بین فراکشن های دقیقه های ۳۰، ۳۵.۵ و ٤٨.٧ با نتیجه مجوعه هر سه فراکشن در آزمون فرمالین نشان داد که بین این پیک ها اثر هم افزایی(سینرژی) وجود ندارد(جدول ٤-٨).

جدول ٤-٨- اثرات هم افزایی فراکشن ها در کاهش درد

درصد کاهش درد مزمن	درصد کاهش درد حاد	فراکشن (دقیقه)
٪٥٧.٣	٪٥٢	٣٠
٪٥٩.٧	٪٤١.٦	٣٥.٥
٪٦٥	٪٨٤.٣	٤٨.٧
%٦٠	%٤٧	ترکیب هر سه فراکشن

۴-۹- مقایسه آماری نتایج مورفین و ونوم

نتایج آماری نشان داد که بین تمام دوز های ونوم و دوز ۱۰ng اختلاف معنی دار دیده می شود و دوز ۱۰ng در هر دو فاز بیشتر از دیگر دوز ها درد را کاهش می دهد(جدول ۴-۸).

بررسی بین دوزهای مشابه در دو فاز نشان داد که دوز های مشابه اختلاف معنی داری در کاهش درد بین دوز فاز نشان می دهند و نتیجه تمام دوزها در فاز اول بهتر است.

جدول ٤-٩-١- اختلاف در پاسخ به درد بین گروه ها در درد حاد در دوزهای مختلف ونوم

دوز (ng)	انحراف استاندارد	Sig.(2-tailed)
5ng – 10ng	2.48998	.119
5ng – 20ng	9.39149	.283
5ng – 60ng	7.23187	.060
5ng – 100ng	7.23187	.001
5ng – control	11.34460	.074
10ng – 20ng	8.44393	.122
10ng – 60ng	5.85662	.016
10ng – 100ng	8.43801	.001
10ng – control	10.35857	.036
20ng – 60ng	11.25611	.560
20ng – 100ng	12.83745	.009
20ng – control	13.41641	.308
60ng – 100ng	12.25561	.012
60ng – control	14.66970	.593
100ng – control	14.77498	.037

جدول٤-٩-٢- اختلاف در پاسخ به درد بین گروه ها در درد مزمن در دوزهای مختلف ونوم

دوز (ng)	انحراف استاندارد	Sig.(2-tailed)
5ng - 10ng	4.91935	.000
5ng - 20ng	8.80341	.006
5ng - 60ng	3.76829	.046
5ng - 100ng	10.80740	.011
5ng – control	6.80441	.222
10ng - 20ng	4.43847	.102
10ng - 60ng	5.47723	.000
10ng - 100ng	14.31084	.002
10ng – control	3.20936	.000
20ng - 60ng	8.98332	.003
20ng - 100ng	16.97940	.005
20ng – control	2.70185	.000
60ng - 100ng	11.26055	.030
60ng – control	6.50385	.897
100ng – control	15.11622	.066

جدول ٤-٩-٣- اختلاف در پاسخ به درد بین درد حاد و مزمن در دوزهای مختلف ونوم

دوز	میانگین	انحراف استاندارد	Sig. (2-tailed)
S5ng - F5ng	35.20000	4.76445	.000
S10ng - F10ng	12.20000	2.48998	.000
S20ng - F20ng	9.00000	6.51920	.037
S60ng - F60ng	31.60000	9.26283	.002
S100ng - F100ng	24.00000	13.76590	.018
Scont – Fcont	27.40000	12.95376	.009

فصل پنجم:

بحث

۵-۱- بحث

بیش از ۵۰۰ گونه حلزون مخروطی سمی در دنیا شناخته شده است. طبق گزارشات بدست آمده سم این موجود سبب ایجاد فلج و سپس به سرعت باعث مرگ طعمه می گردد (Kohn *et al*., 1960&1972, Olivera& Teichert, 2007). عوامل ناشناخته ای در ونوم این حلزون ها وجود دارد که سبب عوارض بالینی و حتی مرگ در انسان می شوند. این گونه ها در محیط های مرجانی گرمسیری در تمام دنیا پراکنش دارند و بر اساس نوع تغذیه به سه گروه عمده تقسیم می شوند. گونه هایی نظیر Conus geographus و Conus striatus از ماهیها و Conus textile و Conus pennaceus از نرم تنان و گونه های Conus imperialis و Conus vexillum از کرم های پرتار تغذیه می کنند(Baby *et al*., 2010). در دو دهه اخیر مطالعات بسیاری در زمینه شناسایی ونوم حلزون های مخروطی از لحاظ بیوشیمیایی، ژنتیک، فیزیولوژی و فعالیت های بیولوژیکی ونوم صورت گرفته است(Cruz *et al*., 1985a, Terlau and Olivera, 2004, Zeikus *et al*., 1987).

