

مطالعه بافت شناسی مجرای تولید توکسین های پتیدی و تحویل آن ها در حلزون مخروطی دریایی (*Conus frigidus*, Reeve 1848)

حلیمه رجبی^{۱*}، حسین ذوالقرنین^۲، احمد سواری^۲، علیرضا آموزنده^۳، نبی جمعه زاده^۱

۱. دانشکده علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران

۲. گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

۳. میکروبیولوژی پزشکی دانشکده علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۰۴

شناسه دیجیتال (DOI): [10.22113/jmst.2017.41711](https://doi.org/10.22113/jmst.2017.41711)

چکیده

در این مقاله، مجرای سم حلزون مخروطی دریایی *Conus frigidus* که جایگاه تولید توکسین های پتیدی با پتانسیل دارویی است، مطالعه شد. مجرای تولید سم حدود ۶ عدد جداسازی گردیدند و به سه قسمت: حباب سم، بخش پروگزیمال مجرای سم (نزدیک به حباب سم) و بخش دیستال مجرای سم (نزدیک به حلق) تقسیم شدند. سپس به مدت ۴۸ ساعت در بوئن فیکس و به اتانول ۷۰ درصد منتقل گردیدند. پس از آگیری، پارافینه کردن و قالب گیری، توسط میکروتوم برش زده شدند و پس از تهیه لام و رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. نتایج نشان داد، حباب سم از ماهیچه های طولی، حلقوی و یک ردیف سلول مکعبی با هسته های گرد تشکیل شده است. بخش های پروگزیمال و دیستال، دارای سلولهای استوانه ای کشیده با هسته های قاعده ای هستند. سلولهای اپیتلیالی مجرا دارای گرانول های فراوان بوده که در بخش دیستال بزرگتر از بخش پروگزیمال است. مسیر عبوری بین لومن مجرای سم و حلق، کانال باریکی است که به کیسه رادولا حاوی رادولاهایی با درجه متفاوت رشد منتهی می شود. لذا تولید و تحویل سم در *C. frigidus* با سنتز در مجرای سم، ذخیره سم تولیدی در دندان رادولایی و تزریق سم توسط حباب سم انجام می شود و بهترین جایگاه جهت استخراج توکسین های پتیدی ناحیه دیستال مجرای سم می باشد. دلیل این امر فعال بودن این بخش در ترشح سموم بالغ است، که می تواند جهت اهداف دارویی استفاده شود.

واژگان کلیدی: مجرای سم، گرانول، رادولا، *Conus frigidus*

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: halimeh.rajabi@gmail.com

۱. مقدمه

پپتیدهای اگزوکترین هستند (Wu et al, 2010)، که در دستگاه تولید سم حلزون های مخروطی دریایی سنتز می شوند. دستگاه تولید سم درحقیقت زائده ای از دستگاه گوارش می باشد، که سم در یک لوله طویل سنتز می شود و به وسیله حباب ماهیچه ای فشرده و به شکار از طریق دندانهای رادولایی تزریق می گردد. این دندانها مشابه سوزن های خاردار هستند که در ساک رادولا ذخیره می شوند (Olivera et al, 1985; Safavi-Hemami et al, 2011). در کیسه رادولایی دندان های رادولایی به تعداد متفاوت و در درجه های متفاوتی از رشد وجود دارند. این دندانها از لحاظ شکل ظاهری در گونه های مختلف حلزون های مخروطی دریایی متفاوت بوده و به عنوان شاخصی در شناسایی گونه ای استفاده می شوند (Franklin et al, 2007; Eisapour et al, 2015).

حلزون های مخروطی دریایی، در ناحیه جزر و مدی گرمسیری زندگی کرده و از کرم ها و ماهی ها و نرمتنان دیگر، به عنوان منبع غذایی استفاده می کنند (Terlau and Olivera, 2004; Bernaldez et al, 2011). حلزون های مخروطی دریایی، توانایی شنا کردن ندارند و با وجود این، تعدادی از آنها از ماهی ها تغذیه می کنند. لذا حضور ترکیبات سمی قوی با اثر گذاری بر سیستم عصبی شکار و بی تحرکی آن، لازم است (Olivera, 1997; Moller et al, 2013). این خاصیت در سموم این گونه ها، آنها را کاندیدای خوبی برای استفاده های دارویی ساخته است. این تحقیق به منظور بررسی ساختار اندام تولید کننده این سموم انجام گردیده است. این اندام از بخش های مختلفی که در تولید سموم (حباب سم، مجرای متصل به حباب یا پروگزیمال و مجرای متصل به حلق یا دیستال) و تحویل سموم (کیسه رادولایی و کانال مرتبط بین حلق و مجرای سم) تشکیل شده است. ولی تمامی این بخش ها حاوی کونوپپتید نبوده، لذا در این مطالعه بخش های مختلف مجرای سم حلزون مخروطی دریایی *C. frigidus* جهت امکان استحصال

حلزون های مخروطی دریایی جنس *Conus*، از نرمتنان دریایی سمی هستند که از سموم پپتیدی کوچک با نام کونوپپتید جهت شکار، دفاع و رقابت استفاده می کنند. از میان آنها، کونوپپتیدهایی که دارای باند های غنی دی سولفیدی هستند، کونوتوکسین نامیده می شوند (Walker et al, 1999; Terlau and Olivera, 2004; Kaas et al, 2010). تا کنون بیش از ۷۰۰ گونه حلزون مخروطی دریایی شناسایی شده اند (Howard et al, 2013; Puillandre et al, 2014 and 2015). تخمین زده شده که هر گونه ممکن است حدود ۱۰۰ نوع کونوپپتید داشته باشد که برخی مربوط به همان گونه و برخی دیگر در بین سایر گونه ها مشترک هستند (Conticello et al, 2001; Terlau and Olivera, 2004). سموم این جانوران توجه فیزیولوژیست ها و بیولوژیست ها را به علت پتانسیل آنها که اغلب به عنوان عامل های کلیدی در بلوکه کردن غشا سلولهای ماهیچه ای و عصبی است، جلب کرده است (Favreau et al, 2011).

