



توکسینولوژی سرپایان: یک مقاله مروری

غلامحسین محبی (phD)^{*}، عمار مریم آبادی (phD)^{**}

^۱ مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۳/۱۰ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۵/۱۳)

چکیده

اغلب سرپایان موجودات زهرآگینی هستند که عمده ترین ترکیبات یافت شده در زهر آن‌ها شامل توکسین‌های پروتئینی، مولکول‌های کوچک زهری، آنزیم‌ها و آمین‌ها می‌باشد. سفالوتوکسین‌های نورو توکسیک، توکسین‌های پروتئینی هستند که نخستین بار از این گروه استخراج گردیده‌اند. آن‌ها به SE- سفالوتوکسین، آلفا- سفالوتوکسین و بتا- سفالوتوکسین تقسیم‌بندی می‌شوند. ترکیب SE- سفالوتوکسین، حدود هزار بار از دیگر اعضای خانواده زهری تر است. در میان مولکول‌های کوچک زهری، می‌توان به تترودوتوکسین و تاکی کینین‌ها اشاره نمود. تاکی کینین‌های بزاق سرپایان، می‌توانند موجب افت شدید فشار خون و انقباض عضلات گوارشی در مهره‌داران گردند. مشتقات پپتیدی تاکی کینین‌های موجود در مغز سرپایان، اثرات سمیت بیشتری نسبت به تاکی کینین‌های ساده دارند. کیتینازها، فسفولیپازها و استیل کولین استراز از مهم ترین اجزاء جدایی ناپذیر ونوم‌های سرپایان هستند. فسفولیپاز A2، در متابولیسم چربی‌ها، در پیشرفت برخی بیماری‌ها و ایجاد اثرات نورو توکسیک و میو توکسیک زهر نقش بسزایی دارد. استیل کولین استراز، موجب مهار تحریک گیرنده‌های موسکارینی می‌گردد. علاوه بر اپی نفرین، نوراپی نفرین، دوپامین، سروتونین و هیستامین، یکی از آمین‌هایی که با غلظت زیاد در غده بزاقی اختاپوس‌ها یافت گردیده، اکتاپامین است. مرکب‌های بسیاری از گونه‌های سرپایان حاوی مقادیر قابل توجهی از ملانین است که علاوه بر کاربردهای بیوتکنولوژی، دارای اثرات ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضدسرطانی می‌باشند. گویچه‌های نامحلول سامانه پیچیده پوستی سرپایان، حاوی پروتئین‌هایی به نام رفلکتین هستند که مسئول ایجاد طیف گسترده‌ای از رنگ‌ها در آن‌ها است. رفلکتین‌ها به صورت اختصاصی تنها در سرپایان یافت شده‌اند. در واقع، مطالعات موجود توکسینولوژی و بیوتکنولوژی زهر این زیست‌مندان دریایی متناسب با تنوع و نیز ترکیبات منحصر بفرد آن‌ها نمی‌باشد و برای موفقیت در این حوزه، می‌بایست تلاش‌های بیشتری انجام گردد.

واژگان کلیدی: سرپایان، سفالوتوکسین‌ها، تترادوتوکسین، اکتاپامین، ملانین، رفلکتین

^{**}بوشهر، مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

Email: ammar@pgu.ac.ir

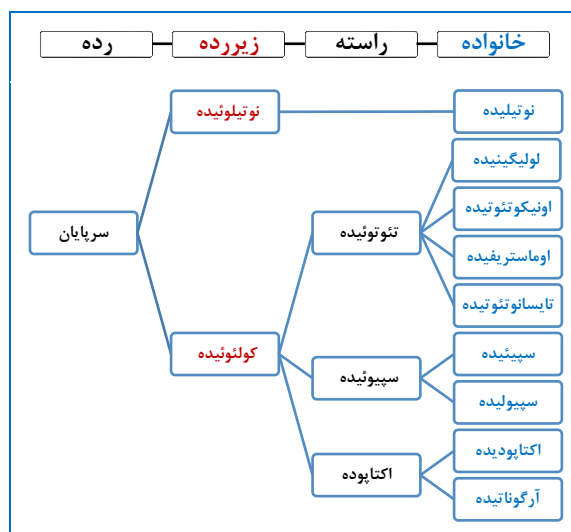
*ORCID: 0000-0003-3393-702X

**ORCID: 0000-0002-0427-0978

مقدمه

سرپایان^۱، گروه مهمی از نرم‌تنان و تکامل یافته‌ترین آن‌ها هستند (۱). پیدایش سرپایان به دوران کامبرین برمی‌گردد و از آن زمان، همانند دیگر نرم‌تنان، پهنه سازگاری خود را با اشغال کنج‌های مناطق مختلفی از آب‌های ساحلی، خورها، دریا‌های کم‌عمق و اقیانوس‌ها، گسترده ساختند (۲). به عقیده برخی از محققان، راسته‌های مختلفی از این نرم‌تنان، در گذشته‌های دور، منقرض شده‌اند و خاستگاه زمانی سرپایان کنونی، به دوره سیلورین بر می‌گردد (۳). رده سرپایان که نام خود را مدیون اتصال پاهای تغییر شکل یافته متعدد در اطراف سر هستند، دارای سه زیررده

نوتیلوئیده^۲، آمونیت^۳ و کولئوئیده^۴ می‌باشند (۴). حیات زیررده آمونیت در برهه زمانی دوورین تا کرتاسه بوده است و وجود آن‌ها تنها توسط فسیل‌های به‌دست آمده از آن دوره به اثبات رسیده‌است. در حال حاضر، از زیررده نوتیلوئیده، تنها شش گونه باقی مانده است که تمامی آن‌ها متعلق به جنس ناتیلوس^۵ بوده و اغلب در آب‌های اقیانوس‌های هند و آرام یافت می‌شوند (۵). امروزه اغلب سرپایان موجود به زیررده کولئوئیده تعلق دارند و به چهار راسته دسته‌بندی می‌شوند. از این چهار راسته، بلمنئوئیده^۶ در اواسط دوران سنوزوئیک منقرض شدند؛ در حالی که راسته‌های سپیوئیدا^۷، تئوتوئیده^۸ و اکتاپودا^۹، امروزه در قلمرویی به پهنای جهان گسترش یافته‌اند (شکل ۱) (۶).



شکل ۱) دسته‌بندی سرپایان بر اساس رده، زیر رده، راسته و خانواده آن‌ها (۶).

Fig 1) Classification of cephalopods based on their class, sub-class, order, and family (6).

- 1 Cephalopods
- 2 Nautiloidea
- 3 Ammonitae
- 4 Coleoidea
- 5 Nautilus
- 6 Belemnoidae
- 7 Sepioidae
- 8 Teuthoidea
- 9 Octopoda

برخی از ویژگی‌های آناتومیکی نوتیلوئیده، کولئوئیده و اکتاپوده

اعضای زیررده نوتیلوئیده مانند ناتیلوس پومپیلوس^{۱۰}، دارای صدف تکامل یافته خارجی، بیش از ده (۶۳ تا ۹۴ عدد) بازوی پیرامونی و دو جفت آبشش می‌باشند (شکل ۲- الف). آن‌ها فاقد غده مرکب‌ساز بوده و بازوهای پیرامونی در آن‌ها بصورت دو حلقه در اطراف دهان قرار گرفته و فاقد بادکش می‌باشند (۷). این زیررده شامل یک خانواده، یک جنس و شش گونه است که تمام آن‌ها دارای چشم‌های ساده و فاقد عدسی بوده و قسمت سر آن‌ها صلب می‌باشد تا هنگام دفاع و ورود سریع به صدف خود، همچون یک سپر از آن‌ها مراقبت نماید (۸). صدف در این خانواده، قطور و سنگین بوده و با کمک تعدادی اتاقک هوا شناور می‌ماند (۹). جانور در حین رشد به جلو می‌خزد و اتاقک جدیدی در پشت سر خود ایجاد می‌نماید و خود در بیرونی‌ترین اتاقک زندگی می‌کند. این اتاقک‌ها با دیواره‌های عرضی در صدف بوجود آمده و درون آن‌ها توسط گاز نیتروژن پر می‌شود که وجود همین گاز به مقاومت صدف در برابر فشار خارجی، شناور ماندن و شنای آن‌ها کمک بسزایی می‌نماید (۱۰).

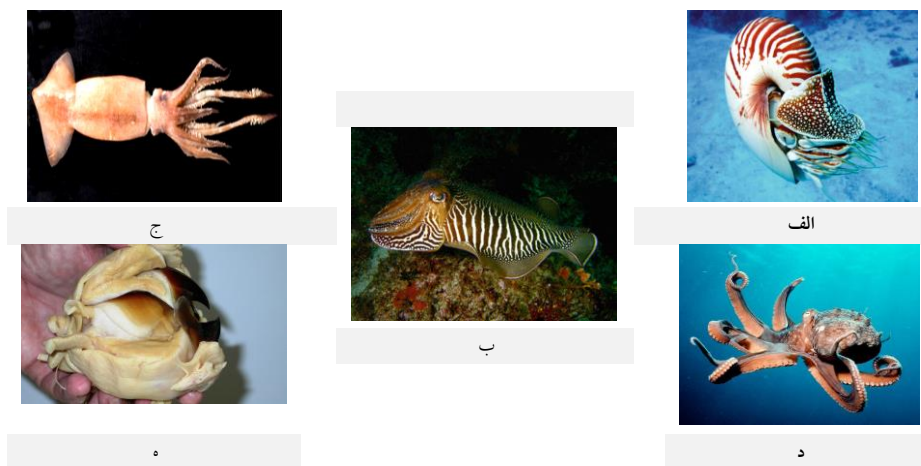
آنچه زیررده کولئوئیده را متمایز می‌نماید، وجود صدف داخلی از جنس کیتین، آهک و یا غضروف است (۱۱). آن‌ها، هشت یا ده بازوی مکنده و تنها یک جفت آبشش دارند. این جانوران، دارای یک کیسه مرکب هستند که به راست روده باز می‌شود. یک غده مرکب ساز، ماده سیاه‌رنگی را به درون این کیسه ترشح می‌کند. هنگامی که جانور احساس خطر کند، این مرکب سیاه از کیسه آزاد می‌شود و ابری غلیظ در اطراف جانور به وجود

می‌آورد که به جانور اجازه فرار از شرایط موجود را می‌دهد (۱۲). این ویژگی‌ها در تمام راسته‌های این زیررده مشترک است. ویژگی ظاهری راسته سپیوئیده نظیر کاتل فیش‌ها، یک بدن بیضوی است که به سمت عقب باریک‌تر می‌شود (شکل ۲- ب). همچنین دو باله باریک در امتداد دو طرف بدن آن‌ها امتداد دارد که در قسمت انتهایی بدن آزاد می‌باشند و بر روی هر بازوی خود دارای دو تا چهار ردیف مکنده هستند. صدف آن‌ها بیضی شکل بوده و در زیر پوست قرار دارد. صدف در راسته سپیوئیده، به‌طور معمول از جنس آهک است (۱۳). راسته تئوتوئیده، در برگیرنده اسکویدها می‌باشد (شکل ۲- ج). این راسته، دارای صدف کیتینی کوچک میله‌ای شکل یا پر مانند است. علاوه بر هشت بازوی منعطف، دو بازوی دیگر به نام تانتاکل دارند که بلندتر از بقیه بوده و حرکت آن‌ها فقط انقباضی است. همچنین آن‌ها دارای باله در امتداد طولی جبهه بوده که تا انتهای آن ادامه دارد. مکنده‌های روی بازوها می‌توانند دارای یک قلاب کیتینی یا فاقد آن‌ها باشند. چشم‌های آن‌ها نیز می‌توانند دارای پوشش یا بدون آن باشند ولی در هر صورت فاقد پلک هستند (۱۴). راسته اختاپوس‌ها با هشت بازو که هر کدام یک تا دو ردیف مکنده دارند قابل شناسایی هستند. این مکنده‌ها ساکن و بدون حاشیه شاخی هستند (۱۵). صدف داخلی در آن‌ها به میزان زیادی تحلیل رفته و در صورت وجود به صورت دو میله باریک وجود خواهد داشت (۱۶). شکل بدن آن‌ها کروی بوده و می‌توانند در بین پاهای خود دارای پرده باشند (شکل ۲- د). تمام سرپایان بجز اعضای زیررده نوتیلوئیده، دارای غدد و کیسه‌های مرکب هستند. تولید مرکب در سرپایان بسیار جوان نیز دیده می‌شود (۱۷).

¹⁰ *Nautilus pompilius*

پژوهشگران بر روی شناسایی روابط شکار- شکارچی، از روی شکل و اندازه نوک بجا مانده در بدن شکارچیان نظیر وال، فوک و ماهی‌ها، می‌توانند گونه سرپای مورد علاقه هر شکارچی را شناسایی نمایند (۱۹).

بسیاری از سرپایان، دارای نوکی شبیه به منقار طوطی هستند (شکل ۲-ه)، که طعمه خود را با آن گاز گرفته و زهری را که در غدد بزاقی خود تولید می‌کنند از طریق زخم ایجاد شده به بدن طعمه وارد می‌کنند (۱۸).



شکل ۲) تصاویر برخی از سفالوپودها. الف: یک ناتیلوس پومپیلوس با صدف خارجی به‌عنوان یک ویژگی اصلی؛ ب: تصویر یک کاتال‌فیش معمولی سپیا آفیسینالیس^{۱۱}؛ ج: یک اسکوبد ایلکس کویندتیی^{۱۲}؛ د: تصویری از یک اختاپوس اوکتوپوس ولگاریس^{۱۳} و ه: نوک منقار مانند آن.

Fig 2) Images of some cephalopods. A: A *Nautilus pompilius* with outer shell as a main feature; B: Image of a common cuttlefish *Sepia officinalis*; C: An *Illex coindetii* squid; D: Image of an octopus *Octopus vulgaris*, and E: its beak-like tip.

زهر سفالوپودها

توکسین‌های پروتئینی به‌دست آمده از سرپایان بسیار اندک می‌باشد. بطور مثال، در پایگاه یونیپروت^{۱۴} که توکسین‌ها را بر اساس منشاء ارگانیسم آن‌ها طبقه‌بندی می‌کند، تنها یک مورد در این خصوص ثبت گردیده است (۲۱). این عدد برای یک گروه که شامل حدود ۸۰۰ گونه می‌شود بسیار اندک است. برای مقایسه و درک بهتر این موضوع، می‌توان به گروه شکم‌پایان اشاره نمود که تعداد ۱۰۲۲ ترکیب زهری پروتئینی به نام آن‌ها ثبت شده است (۲۲).