ویژگی ونوم حلزون های مخروطی بدلیل وجود پپتیدهای کوچک با پیوندهای دی سولفیدی (کونوتوکسین ها) می باشد که از عملکرد کانال های یونی و گیرنده های نوروترانسمیتری ممانعت می کنند(Gray *et al*., 1981). کونوتوکسین ها معمولا دارای ۳۰ -۱۰ اسیدآمینه و گاهی بیش از ۱۰ پیوند دی سولفیدی دارند(Cruz *et al*., 1985b, Garratte *et al*., 2005, Ramilo *et al*., 1992). فعالیت دارویی هر یک از خانواده های کونوتوکسین ها می تواند با نوع پیچش این توکسین ها (تعداد و آرایش پیوندهای دی سولفیدی) و محدوده جرم مولکولی آنها مرتبط باشد.

در تحقیق حاضر بررسی الگوی پروتئینی ونوم حلزون *Conus textile* و بررسی اثرات ضد درد آن انجام شد که نتایج این تحقیق در آینده می تواند در تولید آنتی ونوم و داروهای ضد درد مورد استفاده قرار گیرد.

تحقیقات انجام شده در دنیا که بر روی ونوم برخی از حلزون های مخروطی صورت گرفته، نشان داده است که زهر این حلزون ها دارای خواص ضددردی قابل توجه می باشد (Shen *et al*., 2000, Kim& Wijeskara, 2010).

با وجود تنوع در گونه های دریایی سمی مانند مار دریایی، عروس دریایی، حلزون، اختاپوس و ماهیان سمی، آنتی ونوم ها فقط برای مار دریایی، سنگ ماهی و ژلی فیش *Chironex fleckeri* موجود هستند (Endean et al., 1963, Currie *et al*., 2003, Shahbazzadeh *et al*., 2007). بنابراین شناسایی ماهیت پروتئینی ونوم دیگر گونه های دریایی جهت تولید آنتی ونوم حائز اهمیت می باشد.

پروفایل پروتئینی بدست آمده از SDS-PAGE ونوم حلزون *Conus textile* خلیج فارس حضور پپتیدهای با محدوده وزنی ۱۸۰-۶ کیلو دالتون را نشان داد. سمیت ونوم این حلزون بسیارکم است زیرا تا دوز ۱۰۰ mg/kg هیچ مرگ و میری مشاهده نشد.

در بررسی ونوم *Conus betulinus* ، نتایج SDS-PAGE نشان داد وزن مولکولی اجزای تشکیل دهنده این ونوم ۸۰-۲۰ کیلو دالتون می باشد.

تعیین سمیت ونوم *Conus betulinus*، روی میگوی آب شور، ۵۰٪ مرگ و میر را در دوز ۳۱.۵ µg/ml نشان داد که این نتیجه نشان دهنده سمیت بالای این ونوم می باشد(Giji et al., 2010).

در بررسی که Kobayashi و همکارانش در سال ۱۹۸۱ برای ارزیابی LD_{50}، *Conus textile* بومی فیلیپین انجام دادند تا دوز ۱۰۰mg/kg هیچ مرگ و میری مشاهده نشد که مشابه نتایج تحقیق حاضر می باشد(Kobayashi et al., 1981) .

ونوم *Conus textile* در این مطالعه و مطالعات پیشین نشان داد که این زهر در صورت تزریق صفاقی به موش کشنده نیست ولی در صورت تزریق مغزی در چند دقیقه می تواند سبب مرگ شود. در حالی که با توجه به بررسی های پیشین ونوم *Conus geographus* در هر دو نوع تزریق صفاقی و مغزی سبب مرگ سریع موش می شود. این تفاوت می تواند نشان دهنده اختلاف در پپتیدهای سمی این ونوم ها باشد(Cruz et al., 1976, Endean& Izatt, 1965).