ویژگی مهم کونوپپتیدها که آنها را جهت مطالعات نوروفیزیولوژی مهم ساخته است، توانایی تمایز بین ایزومرهای مولکولی یک کانال یونی خاص می باشد. مثلا، ω -کونوتوکسین، کانالهای کلسیمی، α -کونوتوکسین، گیرنده نیکوتینیک، μ -کونوتوکسین و δ -کونوتوکسین، به ترتیب، به جایگاه های ω و δ کانالهای سدیم متصل می شوند (Kaas et al, 2010; Eisapoor et al, 2016). استراتژیهای عملکرد کونوس ها مشابه به نظر می رسد که شامل پپتید های سمی است که بی حرکتی کزازی سریعی ایجاد و منجر به قطع انتقال عصبی می شوند. چندین پپتید که عملکرد هماهنگی دارند و برای رسیدن به نقطه پایانی فیزیولوژیکی خاص، با هم همکاری دارند تحت عنوان Conopeptides Cabals نامیده می شوند (Walker et al, 1999; Favreau et al, 2011; Howard et al, 2013).

مطالعه و توسط دوربین Dino-Eye AM-4023X (ساخت تایوان) عکس برداری شدند. تمام اندازه گیری ها توسط نرم افزار ImageTools 2 صورت گرفت (Rajabi and Khodabandeh, 2012).

۳. نتایج

مطالعه ریخت شناسی

۱- آناتومی صدف

طرح صدف، به رنگ زرد و نارنجی بود. شکل صدف که شامل: نوع پیچش صدف (Whorl)، حالت مخروط (Spire)، شانه صدف (Shoulder) و دهانه مخروط (Aperture) مورد بررسی قرار گرفت. پیچش بدن به صورت محدب شکل است. لبه داخلی صدف صاف بوده و فاقد طرح خاص و تیره رنگ بود. حالت مخروط، صاف و با نوک کوتاه است و اصطلاحاً conical است. شانه صدف حالت مسطح و سفت است، به همین دلیل با نام frigidus (frigid cone) خوانده می شود. دهانه مخروط در قسمت انتها زیاد گسترده نیست. به رنگ زرد بوده و در سمت لبه خارجی تیره رنگ است (شکل ۱-۱ و شکل ۱-۲).

۲- آناتومی حلزون مخروطی

خرطوم ابزار شکار در حلزون مخروطی است و سم را از طریق هارپن به شکار تزریق می کند. خرطوم در گونه *Conus frigidus* به رنگ زرد بود. سیفون نیز طویل بوده به رنگ زرد با خط مشکی در وسط می باشد. دهان و پا هر دو از لبه بیرونی و دهانه صدف خارج می شوند و گسترش می یابند. که هر دو به رنگ قهوه ای تیره مشاهده شدند (شکل ۱-۳).

مطالعه بافت شناسی

مجرای تولید سم در حلزون مخروطی *C. frigidus* از بخش های متعددی تشکیل گردیده که در روند تولید سم، و تزریق آن به شکار نقش دارد. مجرای تولید سم با توجه به نقش و نوع بافت و ترشحات آن، در سه بخش بررسی گردید که شامل حباب سم، بخش پروگزیمال مجرای تولید سم که در نزدیک حباب سم قرار داشت و بخش دیستال مجرای سم که در نزدیکی

مقادیر بالاتر کونوپتید جهت مصارف دارویی بوسیله مطالعه بافت شناسی انجام گردیده است.

۲. مواد و روش ها

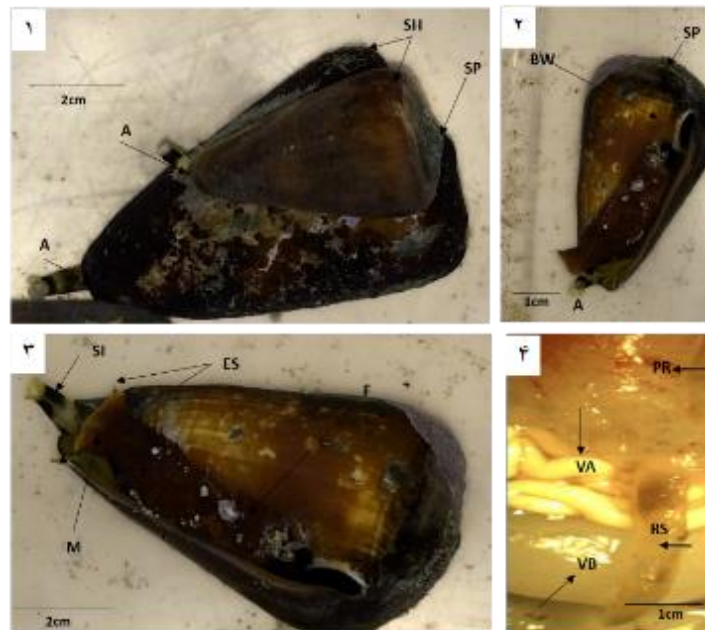
با توجه به جداول زمان بندی جزر و مدی و با توجه به اینکه این گونه ها متعلق به نواحی بین جزر و مدی هستند حلزون های مخروطی دریایی *C. frigidus* از سواحل پارک زیتون جزیره قشم (موقعیت جغرافیایی: N 26⁰55.631; E 056⁰15.209) جمع آوری شدند. نمونه ها ابتدا به کمک کلیدهای شناسایی ذیل، به صورت مورفولوژیکی شناسایی شدند.