سرپایان، شکارچیان و شناگران خوبی هستند و از ابزارهای مختلفی نظیر توانایی ویژه در استتار، تغییر رنگ بسیار فوری و تولید مرکب، استفاده می‌برند. حضور این ویژگی‌ها می‌تواند موجب این تفکر گردد که آن‌ها دارای انواع زیادی ترکیبات زهری در ونوم و بافت‌های خود هستند (۲۰). تعداد مطالعات توکسینولوژی انجام شده بر روی سرپایان محدود است و در اغلب آن‌ها به مطالعه بر روی توکسین‌های پروتئینی پرداخته شده‌اند. برخلاف انتظار، تعداد

¹¹ *Sepia officinalis*

¹² *Illex coindetii*

¹³ *Octopus vulgaris*

¹⁴ UniProt

سفالتوکسین‌ها

شناخته شده‌ترین ترکیب زهری استخراج شده از سرپایان، سفالتوکسین نامگذاری شده است (۲۳). سفالتوکسین، یک نوروتوکسین است که موجب فلج طعمه‌های کوچک مانند خرچنگ‌ها و شاه‌میگوها می‌شود. اثر این توکسین‌ها، به تنهایی بر روی انسان مطالعه نشده است اما گمان می‌رود که موجب بی‌حسی موضعی گردد (۲۴). واژه سفالتوکسین، اولین بار در سال ۱۹۵۹ توسط گیرتی (Ghiretti)، برای توصیف یک پروتئین جداسازی شده از ترشحات غده بزاقی ساپیا آفیسینالیس مورد استفاده قرار گرفت. این ترکیب پروتئینی در سال‌های بعد توسط پژوهشگران مختلفی از دیگر اعضای خانواده سرپایان نظیر اکتاپوس ولگاریس، الدون سیرهوسا^{۱۵} و انترکتوپوس دوفلینی^{۱۶} استخراج گردید (۲۵). گرچه این ترکیبات استخراج شده در مطالعات پیشگام، همگی عنوان سفالتوکسین به خود گرفتند؛ لکن، هیچ کدام از این پروتئین‌ها از طریق توالی‌یابی و یا مطالعه ساختار مولکولی مورد بررسی قرار نگرفتند (۲۶ و ۲۷). در سال ۱۹۷۴، سونگدال (Songdahl) متوجه تفاوت وزن پروتئین استخراج شده ۲۳ کیلودالتونی توسط وی با نمونه استخراج شده توسط کوتزل^{۱۷} (۷۰-۳۰ kDa) گردید و پیشنهاد نمود که سفالتوکسین‌ها دارای انواع مختلفی بوده و باید به‌عنوان یک خانواده در نظر گرفته شوند (۲۴).

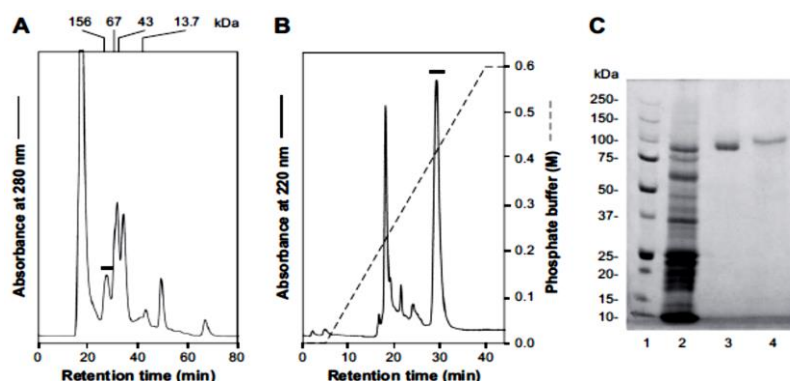
اس ای - سفالتوکسین

یودا (Ueda) و همکاران، برای نخستین بار پروتئین استخراج شده از سپیا اسکولنتا^{۱۸} را که اثرات

نوروتوکسیک داشت، مورد مطالعه توالی‌یابی قرار دادند و نام SE-سفالتوکسین را بر روی آن نهادند. ترکیب SE-سفالتوکسین، دارای ۱۰۵۲ آمینواسید بود که یک توکسین پروتئینی بزرگ تلقی می‌گردد (۲۸). همانند دیگر توکسین‌های پروتئینی، SE-سفالتوکسین نیز دارای پپتید سیگنال، پروپتید و چند ناحیه غنی از سیستئین است (۲۹). با توجه به مشاهدات کاریلو (Cariello)، در مورد ویژگی‌های توکسین استخراج شده از اکتاپوس ولگاریس، به نظر می‌رسد که توکسین به‌دست آمده توسط آن‌ها با SE-سفالتوکسین هم‌خانواده باشد (۳۰).

با توجه به قابلیت حلالیت زیاد پروتئین‌هایی نظیر SE-سفالتوکسین در حلال‌های حاوی نمک، یودا و همکاران، از این خصوصیت بهره برده و با کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و تغییر متوالی میزان نمک موجود در فاز متحرک، ترکیبات عصاره استخراج شده از غدد بزاقی، SE-سفالتوکسین را جداسازی نمودند (شکل ۳) (۲۸). برای این کار، ابتدا شویش‌های خروجی از ستون فیلتراسیون ژلی دستگاه (جداسازی ترکیبات بر اساس وزن مولکولی)، در فواصل زمانی مشخص جمع‌آوری و نمونه حاوی جزء مورد نظر به ستون دیگری از جنس هیدروکسی آپاتیت تزریق گردید تا ترکیب مورد نظر از دیگر مواد، جداسازی و جمع‌آوری گردد. سپس جهت خالص‌سازی نهایی و تعیین وزن مولکولی از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد. این توکسین، پس از کلون کردن محصول SDS-PAGE، توالی‌یابی گردید.

¹⁵ *Eledone cirrhosa*¹⁶ *Enteroctopus doffeini*¹⁷ Cottrell¹⁸ *Sepia esculenta*



شکل ۳) مراحل خالص سازی SE-سفالوتوکسین از غدد بزاقی سپیا اسکولنتا. (A) کروماتوگرام حاصل از فیلتراسیون ژلی که پیک مربوط به جزء مورد نظر توسط یک خط سیاه کوتاه بر بالای آن مشخص شده است؛ (B) کروماتوگرام حاصل از ستون هیدروکسی آپاتیت که پیک مشخص در بخش A را مجدداً مورد جداسازی قرار داده است. در اینجا نیز ترکیب مورد نظر توسط یک خط سیاه کوتاه بر بالای آن مشخص شده است؛ (C) نتایج SDS-PAGE، برای حالت غیرکاهش یافته (ستون های ۱ تا ۳) و کاهش یافته (ستون ۴)؛ ستون ۱: پروتئین های مرجع، ستون ۲: عصاره غدد بزاقی و ستون های ۳ و ۴: SE-سفالوتوکسین.

Fig 3) Purification stages of SE-cephalotoxin from the *Sepia esculenta* salivary gland. (A) A chromatogram of gel filtration that the peak of the component is indicated by a short black bar; B) The chromatogram obtained from the hydroxyapatite column is purified again by the specified peak in section A. Similarly, the composition is indicated by a short bar; C) Results of the SDS-PAGE under non-reduced (lanes 1–3), or reduced condition (lane 4); Lane 1: reference proteins; Lane 2: salivary gland extract; and lanes 3 and 4: the purified SE-cephalotoxin.

سفالوتوکسین های استخراج شده از الدون سیرهوسا، انتروکتوپوس دوفلینیا و اوکتوپوس ولگاریس در برابر خرچنگ مشخص گردید (جدول ۱). مقایسه α - و β -سفالوتوکسین های اوکتوپوس ولگاریس با اجزای فعال جدا شده از سایر سفالوپودها، اثر فلج کنندگی شدیدی را بر خرچنگ ها نشان داد (۳۰).

این کار برای سرپایان دیگری چون الدون سیرهوسا و انتروکتوپوس دوفلینیا و اوکتوپوس ولگاریس انجام شد و ترکیباتی به عنوان سفالوتوکسین از آنها حاصل گردید (۳۱). اوکتوپوس ولگاریس، دارای دو نوع سفالوتوکسین بود که تحت عناوین آلفا-سفالوتوکسین (۹۱/۲ kDa) و بتا-سفالوتوکسین (۳۳/۹ kDa) شناخته شدند (۳۲). در یک مطالعه مقایسه ای، نتایج توانایی کشندگی

جدول ۱) مقایسه دوز کشنده و برخی خصوصیات سفالوتوکسین های استخراجی از سرپایان مختلف الدون سیرهوسا، انتروکتوپوس دوفلینیا و اوکتوپوس ولگاریس در برابر خرچنگ (۳۰)					
ویژگی	SE-سفالوتوکسین	الدون سیرهوسا	انتروکتوپوس دوفلینیا	اوکتوپوس ولگاریس	
				آلفا-سفالوتوکسین	بتا-سفالوتوکسین
دوز کشنده (میکروگرم در هر خرچنگ °)	۲ (میکروگرم بر کیلوگرم °)	۱۶۰	۲	۱۵۰	۴۷۰
جرم مولکولی (kDa)	۱۰۰	۷۰ تا ۳۰	۲۲/۱۵	۹۱/۲	۳۳/۹
نقطه ایزوالکتریک	۹/۰۸	بازی	۵/۲ تا ۵/۳	۵/۱ تا ۴/۵	۲/۵ تا ۱/۸
گلیکوپروتئین	بله	نامشخص	خیر	بله	بله
* $\mu\text{g/crab}$; ** $\mu\text{g/kg}$					

ساختار گلیکوپروتئینی با حدود ۵۰ درصد کربوهیدرات هستند (۳۰). ماهیت اسیدی آنها با نقطه ایزوالکتریک

بر اساس جدول ۱)، وزن مولکولی SE-سفالوتوکسین نزدیک به آلفا-سفالوتوکسین بوده و هر دو دارای

می‌باشد (۳۳ و ۳۴). توالی آمینواسیدهای SE-سفالوتوکسین در شکل (۴) آورده شده است.

و با آنالیز اسید آمینه نشان داده شده است. نقطه ایزوالکتریک SE-سفالوتوکسین بیشتر شبیه توکسین به‌دست آمده از *E. cirrhosa* می‌باشد. علاوه بر این، SE-سفالوتوکسین در حدود هزار بار کشنده‌تر از توکسین‌های اختاپوس‌های موجود در این مطالعه

0 MMGTSRCVIL LFALLLWAAN AAPPEIHTTR NVPEEIKRP NSTEITPAV KQLETSPSIFL
60 LTTLEVAEAD VDSLTETMKD RNKKNSAKLS KIGNNMKSL SSVSVGGFL SLLSVVTTS
120 DLQVISDMFT GVNRLDQIN DKLDKLDNSV ELQGLLTNYI PWQSVKNGI EKLIETYKKM
180 VEETDMNKRRL LMAENFILFF ENNQIESNIN NLIKLTITTD AVHQNMLFNE LLDEAGCDII
240 RLTRIYMHVR RIFYQGTQLV LAYNSFKQMD PPEMKKYLA LIFIRNMYQS RVWHCKETTI
300 AQSKKDIKDI VKTNAKFGIT TVLRKINSEL SRKYPWYSWS IVTVKKMLAN QRNSTLGNQF
360 YEMEAVGPHG SNFVVIWQGF KEHSQCEDIQ KANTIAVLT ICKSCHQSHVF TPSNMLNKNT
420 CPNNQYPQVK AFIDRREPFR DEIQRKSDV FWVAAGFKAP GNPCNHGNG HGECKVVPYT
480 DQFQCFCHGN YEGKMCQKKI QMKRDISKLI SDLQTYKNA FNVPSLTNII IQGENLAKQL
540 KKMIRIDNQ FELTHILVKY ISDLQKLDYI LKISFNYSKK KITVDAFSRR MKAFLSLNPV
600 DFIFQQLSNA ILAEGFTDIQ GKDFNTFKR MIASNRDACT APYGNEATIL LERLSRLDLT
660 AAESILAYYS FESNYLNP MKRMLENAKQ LVRDSKRRMR SYARYWERTS CPPLNVTHLT
720 QTGCGALLSF EGMKVKLSCD GGRAAVPQNI ECVNVNGNLQ WSATPKCESS WSRWSKWSAC
780 ASTCGNATQS RRRRLCGQSE SEKICGPSKQ VRKCFVEDCC QEKYGFKCD NNKCISLSRV
840 CDGNDDCRNA EDESKSRCKY LRSGDRIALR NMAYSQEWLS VQYTDVQAD LYYGRAYLNH
900 CIKGHDVTSS EWNSCAGQSL LIYGNYENGK IGKAIRFGDK IAMYYRKTNY HYRWFICYPT
960 YCMTYTCPKK AGSFTFGPNG GCDEYEFYII NYNDKLSRDP VKPGDVITLA NNRGSVKGNG
1020 YNRNININDC TVKRAQDDRI ECNANAWQIF IK

شکل (۴) توالی آمینواسیدهای SE-سفالوتوکسین (۲۸).

Fig 4) the amino acids sequence of SE-cephalotoxin (28).

ماکولوتوکسین

در یک مطالعه در سال ۱۹۷۰، نشان داده شد که ونوم غدد بزاقی خلفی هشت‌پای حلقوی آبی ماکولوسوس هوپلی (هپالوکلائنا)^{۱۹}، حاوی یک نوروپروتوکسین است که از نظر فارماکولوژیکی بسیار شبیه تترودوتوکسین و ساکسی‌توکسین است.

این توکسین که "ماکولوتوکسین"^{۲۰} نامیده شد، موجب کاهش فشار خون، برادیکاردی و فلج تنفسی در خرگوش‌ها و موش‌های صحرایی گردید. نشان داده شد که افت فشار خون را می‌توان موقتاً با ال-اپی نفرین یا ال-نوراپی نفرین، معکوس کرد. شواهدی ارائه گردید که نشان می‌داد نارسایی تنفسی پس از تزریق وریدی به دلیل مهار آکسون‌های نرون‌های عضلانی است. این

توکسین مانع از انتقال در عصب سیاتیک وزغ و موش صحرایی می‌شود و به نظر می‌رسد که در دوزهای پایین دارای فعالیت انسداد عصبی عضلانی باشد. در دوزهای بالاتر، غشای عضلانی نیز غیرقابل تهییج می‌گردد ولی تأثیر قابل توجهی روی انقباض ناشی از استیل‌کولین دیافراگم موش صحرایی عصب‌کشی شده مزمن، راست روده وزغ یا ایلئوم کوچک هندی دیده نمی‌شود. حیوانات را می‌توان پس از یک دوز کشنده مرزی^{۲۱}، به شرطی که قبل از تشدید هیپوکسی ایجاد گردد؛ تنها با تهویه مصنوعی احیاء نمود (۳۵).

در مطالعات متعددی بیان گردیدند که مؤلفه سمی، گزارش گردیده توسط فریمن و ترنر (Freeman & Turner) (۳۵)، یعنی "ماکولوتوکسین"،

¹⁹ (*Hapalochlaena*) *maculosus* Hoyle

²⁰ Maculotoxin

²¹ Marginal lethal dose

ممکن است شامل یک یا دو توکسین با عملکرد فارماکولوژیکی مشابه با تترودوتوکسین و ساکسی توکسین باشد (۳۶-۳۹). ماکولوتوکسین به راحتی توسط تکنیک‌های کروماتوگرافی از ساکسی توکسین تشخیص داده شد (۳۸)، اما همچنان در مورد شباهت ماکولوتوکسین و تترودوتوکسین سردرگمی وجود داشت (۳۵).

هشت سال بعد نیز شئوماک (Sheumack) و همکاران، نشان دادند که ماکولوتوکسین، نورو توکسین قوی جدا شده از غدد بزاقی خلفی هشت‌پای حلقوی آبی هاپالوکلانثا ماکولوسا^{۲۲}، همان تترودوتوکسین است. این اولین مورد گزارش شده‌ای بود که مشخص گردید تترودوتوکسین در یک ونوم وجود دارد (۴۰). اکنون با جستجو در پایکم^{۲۳} نیز، این ترکیبات به نام‌های مشابه مشاهده می‌گردند.

هاپالوتوکسین

برخی گزارش‌ها و مطالعات مربوط به تلفات انسانی منسوب به هشت پای حلقه آبی (*H. maculosa*)، فارماکولوژی و شیمی ترکیبات تشکیل دهنده غدد بزاقی خلفی آن در منابع موجود هستند (۴۰ و ۴۱).

در مطالعات فریمن و ترنر (۳۵) و همچنین جارویس (Jarvis) و همکاران (۳۹) نشان داده شدند که خصوصیات فارماکولوژیکی و کروماتوگرافی ماکولوتوکسین و تترودوتوکسین غیرقابل تمیز هستند. در حالی‌که، دولونتی و گیج (Dulhunty & Gage) (۴۲) با استفاده از نمونه‌ای که توسط کرافت و هودن (Croft & Howden) (۳۸) تهیه شده بود، اثرات

فارماکولوژیکی متفاوتی را برای این دو توکسین گزارش نمودند.