در تحقیق حاضر، پس از تزریق دوزهای بالای ونوم به موش به صورت صفاقی علائمی همچون فلج موقت پاها، افتادگی پلک ها و لرزش بدن مشاهده شد که مشابه با مطالعه انجام شده توسط Cruz و همکاران در سال ۱۹۷۶ می باشد(Cruz et al., 1976).

پپتید £.TXIX تخلیص شده از *Conus textile* بومی ویتنام، پس از تزریق مغزی به موش حتی در دوزهای بالا هیچ مرگ و میری مشاهده نشد(Rigby et al., 1999). در تزریق صفاقی ونوم *Conus textile* خلیج فارس، نیز حتی تا دوز ۱۰۰mg/kg نیز هیچ مرگ ومیری دیده نشد.

در مطالعه ای که در سال ۱۹۷۶ توسط Cruz و همکارانش روی حلزون های مخروطی *Conus textile* بومی فیلیپین انجام شد، پس از تزریق صفاقی ونوم به موش هیچ دوزی سبب مرگ موش ها نشد در حالی که تزریق مغزی ۲.۵ µg ونوم باعث مرگ موش طی ۲۵-۲ دقیقه شد(Cruz et al., 1976).

پیش از این مطالعات مختلفی به منظور تعیین الگوی فراکشن های پروتئینی و پپتیدی حلزون های جنس *Conus* به روش HPLC انجام گرفته است (Cruz *et al*., 1978, Olivera, 1994&1999).

در تحقیق حاضر، روش انجام HPLC برای سم *Conus textile* خلیج فارس ، جهت تفکیک کامل فراکشن های پپتیدی و پروتئینی بهینه سازی شد. جداسازی مناسب اجزای سم می تواند در تحقیقاتی نظیر بررسی خواص بیولوژیکی فراکشن ها مورد استفاده قرار گیرد.

با توجه به کروماتوگرام حاصل از HPLC، بیشتر پپتیدهای حلزون *Conus textile* خلیج فارس، هیدروفوبیسیته پایینی دارند و در غلظت های کمتر استونیتریل از ستون جدا می شوند.

جهت تفکیک فراکشن های *Conus textile* سواحل شرقی آفریقا از شیب غلظتی ۱۰۰-۰ ٪ استونیتریل به مدت ۱۴۰ دقیقه استفاده گردید که بیشتر کونوتوکسین ها در دقایق اولیه کروماتوگرافی یعنی در غلظت های کمتر استونیتریل از ستون خارج شده اند(Quinton et al., 2009).

در مطالعه حاضر، HPLC با استفاده از ستون C_{18} analytical انجام شد و ۴۴ فراکشن از ونوم جدا گردید در حالی که کروماتوگرافی ونوم *Conus textile* سواحل شرقی آفریقا، منجر به تفکیک ۸۰ فراکشن شد(Quinton et al., 2009).

مقایسه الگوی کروماتوگرافی ونوم *Conus textile* خلیج فارس با مناطق دیگر نشان دهنده تفاوت بین تعداد و الگوی فراکشن های بدست آمده می باشد که این اختلاف می تواند به دلیل تکامل موجود بر اساس شرایط زیست محیطی باشد(Olivera *et al*., 1991, Rigby *et al*., 1999).

در مطالعه ای که برای بررسی ونوم *Conus textile* و *Conus marmoreus* صورت گرفت، به منظور تفکیک اجزای تشکیل دهنده ونوم *Conus marmoreus* از دو حلال استونیتریل و تری فلوئورواستیک اسید با شیب غلظت ۶۰-۰ ٪ استفاده شد، در حالی که جداسازی پپتید های *Conus textile* با دو حلال استونیتریل و هپتا فلوئوروبوتیریک اسید با گرادیان غلظت ۶۰-۳۰ ٪ انجام شد.

هپتا فلوئوروبوتیریک اسید مادهای هیدروفوب تر از تری فلوئورواستیک اسید است که نشان می دهد پپتید های*Conus textile* آب گریزتر از پپتید های *Conus marmoreus* هستند و با حلال هیدروفوب تر بهتر از ستون جدا می شوند(Corpuz et al., 2005).