- Sea Shells of Eastern Arabia (Bosch et al, 1995)
- Encyclopedia of marine gastropods (Robin, 2008)

دو فاکتور مورفولوژیکی مورد بررسی شامل: آناتومی صدف که خود شامل طرح، طول و شکل صدف است و آناتومی حلزون مخروطی، که شامل خرطوم، سیفون، دهان، پا و پایه چشمی است، بود. طول صدف تمامی نمونه ها با استفاده از کولیس اندازه گیری گردید. جهت مطالعه بافت شناسی کلاسیک پس از شکستن صدف توسط گیره و تشریح سریع نمونه ها روی یخ، مجرای سم آنها در کنار بخش منتهی به خرطوم جداسازی گردید. طول مجرای سمی اندازه گیری شده و سپس به سه قسمت پروگزیمال، دیستال و حباب سم تقسیم شده و در محلول بوئن به مدت ۴۸ ساعت فیکس شدند و به آزمایشگاه بافت شناسی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردیدند. نمونه ها بعد از ۴۸ ساعت از بوئن خارج و پس طی مراحل آبیگری در هیستوکینت Tissue-Tek Rotary RX-11B (ساخت ژاپن)، در نهایت در پارافین قالب گیری شدند. از قالب ها بوسیله میکروتوم Leica RM2245 (ساخت آلمان)، برش هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و بوسیله هماتوکسلین-ئوزین رنگ آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus CH2 (ساخت ژاپن)

تشکیل شده و همچنین دندانهای رادولایی که در تزریق سم به طعمه نقش دارند (شکل ۴-۱).

حلق قرار گرفته است. بخش تحویل سم نیز از یک کانال عبوری پس از بخش دیستال به سمت حلق



فتومیکروگراف شماره ۱. ریخت شناسی حلزون مخروطی *Conus frigidus*

شکل ۱-۱. اندازه های متفاوت از حلزون مخروطی در تصاویر قابل رویت است. شانه صدف به صورت مسطح و حالت مخروط نوک کوتاه یا Conical است.

شکل ۱-۲. در این تصویر نوع پیچش بدن که محدب شکل و راستگرد است دیده می شود.

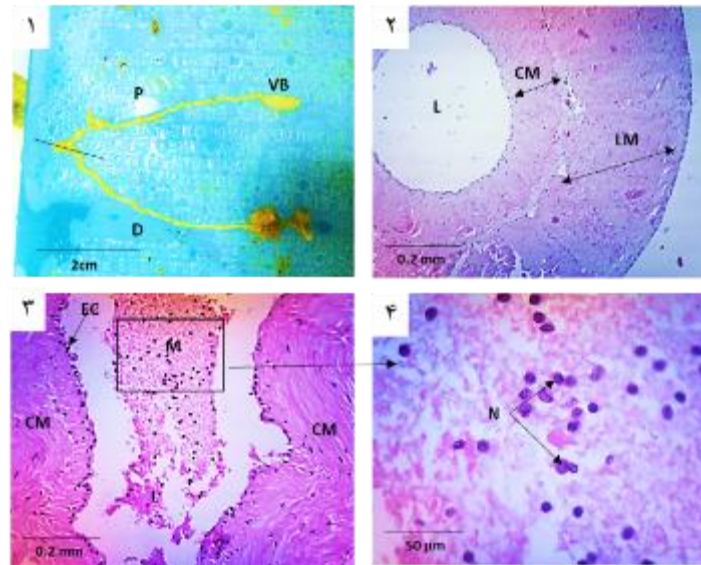
شکل ۱-۳. آناتومی حلزون مخروطی در این شکل دیده می شود که شامل سیفون به رنگ زرد و با خط مشکی در وسط، چشم ها که روی پایه های چشمی و روی دهان قرار گرفته اند و پای عضلانی بزرگ که از دهانه صدف خارج شده است.

شکل ۱-۴. ساختار مجرای سم که به ترتیب شامل حباب سم، مجرای پیچ خورده سم، کیسه رادولا که متصل به خرطوم می باشد. اختصارات به ترتیب تصاویر

دهانه مخروط (A)، حالت مخروط (SP)، شانه صدف (SH)، پیچش بدن (BW)، سیفون (SI)، دهان (M)، پا (F)، پایه چشمی (ES)، کیسه رادولا (RS)، حباب سم (VB)، مجرای سم (VB)، خرطوم (PR)

از ماهیچه های طولی تشکیل شده و ماهیچه های حلقوی و سلولهای لایه داخلی فقط قسمت کوچکی از آن را تشکیل می دهند. قطر حباب حدود ۱/۲۵ میلی متر و طول آن، ۱/۳ سانتی متر و قطر دهانه آن ۰/۳ میلی متر می باشد (شکل ۲-۲). در برش طولی از حباب سم، مایعی ترشخی در دهانه آن دیده می شود (شکل ۲-۳ و ۲-۴).

مجرای تولید سم به صورت یک لوله طویل، باریک، پیچ خورده و به رنگ زرد روشن بوده که طول تقریبی آن، در حلزونی با اندازه ۵/۴ سانتی متر، حدود ۱۵ سانتی متر است (شکل ۱-۲). حباب سم در ابتدای این مجرای طویل قرار گرفته و دارای ساختاری عضلانی و شامل ماهیچه های طولی—حلقوی است. در بخش داخلی یک ردیف سلول مکعبی با هسته های گرد تا بیضی قرار دارد. بیشتر فضای حباب سم



شکل شماره ۲. مجرای تولید سم و برش عرضی از حباب سم در حلزون مخروطی *Conus frigidus*، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین
شکل ۱-۲. تصویری از مجرای تولید سم که به سه قسمت حباب، پروگزیمال و دیستال تقسیم شده است. محدوده بین پروگزیمال و
دیستال، تقریبی است.

شکل ۲-۲. برش عرضی حباب که در آن لایه های عضلات حلقوی و طولی مشخص شده است (4X)

شکل ۲-۳. برش طولی حباب سم که در فضای دهانه مایع مترشحه از سلولهای اپیتلیالی به همراه هسته های سلولی قابل رویت است
(4X)

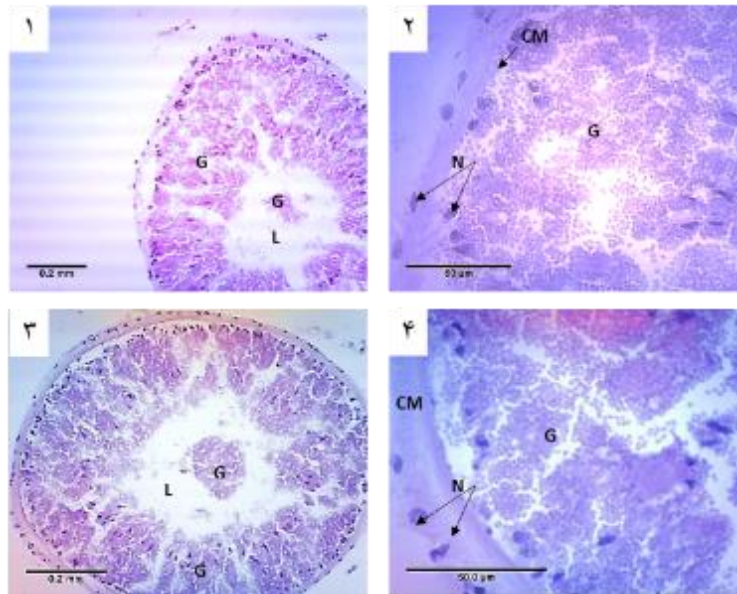
شکل ۲-۴. نمایی نزدیک از مایع مترشحه در فضای دهانه (10X).