این گزارش جداسازی غدد بزاقی خلفی *H. maculosa* از دو توکسین مشخص خبر می‌داد. یکی، همان‌که توسط فریمن و ترنر (۳۵)، ماکولوتوکسین با خواص کروماتوگرافی مشابه تترودوتوکسین نامگذاری شده بود و دیگری یک توکسین قطبی‌تر، که هاپالوتوکسین^{۲۴} نامیده شد. مقایسه سمیت عصاره‌های اسید استیکی آبی و متانولی نشان دادند که فعالیت کل عصاره آبی (حداقل دوز کشنده، تقریباً ۲۵ میلی گرم در کیلوگرم)، ۲ تا ۴ برابر بیش از عصاره متانولی است (۹۵-۴۰ میلی گرم در هر کیلوگرم). هاپالوتوکسین جداسازی شده، یک پودر سفید بی‌شکل بود که به نین‌هیدرین پاسخ مثبت می‌داد. سمیت نمونه‌های جداگانه هشت پا، بسته به اندازه غدد بزاقی متغیر بود. هر چند که پس از خالص‌سازی، بجز با گذشت زمان، در ۲۲۰ نانومتر با نین‌هیدرین واکنشی نشان نداد و همچنین به راحتی در معرض هوا به یک روغن قهوه‌ای رنگ با از دست دادن قدرت مرگ‌آوری تبدیل شد. کروماتوگرافی مؤلفه با اصطلاح "ماکولوتوکسین" و خواص شیمیایی آن توسط کرافت و هودن گزارش گردید (۳۸). هر چند، در تحقیقات آن‌ها، هیچ مدرکی دال بر گزارش دومین فراکشن توکسیک موجود نیست؛ در مطالعه ساواج و هودن (Savage & Howden)، طیفی از هاپالوتوکسین آورده شده است که نسبت به آنچه قبلاً ارائه شده بود، تعریف بهتری دارد (شکل ۵-الف). در این طیف به‌طور خاص، باندهای کششی C-H در محدوده (cm^{-1}) ۲۸۰۰-۳۰۰۰

²² *Hapalochlaena maculosa*

²³ Pubchem

²⁴ Hapalotoxin

بسیار برجسته‌تر هستند و جذب قابل توجهی در مناطق نزدیک به ۱۷۰۰ و ۲۶۰۰ cm^{-1} وجود دارد (۴۳). جدول ۲، برخی خصوصیات مشاهده شده هاپالوتوکسین و ماکولوتوکسین را بر اساس مطالعه ساواج و هودن، مقایسه می‌کند. هر دو توکسین در کروماتوگرافی تبادل یونی کاتیونی پسر رفتگی‌های مشابهی را روی ستون‌های سفادکس G-10 و G-15 نشان دادند که این احتمالاً بیانگر اوزان مولکولی کمتر از ۷۰۰ دالتون برای هر دو ترکیب

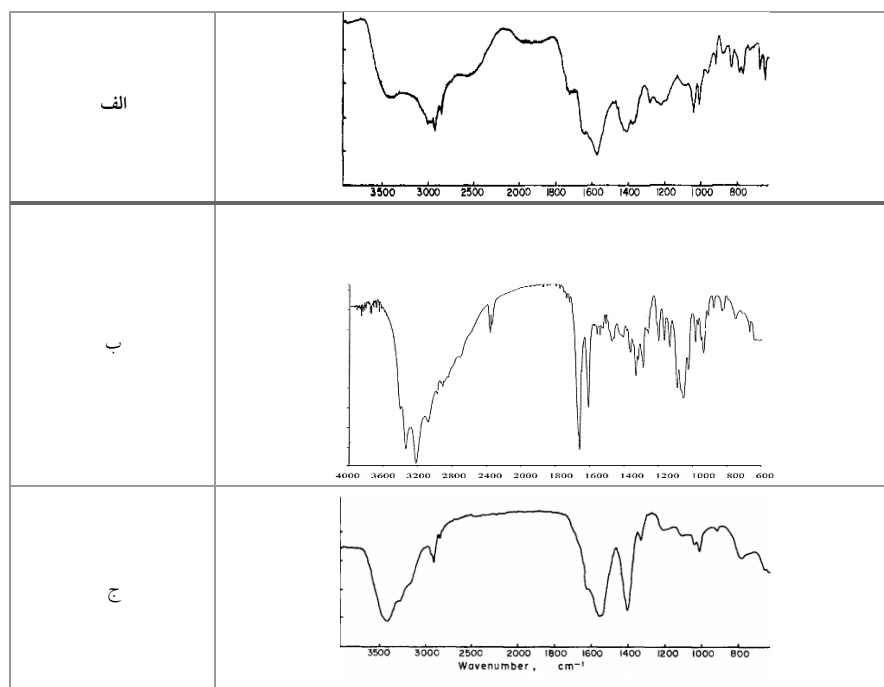
بود. بر اساس بیان محققان، به دلیل دشواری و محدودیت در دستیابی به مقادیر کافی غدد بزاقی، مطالعه روابط دقیق پاسخ دوز در مطالعه آن‌ها مقدور نبود و یک مقدار تقریبی ۵۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، به ترتیب برای ماکولوتوکسین و هاپالوتوکسین گزارش گردیدند. علائم منجر به مرگ برای هر دو مشابه بود؛ لکن زمان شروع عمل هاپالوتوکسین کمی طولانی‌تر بود (۴۳).

جدول ۲) مقایسه برخی خصوصیات هاپالوتوکسین و ماکولوتوکسین			
ویژگی	هاپالوتوکسین	ماکولوتوکسین	
پایداری محیطی	ناپایدار	پایدار	
رفتار روی سفادکس G-10	کند	کند	
طیف UV (نانومتر)	انتهای پیک در ۲۲۰	حداکثر جذب در ۲۲۰ $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 6/2$	
سیستم‌های R_f در TLC	A	۰/۲۰	۰/۶۵
	B	۰/۰۸	۰/۳۵
	C	۰/۳۰	۰/۵۰
آشکارسازی TLC	ید	مثبت	مثبت
	KOH/MeOH	مثبت	مثبت
	نین‌هیدرین	منفی	مثبت

*: سیستم مورد استفاده برای TLC: (A) سیلیکاژل G، حلال: ایزوپروپانول (۷۰)، اسید استیک (۵)، آب (۲۰) (B) سیلیکاژل G، حلال: ایزوپروپانول (۲)، اسید استیک (۱)، آب (۱) (C) سلولز MN۳۰۰، حلال: ایزوپروپانول (۲)، اسید استیک (۱)، آب (۱)

در مطالعه گوتو (Goto) و همکاران، طیف‌های IR (شکل‌های ۵-ب و ۵-ج)، ماکولوتوکسین و تترودوتوکسین یکسان نبودند (۴۴). این مسئله، نشان‌دهنده این بود یا ماکولوتوکسین و تترودوتوکسین دو ترکیب متفاوت هستند یا اینکه ناخالصی‌های کروماتوگرافی غیرقابل تشخیصی در ماکولوتوکسین وجود دارد. افزون بر این، در طیف IR

ماکولوتوکسین، یک باند کششی قوی O-H و یا N-H را در ۳۴۴۰ با شانه‌هایی در ۳۲۹۰ و ۳۱۸۰، باندهای C-H در محدوده ۲۸۰۰-۳۰۰۰ و جذب قوی در ۱۶۳۰، ۱۵۶۰ و ۱۴۱۰ cm^{-1} نشان داد. بر اساس این طیف، ماکولوتوکسین احتمالاً حاوی نسبت بالایی از گروه‌های OH و یا NH بوده و نسبت OH و NH به CH نیز زیاد می‌باشد (۴۳).



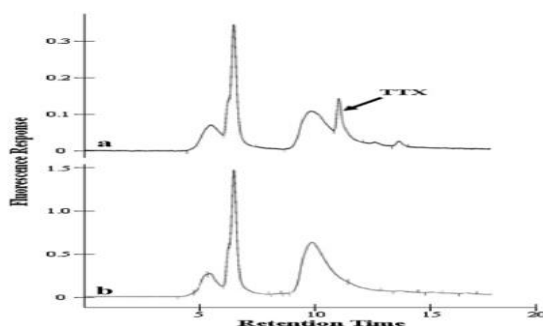
شکل ۵) طیف‌های IR برای: الف) هاپالوتوکسین (۴۳)، ب) تترودوتوکسین (۴۴) و ج) ماکولوتوکسین (۴۴).

Fig 5) IR spectra for: **A)** Hapalotoxin (43), **B)** Tetrodotoxin (44), and **C)** Maculotoxin (44).

هرچند که تعداد کمی از آن‌ها به اندازه TTX کارآمد هستند (۴۵). گرچه نتایج آنالیز مطالعه ویلیامز (Williams) و همکاران، هیچ پیکی را در کروماتوگرام HPLC از *H. lunulata paralarvae* نشان نداد که این موضوع به وجود دیگر آنالوگ‌های TTX منسوب گردید (شکل ۶) (۴۶). در مجموع، هاپالوتوکسین به‌عنوان یک توکسین سرپایان پذیرفته شده است.

در مطالعه ساواج و هودن، غدد بزاقی خلفی *H. Maculosa*، محتوی حداقل دو توکسین مجزای مهلک بود که پیش‌بینی گردید احتمالاً فعالیت فارماکولوژیکی عصاره تام غده، پیچیده‌تر از ماکولوتوکسین به تنهایی باشد (۴۳).

پس از گزارش ساواج و هودن، از وجود دومین ماده توکسیک هاپالوتوکسین علاوه بر ماکولوتوکسین در *H. fasciata* و نیز ارائه یکسان بودن ماکولوتوکسین و TTX توسط شئوماک، در مورد ارتباط هاپالوتوکسین و TTX، یاسوموتو و یوتسو-یاماشیتا (Yasumoto & Yotsu-Yamashita)، بیان نمودند که هاپالوتوکسین از نظر اندازه، مشابه TTX است اما برخی از خصوصیات منحصر به فردی را ارائه می‌دهد و بنابراین ممکن است آنالوگ TTX باشد. آنالوگ‌های دیگر TTX در گونه‌های حاوی TTX معمول هستند؛

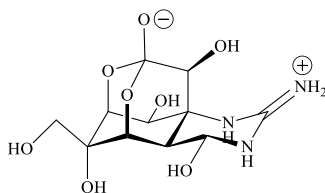


شکل ۶) کروماتوگرام HPLC تترودوتوکسین استخراجی از *H. lunulata paralarvae*. الف) نمونه اسپایک شده بوسیله تترودوتوکسین؛ ب) نمونه حقیقی بدون تترودوتوکسین (۴۶).

Fig 6) HPLC chromatogram of tetrodotoxin extracted from *H. lunulata paralarvae*. A) The sample spiked by tetrodotoxin; B) the real sample without tetrodotoxin(46).

تترودوتوکسین

را به وجود تترودوتوکسین ارتباط دادند (۴۹)؛ هر چند، این هم‌خانواده تترودوتوکسین نیز از این اختاپوس جداسازی و شناسایی شده بود (۵۰). تترودوتوکسین (TTX) از لحاظ شیمیایی، یک ترکیب هتروسیکل با فرمول ملکولی $C_{11}H_{17}N_8O_3$ می‌باشد (شکل ۷)، که برای اولین بار در سال ۱۹۰۹ از ماهی بادکنکی استخراج شد (۵۱). این توکسین، از نظر ساختاری، یک آمینوپرهیدروکینازولون محلول در آب و مقاوم به دما است. برای درک قدرت کشندگی انسان توسط این توکسین، تنها کافی است گفته شود که قدرت آن حدود هزار برابر سم سیانید بوده و پادزهری برای آن وجود ندارد (۵۲).



شکل ۷) ساختار فضایی تترودوتوکسین.

Fig 7) the spatial structure of Tetrodotoxin.

علاوه بر سفالوتوکسین‌ها که منحصر به سرپایان هستند در این موجودات توکسین‌های دیگری نیز یافت گردیده‌اند که با دیگر موجودات مشترک می‌باشند. یکی از مهلک‌ترین این توکسین‌ها، تترودوتوکسین می‌باشد که یک نورو توکسین با وزن مولکولی کم است. تترودوتوکسین در موجودات آبی متعددی چون برخی ماهی‌ها، کرم‌ها، خارپوستان، دوکفه‌ای‌ها، شکم‌پایان و نرم‌تنان یافت گردیده است (۴۷). تترودوتوکسین در سرپایان اغلب در اختاپوس‌های حلقه آبی متعلق به جنس هاپالوکلائنا^{۲۵} یافت شده است (۴۸). از سال ۱۹۵۴ که یک مورد مرگ در شمال استرالیا به دلیل تلقیح زهر این اختاپوس گزارش گردید مطالعات مختلفی درباره آن انجام گردید اما در ابتدا گمان می‌رفت که کشندگی اختاپوس‌هایی نظیر هاپالوکلائنا ماکولوزا^{۲۶}، به دلیل وجود ماکولوتوکسین است. پس از اندکی آن

²⁵ *Hapalochlaena*

²⁶ *Hapalochlaena maculosa*

مکانیسم اثر این توکسین، در مدل‌های حیوانی بررسی شده است و عمده اثر آن به دلیل مسدود کردن کانال سدیمی تشخیص داده شد (۵۳). تترودوتوکسین به کانال سدیمی اندام موجود متصل شده و با از کار انداختن کانال سدیمی موجب بی‌حرکت شدن آن اندام می‌گردد. در انسان‌ها، وسعت و شدت اثرات مسمومیت با این توکسین بستگی به دوز دریافت شده دارد. نشانه‌های اولیه شامل سوزن سوزن شدن زبان و لب‌ها می‌باشد که با سردرد و استفراغ دنبال می‌شود. علائم شدیدتر مانند ضعف عضلانی و از دست دادن کنترل عضلات ممکن است رخ دهد. سرانجام نیز احتمال فوت فرد آسیب دیده به دلیل از کار افتادن سیستم تنفسی و یا سکته قلبی وجود دارد. از آنجایی که درمان اختصاصی برای این توکسین وجود ندارد، لذا تنها مراقبت کافی و درمان بر اساس علائم قابل انجام است (۵۴).

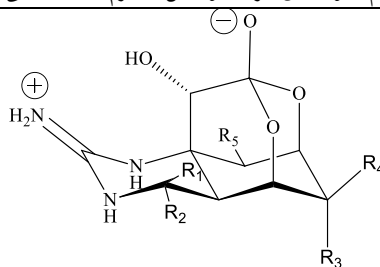
تترودوتوکسین به‌طور طبیعی دارای هم‌خانواده‌هایی است که میزان سمیت آن‌ها مرتبط با ساختار شیمیایی این ترکیبات است. تاکنون ۳۰ عضو از این خانواده شناسایی شده‌اند که ساختار تعدادی از آن‌ها در شکل (۸) آورده شده است (۵۵). مطالعه سمیت تمام ملکول‌های این خانواده بدلیل فراهم نبودن ماده خالص و استاندارد امکان‌پذیر نبوده است ولی در یک دسته‌بندی کلی می‌توان بیان نمود که اعضای کتون تترودوتوکسین دارای سمیت کمتر و هم‌خانواده‌های هیدروکسیلی، سمیت بیشتری دارند (شکل ۸) (۵۶). نتایج هانفین (Hanifin) و همکاران، بر روی تأثیر تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل موجود در تترودوتوکسین بر میزان سمیت آن، نشان داد که گروه‌های هیدروکسیل موجود بر روی کربن‌های شماره ۶ و ۱۱ به‌عنوان دهنده پیوند هیدروژنی، نقش کلیدی

در اتصال این سموم به کانال سدیمی ایفاء می‌نمایند (۵۷). همچنین مطالعه یانگ و کائو (Yang & Kao)، نشان داده بود که وجود گروه‌های هیدروکسیل بر روی کربن‌های شماره ۴، ۶، ۹، ۱۰ و ۱۱ می‌تواند به این اتصال کمک نماید. ۱۱-اکسوتترودوتوکسین که تاکنون فقط در قورباغه‌ها یافت شده، ۴ تا ۵ برابر سمی‌تر از تترودوتوکسین است. وجود یک گروه هیدروکسیل اضافه در ۱۱-اکسوتترودوتوکسین به آن کمک می‌کند تا به‌صورت مؤثرتری به کانال سدیمی پیوند یابد (۵۸).