در تحقیق حاضر، روش نهایی HPLC که برای تفکیک فراکشن ها استفاده شد، دارای شیب غلظتی ۹۰-۰٪ در ۶۵ دقیقه بود و پپتید ضد درد در ۶۳.۴٪ استونیتریل از ستون جدا شد. در تحقیقی که در سال ۱۹۹۱ برای تفکیک فراکشن های *Conus textile* بومی ویتنام انجام شد گرادیان غلظت ۶۰-۰٪ به مدت ۸۰ دقیقه بود و پپتید £.TXIX جدا شده از ونوم این حلزون در ۴۸٪ استونیتریل از ستون خارج شد. این پپتید سبب کاهش نفوذ نوروترانسمیترها در فضای پس سیناپسی می شود(Rigby et al., 1999).

در مطالعه ای که در سال ۱۹۹۱ بر روی *Conus textile* زیر گونه *Neovicarius* انجام شد، تفکیک فراکشن ها با استفاده از HPLC و گرادیان غلظت ۶۰-۰٪ به مدت ۷۰ دقیقه صورت گرفت. اثر بیولوژیکی سه پپتید تفکیک شده TXIA, TXIIA و TXIB در درصد های ۴۰، ۵۸ و ۵۷ ، روی لیمپت، ماهی گامبوزیا، سخت پوست ایزوپود و موش بررسی شد. نتایج نشان داد که این سه پپتید در دوزهای Pmol ۸۰-۹ برای لیمپت بسیار سمی و فلج کننده است در حالی که تا دوز ۲۰ برابر بالاتر از دوز تزریق شده به لیمپت فاقد هر گونه اثر سمی بر سخت پوست و ماهی گامبوزیا می باشند. تزریق مغزی nmol ۲۰-۱۵ از این سه پپتید به موش فاقد هر گونه اثرات مربوط به سمیت بود که نتایج آن بر خلاف مطالعات انجام شده بر روی تزریق مغزی ونوم *Conus textile* زیر گونه *Lineause* می باشد. در بررسی حاضر، ونوم *Conus textile* زیر گونه *Lineause* تحت شیب غلظتی ۹۰-۰٪ استونیتریل کروماتوگرافی شد و ونوم آن به صورت صفاقی به موش تزریق گردید و علائم سمیت مانند فلج موقت پاها ، افتادگی پلک ها و لرزش بدن مشاهده شد که این اختلاف در نتایج می تواند نشان دهنده تفاوت در ساختار و عملکرد ونوم این دو زیر گونه باشد(Fainzilber *et al*., 1991).

در بررسی حلزون کرم خوار *Conus spurius* که در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت، HPLC ونوم تحت برنامه ۸۰ دقیقه ای با شیب غلظتی ۱۰۰-۰٪ انجام شد که پپتید فعال Conorfamide-sr2 در حدود دقیقه ۴۳ و ۵۵-۴۵٪ استونیتریل از ونوم تفکیک گردید. اثر بیولوژیکی این پپتید روی حلزون آب شیرین، لیمپت، ماهی آب شیرین و موش مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج تزریق دوز بالای این کونوتوکسین در حلزون ، لیمپت و ماهی اثرات بیش فعالی موقت و در لیمپت فلج متوسط و دوزهای پایین تر آن هیچ اثری روی ماهی نداشت. در تزریق مغزی با دوز بالا Pmol ۱۰۰۰ نیز فقط سبب بیش فعالی موقت شد که این نتایج به دلیل ضعیف تر بودن ونوم حلزون های کرم خوار نسبت به ونوم حلزون های نرم تن خوار و ماهی خوار می باشد(Aguilar et al., 2008).

یکی از اهداف مطالعات جهانی در رابطه با حلزون های مخروطی و جستجو برای پپتید های ضد درد جدید، یافتن داروهای قوی تر و با فرمول غیر اعتیاد آور نسبت به مرفین می باشد(Lee et al., 2010). بدلیل نیاز به داروهای ضد درد قوی برای بیمارانی همچون افراد مبتلا به سرطان های پیشرفته، جستجو برای یافتن یک عامل بیولوژیک موثر در این زمینه ضروری است.