اختصارات به ترتیب تصاویر

حباب سم (VB)، پروگزیمال (P)، دیستال (D)، دهانه (L)، ماهیچه حلقوی (LC)، ماهیچه طولی (LM)، مایع مترشحه (M)، سلولهای اپی
تلالی (EC)، هسته سلول (N)

گرانولهای کمتری هم در فضای بین سلولها و هم در
دهانه می باشد (شکل ۳-۳ و ۳-۴). از خارج به داخل
هر دو بخش از مجرای تولید سم، به ترتیب ماهیچه
های طولی، ماهیچه های حلقوی، سلولهای استوانه ای
و هسته های آنها در کنار گرانولهای سم که هم بین
سلولها و هم در فضای دهانه دیده می شوند، تشکیل
شده است. گرانول های حاوی سم که قسمت اعظم
فضای سلولهای اپیتلیالی و دهانه را تشکیل داده اند
به شکل دوکی هستند.

بخش پروگزیمال مجرای سم که در اتصال با حباب
ماهیچه ای دیده می شود دارای اندازه تقریبی ۷
سانتی متر طول حدود ۱ میلی متر قطر می باشد،
دارای یک دهانه وسیع بوده با یک لایه از سلولهای
پوششی استوانه ای با هسته های کاملا مشخص است.
گرانولهای سمی در فضای بین سلولها و دهانه قابل
رویت هستند (شکل ۳-۱ و ۳-۲) در مقایسه با بخش
پروگزیمال، بخش دیستال لوله سم که در حقیقت
بخش انتهایی مجرای تولید سم می باشد، دارای تعداد



شکل شماره ۳: تصاویری از برش های عرضی مجرای تولید سم در *C. frigidus*، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین
شکل ۳-۱. برش عرضی بخش پروگزیمال که دارای لایه های حلقوی در خارج است و سطح اپی تلیوم داخلی مملو از گرانول سم دیده می
شود (10X)

شکل ۳-۲. در نمای نزدیک از برش عرضی پروگزیمال علاوه بر گرانولها، هسته های جدا شده به فضای دهانه نیز دیده می شود (40X).
شکل ۳-۳. برش عرضی بخش دیستال که دارای لایه های حلقوی در خارج است و سطح اپی تلیوم داخلی مملو از گرانولهای سم است
(10X)

شکل ۳-۴. نمای نزدیک از برش عرضی دیستال، تعداد زیاد گرانولها و لایه عضلانی خارجی قابل رویت است (40X).
اختصارات به ترتیب تصاویر

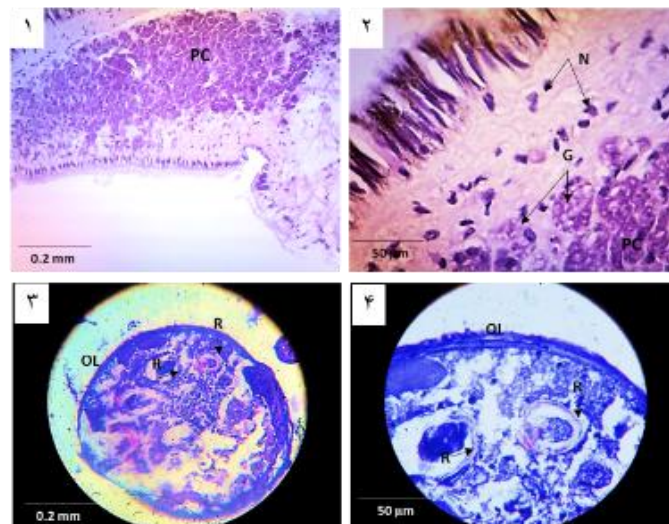
گرانول سم (G)، دهانه (L)، ماهیچه حلقوی (CM)، هسته سلول (N)

۲- بخش تحویل سم شامل کانال عبوری از مجرای
سم به دیواره حلق می باشد که مملو از گرانولهای
سمی است (شکل ۴-۱ و ۴-۲). در برش عرضی،
همچنان کیسه رادولا را به همراه دندان های رادولایی
مشاهده می کنید که دارای اندازه های متفاوتی
هستند (شکل ۴-۳ و ۴-۴).

بررسی تعداد و طول گرانولها با استفاده از نرم افزار
ImageTools 2 انجام گردید و نتایج آن در جدول ۱
نشان داده شده است. همانطور که جدول ۱ مشاهده
می شود، میانگین طول گرانول های سم در قسمت
پروگزیمال کمتر ولی تعداد آنها در مقایسه با بخش
دیستال بیشتر بوده است.

جدول ۱. میانگین تعداد و قطر گرانولها در مجرای تولید سم

بخش دیستال	بخش پروگزیمال	
$4/2 \pm 0/024$	$3/3 \pm 0/11$	اندازه گرانول ها μm
102 ± 11	162 ± 16	تعداد گرانول ها ($\text{mm}^2 \cdot 0/05$)



شکل شماره ۴: تصاویری از مجرای تحویل سم در *C. frigidus*، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین

شکل ۱-۴. برش طولی کانال مرتبط با کیسه رادولا و بخش دیستال که سطح داخلی آن سلولهای بنفش به همراه تعدادی گرانول سم دیده می شود (10X)

شکل ۲-۴. در نمای نزدیک گرانولها و سلولهای بنفش در وسط کانال قابل رویت هستند (40X).