تاکی‌کینین‌ها

تاکی‌کینین‌ها (TKs)، دسته بزرگی از ناقل‌های عصبی هستند که در مهره‌داران و بی‌مهرگان از جمله سرپایان یافت می‌شوند. آن‌ها در سیستم‌های عصبی مرکزی و محیطی به طرق مختلف مشارکت دارند. تاکی‌کینین‌ها در بی‌مهرگان با توالی FXGLMamide، در C-ترمینال به پایان می‌رسند. آن‌ها در بی‌مهرگان، فقط در بزاق یافت گردیده‌اند. این دسته از ترکیبات، جهت القاء عملکرد، به پروتئین‌های گیرنده خود پیوند می‌یابند. پیوند بین این دو بصورت اختصاصی رخ می‌دهد. مشتقات پپتیدی تاکی‌کینین (TKRP) نیز دارای عملکردی مشابه TKs هستند با این تفاوت که منشاء آن‌ها سیستم عصبی و روده بوده و انتهای توالی آن‌ها در سمت C به‌صورت FXGXRamide می‌باشد (۵۹). تاکی‌کینین ۲-، (OctTK-II)، از پپتیدهای فعال به‌دست آمده از اکتاپوس و لگاریس است که سلول‌های عصبی را تحریک و پاسخ‌های رفتاری را برمی‌انگیزد. آن‌ها گشاد کننده عروق و ترشحات عروقی قوی هستند و به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم، بسیاری از عضلات صاف را منقبض می‌کنند (۶۰).

هم خانواده‌های تتروdotوکسین در فرم هیدروکسیلی



توکسین	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
TTX	H	OH	OH	CH ₂ OH	OH
4-epiTTX	OH	H	OH	CH ₂ OH	OH
6-epiTTX	H	OH	CH ₂ OH	OH	OH
11-deoxyTTX	H	OH	OH	CH ₃	OH
6,11-dideoxyTTX	H	OH	H	CH ₃	OH
8,11-dideoxyTTX	H	OH	OH	CH ₃	H
11-oxoTTX	H	OH	OH	CH(OH) ₂	OH
11-norTTX-6,6-diol	H	OH	OH	OH	OH
11-norTTX-6(R)-ol	H	OH	H	OH	OH
11-norTTX-6(S)-ol	H	OH	OH	H	OH
Chiriquitoxin	H	OH	OH	CH(OH)CH(NH ₃ ⁺)COO ⁻	OH
TTX-8-O-hemisuccinate	H	OH	OH	CH ₂ OH	OOC(CH ₂) ₂ COO ⁻
TTX-11-carboxylic acid	H	OH	OH	COO ⁻	OH

هم خانواده‌های تتروdotوکسین در فرم کتونی

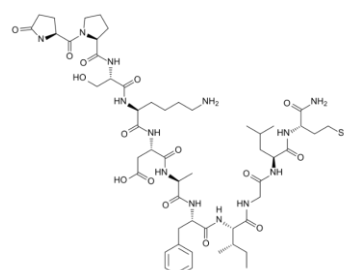
	4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX	R ₁	R ₂			
		H	OH			
	4,9-anhydro-8-epi-5,6,11-trideoxyTTX		OH	H		
	4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX	R ₁	R ₂	R ₃		
		H	OH	H		
	1-hydroxy-4,4a-anhydro-8-epi-5,6,11-trideoxyTTX		OH	H	OH	
	5-deoxyTTX	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
	5,6,11-trideoxyTTX	OH	CH ₂ OH	H	H	OH
		H	CH ₃	H	H	OH
	8-epi-5,6,11-trideoxyTTX	H	CH ₃	H	H	OH
	1-hydroxy-8-epi-5,6,11-trideoxyTTX	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
		OH	H	OH	OH	H
	4-epi-5,6,11-trideoxyTTX		H	OH	H	OH
	1-hydroxy-5,11-dideoxyTTX					

شکل ۸) هم خانواده‌های تتروdotوکسین در فرم‌های هیدروکسیلی و کتونی (۵۶).

Fig 8). The tetrodotoxin families in hydroxyl and ketone forms (56).

الدوئیسین

اولین توکسین پپتیدی که از زهر سرپایان جداسازی و توالی‌یابی شد، یک تاکی‌کینین، تحت عنوان الدوئیسین^{۲۷} بود (شکل ۹) که از اختاپوس الدونا موسکاتا^{۲۸} جداسازی گردید و اولین TK شناخته شده در قلمرو بی‌مهرگان به شمار می‌رود (۶۱).



شکل ۹) ساختار الدوئیسین (منبع: پابکم^{۲۹}).

Fig 9) The structure of Eleudoisin (Source: Pabchem).

الدوئیسین با فرمول ملکولی $C_{54}H_{85}N_{13}O_{15}S$ و وزن ملکولی ۱۱۸۸/۴ گرم بر مول با دوز مرگ‌آور داخل صفاقی ۳۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم، در سگ دارای اثرات قلبی و کاهندگی فشارخون است (۶۲). الدوئیسین در غدد بزاقی اختاپوس‌های جنس‌الدون^{۳۰} یافت شده است. مطالعات انجام شده بر روی سگ و

خوکچه نشان داده‌اند که این توکسین قادر است موجب افت فشار خون و انقباض عضلات دستگاه گوارشی در مهره‌داران گردد. اثرات این توکسین بر روی بی‌مهرگان بررسی نشده است (۶۳).

مطالعات کاندا (Kanda) و همکاران، جزئیات بیشتری از نقش TKs در اکتاپوس ولگاریس^{۳۱} را آشکار ساخت. در مطالعه آن‌ها از غدد بزاقی خلفی اختاپوس، دو نوع تاکی‌کینین (Oct-TK-I و Oct-TK-II) استخراج گردید. این گروه در سال ۲۰۰۷، موفق به یافتن هفت TKRP گردید. این گروه همچنین موفق به یافتن اولین گیرنده TK در مغز اختاپوس گردید. جالب اینکه، این گیرنده به Oct-TK-I و Oct-TK-II تولیدی در غدد بزاقی پشتی بدون پاسخ بود و تنها به TKRP تولید شده در مغز پاسخ می‌داد. بر اساس نتایج کاندا و همکاران، TKs بزاقی برای عمل در سیستم عصبی اختاپوس تولید نمی‌شوند بلکه تنها برای تکمیل زهر این موجود ساخته می‌شوند (۶۴). توالی آمینواسیدهای شناسایی شده برای TKs و TKRPs مربوط به اکتاپوس ولگاریس در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳) توالی آمینواسیدهای شناسایی شده برای TKs و TKRPs مربوط به اکتاپوس ولگاریس (۶۴)	
مشتقات پپتیدی تاکی‌کینین به‌دست آمده از مغز اختاپوس	
Oct-TKRP I	Val-Asn-Pro-Tyr-Ser-Phe-Gln-Gly-Thr-Arg-NH ₂
Oct-TKRP II	Leu-Asn-Ala-Asn-Ser-Phe-Met-Gly-Ser-Arg-NH ₂
Oct-TKRP III	Thr-Val-Ser-Ala-Asn-Ala-Phe-Leu-Gly-Ser-Arg-NH ₂
Oct-TKRP IV	Ser-Asp-Ala-Leu-Ala-Phe-Val-Pro-Thr-Arg-NH ₂
Oct-TKRP V	Met-Asn-Ser-Leu-Ser-Phe-Gly-Pro-Pro-Lys-NH ₂
Oct-TKRP VI	Tyr-Ser-Pro-Leu-Asp-Phe-Ile-Gly-Ser-Arg-NH ₂
Oct-TKRP VII	Ala-Ser-Leu-His-Asn-Thr-His-Phe-Ile-Pro-Ser-Arg-NH ₂
تاکی‌کینین‌های به‌دست آمده از غده بزاقی اختاپوس	
Oct-TK-I	Lys-Pro-Pro-Ser-Ser-Ser-Glu-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂
Oct-TK-II	Lys-Pro-Pro-Ser-Ser-Ser-Glu-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂

²⁷ Eleudoisin

²⁸ *Eledona moschata*

²⁹ Pubchem

³⁰ *Eledone*

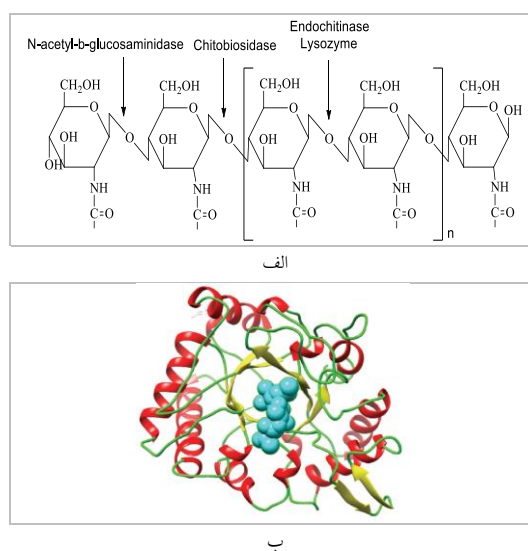
³¹ *Octopus vulgaris*

برخی آنزیم‌ها

آنزیم‌های هضم‌کننده در زهر بسیاری از موجودات زهراگین وجود دارند که به دلیل توانایی آن‌ها در تخریب بافتی یا سلولی و حتی ایجاد اثرات نورو توکسیک، می‌توان آن‌ها را در دسته توکسین‌ها جای داد (۶۵). آنزیم‌ها، مولکول‌های زیستی مهم را به صورت اختصاصی هدف قرار داده و موجب افزایش نفوذپذیری بافتی، تخریب سلولی و خونریزی می‌گردند (۶۶). این امر، موجب نفوذ و انتشار دیگر اجزای زهر در بدن طعمه شده و نتایجی چون فلج یا مرگ آن را به دنبال دارد. انواع مختلفی از آنزیم‌ها در زهر سرپایان شناسایی شده‌اند.

کیتیناز

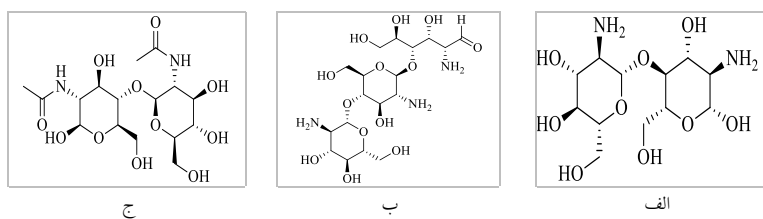
کیتینازها، گروهی از آنزیم‌ها هستند که قادر به هیدرولیز اتصال بتا-۱ و ۴ در N-استیل گلوکزآمین موجود در بیوپلیمر کیتین می‌باشند (شکل ۱۰) (۶۷). وزن آنزیم‌های کیتیناز، بین ۲۰ تا ۹۰ kDa متغیر است (۶۸). کیتین در طبیعت، همراه با رنگدانه‌های آبگریز، پروتئین‌ها و مواد معدنی مانند کلسیم یافت می‌شود؛ از این رو، استخراج آن نیازمند شرایط اسیدی یا بازی قوی می‌باشد. این فرآیند بازدهی کم، هزینه زیاد و نیز مشکلات ناشی از خوردنگی مواد استفاده شده دارا می‌باشد (۶۹). این موارد، می‌تواند نشان دهنده اهمیت استفاده از آنزیم‌های تجزیه‌کننده کیتین و در کنار آن ایجاد محصولات و مواد جانبی دوست‌دار محیط زیست باشد. کیتینازها به دو دسته کلی اندوکیتیناز و اگزوکیتیناز تقسیم می‌شوند.



شکل ۱۰ الف) محل شکست پلیمر کیتین توسط آنزیم‌های اندو و اگزوکیتیناز و ب) نحوه اتصال یک دایمر کیتوبایوز به جایگاه فعال آنزیم کیتیناز.

Fig 10) The breakdown site of polymeric chitin by endo and exochitinase enzymes (A); the binding type of a chitinobiose dimer to the active site of the chitinase enzyme.

اندوکیتینازها، موجب شکستن پلیمر به صورت تصادفی شده و مولتیمرهای با جرم پایینی از گلوکز آمین همچون کیتوتریوز، کیتوبایوز و دی استیل کیتوبایوز (شکل ۱۱) ایجاد می نمایند.



شکل ۱۱) ساختارهای شیمیایی کیتوتریوز (الف)، کیتوبایوز (ب) و دی استیل کیتوبایوز (ج).

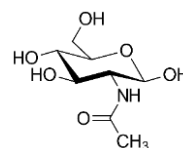
Fig 11) Chemical structures of chitotriose (A), chitobiose (B) and diacetyl-chitobiose (C).

برای بدن، تبدیل نمایند. دسته سوم، شامل موجوداتی هستند که مستعد بیماری توسط میکروارگانیسم های دارای دیواره کیتینی هستند. آن ها از کیتینازها برای از بین بردن دیواره این میکروارگانیسم ها و در نهایت از بین بردن آن ها بهره می گیرند. سرپایان اغلب همچون دسته دوم، از کیتینازها جهت از بین بردن پوسته کیتینی شکار خود استفاده می نمایند (۷۱).

فسفولیپاز A₂

فسفولیپاز A₂ موجب هیدرولیز و جدا شدن اسیدهای چرب از موقعیت sn-2 در فسفولیپیدهای غشایی می شود. فسفولیپازهای A₂ (PLA₂)، شامل ۱۵ گروه بوده و بر اساس آخرین دسته بندی به چهار شاخه اصلی تقسیم می شوند (۷۲). فسفولیپازهای ترشحی (sPLA₂)، سیتوزولی (cPLA₂)، مستقل از کلسیم (iPLA₂) و فسفولیپازهای دارای فعالیت استیل هیدرولازی بر روی عامل محرک پلاکت (LpPLA₂)، از چهار شاخه اصلی می باشند. هر یک از این دسته ها به سهم خود در متابولیسم چربی و نیز پیشرفت برخی بیماری ها نقش دارند و توجه زیادی را در صنایع زیست فناوری و داروسازی به خود جلب نموده اند.

اگزوکیتینازها، خود به دو دسته تقسیم می شوند؛ کیتوبایوسیداز که موجب آزاد سازی دی استیل کیتوبایوز از انتهای غیراحیای پلیمر شده و N- استیل گلوکز آمینیداز که محصولات الیگومری ناشی از اندوکیتینازها را به مونومرهای N- استیل گلوکز آمین می شکند (شکل ۱۲) (۷۰).



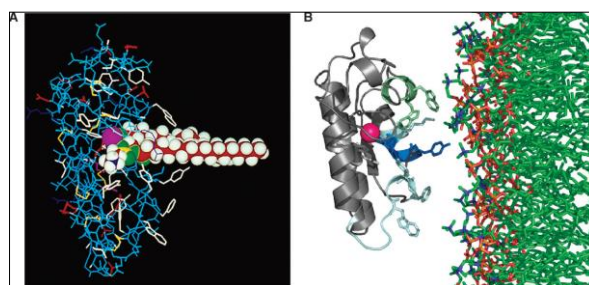
شکل ۱۲) ساختار مونومر N-استیل گلوکز آمین.