بر خلاف پتانسیل درمانی بالای کونوپپتیدها، تعداد کمی از آنها به طور کامل بررسی شده اند. ونوم هر گونه حاوی ترکیبات زیادی با خواص دارویی می باشد که به عنوان نمونه می توان به GVIA, MVIIA, CVID و SO-3 اشاره کرد.

اولین گزارش مربوط به فعالیت ضد درد این کونوپپتیدها در سال ۱۹۷۵ مطرح شد که مربوط به کونوتوکسین CTx-MVIIA است که به تائید سازمان غذا و داروی آمریکا رسیده است و از ونوم *Conus magus* استخراج شده است و تحت نام تجاری زیکونوتاید در بازار موجود است. زیکونوتاید قادر است دردهای مزمن و شدید را کاهش داده و کیفیت زندگی فرد بیمار را بهبود بخشد اما دارای عوارض جانبی بسیاری می باشد.

مقایسه اثر ضد درد پپتید *Conus textile* خلیج فارس، مورفین، زیکونوتاید و CTX-FVIA که از *Conus fulmen* استخراج شده است، نشان می دهد که پپتید *Conus textile* خلیج فارس بر خلاف مورفین، زیکونوتاید وCTX-FVIA در کاهش درد حاد بهتر از کاهش درد مزمن عمل می کند(Lee *et al*., 2010).

مطالعه حاضر نشان داد که بین افزایش غلظت مرفین و میزان کاهش درد ناشی از آن ارتباط مستقیمی وجود دارد، در حالی که فراکشن تخلیص شده از ونوم *Conus textile* و برخی از تحقیقات پیشین، از این رابطه تبعیت نمی کنند.

در بررسی قدرت کاهش درد بین CTX-FVIA و زیکونوتاید با استفاده از آزمون فرمالین مشخص شد که اثرات ضد درد زیکونوتاید با افزایش دوز زیاد می شود در حالی که CTX-FVIA در بین دوزهای ng/25gr ۱۰۰۰-۰ ، بهترین کاهش درد را در دوز ng/25gr ۳۰ نشان می دهد و پس از آن در دوزهای بالاتر میزان درد افزایش می یابد(Lee *et al*., 2010).

مزیت آزمون فرمالین که در مطالعه حاضر برای بررسی اثرات ضد درد ونوم مورد استفاده قرار گرفت، مربوط به امکان ارزیابی درد حاد و مزمن می باشد که در مطالعه Lee و همکاران نیز برای بررسی اثرات ضد درد زیکونوتاید و CTX-FVIA، از این آزمون برای تفکیک کاهش درد حاد و مزمن استفاده شده است(Lee *et al*., 2010).

بر اساس نتایج بدست آمده در بررسی حاضر نیز، ونوم *Conus textile* خلیج فارس بیشترین کاهش درد را در بین دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۶۰ و ۱۰۰ در دوز ng/25gr۱۰ از خود نشان می دهد که این پدیده می تواند به دلیل رقابت منفی بین لیگاندها برای اتصال به گیرنده ها رخ دهد.

در واقع می توان نتیجه گیری کرد که برای ونوم *Conus textile* موثرترین اتصال بین لیگاند و گیرنده در دوز ng۱۰اتفاق می افتد و بهینه کاهش درد در این دوز مشاهده می شود.

LD_{50} زیکونوتاید ۵۷/۵ mg/kg در موش محاسبه شده است(Buenaflor et al., 1981) در حالی که در تحقیق حاضر تا دوز ۱۰۰mg/kg هیچ مرگ و میری مشاهده نشد. این قضیه نشان دهنده این است که سمیت ونوم *Conus textile* بسیار کمتر از ونوم *Conus magus* می باشد.

با توجه به مقایسه فراکشن ضد درد حلزون خلیج فارس با مورفین ، این پپتید می تواند تا ۵۰٪ بیشتر از مرفین درد را کاهش دهد در حالی که زیکونوتاید ۱۰۰۰ برابر موثرتر از مورفین است ولی با توجه به عوارض جانبی و سمیت بیشتر زیکونوتاید(Wen et al., 2006)، پپتید *Conus textile* خلیج فارس می تواند به عنوان جایگزینی مورفین و حتی زیکونوتاید مطرح گردد.