شکل ۳-۴. برش عرضی کیسه رادولایی و حضور تعدادی دندان رادولایی در آن، که در مراحل مختلف بلوغ هستند (10X)

شکل ۴-۴. نمایی بزرگ از برش عرضی کیسه رادولا (40X).

اختصارات به ترتیب تصاویر

سلولهای بنفش (PC)، گرانول سم (G)، هسته سلول (N) دندان رادولایی (R)، لایه خارجی (OL)

۴. بحث و نتیجه گیری

حاوی گرانولهای سمی است و اتصال بین لوله سم و حلق که کانالی ایجاد نموده که مملو از گرانولهای سمی است و این کانال به کیسه رادولایی که دارای تعدادی دندان رادولایی است، ارتباط می یابد. این دندان ها پس از بلوغ و به زمان شکار یا تغذیه، به خرطوم حلزون مخروطی دریایی منتقل می شوند. حلزون مخروطی دریایی، از خرطوم لوله ای و کششی خود به عنوان کانالی جهت تحویل یک ترکیب قوی از یک سم فعال زیستی به درون شکار استفاده می کند. شکار موفق نیازمند مکانیسم بیومکانیکی و فیزیولوژیکی سریع است. وجود سم و خرطوم حلزون مخروطی دریایی را صاحب این مزیت می سازد که با سرعت بالایی شکار کند (Schulz et al, 2004). دو رویداد نقش حیاتی در این فرایند دارند، تنگ شدن دهانه نزدیک خرطوم که متشکل از سلولهای اپی تلیالی بلند متراکم با میکروفیلانمنت که مانع حرکت رو به جلو دندان رادولایی قبل تحریک آن می گردد و تنگ شدن پروگزیمال، یک اسفنگتر ماهیچه ای

حلزون های مخروطی دریایی، خانواده بزرگی از شکمپایان گوشتخوار با سموم پیچیده جهت شکار و دفاع از خود هستند. بیش از ۳۰ سال کونوپتیدها یا سموم حلزون های مخروطی دریایی با تنوع مولکولی قابل توجه خود و اختصاصی بودن برای کانال های یونی و گیرنده های عصبی، از نظر مطالعات فیزیولوژی عصبی، با ارزش هستند (Olivera et al, 1985; Terlau and Olivera, 2004; Kaas et al, 2010). به عنوان مثال MVIIA با نام کلینیکی Prialt، از *C. magus* جهت درمان درد نوروپاتیک استفاده می شود یا Xen2174 آنالوگ پپتید MrI که از *C. mamoreus* جداسازی شده، وارد فاز دوم مطالعات بالینی برای درمان درد حاد شده است (Kaas et al, 2010, Hu et al, 2011). این مقاله مشاهده گردید، آناتومی کلی مجرای سم *C. frigidus* شامل، حباب سم با ساختار عضلانی، بخش پروگزیمال و بخش دیستال که دارای اپیتلیوم و دهانه

سلولهای بسیار کوچک تر با هسته های کوچک است، استنباط می گردد که این بخش از دستگاه تولید سم خاصیت ترشحي چشم گیری در رابطه با تولید سم نداشته باشد. ولی موادی در حال ترشح از سلولهای آن دیده می شود و ممکن است همان مایعی باشد که در مطالعات گذشته به آن اشاره شده است، که نقش ایجاد فشار لازم جهت خروج سم را بر عهده دارد و فاقد گرانول های سمی است (Hinegardner, 1958; Rajabi et al, 2016). رشد لایه عضلانی در بخش حباب سم نسبت به سایر نقاط می تواند دلیل بر این موضوع باشد که سلولهای عضلانی با قدرت انقباضی خود انرژی لازم جهت خروج سم را فراهم می سازند (Salisbury et al, 2010; Rajabi et al, 2016)

Puillandre و همکاران بیان کردند که تنوع گونه های حلزون مخروطی دریایی می تواند به دلیل تکامل مکانیسم گرفتن شکار با سرعت بالا باشد (Puillandre et al, 2014, 2015). حلزون مخروطی دریایی یک دندان رادولایی را به شکار تزریق می کند و سموم از طریق حفره مرکزی توخالی دندان به شکار منتقل می شود (Franklin et al, 2007). طی این فرایند، دندان رادولایی از حفره خود در نزدیک خرطوم به درون شکار در کمتر از یک میلیمتر ثانیه خارج می شود. قبل از خروج دندان، ابتدا دندان رادولایی نیرویی علیه تنگ شدن دهانه خرطوم اعمال می کند. این تنگ شدن گرچه مربوط به اسفنگتر ماهیچه ای است که منقبض می شود تا دندان رادولا قبل از رها شدن آن، باقی بماند. انرژی مورد نیاز برای حرکت دندان به وسیله افزایش فشار ناشی از انقباض خرطوم، عضلات و در پی آن، ارسال دندان به درون شکار روی می دهد (Biggs et al, 2008; Salisbury et al, 2010).

در مطالعات گذشته مشخص شده که بخش پروگزیمال و دیستال مجرای سم از لحاظ محتوا (نوع پپتیدها و ترکیبات دارویی) و ساختار (فراساختار سلولها و شکل و اندازه گرانول ها) با یکدیگر تفاوت

کوچک که جریان سم و فشار آن را در خرطوم تنظیم می کند (Salisbury et al, 2010). مطالعات نشان داده اند که فرایند تولید سم در یک مجرای پیچ خورده اتفاق می افتد. قسمت پروگزیمال این مجرا به یک حباب عضلانی مجهز شده است و بخش دیستال در ابتدای مرز بین حلق با مری وارد حلق می شود (Endean and Duchemin, 1967; Songdahl and Lane, 1973; Marshall et al, 2002). سم عمدتاً پس از تولید در سلولهای اپی تلیالی مجرای سم، به دهانه ی مجرا رها شده و سپس از طریق رادولا به شکار تزریق می شوند. رادولاها در بازوی بلند کیسه رادولا ساخته شده و دندانهای بالغ در بازوی کوتاه ذخیره می شوند که دهانه آنها به مرز بین حلق یا مری در نزدیکی مجرای تولید سم باز می شود (Marsh, 1977; Kohn et al, 2003; Wang and Chi, 2004; Eisapour et al, 2015). در مطالعات انجام شده روی *C. tulipa* و *C. textile*، پیشنهاد شده سم در حباب تولید می شود (Bergh, 1896; Shaw, 1914)، اما در سالهای بعد طی مطالعاتی که انجام شد گفته شد که حباب سم از مایعی متفاوت از سم پر شده که این مایع فشار لازم برای خارج کردن سم از دستگاه تولید سم را تامین می کند (Hinegardner, 1958; Olivera, 1997; Rajabi et al, 2016).