Fig 12) The structure of N-acetyl glucosamine monomer.

جانوران مختلف به دلایل گوناگون، به تولید آنزیم های کیتیناز در بدن خود نیاز دارند. دسته اول، شامل برخی از آن ها است که دارای ساختار سخت کیتینی هستند. آن ها در جریان رشد، برای تغییر اندازه و یا شکل بخش کیتینی خود از کیتیناز کمک می گیرند. دسته دوم از موجودات، کیتیناز را برای هضم دیواره سخت کیتینی طعمه های خود استفاده می کنند تا در کنار دسترسی به مواد مغذی درون بدن طعمه، کیتین موجود را نیز به مواد قابل تبدیل به انرژی

نوروتوکسیک و میوتوکسیک ایجاد می‌نماید (۷۴). این آنزیم در غدد بزاقی سرپایان جمع‌آوری شده از اقیانوس منجمد جنوبی شناسایی شد. نشان داده شده است که این آنزیم در گونه‌های اختاپوس *O. kaurana*، *H. maculosa* و کاتل‌فیش‌های *S. pharaonic*، *S. latimamus* و اسکوییدهای *S. australis* و *L. noctiluca* دارای ساختار مولکولی همولوگی می‌باشند (۷۵).

فسفولیپازهای ترشحی، به‌عنوان اولین نوع از PLA₂ هستند که در زهر بسیاری از مارها و عنکبوت‌ها کشف شده‌اند (۷۳). این دسته از فسفولیپازها دارای جرم مولکولی پایین (۱۳ تا ۱۵ کیلودالتون) بوده و در جایگاه فعال خود دارای هیستیدین، کلسیم و شش پیوند دی‌سولفیدی می‌باشند (شکل ۱۳). این آنزیم، در بی‌مهرگانی چون شکم‌پایان و سرپایان نیز یافت می‌شود. فسفولیپاز ترشحی، به گروه‌های عاملی مختلف تقسیم شده و اثرات

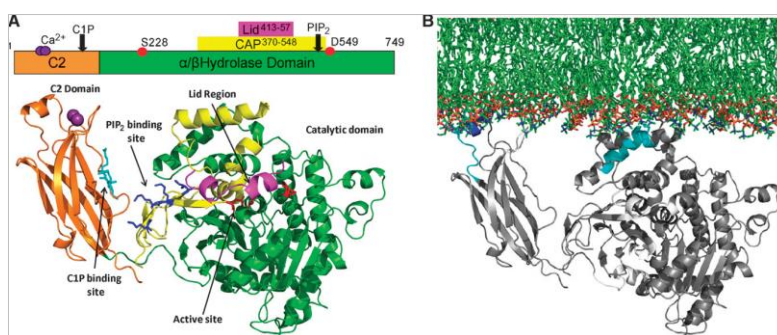


شکل ۱۳ الف) اتصال یک فسفولیپید با sPLA₂ که در آن یون‌های کلسیم به‌صورت گلوله‌های بنفش و فسفولیپید به‌صورت مدل توپر نشان داده شده‌اند و ب) نحوه اتصال sPLA₂ با لیپیدهای غشایی.

Fig 13) Binding of a phospholipid to sPLA₂ where calcium ions are shown as purple circles and phospholipids as a solid model (A); The binding model of sPLA₂ to the membrane lipids (B).

آن در برابر فسفولیپیدهایی که در موقعیت sn-2 خود حاوی اسید آراشیدونیک هستند بیشتر است (۷۷). از آنجا که آراشیدونیک اسید، پیش‌ساز تولید ایکوزانوئیدها بوده و ایکوزانوئیدها نیز به‌طور مستقیم در ایجاد التهاب نقش دارند؛ لذا می‌توان گفت cPLA₂ در ایجاد بیماری‌های التهابی نقش دارد.

اولین گروه از فسفولیپازهای سیتوزولی (cPLA₂)، در سال ۱۹۸۶ از خون انسان جداسازی، شناسایی و در سال ۱۹۹۱ توالی‌یابی گردیدند (۷۶). ویژگی بارز این دسته، وجود یک دایاد متشکل از سرین و آسپارتیک اسید در جایگاه فعال و نیز نیاز آن به یون کلسیم جهت فعال شدن می‌باشد (شکل ۱۴). همچنین، انتخاب‌پذیری



شکل ۱۴) قسمت‌های مختلف یک cPLA₂ که در آن دو یون کلسیم به‌رنگ بنفش، بخش کاتالیزوری به‌رنگ زرد و اسیدهای آمینه در جایگاه فعال به رنگ قرمز و مدل لوله‌ای نشان داده شده‌اند (الف)؛ اتصال آنزیم به چربی‌های غشایی (ب).

Fig 14) Different parts of a cPLA₂ which are shown two ions of calcium ion in purple color, the catalytic part as yellowish, and amino acids in the active site in red color and tubular model (A); the binding of the enzyme to the membrane lipids (B).

دیگر فسفولیپازها، این گروه می‌تواند در محیط آبی نیز به هدف خود متصل شده و به فعالیت بپردازد (۸۰). به‌عنوان یک وجه تمایز دیگر، برخلاف دیگر گروه‌ها که جایگاه فعال آن‌ها از دایاد تشکیل شده‌است، در این گروه از یک تریاد سرین، هیستیدین و آسپارتیک اسید تشکیل شده است (۸۱). این آنزیم، در سال ۱۹۹۵ کلون شد و مطالعه بر روی آن نشان داد که در بدن موجودات زنده خاصیت ضدالتهابی ایجاد می‌کند (۸۲). این مطالعه، منجر به این فرضیه گردید که این آنزیم از طریق متوقف نمودن فعالیت پیش‌التهابی PAF، موجب محافظت از بدن می‌شود. امروزه از میزان LpPLA₂ در خون بیماران به‌عنوان یکی از نشانگرهای امراض عروق قلبی استفاده می‌شود (۸۳).

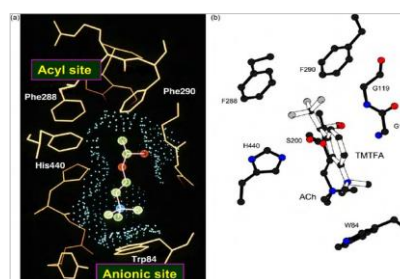
استیل کولین استراز

آنزیم استیل کولین استراز از خانواده سرین هیدرولازها بوده و در بافت‌های مختلف از جمله بافت‌های عصبی، عضلانی، پلاسما و سلول‌های خونی یافت می‌شود. وظیفه آن هیدرولیز استیل کولین و تبدیل آن به کولین و گروه استات در سیناپس کولینرژیک می‌باشد (۸۴).

نخستین عضو از فسفولیپازهای مستقل از کلسیم (iPLA₂)، در سال ۱۹۹۴ از ماکروفاژها استخراج شد و اغلب هم‌گروه‌های آن پس از سال ۲۰۰۶ شناسایی شدند (۷۸). ویژگی اصلی iPLA₂ همان عدم وابستگی عملکرد آن‌ها به حضور کلسیم در محیط می‌باشد. این گروه، علاوه بر فعالیت فسفولیپازی می‌تواند فعالیت لیزوفسفولیپازی و ترانس آسیلازی نیز نشان دهد (۷۹). این گروه همانند cPLA₂ در جایگاه فعال خود دارای سرین می‌باشند ولی نسبت به آراشیدونیک اسید انتخاب‌گری ندارند. تنظیم فعالیت در iPLA₂ به روش‌های مختلفی صورت می‌پذیرد که اتصال ATP، شکست کاسپاز، کالمدولین و تجمع گروه‌های تکرار شونده آنکرین، از این روش‌ها می‌باشند.

فسفولیپازهایی که دارای فعالیت استیل‌هیدرولازی بر روی عامل محرک پلاکت می‌باشند (LpPLA₂)، نام خود را از توانایی شکستن گروه استیل از جایگاه sn-2 عامل محرک پلاکت (PAF) گرفته‌اند. این نام می‌تواند کمی گمراه کننده باشد زیرا در موقعیت sn-2، این آنزیم علاوه بر گروه استیل، می‌تواند چربی‌هایی با زنجیره‌های تا ۹ کربنی را اکسید و جدا نماید. برخلاف

هیدرولیز استیل کولین در جایگاه فعال خود که متشکل از آمینواسیدهای سرین ۲۰۳، گلوتامین ۳۳۴ و هیستیدین ۴۴۷ هستند انجام می‌پذیرد. این جایگاه فعال در انتهای تونل باریکی به عمق ۲۰ آنگستروم قرار گرفته است (شکل ۱۵) (۸۵). وجود این گذر موجب می‌گردد که بسیاری از مولکول‌های بزرگ قادر به نزدیک شدن به سایت فعال آنزیم نباشند و بدین وسیله، انتخابگری آنزیم و سرعت فعالیت آن بالا رود.



شکل ۱۵) جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز و نحوه قرارگیری استیل کولین روی آنزیم.

Fig 15) The active site of the acetylcholinesterase enzyme and the localization of acetylcholine on the enzyme.

انتظار می‌رود که وجود مهارکننده‌های استیل کولین استراز، مانند فازیکولین، موجب افزایش حضور استیل کولین در سیناپس‌ها شده و در نهایت موجب بروز برادیکاردی گردد. هرچند این استدلال صحیح است اما این ترکیبات مهارکننده نیز در زهر برخی مارها یافت می‌شوند و در زهرهای گردآوری شده از سرپایان دیده نشده‌اند. از سوی دیگر، آنزیم AChE در زهر سرپایانی نظیر ادیلدون پلیمورفا^{۳۲}، مگاللدون ستوبوس^{۳۳}، پارلدون ائکیپالانه^{۳۴} و پارلدون تورکوئی^{۳۵} شناسایی شده است. حضور مقادیر زیاد این

آنزیم در زهر سرپایان می‌تواند موجب به تله‌افتادن استیل کولین و در نتیجه جلوگیری از تحریک گیرنده‌های موسکارینی شده و در نهایت به افت فشار خون بیانجامد (۸۶).

آمین‌ها

آمین‌ها مولکول‌های آلی با وزن کم هستند که در سیستم‌های مختلف زیستی وجود دارند. بسیاری از آمین‌ها مانند ابی‌نفرین، نوراپی‌نفرین، دوپامین، سروتونین و هیستامین به عنوان ناقل عصبی شناخته شده‌اند. این مواد در زهر بسیاری از سرپایان شناسایی شده‌اند و با وجود ایجاد دردهای حاد اما اغلب دلیل اصلی اثرات جدی مانند فلج یا مرگ نیستند (۸۷).

اکتاپامین

اکتاپامین یک آمین بیوژنیک است که اولین بار توسط ارسپامر و بورتی (Erspamer & Boretti) در ترشحات غده بزاقی اختاپوس *Octopus Vulgaris* شناسایی شد (۸۸). این ترکیب در بیشتر بافت‌های عصبی و غیرعصبی بی‌مهرگان یافت شده است. بسیاری از اندام‌های محیطی، اندام‌های حسی و سیستم اعصاب مرکزی بی‌مهرگان توسط اکتاپامین مدوله می‌شوند. اکتاپامین، در کنار تیرامین تنها ناقل‌های عصبی غیرپپتیدی هستند که نقش فیزیولوژیک آن‌ها تنها به بی‌مهرگان خلاصه می‌شوند (۸۹). گرچه این ترکیب با نورآدرنالین ساختار شیمیایی متفاوتی دارند اما مشخص شده است که سیستم‌های اکتاپامینرژیک در بی‌مهرگان و نورآدرنرژیک در مهره‌داران دارای شباهت‌های بسیاری بوده و همولوگ هستند (۹۰). از آنجا

³² *Adelieledone polymorpha*

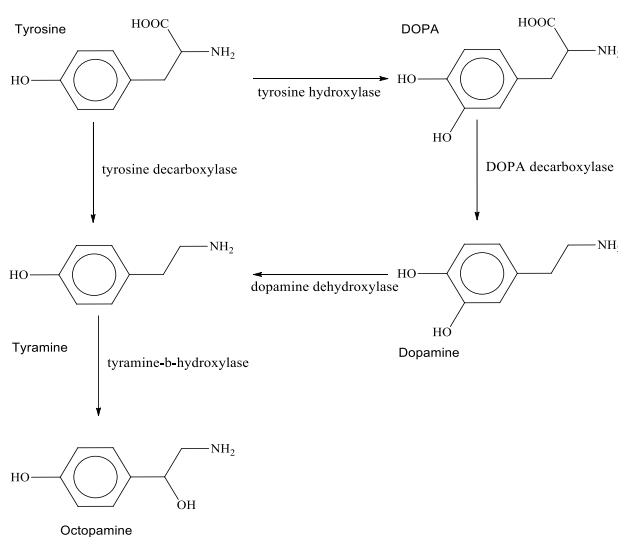
³³ *Megaleledone setebos*

³⁴ *Pareledone aequipapillae*

³⁵ *Pareledone turqueti*

اکتاپامین در اغلب بی‌مهرگان از طریق بتا-هیدروکسیل دار شدن تیرامین به وجود می‌آید. اکتاپامین، همچنین می‌تواند به صورت غیرمستقیم از DOPA و دوپامین نیز تولید گردد (شکل ۱۶).

که اکتاپامین در مهره‌داران و نورآدرنالین در بی‌مهرگان عملکرد فیزیولوژیک ندارند، لذا اکتاپامین را در بی‌مهرگان به عنوان ناقل آدرنرژیک می‌توان در نظر گرفت. این فرض با توجه به شباهت ساختاری این دو ترکیب که تنها در یک گروه هیدروکسیل بر روی حلقه فنلی باهم تفاوت دارند، پشتیبانی و تأیید می‌شود (۹۱).



شکل ۱۶) راه‌های متابولیک تولید اکتاپامین (۹۱).

Fig 16) The metabolic pathways of octapamine production (91).

برسد که در مقایسه با دیگر بافت‌ها و موجودات تفاوت چشمگیری دارد (جدول ۴) (۹۱).