مقایسه آماری بین اثرات کاهش درد در فاز اول و دوم در آزمون فرمالین، اختلاف معنی داری نشان داد، به این ترتیب که می توان نتایج فاز اول به طور معنی داری بهتر از فاز دوم می باشند.

بنابراین می توان نتیجه گرفت که کونوپپتید مذکور سریعتر به گیرنده درد متصل شده و درد را سریعتر کاهش می دهد.

براساس نتایج مطالعه Lee و همکارانش در سال ۲۰۱۰ مشخص شد که برگشت پذیری یا جدا شدن CTX-FVIA از گیرنده ها سریع تر از زیکونوتاید صورت میگیرد، بنابراین سمیت و عوارض کمتری را در بدن فرد بیمار بوجود می آورد.در نتیجه می تواند گزینه مناسب تری برای کاهش دردهای مزمن نسبت به زیکونوتاید مطرح گردد(Lee *et al.*, 2010). از آنجایی که نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ونوم *Conus textile* خلیج فارس در کاهش دردهای حاد موثر تر است، به نظر می رسد اتصال و برگشت پذیری این پپتید به گیرنده ها سریع تر از زیکونوتاید و حتی CTX-FVIA عمل می کند و با توجه به سمیت پایین، این ونوم انتخاب بسیار مناسبی برای کاهش دردهای حاد می باشد.

داروی زیکونوتاید مشابه پپتید بدست آمده از *Conus textile* است که هزینه هر ویال آن در امریکا ۱۶۰۰۰۰۰۰ ریال می باشد و واردات آن مستلزم هزینه های گزاف بوده و تهیه آن برای بیماران دشوار است.

با توجه به یافته های این تحقیق، ونوم حلزون خلیج فارس می تواند برای تولید داروهای ضد درد جدید با سمیت پایین تر و هزینه کمتر می تواند راه حل مناسبی برای حل این مشکل مطرح گردد.

به این ترتیب می توان داروی مورد نیاز برای بیماران دارای دردهای صعب العلاج، مزمن و پیشرفته را تامین نمود.

از آنجا که فراکشن ضد درد تخلیص شده از ونوم این حلزون دارای وزن ۶ کیلو دالتون است، تولید آن به صورت سنتزی در آزمایشگاه آسان است.

به دلیل گران بودن سنتز آزمایشگاهی در ایران و نبود امکانات لازم سخت افزاری، پرورش بیولوژیکی حلزون های مخروطی با توجه به تکثیر سریع و فراوان این موجود می تواند موجب استخراج در حجم بالای ونوم ضد درد شده و با استفاده از HPLC با ستون semi-preparative می توان حداقل مقدار داروی مرد نیاز کشور را با هزینه کمتر تولید نمود.

۵-۲- نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، ونوم *Conus textile* در کاهش دردهای حاد موثرتر است. پپتید تخلیص شده از ونوم، ۵۰٪ قویتر از مورفین درد را کاهش می دهد.

تصور می شود ونوم حاوی کونوپپتیدهایی با اثر سریع ضد درد می باشد که با توجه به عوارض جانبی و اعتیاد آور بودن مرفین این پپتید ها می توانند در درمان دردهای شدید و حاد جایگزین مناسبی برای مرفین باشند.

۵-۳- پیشنهادات

- مطالعه ونومیکس دیگر گونه های سمی خلیج فارس
- بررسی اثر ضد درد گونه های دیگر حلزون های مخروطی خلیج فارس
- بررسی اثرات بیولوژیکی دیگر ونوم *Conus textile*
- تعیین سکانس پپتید ضد درد تخلیص شده *Conus textile* و مقایسه آن با توالی پپتید های ضد درد ثبت شده در بانک جهانی پروتئین

منابع فارسی

نصیری نژاد، فریناز، صفارپور، سپیده. ۱۳۸۷. بررسی دخالت رسپتورهای NMDA در اثر ضد دردی ویتامین C در یک مدل درد نوروپاتیک. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران. دوره ۱۵، شماره ۶۰و ۶۱.

Reference

Aguilar,B.M., Ramirez, K.S.L., Echeverria, D., Falcon, A., Olivera, B.M., Cotera, E.P.H.D.L., Maillo, M., 2008. Conorfamide-sr2, a gamma-carboxyglutamate- containing FMRFamide-related peptide from the venom of *Conus spurius* with activity in mice and mollusks. Peptides. 29, 186-195.