در مطالعات اخیر که روی گونه های *C. novaehollandiae* و *C. victoriae* انجام شده نقش حباب سم توسط روش های بافت شناسی و پروتئو میکس بررسی شده و در قیاس با عضله های حباب سم با منتل آسکوئید نشان داده که این ترتیب قرار گیری عضله برای حرکت سریع جانور در هنگام شکار اختصاص یافته است. همچنین نتایج پروتئومیکس تحقیق مذکور نقش پمپ مانند را برای این بخش از دستگاه تولید سم تأیید کرد (Safavi-Hemami et al, 2010; Tayo et al, 2010). طبق نتایج حاصل از این تحقیق، حباب سم دارای ساختار عضلانی است. همچنین با توجه به نوع سلولهای درونی ترین لایه که متفاوت با سلولهای ترشحي مجرای سم بوده و دارای

مشخص شد که ترشح هولوکیرین محدود به بخش خاصی نبوده و در سرتاسر مجرای تولید سم وجود دارد. به نظر می رسد گرانول ها در نزدیکی هسته و در قاعده سلولها ساخته شده و در طول سلول توسط لیزوزوم های موجود در یک سلول، کل سلول به همراه گرانول های داخل آن ها به دهانه مجرا رها می شوند. به همین دلیل تعداد زیادی هسته در فضای دهانه ی مجرا مشاهده گردید. گرانولها سپس به داخل کانالی که در ارتباط با کیسه رادولایی است، تخلیه می گردند. سطح داخلی این کانال مملو از سلولهای خاص است که سلولهای بنفش یا Purple Cell نامیده می شوند. علت نامگذاری آن است که پس از رنگ آمیزی به علت حضور گرانولهای سم لا به لای آنها به این رنگ در می آیند. در این ناحیه گرانولها عبور کرده و وارد کیسه رادولایی می شوند (Marshall et al, 2002). در این مطالعه نیز حضور گرانول های سمی در بین سلولهای بنفش کانال مرتبط با کیسه رادولا مشاهده گردید. همانطور که دیده می شود تعداد گرانولها در این ناحیه نسبت به مجرای تولید سم بسیار کمتر بوده و احتمالا دلیل آن این است، تا در زمان مناسب و هنگام نیاز از مجرای سم به کانال تخلیه گردند و از طریق دندان های رادولایی به شکار تزریق شوند (Duda et al, 2001). برش عرضی کیسه رادولایی در این مطالعه نشانگر حضور دندانهای رادولایی با اندازه متفاوت بود و فقط یک دندان رادولایی بالغ مشاهده گردید. با توجه به مطالعات گذشته، در کیسه رادولا در لحظه، فقط یک رادولا به صورت بالغ و آماده برای پرتاب قرار دارند. سایر رادولاها در مراحل بعدی رشد قرار دارند که بعد از خارج شدن یک رادولا از بازوی کوتاه کیسه رادولا، یک رادولای دیگر رشد کرده و وارد بازوی کوتاه می شود تا در مرحله آخر از سم پر شده و به شکار یا مهاجم تزریق می گردد (Jakubowski et al, 2005; Franklin et al, 2007; Eisapour et al, 2015)

نتیجه گیری کلی

دارند (Edean and Duchemin, 1967; Songdahl and Lane, 1973; Marshall et al, 2002; Tayo et al, 2010) در مطالعه انجام شده بر روی گونه *magus* اعلام گردید که گرانول های بخش انتهایی درشت تر و بالغ تر از گرانول های بخش ابتدایی می باشند (Edean and Duchemin, 1967). سپس با مطالعه بر روی گونه *C. spurius atlanticus* نیز مشاهده شد که سم قسمت انتهایی مجرای سم، مایعی شیری رنگ و چسبناک، در صورتی که سم بخش ابتدایی بسیار چسبناک تر و حتی ژله مانند بود (Songdahl and Lane, 1973). همچنین در طی بررسی بر روی گونه *C. californicus* توسط میکروسکوپ الکترونی مشخص شد که بخش پروگزیمال مجرای سم دارای یک ساختار ویژه برای انتقال فعال و نه ترشح می باشد و بخش دیستال دارای ساختاری است که نشان دهنده ترشح هولوکیرین می باشد. همچنین سلولهای بخش پروگزیمال دارای میتوکندری فراوان و انتهای سلول دارای میزان زیادی میکروویلی می باشد (Marshall et al, 2002; Bingham et al, 2009). بر طبق یافته های ما، سلولهای اپیتلیالی مجرا و دهانه هر دو دارای گرانول های بسیاری هستند. بخش پروگزیمال مجرای سم، دارای گرانول های کوچک تر اما با تعداد بیشتر، ولی بخش دیستال دارای گرانول های بزرگ تر با فراوانی کمتری هستند (جدول ۱)، که به نظر می رسد بخش دیستال از نظر ترشحي فعال و دارای گرانول های بالغ تری می باشد. همچنین تعداد کمتر گرانول ها در بخش دیستال ممکن است به دلیل ترشح بیشتر و سریع تر این بخش باشد که موجب انتقال زودتر گرانول ها به دهانه می گردد و در لحظه تعداد کمتری از گرانول در سلول دیده شود. در این جانوران خروج گرانول های سم توسط روش هولوکیرین بوده و هسته های جدا شده بر اثر ترشح در هر سه بخش مجرای سم در بین سلولهای اپی تلیالی و دهانه مجرا مشاهده می شوند (Jakubowski et al, 2005). در این بررسی همچنین

5-Bosch D., Dance S. P., Moolenbeek R. and Oliver P. G. 1995. Seashells of eastern Arabia Motivate Publishing, 24-186 P.