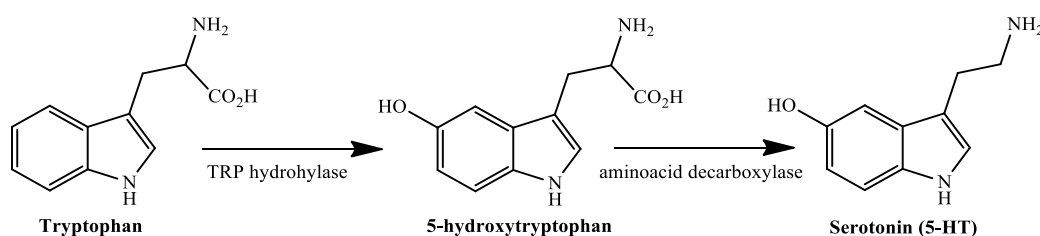
نشان داده شده است که میزان این بیوژنیک در غده بزاقی اختاپوس می‌تواند به ۱۳۱۰۰۰۰ نانوگرم بر گرم

جدول ۴) مقایسه میزان اکتاپامین در بافت‌های موجودات مختلف با میزان این آمین بیوژنیک در غده بزاقی اختاپوس			
گونه	نام گونه	بافت	میزان اکتاپامین (نانوگرم بر گرم)
نماتودها	<i>Caenorhabditis elegans</i>	تمام بدن	۱۳۰
آنلیدها	<i>Erpobdella octoculata</i>	گانگلیون مغزی	۲۷۰۰۰
	<i>Lumbricus terrestris</i>	گانگلیون مغزی	۷۳۹۰
		بند نخاع شکمی	۵۳۴۰
		ماهیچه	۳۳۰
	<i>Macrobdella decora</i>	گانگلیون مغزی	۲۵۰۰۰
نرم تنان	<i>Aplsia californica</i>	گانگلیون مغزی	۲۸۰
		گانگلیون پدال	۱۶۰
		گانگلیون شکمی	۳۵
		گانگلیون پلورال	۳۰
		گانگلیون مغزی	۷۵۰
	<i>Helix aspersa</i>	قلب	۱۳۲۰
	<i>Octopus vulgaris</i>	گانگلیون سطحی	۱۲۰۰
		لوب پسین	۴۶۰۰
		گانگلیون ستاره ای	۲۱
		غده بزاقی	۱۳۱۰۰۰۰
		گانگلیون مغزی	۳۳۰۰
	<i>Tapes watlini</i>	قلب	۸۰
	<i>Glossina morsitans</i>	مغز	۷۹۹۰
		گانگلیون سینه ای	۱۰۹۰۰
		ماهیچه پروازی	۱۰۸۰
حشرات	<i>Locuta migratoria</i>	پروتوسربروم	۱۴۱۵۰
		لوب بینایی	۱۴۵۳۰
		گانگلیون سینه ای	۶۰۵۰
		کورپوس آلانوم	۳۱۰
		قلب	۶۸
		همولنف	۱۰
	<i>Manduca sexta</i>	گانگلیون مغزی	۲۷۴۲
	<i>Schistocerca gregaria</i>	گانگلیون مغزی	۲۴۳۰
		لوب بینایی	۳۹۱۰
		لوب بینایی-مغزی	۸۶۰
		گانگلیون مغزی	۲۱۱۵
	<i>Spodoptera littoralis</i>	گانگلیون سینه ای	۶۵۸
		غده بزاقی	۱۶/۳
		چربی	۷/۸
		ماهیچه پشتی	۲۷/۳
		هیپوتالاموس	۸۰
مهره‌داران	<i>Homo sapiens</i>	تالاموس	۳
		لوکوس کورولوس	۲۰
		هیپوکمپوس	۳/۵
		هیپوتالاموس	۲۶
	<i>Rattus spec.</i>	هیپوکمپوس	۵/۲
		استراتوم	۵/۳

سروتونین

مطالعات اولیه بر روی زهر استخراج شده از غده بزاقی اختاپوس نشان‌دهنده وجود ترکیبی در آن بود که موجب تحریک عضله صاف و انقباض آن در پستانداران می‌شد. در ابتدا، این ترکیب انترامین نامگذاری شد اما مطالعات بعدی نشان داد که این ترکیب همان سروتونین است (۹۲). سروتونین با نام شیمیایی ۵-هیدروکسی تریپتامین (5-HT)، یک ناقل عصبی مونوآمینی است که

طی یک مسیر آنزیمی از اسیدآمین تریپتوفان تولید می‌شود (شکل ۱۷) (۹۳). در انسان، سروتونین اثرات خود را بر عملکرد سیستم اعصاب مرکزی، سیستم‌های قلبی-عروقی، کلیوی، ایمنی و گوارشی اعمال می‌دارد به‌طوری که هر نوع اختلال در سنتز، متابولیسم یا بازجذب آن، منجر به بروز علائم بیماری‌هایی نظیر اسکیزوفرنی، افسردگی، وسواس اجباری و اختلال در یادگیری می‌گردد (۹۴).



شکل ۱۷) مسیر آنزیمی تبدیل تریپتوفان به سروتونین (۹۳).

Fig 17) the enzymatic pathway for the conversion of tryptophan to serotonin (93).

بر اساس مطالعه مکفی و ویلکنس (Mcphee & Wilkens)، تزریق دوز پائینی از سروتونین به خرچنگ‌ها موجب اختلال در راه رفتن و از دست رفتن تعادل آن‌ها می‌گردد. در صورتی که خرچنگ‌ها تحت تأثیر سروتونین قادر به قدم برداشتن باشند، این راه رفتن به صورت غیرجهت‌دار و بدون مسیری خاص صورت می‌گیرد. آن‌ها نشان دادند که مدت زیادی نیاز است تا این خرچنگ‌ها در صورت وارونه شدن، به حالت اول خود برگردند (7.8 ± 1.2 s)، که این مدت زمان برای گروه کنترل، کمتر از $1/5$ s به طول می‌انجامد (۹۵). با تزریق دوز بالای این ترکیب ($1/5 \times 10^{-4}$ مول بر لیتر)، خرچنگ‌ها دچار خمیدگی و انقباض شدید شدند که این حالت بین ۴ تا ۶ ساعت ادامه یافت. پس از گذشت این مدت

زمان، خرچنگ‌ها به تدریج به حالت عادی خود بازگشتند. در مطالعه ولش و مورهد (Welsh & Moorhead)، میزان سروتونین در غده بزاقی *O. vulgaris* گردآوری شده از دریای مدیترانه بین ۳۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر گرم گزارش گردید؛ در حالی که میزان آن برای همین گونه از اختاپوس در سواحل برمودا بین ۶۸ تا ۷۲ میکروگرم بر گرم بود (۹۶). به نظر می‌رسد این مقدار از سروتونین اگرچه کشنده نیست اما می‌تواند اثرات دوز بالا را براحتی در بدن طعمه القاء نماید.

برخی ترکیبات فعال سرپایان

سرپایان نیز مانند بسیاری دیگر از موجودات آبی دارای ترکیبات طبیعی منحصر بفرد و شگفت‌انگیزی در

بدن خود هستند. آن‌ها از این ترکیبات شیمیایی برای استتار، فرار و نیز شکار طعمه خود استفاده می‌نمایند

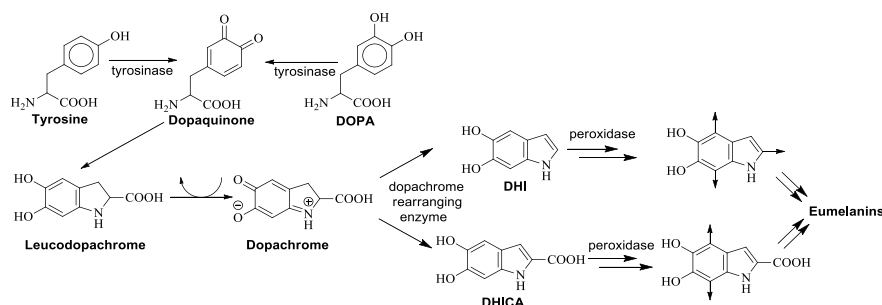
مرکب

یکی از شاخص‌ترین ترکیبات طبیعی در سرپایان، مرکبی است که هنگام احساس خطر آزاد می‌نمایند. آن‌ها با این عمل خود، حواس شکارچی را پرت نموده و درعین حال، اطرافیان خود را از خطر آگاه می‌سازند. این مایع تیره رنگ حاصل عملکرد دو اندامک به صورت همزمان می‌باشد. اولین اندامک که مطالعات زیادی بر روی آن انجام شده، کیسه مرکب می‌باشد و همانگونه که از نام آن برمی‌آید، موجب رهاسازی مرکب تیره رنگ می‌گردد. اندامک دیگر، غده مخاطی موجود در اندام قیفی سرپایان است که به نسبت کیسه مرکب، مطالعات کمتری بر روی آن انجام شده است. نتایج مطالعات نشان داده‌اند که رنگ تیره این مرکب، ناشی از وجود ملانین است (۹۷).

ملانین، یک رنگدانه طبیعی است که در اغلب موجودات نظیر قارچ‌ها، باکتری‌ها، گیاهان و جانوران وجود دارد و نقش‌های مختلفی برای آن شناسایی شده است. این رنگدانه در صنایع غذایی، رنگ‌سازی، جوهر چاپگر، نیمه رساناها، سلول‌های خورشیدی و به طور عمده در صنایع آرایشی کاربرد دارد. بیشترین مصرف آن به عنوان آنتی‌اکسیدان در کرم‌های ضدآفتاب می‌باشد. ملانین از آمینواسیدها به وجود می‌آید ولی ساختار پروتئینی ندارد بلکه یک پلیمر زیستی می‌باشد که به دو فرم اتوملانین و فتوملانین وجود دارد (شکل

۱۸) (۹۸). اتوملانین، پلیمر تشکیل شده از واحدهای ۵ و ۶-دی هیدروکسی ایندول (DHI) و ۵ و ۶-دی هیدروکسی ایندول-۲-کربوکسیلیک اسید (DHICA) است. هر دوی DHI و DHICA از تیروزین مشتق می‌شوند. فتوملانین از مونومرهای بنزوتیازین و بنزوتیازول تشکیل شده است (۹۹). این مونومرها در حضور سیستئین به وجود می‌آیند. رنگ فتوملانین، نارنجی-قرمز و رنگ اتوملانین که نوع یافت شده در مرکب سرپایان است قهوه‌ای تیره می‌باشد (۱۰۰).

اتوملانین، مخلوطی از پلیمرهای فاقد نظم و شاخه‌دار است که از DHI، DHICA، اسیدهای پیروکربوکسیلیک، لوکودوپاکروم و دوپا (DOPA) غیرحلقوی تشکیل گردیده است (۱۰۱). مطابق با شکل (۱۸)، در مرحله اول، تیروزین و دوپا توسط آنزیم تیروزیناز به دوپاکینون تبدیل می‌شوند. دوپاکینون از لحاظ شیمیایی ناپایدار بوده و بدون فعالیت آنزیمی تبدیل به دوپاکروم می‌گردد. آنزیم‌های نوآرایی دهنده دوپاکروم (DRES)، فرآیند تبدیل دوپاکروم به DHI و DHICA را پیش می‌برند. سپس آنزیم‌های پروکسیداز موجود در غده مرکب ساز، DHI و DHICA را از طریق فرآیند پلیمریزاسیون به اتوملانین تبدیل می‌نمایند. نسبت DHI به DHICA در اتوملانین بستگی به میزان فعالیت آنزیم-های نوآرایی کننده دارد. به عنوان مثال، DHI در اتوملانین جداسازی شده از سپیا، ۵ برابر DHICA در آن است که نشان می‌دهد آنزیم‌های نوآرایی کننده تمایل بیشتری برای ایجاد DHI داشته‌اند (۱۰۲).

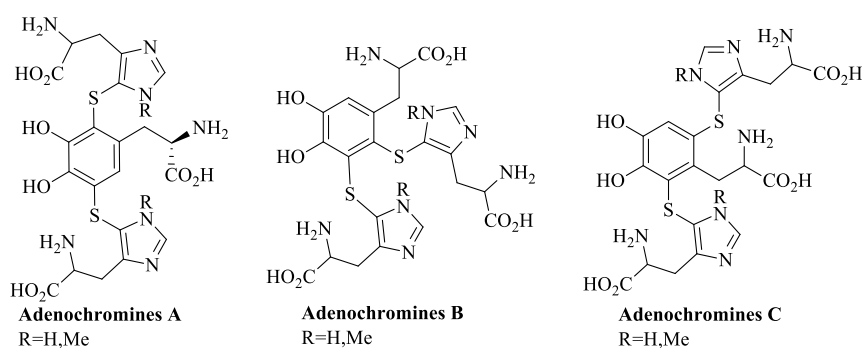


شکل ۱۸) مراحل تولید انوملانی و ترکیبات شرکت کننده در آن (۱۰۲)

Fig 18) The eumelanin production stages, and its participating compounds (102).

ترکیبی از آن‌ها وجود دارد (۱۰۳). آدنوکرومین، حاوی آهن است ولی ساختار پورفیرینی ندارد. این رنگدانه، ترکیبی از یک هسته گلیسین با سه آلفا-آمینواسید حاوی گوگرد است (شکل ۱۹) (۱۰۴).

قابل ذکر است که ملانین تنها رنگدانه مهم موجود در سرپایان نیست. آدنوکرومین (Adenochromine) نیز به عنوان رنگدانه بنفش از قلب اکتاپوس ولگاریس جداسازی شده است و در سه حالت A، B و C یا



شکل ۱۹) آدنوکرومین‌های مختلف استخراج شده از قلب اکتاپوس ولگاریس (*Octopus vulgaris*).

Fig 19) Different adenochromines extracted from the heart of *Octopus vulgaris*.

میلی گرم بر میلی لیتر، می تواند موجب از بین رفتن باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی گردد که در مقایسه با آموکسی سیلین (۰/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر)، مقداری متوسط به حساب می آید. همچنین در مطالعه مهانراجو (Mohanraju) و همکاران، مقایسه

از دیگر موارد استفاده مرکب، خاصیت ضد میکروبی آن است. پتکویچ (Petkovic) در سال ۲۰۱۳ با جداسازی ملانین از اکتاپوس میموس^{۳۶} فعالیت ضد میکروبی آن را مورد ارزیابی قرار داد (۱۰۵). بر اساس نتایج مطالعه آن‌ها، این رنگدانه در غلظت ۱/۳

³⁶ *Octopus mimus*

تأثیر مرکب به دست آمده از سپیوتیوتیس لسونینا^{۳۷}، سپیا برویماننا^{۳۸} و اکتوپوس سیائوس^{۳۹} بر روی باکتری‌های *S.aureus*، *K. pneumoniae*، *E.coli*، *B. subtilis* و *V. cholerae*، نشان داده شد که تنها مرکب سپیا برویماننا اثر ضدباکتریایی در مقابل تمام باکتری‌های مورد مطالعه را دارا می‌باشد (۱۰۶).

بر اساس مطالعه ونیلا (Vennila) و همکاران، مرکب حاصل از اختاپوس و کاتل فیش در از بین بردن قارچ‌های *A. fumigates* و *Fusarium sp.* عملکرد خوبی نشان می‌دهند؛ در حالی که مرکب اسکوید، فاقد این فعالیت بود (۱۰۷).

بر اساس یافته‌های آزمایشگاهی، مرکب سرپایان می‌تواند به عنوان یک ترکیب بالقوه ضدسرطانی عمل نماید. در مطالعه فهمی (Fahmy) و همکاران، بر روی اثر مرکب سپیا افسینالیس^{۴۰} سلاتورا اجیپتیکا^{۴۱}، بر روی سلول‌های سرطانی کبدی HepG2، نشان داده شد که مرکب این سرپایان دارای سمیت سلولی با IC₅₀ به ترتیب برابر با ۴۹/۲۴ و ۷۶/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشند (۱۰۸). مطالعات بیشتر نشان داده‌اند که فعالیت‌های ضدسرطانی مرکب، اغلب مربوط به حضور ترکیباتی نظیر آنزیم تیروزیناز، پپتیدوگلیکان‌ها و الیگوپپتیدهای آن می‌باشد (۱۰۹).