Bazaa, A., Marrakchi, N.; Ayeb, M.; Libia, S. and Calvete, J., 2005. Snake venomics: Comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes Cerastes cerastes Cerastes vipera and Macrovipera lebetina. Proteomics. 5, 4223-4235.

Baby, J., Sheeja, R., Jeevitha, M.V., Ajiha, S.U., Jini, D., 2010. Conotoxins: a potential natural therapeutic for pain relief. Pharmacy & Pharma. Sci. 3, 975-985.

Balamurgan, K.; Akalanka, D.; Raju, S.; Sharma, A., 2007. Some Neuropharmacological Effects of the Crude Venom Extract of Conus musicus in Mice. East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences. 10, 28-33.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72, 248-254.

Cartier, G.E., 1996. A new a-conotoxin which targets a3b2 nicotinic acetylcholine receptors. J. Biol. Chem. 271, 7522-7528..

Cruz, L. J., Corpuz, G., Olivera, B. M., 1976. A preliminary study of Conus venom protein. Veliger 18, 302-308.

Cruz, L.J., Gray, W.R., Olivera, B.M., 1978. Purification and properties of a myotoxin from Conus geographus venom. Arch. Biochem. Biophys. 190, 539-548.

Currie, B.J., 2003. Marine antivenoms. Journal of drug assessment 41, 301-308.

Endean, R., Rudkin, C., 1963. Studies of the venoms of some Conidae. Toxicon 1, 49-64.

Endean, R., Rudkin, C., 1965. Further studies of the venom of Conidae. Toxicon 69, 225–24.

Fainzilber, M, Gordon, D., Hasson, A., Spira, M.E., Zlotkin, E., 1991. Mollusc-specific toxins from the venom of *Conus textile neovicarius*. 202, 589-595.

Garratte, J.E.; Buczek, O.; Watkins, M.; Olivera, B.M. and Bulaj, G., 2005. Biochemical and genenexpression analysis of conotoxins in conus. Biochemical and biophysical research communications. 328, 362-367.

Giji, S., Muthuvel, A., Rajasekaran, R., Pachaiyappan, A., Thangavel, B., 2012. Studies on biochemical and biomedical properties of Conus betulinus venom.3514, 24-34.

Gray, W.R., Luque, A., Olivera, B.M., Barrett, J., Cruz, L.J., 1981. Peptide toxins from Conus geographus venom. J. Biol. Chem. 256, 4734-4740.

Han, T.S., Teichert, R.W., Olivera, B.M., Bulaj, G., 2008. Conus Venoms-A rich source of peptide-based therapeutics. Curr. Pharm. Des. 14, 2462–2479.

Kim, S.K.; Wijesekara, I., 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides. A review. Journal of Functional Foods. 2, 423-429.

Kobayashi, J., Ohizumi, Y., Nakamura, H., Hirata, Y., 1981. Pharmacological study on the venom of the marine snail conus textile. Toxicon 19, 757-762.

Kohn, A.J., Saunders, P.R., Wiener, S., 1960. Preliminary studies on the venom of the marine snail Conus. Ann. N.Y. Acad. Sci. 90, 706-725.

Kohn, A.J., Nybakken, J.W., Mool, V., 1972. Radula tooth structure of the gastropod Conus imperialis. Science 176, 49-51.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.

Lee, S., Yoonji, K., Back, S.K., Choi, H.W., Lee, J.Y., Jung, H.H., Ryu, J.H., 2010. Analgesic effect of highly reversible ω- conotoxin FVIA on N-type Ca+2 channels. Molecular pain 4, 1-12.

Olivera, B. M., Rivier, J. K., Scott, H., Cruz, L. J., 1991. Conotoxins. J. Biol. Chem. 33, 22067- 22070.

Olivera, B.M., 1994. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: The v-conotoxins and v-agatoxins. Ann. Rev.Biochem. 63, 823-867.

Olivera, B.M., 1999. Speciation of cone snails and interspecific hyperdivergence of their venom peptides. evolutionary significance of introns. Ann. New York Acad. Sci. 870, 223–237.