6-Conticello S. G., Gilad Y., Avidan N., Ben-Asher E., Levy Z. and Fainzilber M. 2001. Mechanisms for evolving hypervariability: the case of conopeptides. *Molecular Biology and Evolution*. 18 (2): 120-131

7-Duda T. F., Kohn A. J. and Palumbi S. R. 2001. Origins of diverse feeding ecologies within *Conus*, a genus of venomous marine gastropods. *Biological Journal of the Linnean Society*. 73: 391-409.

8-Endean R. and Duchemin C. 1967. The Venom apparatus of *Conus magus*. *Toxicon*. 4: 275-280.

9-Eisapoor S. S., Jamili Sh., Shahbazzadeh D., Mostafavi P. Gh. and Pooshang Bagheri K. 2016. A new, high yield, rapid, and cost effective protocol to deprotection of cysteine rich conopeptide, omega-conotoxin MVIIA. *Chemical Biology and Drug Design*. 73: 391-409.

10-Eisapour M., Seyfabadi S. J. and Daghooghi B. 2015. Comparative radular morphology in some intertidal gastropods along Hormozgan Province, Iran. *Aquaculture Research and Development*. 6 (4): 2155-

11-Favreau P., Benoit E., Hocking H. G., Carlier L. and Hoedt D. D. 2012. A novel μ -conopeptide, CnIIIC, exerts potent and preferential inhibition of Na_v 1.2/1.4 channels and blocks neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *British Journal of Pharmacology*. 166: 1654-1668.

12-Franklin J. B., Fernando S. A., Chalke B.A. and Krishnan K. S. 2007. Radular morphology of *Conus* (Gastropoda: Caenogastropoda: Conidae) from India. *Molecular Research*. 27 (3): 111-122.

13-Hinegardner R. T. 1958. The Venom apparatus of the cone shell. *Hawaii Medical Journal*. 17: 533-6.

14-Howard P., OLeary B. C., Hawkins J. P., Carpenter K. E. and Roberts C. M. 2013. *Conus*: first comprehensive conservation red list assessment of a marine gastropod mollusk genus. *Plos one*. 8(12): 1-12

15-Hu H., Bandyopadhyay P. K., Olivera B. M. and Yandell M. 2011. Characterization of the *Conus bullatus* genome and its venom-duct transcriptome. *BMC Genome*. 60: 1471-2164.

16-Jakubowski J. A., Kelley W. P. and Sweedler J. V. 2005. Intraspecific variation of venom injected by fish-hunting cone snails.

تولید و تحویل سم حلزون مخروطی دریایی *frigidus* در سه مرحله انجام می گردد:

۱- سنتز که پروسه تولید و دسته بندی توکسین های پپتیدی است و در مجرای سم روی می دهد. مجرای سم، شامل بخش پروگزیمال است که به حباب منتهی می گردد و بخش دیستال که در حقیقت محل اتصال به حلق است. بخشهای پروگزیمال و دیستال کاملاً از نظر ساختار و محتوای سم با هم تفاوت دارند. با این وجود جایگاه تغییرات پس از ترجمه ای و تبدیل پپتیدها به گرانولهای سم بزرگ نامعلوم است.

۲- ذخیره سم تولیدی در دندان رادولایی و انتقال یک دندان بالغ به نوک خرطوم. دندانها از بازوی بلند ساک رادولایی منشا گرفته و دندان بالغ در بازوی کوتاه ذخیره می شود.

۳- تزریق سم، حباب سم نقش ترشحي ضعيفی دارد. حباب اغلب نیروی لازم جهت تزریق سم به خارج را فراهم می سازد و این امر با توجه به لایه عضلانی قطور آن نسبت به سایر بخش های مجرا قابل توجهی است. بنابراین به نظر می رسد بررسی مسیر تولید تا تحویل توکسین های پپتیدی توسط مطالعات بافت شناسی نیز امکان پذیر بوده و بررسی های بیشتر در این زمینه را می توان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انجام داد.

منابع

1-Bergh R. 1896. On the Anatomy of *Conus tulipa* Linn, and *Conus textile* Linn. *Journal of Cell Science*. 60: 1-60

2-Bernaldez J., López O., Licea A., Salceda E., Arellano R. O., Vega R. and Soto E. 2011. Electrophysiological characterization of a novel small peptide from the venom of *Conus californicus* that targets voltage-gated neuronal Ca^{2+} channels. *Toxicon*. 57:60-67.

3-Biggs J. S., Olivera B. M. and Kantor Y. I. 2008. α -Conopeptides specifically expressed in the salivary gland of *Conus pulicarius*. *Toxicon*. 52: 101-105

4-Bingham J. P., Mitsunaga E. and Bergeron Z. L. 2009. Drugs from slugs—past, present and future perspectives of ω -conotoxin research. *Chemico Biological Interaction*. 183:118.