در مطالعه پروتا (Prota)، میزان آنزیم تیروزیناز در مرکب سپیا حدود یک میکروگرم بازای هر میلی‌لیتر از مرکب بود. آنزیم تیروزیناز، در حضور سوبستراهای لازم موجب تولید دوپاکینون می‌شود که قادر به برهمکنش با هسته دوست‌های مختلف بوده و از طریق

S-۵-سیستئینیل دوپا موجب ایجاد پروتئین‌های حاوی دوپا می‌گردد. این امر موجب تخریب اکسیداتیو مولکول‌های سلولی می‌شود (۱۱۰). پپتیدوگلیکان‌های غنی از فوکوز در مرکب سرپایانی چون اوماسترفس برترامی^{۴۲}، ایلکس آرژنتینوس^{۴۳} و سپیا مایندرونی^{۴۴} یافت شده‌اند. این ماکرومولکول‌ها، بیش از عمل فراری دادن دشمن، به جهت خواص درمانی آن‌ها، به‌ویژه خواص ضدسرطانی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۱۱). فعالیت ضدسرطانی پپتیدوگلیکان‌ها، دور از انتظار نیست؛ زیرا پیش از این مشخص گردیده بود که این مولکول‌ها بر روی تقسیم سلولی اثر می‌گذارند. آن‌ها از طریق شکستن DNA موجب آپوپتوز می‌گردند (۱۱۲). برخی پلی‌ساکاریدها و الیگوپپتیدهای جداسازی شده از مرکب سرپایان نیز همانند پپتیدوگلیکان‌ها دارای خاصیت ضدسرطانی هستند؛ به عنوان مثال، الیگوپپتیدهای استخراج شده از مرکب سپیا می‌توانند از طریق القاء مرگ سلولی موجب تخریب سلول‌های سرطانی پروستات گردند. آن‌ها این کار را از طریق فعال نمودن کاسپاز ۳- و بالا بردن نسبت Bax/Bcl-2 انجام می‌دهند (۱۱۳). از دیگر اثرات زیستی مرکب می‌توان به اثرات هموپویتیک، ضد فشارخون، ضد ویروسی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی آن اشاره نمود (۱۱۴).

رفلکتین

رنگ‌های قابل رویت در طبیعت، حاصل حضور رنگدانه‌ها یا عوامل ساختاری و یا ترکیبی از این دو هستند (۱۱۵). برخلاف رنگ‌های تولید شده توسط رنگدانه‌ها، رنگ‌های

³⁷ *Sepioteuthis lessoniana*

³⁸ *Sepia brevimana*

³⁹ *Octopus cyaneus*

⁴⁰ *Sepia officinalis*

⁴¹ *Coelatura aegyptiaca*

⁴² *Ommastrephes bartrami*

⁴³ *Illex argentine*

⁴⁴ *Sepiella maindroni*

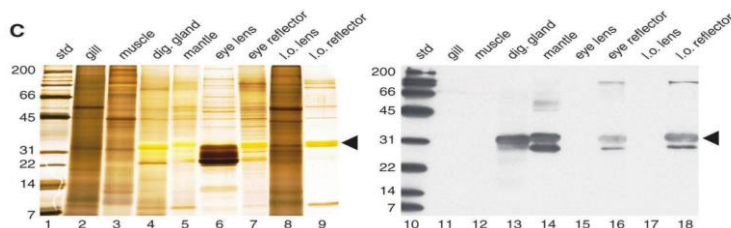
وجود دارد که از گویچه‌های نامحلول (ایریدوفورها و لوکوفورها) با شکل‌های نامنظم وجود دارد (شکل ۲۰). ایریدوفورها حاوی پروتئین‌هایی به نام رفلکتین^{۴۵} بوده که به صورت لایه‌ای قرار گرفته و مسئول ایجاد طیف بزرگی از رنگ‌ها در این موجودات است. با انقباض و انبساط ایریدوفورها، لایه‌های رفلکتین به هم نزدیک و یا از هم دور می‌شوند که این امر موجب پخش نور در طول موج‌های مختلف و ایجاد رنگ‌های متفاوتی می‌شود (۱۱۷). رفلکتین‌ها به صورت اختصاصی تنها در سرپایان یافت شده‌اند و بیشترین توزیع آن‌ها در جبه و لنزهای چشم‌های سرپایان می‌باشد (شکل ۲۱) (۱۱۸).

ساختاری از برهمکنش فیزیکی نور با ساختارهای در اندازه نانومتر و میکرومتر بوجود می‌آیند. رنگ‌های ساختاری، اغلب روشن و براق هستند و توسط موجودات مختلف برای استتار یا ارسال پیام استفاده می‌شوند. سرپایان تغییر رنگ ظاهری خود را مدیون ساختار پوست بی‌همتهای خود هستند. پوست آن‌ها دارای چندین نوع سلول بوده که در عمق‌های مختلفی قرار گرفته و وظایف متفاوتی را بر عهده دارند. کیسه‌های محتوی رنگدانه، در کروماتوفورهای پوستی قرار دارند و مسئولیت بخشی از تغییر رنگ سریع سرپایان را به عهده دارند (۱۱۶). در کنار کروماتوفورها، یک سامانه پیچیده تولید رنگ ساختاری نیز



شکل ۲۰) نحوه قرار گرفتن کروماتوفورها، ایریدوفورها و لوکوفورها در برش عمقی پوست سرپایان (۱۱۶).

Fig 20) The localization of Chromatophores, Iridophores and leucophores indeep section of the cephalopod skins (116).

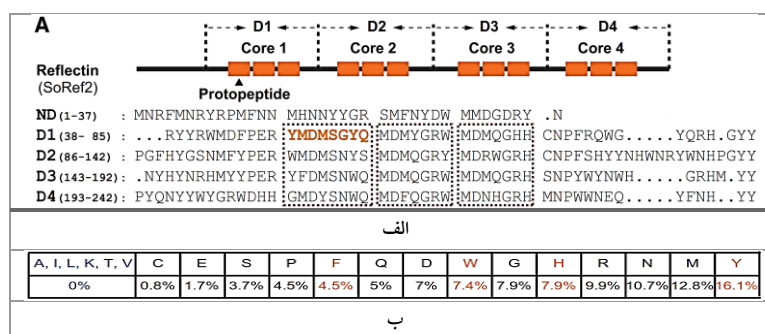


شکل ۲۱) نتایج SDS-PAGE برای نحوه توزیع رفلکتین در بافت‌های مختلف *E. scolopes*. ستون‌های ۱ تا ۹ با نقره رنگ شده اند و ستون‌های ۱۰ تا ۱۸ بروش ایمونوبلات آنالیز شده‌اند. پیکان سیاه محل قرار گرفتن پروتئین‌های رفلکتین را نشان می‌دهد. استانداردهای جرم‌های ملکولی برحسب kD می‌باشند (۱۱۸).

Fig 21) The SDS-PAGE results for distribution of reflectin in different tissues of *E. scolopes*. Lanes 1 to 9 were silver-stained, and lanes 10 to 18 were analyzed by immunoblotting assay. The black arrow indicates the location of the reflectin proteins. The molecular mass standards are in kD (118).

فیل آلانین تشکیل شده است (شکل ۲۲). تا به امروز، هیچ توالی اسید نوکلئیکی یا آمینواسیدی مشابه خانواده رفلکتین‌ها شناسایی نگردیده و توزیع آمینوسیدها در این خانواده پروتئینی بسیار غیرمعمول است (۱۱۹).

بسیاری از رفلکتین‌ها، حاوی چهار تا هفت دامنه تکرار شونده هستند. هر دامنه در رفلکتین T دارای یک هسته مرکزی است که از سه بار تکرار شدن یک اکتاپپتید با توالی YMDMSGYQ و دو ناحیه جانبی غنی از تیروزین-



شکل ۲۲) توالی آمینواسید رفلکتین SoRef2 و شکل شماتیک که در آن دامنه‌ها نشان داده شده‌اند (الف)؛ درصد هر آمینواسید در این پروتئین (ب) (۱۱۹).

Fig 22) The reflectin (SoRef2) amino acid sequence and schematic diagram showing the domains (A); Percentage of each amino acid in the protein (B) (119).

SE- سفالوتوکسین بسیار سنگین‌تر و سمیت آن حدود هزار بار بیشتر از دیگر اعضای خانواده آن است. این توکسین اغلب در *S. esulenta* یافت شده است و دارای ۱۰۵۲ آمینواسید می‌باشد. وزن مولکولی آلفا- سفالوتوکسین و بتا- سفالوتوکسین به‌دست آمده از *O. vulgaris* به ترتیب ۹۱ و ۳۴ دالتون و سمیت ایزومر آلفا حدود سه برابر ایزومر بتای آن گزارش گردیده است. در میان مولکول‌های کوچک توکسیک می‌توان به تترودوتوکسین‌ها و تاکی‌کینین‌ها اشاره کرد. در یک دسته‌بندی کلی می‌توان گفت که اعضای کتونی تترودوتوکسین‌ها دارای سمیت کمتر و هم‌خانواده‌های هیدروکسیلی آن‌ها سمیت بیشتری نسبت به خود تترودوتوکسین نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد که دلیل این سمیت بیشتر در هم‌خانواده‌های هیدروکسیلی، ایجاد پیوند هیدروژنی بیشتر با پروتئین‌های کانال سدیمی از طریق گروه‌های هیدروکسیلی به‌ویژه بر روی کربن‌های ۶ و ۱۱ باشد. تاکی‌کینین‌ها به‌صورت پپتیدی

نتیجه‌گیری

هدف از این مطالعه، بررسی زهر و برخی ترکیبات طبیعی سرپایان است. سرپایان امروزی، تکامل یافته‌ترین نرم‌تنان هستند و به دو زیر رده نوتیلوئیدا و کولئوئیدا تقسیم می‌شوند. آن‌ها دارای قابلیت‌های منحصر به فردی در استفاده از ابزارهای شیمیایی برای استتار، دفاع و حمله می‌باشند. اغلب سرپایان در غده بزاقی خود دارای ترشحات زهری بوده و قادرند آن‌ها را از طریق نوک طوطی مانند خود وارد بدن طعمه نموده و موجب فلج آن گردند. از عمده‌ترین ترکیبات یافت‌شده در زهر آن‌ها می‌توان به توکسین‌های پروتئینی، مولکول‌های کوچک زهری، آنزیم‌ها و آمین‌ها اشاره نمود. سفالوتوکسین، اولین بار در سال ۱۹۵۹ از سپیا افیسینالیس استخراج گردید و مشخص شد که دارای اثرات نوروکسیک هستند. مهم‌ترین اعضای خانواده سفالوتوکسین در سرپایان، SE- سفالوتوکسین، آلفا-سفالوتوکسین و بتا- سفالوتوکسین می‌باشند که از این میان،

در بزاق سرپایان یافت می‌شوند و با توالی FXGLMamide در انتهای C به پایان می‌رسند و می‌توانند موجب افت فشار خون و انقباض عضلات سیستم گوارشی در مهره‌داران گردند. مشتقات پپتیدی تاکیکینین‌های یافت شده در مغز سرپایان، دارای سمیت بیشتری نسبت به تاکیکینین‌های ساده می‌باشند. آنزیم‌ها به‌عنوان جزء جدایی‌ناپذیر اغلب زهرها، در ونوم سرپایان نیز حضور دارند. کیتیناز، فسفولیپاز و استیل کولین استراز، مهم‌ترین این آنزیم‌ها در زهر سرپایان می‌باشند. آنزیم‌های کیتیناز با وزن بین ۲۰ تا ۹۰ کیلو دالتون به دو دسته کلی اندوکیتیناز و اگزوکیتیناز تقسیم می‌شوند. اندوکیتینازها، موجب شکستن پلیمر به‌صورت تصادفی شده و مولتیمرهای کم جرمی از گلوکز آمین نظیر کیتوتریوز، کیتوبایوز و دی‌استیل کیتوبایوز ایجاد می‌نمایند. اگزوکیتینازها خود به دو دسته تقسیم می‌شوند؛ کیتوبایوسیداز که موجب آزاد شدن دی‌استیل کیتوبایوز از انتهای غیراحیای پلیمر شده و N-استیل گلوکز آمینیداز که محصولات الیگومری ناشی از اندوکیتینازها را به مونومرهای N-استیل گلوکز آمین می‌شکند. فسفولیپاز A₂ موجب هیدرولیز و جداشدن اسیدهای چرب از موقعیت sn-2 در فسفولیپیدهای غشایی می‌شود. فسفولیپازهای A₂ (PLA₂) شامل ۱۵ گروه بوده و بر اساس آخرین دسته‌بندی به چهار شاخه اصلی فسفولیپازهای ترشحی (sPLA₂)، سیتوزولی (cPLA₂)، مستقل از کلسیم (iPLA₂) و فسفولیپازهای دارای فعالیت استیل هیدرولازی بر روی عامل محرک پلاکت (LpPLA₂) تقسیم می‌شوند. این آنزیم‌ها در متابولیسم چربی و نیز پیشرفت برخی بیماری‌ها و نیز ایجاد اثرات نوروتوکسیک و میوتوکسیک نقش دارند. آنزیم استیل کولین استراز از خانواده سرین هیدرولازها بوده که وظیفه آن کاتالیز واکنش هیدرولیز ناقل عصبی

استیل کولین و تبدیل آن به کولین و گروه استات در سیناپس کولینرژیک است. حضور مقادیر زیاد این آنزیم در ونوم سرپایان می‌تواند موجب به تله افتادن استیل کولین و در نتیجه جلوگیری از تحریک گیرنده‌های موسکارینی و در نهایت افت فشار خون گردد.

بسیاری از آمین‌ها همچون اپی‌نفرین، نوراپی‌نفرین، دوپامین، سروتونین و هیستامین در زهر بسیاری از سرپایان شناسایی شده‌اند و با وجود ایجاد دردهای حاد، اغلب دلیل اصلی اثرات جدی مانند فلج یا مرگ نیستند. یکی از آمین‌هایی که با غلظت زیادی در غده بزاقی *O. vulgaris* یافت شده، اکتاپامین است که در مقادیر بسیار کمتر در سیستم عصبی بی‌مهرگان یافت شده است و به‌نظر می‌رسد که به‌عنوان ناقل عصبی در آن‌ها ایفاء نقش می‌نماید. این آمین در بدن مهره‌داران نیز یافت شده است اما تاکنون عملکردی برای آن تشخیص داده نشده است. سروتونین از دیگر آمین‌های مهم زیستی است که در زهر سرپایان دیده شده است. سروتونین، موجب تحریک عضله صاف و انقباض آن در پستانداران می‌گردد. دوز پائینی از سروتونین موجب اختلال در راه رفتن و از دست رفتن تعادل پاها و نیز عدم تعادل کل بدن خرچنگ‌ها می‌شود.

ترکیبات طبیعی در سرپایان از تنوع بالایی برخوردار بوده که مرکب به‌عنوان یکی از شاخص‌ترین آن‌ها در بسیاری از گونه‌ها دیده می‌شود. مرکب در سرپایان حاوی مقادیر زیادی ملانین است که کاربردهای صنعتی زیادی دارد. مرکب اختاپوس و کاتل فیش توانایی مهار قارچ‌هایی مانند *A. fumigates* و *Fusarium sp.* و سلول‌های سرطانی نظیر HepG2 را از خود نشان داده‌اند. مرکب سپیا بروی‌مانا نیز به‌عنوان عامل ضدباکتری در مقابل باکتری‌های *S. aureus*، *K. pneumoniae*، *E. coli*، *B. subtilis* و *V. cholerae* عملکرد خوبی نشان داده است. همچنین

سرپایان دارای یک سامانه پیچیده پوستی حاوی یک سامانه تولید رنگ ساختاری هستند. این سامانه دارای گویچه‌های نامحلول حاوی پروتئین‌هایی به نام رفلکتین است که مسئول ایجاد طیف بزرگی از رنگ‌ها در این موجودات است. رفلکتین‌ها به صورت اختصاصی تنها در سرپایان یافت شده‌اند.

داده‌های مربوط به توکسین‌ها و ترکیبات زیست‌فعال این زیست‌مندان ارزشمند می‌توانند چارچوبی را برای تحقیقات بیشتر در مورد اثرات بیولوژیک و بیوتکنولوژیک مبتنی بر این ترکیبات را فراهم آورند.

همان‌طور که از این بررسی مشخص گردید اطلاعات زیاد توکسینولوژیک پیشرفته چندان که در خور این جانوران باشد وجود ندارد؛ جای امید است که در جهت رفع این شکاف، یکی از جهت گیری‌های تحقیقات در آینده تمرکز بر توکسینولوژی سفالوپودها صورت پذیرد.