Olivera, B.M., Teichert, R.W., 2007. Diversity of the Neurotoxic Conus peptides, A Model for Concerted pharmacological Discovery. Molecular Interventions 7, 253-262.

Quinton, L., Gilles, N., Pauw, E.D., 2009. TxXIIIA, an atypical homodimeric conotoxin found in the *Conus textile* venom. Proteomics 72, 219-226.

Ramilo, C.A., Zafaralla, G.C., Nadasdi, L., 1992. Novel a- and v-conotoxins from Conus striatus venom. Biochemistry 31, 9919-9926.

Rigby, A.C., Meunier, E.L., Kalume, D.E., Czerwiec, E., Hambe, B., 1999. A conotoxin from Conus textile with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic ca+2 influx. Neurobiology 96, 5758-576.

Shahbazzade,D.; Srariabid, N.; Feng, N.; Ram, L.; Borchani, M.; Ronjat, A.; Akbari, I.N.; Pessah M.D.E. Elayeb, M., 2007.Hemicalcin,new toxin from the Iranian scorpion Hemiscirpius lepturus which is active on waard,ryanodine-sensitive ca2+ channel. Biochem.J. 404, 89-96.

Shen, G.S., Layer, R.T., McCabe, R.T., 2000. Conopeptides: from deadly venoms to novel therapeutics. Drug Discov Today. 5, 98-105.

Stix, G., 2005. A toxin against pain. Sci Am. 292, 88-93.

Szewczyk, B.; Summers, D.F., 1992. Efficient elution of purified proteins from polyvinylidene Difluride membranes (Immobilon) after transferfrom SDS-PAGE andt Methods in molecular biology., vol. 10.The Humana .heiruseas Immunogens. Ed.M.Manson press. Totowa,N.J.

Terlau, H.; Shon, K.J.; Grilley, M.; Stocker, M.; Stuhmer W.; Olivera, B.M., 1996 .Strategy for rapid immobilization of prey by a fish hunting marine snail. Nature. 381, 148-151.

Terlau, H., Olivera, B.M., 2004. Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. Physiol Rev. 84, 41-68.

Wen, L., Yang, Sh., Zhou, W., Zhang, Y., Huang, P., 2006. New conotoxin so-3 targeting N-Type voltage-sensitive calcium channels. Mar.Drugs. 4, 215-227.

Zeikus, R.; Gray, W.R.; Olivera, B.M., 1987. Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs Characterization of peptides from Conus geographus and Conus striatus venoms. J. Biol. Chem. 262, 15821-15824.

Abstract

Extraction, purification and analysis of conotoxin of *Conus textile* captured from Persian Gulf and the investigation of analgesic effects of conotoxin in an animal model

Nasim Tabaraki**,** Delavar Shahbazzadeh, Ali Mashinchian Moradi, Gholamhossein Vosughi, Pargol Ghavam Mostafavi

Identification of venomous species of Persian Gulf cone snails and characterization of venom composition and their features is so important from the point of medical importance. Marine cone snails from the genus Conus are estimated to consist of up to 700 species. The venom of cone snails has yielded a rich source of novel neuroactive peptides or conotoxins. The present study was aimed to study the analgesic effect of Persian Gulf *Conus textile* and its comparison with morphine in mouse model.

The specimens of *Conus textile* were collected of Larak Island from depth of 7 m. The collected samples were transferred to laboratory alive and were stored at -70^0 c.

The venom´s ducts were separated and homogenized with deionized water. The mixture centrifuged at 13000 rpm for 15 minutes. Supernatant was considered as extracted venom and stored at -20 ˚ C after lyophylization. The protein profile of venom determined by using SDS-PAGE and HPLC used to investigate the extracted venom and to evaluate the analgesic activity, formalin test was carried out. SDS-PAGE indicated several bands ranged between 6 and 250 kDa. Chromatogram of the venom demonstrated more than 44 large and small fractions. The amount of 10 ng of Conus crude venom and analgesic peptide showed the best anti-pain activity in formalin test. No death observed up to 100 mg/kg, which is 250,000 times higher than the effective dose.Venom characterization of Persian Gulf *Conus textile* may be of medical importance and potential for new pharmaceutical drugs as well.

Keywords: Cone snails, *Conus textile*, Venom, HPLC, Analgesic activity.

By: Nasim Tabaraki