- 28-Rajabi H., Zolgharnen H., Ronagh M. T., Savari A. and Ranjbar M. Sh. 2016. Histological study of the venom production organ in *Conus coronatus* and *Conus frigidus*. International Journal of Fisheries and Aquatic Study. 4(1): 370-372
- 29-Safavi-Hemami H., Young N. D. and Williamson N. A. 2010. Proteomic interrogation of venom delivery in marine cone snails, novel insights into the role of the venom bulb. Journal of Proteome Research. 9: 5610-9.
- 30-Salisbury S. M., Martin G. G., Kier W. M. and Schulz J. R. 2010. Venom kinematics during prey capture in conus: the biomechanics of a rapid injection system. Journal of Experimental Biology. 213: 673-682
- 31-Schulz J. R., G. Norton A. G. and Gilly W. F. 2004. The Projectile Tooth of a Fish-Hunting Cone Snail: *Conus catus* Injects Venom Into Fish Prey Using a High-Speed Ballistic Mechanism. Biology Bulletin. 207: 77-79.
- 32-Songdahl J. H. and Lane C. E. 1973. Some pharmacological characteristics of the venom of the alphabet cone, *Conus Spurius Atlanticus*. Toxicon 8: 289-92.
- 33-Terlau H. and Olivera B. M. 2004. *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. Physiological Review. 84(1): 41-68.
- 34-Tayo L. L., Lu B., Cruz L. J. and J. R. Yates. 2010. Proteomic Analysis Provides Insights on Venom Processing in *Conus textile*. Journal Proteome Research. 9(5): 2292-2301.
- 35-Walker C. S., Steel D., Jacobsen R. B., Lirazan M.B., Cruz L. J., Hooper D., Shetty R., Delacruz R. C., Nielsen J. S., Ming Zhou L., Bandyopadhyay P., Craig A.G. and Olivera B. M. 1999. The T-superfamily of conotoxins. Journal Biological Chemistry. 274: 30664-30671
- 36-Wang C. Z. and Chi C. W. 2004. *Conus* peptides a rich pharmaceutical treasure. Acta Biochimica Biophysica Sinica. 36(11): 713-723.
- 37-Wu X., Shao X., Guo Z. Y. and Chi C.W. 2010. Identification of neuropeptide Y-like conopeptides from the venom of *Conus betulinus*. Acta Biochimica Biophysica Sinica. 42: 502-505.
- Histological study of Peptide toxins manufacture and delivery apparatus of marine cone snail (*Conus frigidus*, Reeve 1848) Journal of Experimental Biology. 208: 2873-83.
- 17-Kaas Q., Westermann J. and Craik D. J. 2010. Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. Toxicon. 55(8): 1491-1509.
- 18-Kohn A. J., Wells F. E. and Walker D.I. 2003. Biology of *Conus* on shores of the Dampier Archipelago, Northwestern Australia. The Marine Flora and Fauna of Dampier, Western Australia. Western Australian Museum, Perth 1: 90-100.
- 19-Marsh H. 1997. The Radular apparatus of *Conus*. Journal of Molluscan Study. 43: 1-11.
- 20-Marshall J., Kelley W. P., Rubakhin S. S., Bingham J. P. and Sweedler J. V. 2002. Anatomical correlates of venom production in *Conus californicus*. The Biological Bulletin. 203: 27-41.
- 21-Moller C., Vanderweit N. and Mari F. 2013. Comparative analysis of proteases in the injected and dissected venom of cone snail species Toxicon. 65: 59-67.
- 22-Olivera B. M., Gray W. R., McIntosh J. M., Varga J., Santos V. and Cruz L. J. 1985. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. Science. 230: 1338-1343.
- 23-Olivera B. M. 1997. *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 Million Years of Neuropharmacology Molecular Biology of the Cell. 8: 2101-2109.
- 24-Robin, A. 2008. Encyclopedia of marine gastropods, Ed. IKAN Unterwasser-Archive, ConchBooks, 480 P.
- 25-Pillandre N., Bouchet P., Duda T. F., Kaufenstein S., Kohn A., Olivera B. M., Watkins M. and Meyer C. 2014. Molecular phylogeny and evolution of the cone snails. Molecular Phylogeny and Evolution. 78: 290-303.
- 26-Pillandre N., Duda T. F., Meyer C., Olivera B. M. and Bouchet P. 2015. One, four or 100 genera? A new classification of the cone snails. Molluscan Study. 81: 1-23
- 27-Rajabi H. and Khodabandeh S. 2012. Investigation of the osmoregulation ability in different sizes of +2 Caspian trout (*Salmo trutta caspius*), with the same age, in direct transfer from fresh water to the Caspian Sea water. Journal Agriculture Science and Technology. 15: 279-292

Histological study of Peptide toxins manufacture and delivery apparatus of marine cone snail (*Conus frigidus*)

Halimeh Rajabi^{*1}, Hossein Zolgharnen², Ahmad Savari², Alireza Amouzandeh³, Nabi Jomehzadeh¹

1. Abadan School of Medical Sciences, Abadan, Iran
2. Department of Marine Biology. Faculty of Marine Sciences and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology. Khorramshahr, Iran.
3. Associate Professor in Medical Microbiology. Abadan School of Medical Sciences, Abadan, Iran

Abstract

In this paper, the venom apparatus of the marine cone snail *C. frigidus* that is peptide toxins manufacture section with pharmacological effect have been studied. The venom apparatus of about 6 specimens were removed and divided to 3 parts: The venom bulb, the proximal portions of the venom apparatus (close to venom bulb), the distal portions of the venom apparatus (close to pharynx). Then were fixed in Bouin's for 48 hours and transferred to 70% ethanol. After dehydration and Paraffin embedded, they were cut by microtome, collected on glass slides, stained with Haematoxylin-Eosin and studied by light microscope. The results showed that the venom bulb has longitudinal, transversal muscles, and a row of cubic cells with round nuclei. The proximal and the distal parts are composed of elongated cylindrical cells with the basal ganglia. The epithelial cells of the venom apparatus have abundant granules and in the distal part that are larger than the proximal. The passageway between the lumen of the venom duct and the pharynx is a channel that lead to the radula bag containing radula with different degrees of a formation. So, *C. frigidus* venom production and delivery was performed by synthesis in the venom apparatus, storage toxin in the radula teeth and the venom injection is done by the venom bulb and the best section for toxin peptide extraction is the distal portion of the venom apparatus. The reason is that this part, is active in the secretion of mature toxins that can use for Medicinal purposes.

Key words: Venom apparatus, Granule, Radula, *Conus frigidus*

Table of contents

Photomicrograph No. 1: Morphology of *Conus frigidus*.

Photomicrograph No. 2: Venom apparatus and a cross-section of bubbles of *Conus frigidus*, stained with hematoxylin-eosin.

Photomicrograph No. 3: Cross sections of venom apparatus in *C. frigidus*, hematoxylin and eosin staining.

Photomicrograph No. 4: Images of venom delivery in *C. frigidus*, hematoxylin and eosin staining.

Table NO. 1: The mean number and diameter of the granules in the venom apparatus 9

*Corresponding author, E-mail: halimeh.rajabi@gmail.com