تضاد منافع

هیچگونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

- Hanlon R, Vecchione M, Allcock L. Octopus, Squid, And Cuttlefish: A Visual, Scientific Guide To The Oceans' Most Advanced Invertebrates. Chicago: University Of Chicago Press, 2018.
- Smith MR, Caron JB. Primitive Soft-Bodied Cephalopods From The Cambrian. *Nature* 2010; 465(7297): 469-72.
- Young RE, Vecchione M, Donovan DT. The Evolution Of Coleoid Cephalopods And Their Present Biodiversity And Ecology. *S Afr J Mar Sci* 1998; 20(1): 393-420.
- Gestal C, Pascual S, Guerra Á, et al. Handbook Of Pathogens And Diseases In Cephalopods. Springer, 2019.
- Saunders WB, Landman N. Nautilus: The Biology And Paleobiology Of A Living Fossil. Springer Science & Business Media, 2009.
- Venkatesan V, Mohamed KS. Cephalopod Classification And Taxonomy. Central Marine Fisheries Research Institute, Kochi, 2015.
- Iglesias J, Fuentes L, Villanueva R, Editors. Cephalopod Culture. Springer Science & Business Media, 2014.
- Sasaki TA, Shigeno S, Tanabe KA, Shigeta Y, Hirano H. Anatomy Of Living Nautilus: Reevaluation Of Primitiveness And Comparison With Coleoidea. Cephalopods-Present And Past. Tokai University Press, Tokyo, 2010.
- Von Byern J, Wani R, Schwaha T, et al. Old And Sticky—Adhesive Mechanisms In The Living Fossil Nautilus Pompilius (Mollusca, Cephalopoda). *Zoology* 2012; 115(1): 1-11.
- Saunders WB, Wehman DA. Shell Strength Of Nautilus As A Depth Limiting Factor. *Paleobiology* 1977; 3(1): 83-9.
- Klug C, Landman NH, Fuchs D, et al. Anatomy And Evolution Of The First Coleoidea In The Carboniferous. *Commun Biol* 2019; 2(1): 1-2.
- Doguzhaeva LA, Mapes RH, Mutvei H. The Shell And Ink Sac Morphology And Ultrastructure Of The Late Pennsylvanian Cephalopod Donovaniconus And Its Phylogenetic Significance. *Berliner Paläobiologische Abhandlungen* 2003; 3: 61-78.
- Norman M, Reid A. Guide To Squid, Cuttlefish And Octopuses Of Australasia. CSIRO Publishing, 2000.
- Yang FC, Peters RD, Dies H, Rheinstädter MC. Hierarchical, Self-Similar Structure In Native Squid Pen. *Soft Matter* 2014; 10(30): 5541-9.
- Garcia A. Comparative Study Of The Morphology And Anatomy Of Octopuses Of The Family Octopodidae [dissertation]. Auckland University Of Technology, 2010.
- Lindgren AR, Giribet G, Nishiguchi MK. A Combined Approach To The Phylogeny Of

- Cephalopoda (Mollusca). Cladistics 2004; 20(5): 454-86.
17. Ali SM, Mohammed TA, Mandour AM, et al. Structure Of The Ink Apparatus And The Funnel Organ Of The Squid " *Sepioteuthis Sepioidea*" (Cephalopoda: Loliginidae). Egypt J Zool 2017; 67(67): 35-50.
 18. Xavier JC, Cherel Y. Cephalopod Beak Guide For The Southern Ocean. British Antarctic Survey, 2009.
 19. Xavier JC, Phillips RA, Cherel Y. Cephalopods In Marine Predator Diet Assessments: Why Identifying Upper And Lower Beaks Is Important. ICES J Mar Sci 2011; 68(9): 1857-64.
 20. Villanueva R, Perricone V, Fiorito G. Cephalopods As Predators: A Short Journey Among Behavioral Flexibilities, Adaptions, And Feeding Habits. Front Physiol 2017; 8: 598.
 21. Reich G. A New Peptide Of The Oxytocin/Vasopressin Family Isolated From Nerves Of The Cephalopod *Octopus Vulgaris*. Neurosci Lett 1992; 134(2): 191-4.
 22. West DJ, Andrews EB, Bowman D, et al. Toxins From Some Poisonous And Venomous Marine Snails. Comp Biochem Phys C 1996; 113(1): 1-10.
 23. Ghiretti F. Cephalotoxin: The Crab-Paralysing Agent Of The Posterior Salivary Glands Of Cephalopods. Nature 1959; 183(4669): 1192-3.
 24. Songdahl JH, Shapiro BI. Purification And Composition Of A Toxin From The Posterior Salivary Gland Of *Octopus Dofleini*. Toxicon 1974; 12(2): 109-12.
 25. Key LN, Boyle PR, Jaspars M. Novel Activities Of Saliva From The *Octopus Eledone Cirrhosa* (Mollusca; Cephalopoda). Toxicon 2002; 40(6): 677-83.
 26. Ghiretti F, Libonati M. Research On Cephalotoxin. 1. Extraction And Purification Of The Substance. Soc Ital Biol Sper 1959; 35: 2000-3.
 27. McDonald NM, Cottrell GA. Purification And Mode Of Action Of Toxin From *Eledone Cirrhosa*. Toxicon 1970; 8(2): 142.
 28. Ueda A, Nagai H, Ishida M, et al. Purification And Molecular Cloning Of SE-Cephalotoxin, A Novel Proteinaceous Toxin From The Posterior Salivary Gland Of Cuttlefish *Sepia Esculenta*. Toxicon 2008; 52(4): 574-81.
 29. Wang J, Shen B, Guo M, et al. Blocking Effect And Crystal Structure Of Natrin Toxin, A Cysteine-Rich Secretory Protein From *Naja Atra* Venom That Targets The BKCa Channel. Biochemistry 2005; 44(30): 10145-52.
 30. Cariello L, Zanetti L. Alpha-And Beta-Cephalotoxin: Two Paralysing Proteins From Posterior Salivary Glands Of *Octopus Vulgaris*. Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol 1977; 57(2): 169-73.
 31. Asakawa M, Matsumoto T, Umezaki K, et al. Toxicity and Toxin Composition of the Greater Blue-Ringed Octopus *Hapalochlaena lunulata* from Ishigaki Island, Okinawa Prefecture, Japan. Toxins 2019; 11(5): 245.
 32. Wells MJ. Octopus: Physiology And Behaviour Of An Advanced Invertebrate. Springer Science & Business Media, 2013.
 33. Kawashima Y, Nagashima Y, Shiomi K. Toxicity And Tetramine Contents Of Salivary Glands From Carnivorous Gastropods. Shokuhin Eiseigaku Zasshi 2002; 43(6): 385-388.
 34. Ruder T, Sunagar K, Undheim EA, et al. Molecular Phylogeny And Evolution Of The Proteins Encoded By Coleoid (Cuttlefish, Octopus, And Squid) Posterior Venom Glands. J Mol Evol 2013; 76(4): 192-204.
 35. Freeman SE, Turner RJ. Maculotoxin, A Potent Toxin Secreted By *Octopus Maculosus* Hoyle. Toxic Appl Pharmacol 1970; 16(3): 681-90.
 36. Simon SE, Cairncross KD, Satchell DG, et al. The Toxicity Of *Octopus Maculosus* Hoyle Venom. Arch Int Pharmacodyn Ther 1964; 149: 318-29.
 37. Sutherland SK, Lane WR. Toxins And Mode Of Envenomation Of The Common Ringed Or Blue-Banded Octopus. Med J Aust 1969; 1(18): 893-8.
 38. Croft JA, Howden ME. Chemistry Of Maculotoxin: A Potent Neurotoxin Isolated From *Hapalochlaena Maculosa*. Toxicon 1972; 10(6): 645-51.
 39. Jarvis MW, Crone HD, Freeman SE, et al. Chromatographic Properties Of Maculotoxin,

- A Toxin Secreted By *Octopus* (*Hapalochlaena Maculosa*). *Toxicon* 1975; 13(3): 177-81.
40. Sheumack DD, Howden ME, Spence I, et al. Maculotoxin: A Neurotoxin From The Venom Glands Of The Octopus *Hapalochlaena Maculosa* Identified As Tetrodotoxin. *Science* 1978; 199(4325): 188-9.
41. Gage PW, Dulhunty A. Effects Of Toxin From The Blue-Ringed Octopus (*Hapalochlaena Maculosa*). In: Martin DF, Padilla GM, editors. Chapter III. New York: Marine Pharmacognosy, Academic Press, 1973.
42. Dulhunty A, Gage PW. Selective Effects Of An Octopus Toxin On Action Potentials. *J Physiol* 1971; 218(2): 433-45.
43. Savage IVE, Howden MEH. Hapalotoxin: A Second Lethal Toxin From The Octopus *Hapalochlaena Maculosa*. *Toxicon* 1977; 15(5): 463-6.
44. Goto T, Kishi Y, Takahashi S, et al. Tetrodotoxin. *Tetrahedron* 1965; 21(8): 2059-88.
45. Yasumoto T, Yotsu-Yamashita M. Chemical And Etiological Studies On Tetrodotoxin And Its Analogs. *J Toxicol Toxin Rev* 1996; 15(2): 81-90.
46. Williams BL, Lovenburg V, Huffard CL, et al. Chemical Defense In Pelagic *Octopus Paralarvae*: Tetrodotoxin Alone Does Not Protect Individual Paralarvae Of The Greater Blue-Ringed Octopus (*Hapalochlaena Lunulata*) From Common Reef Predators. *Chemoecology* 2011; 21(3): 131-41.
47. Lago J, Rodríguez LP, Blanco L, et al. Tetrodotoxin, An Extremely Potent Marine Neurotoxin: Distribution, Toxicity, Origin And Therapeutical Uses. *Mar Drugs* 2015; 13(10): 6384-406.
48. Yotsu-Yamashita M, Mebs D, Flachsenberger W. Distribution Of Tetrodotoxin In The Body Of The Blue-Ringed Octopus (*Hapalochlaena Maculosa*). *Toxicon* 2007; 49(3): 410-2.
49. Jacups SP, Currie BJ. Blue-Ringed Octopuses: A Brief Review Of Their Toxicology. *North Territ Nat* 2008; 20: 50-7.
50. Crone HD, Leake B, Jarvis MW, et al. On The Nature Of "Maculotoxin", A Toxin From The Blue-Ringed Octopus (*Hapalochlaena Maculosa*). *Toxicon* 1976; 14(6): 423-6.
51. Suehiro M. Historical Review On Chemical And Medical Studies Of Globefish Toxin Before World War II. *Yakushigaku Zasshi* 1994; 29(3): 428-34.
52. Woodward RB. The Structure Of Tetrodotoxin. *Pure Appl Chem* 1964; 9(1): 49-74.
53. Denac H, Mevissen M, Scholtysik G. Structure, Function And Pharmacology Of Voltage-Gated Sodium Channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000; 362(6): 453-79.
54. Karimi G, Lari P. Tetrodotoxin. *Encyclopedia Of Toxicology*. 3rd ed. Academic Press, 2014, 515-8.
55. Yotsu-Yamashita M, Sugimoto A, Takai A, et al. Effects Of Specific Modifications Of Several Hydroxyls Of Tetrodotoxin On Its Affinity To Rat Brain Membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289(3): 1688-96.
56. Bane V, Lehane M, Dikshit M, et al. Tetrodotoxin: Chemistry, Toxicity, Source, Distribution And Detection. *Toxins* 2014; 6(2): 693-755.
57. Hanifin CT, Yotsu-Yamashita M, Yasumoto T, et al. Toxicity Of Dangerous Prey: Variation Of Tetrodotoxin Levels Within And Among Populations Of The Newt *Taricha Granulosa*. *J Chem Ecol* 1999; 25(9): 2161-75.
58. Yang L, Kao CY. Actions Of Chiriquitoxin On Frog Skeletal Muscle Fibers And Implications For The Tetrodotoxin/Saxitoxin Receptor. *J Gen Physiol* 1992; 100(4): 609-22.
59. Nässel DR, Zandawala M, Kawada T, et al. Tachykinins: Neuropeptides That Are Ancient, Diverse, Widespread And Functionally Pleiotropic. *Front Neurosci* 2019; 13: 1262.
60. Kanda A, Iwakoshi-Ukena E, Takuwa-Kuroda K, et al. Isolation And Characterization Of Novel Tachykinins From The Posterior Salivary Gland Of The Common Octopus *Octopus Vulgaris*. *Peptides* 2003; 24(1): 35-43.
61. Anastasi A, Erspamer V. The Isolation And Amino Acid Sequence Of Eledoisin, The Active Endcapeptide Of The Posterior Salivary Glands Of Eledone. *Arch Biochem Biophys* 1963; 101(1): 56-65.

62. Erspamer V, Anastasi A. Structure And Pharmacological Actions Of Eledoisin, The Active Endecapeptide Of The Posterior Salivary Glands Of Eledone. *Experientia* 1962; 18(2): 58-9.
63. Anastasi A, Erspamer V. Occurrence And Some Properties Of Eledoisin In Extracts Of Posterior Salivary Glands Of Eledone. *Br J Pharmacol Chemother* 1962; 19(2): 326-36.
64. Kanda A, Takuwa-Kuroda K, Aoyama M, et al. A Novel Tachykinin-Related Peptide Receptor Of *Octopus Vulgaris*- Evolutionary Aspects Of Invertebrate Tachykinin And Tachykinin-Related Peptide. *FEBS J* 2007; 274(9): 2229-39.
65. Kini RM. Excitement Ahead: Structure, Function And Mechanism Of Snake Venom Phospholipase A2 Enzymes. *Toxicon* 2003; 42(8): 827-40.
66. Wong ES, Belov K. Venom Evolution Through Gene Duplications. *Gene* 2012; 496(1): 1-7.
67. Hou F, Ma X, Fan L, et al. Enhancement Of Chitin Suspension Hydrolysis By A Combination Of Ultrasound And Chitinase. *Carbohydr Polym* 2020; 231: 115669.
68. Li S, Zhang B, Zhu H, et al. Cloning And Expression Of The Chitinase Encoded By Chikj406136 From *Streptomyces Sampsonii* (Millard & Burr) Waksman KJ40 And Its Antifungal Effect. *Forests* 2018; 9(11): 699.
69. Annamalai N, Rajeswari MV, Vijayalakshmi S, et al. Purification And Characterization Of Chitinase From *Alcaligenes Faecalis* AU02 By Utilizing Marine Wastes And Its Antioxidant Activity. *Ann Microbiol* 2011; 61(4): 801-7.
70. Sahai AS, Manocha MS. Chitinases Of Fungi And Plants: Their Involvement In Morphogenesis And Host-Parasite Interaction. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 11(4): 317-38.
71. Rathore AS, Gupta RD. Chitinases From Bacteria To Human: Properties, Applications, And Future Perspectives. *Enzyme Res* 2015; 2015: 791907.
72. Mohebbi GH, Vatanpour H, Vazirizadeh A, et al. Phospholipase A2 Activity Of The Persian Gulf Upside-Down Jellyfish Venom (*Cassiopea Andromeda*). *Iran South Med J* 2017; 20(3): 287-300. (Persian)
73. Six DA, Dennis EA. The Expanding Superfamily Of Phospholipase A2 Enzymes: Classification And Characterization. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2000; 1488(1-2): 1-19.
74. Scott DL, White SP, Otwinowski Z, et al. Interfacial Catalysis: The Mechanism Of Phospholipase A2. *Science* 1990; 250(4987): 1541-6.
75. Fingerhut LC, Strugnell JM, Faou P, et al. Shotgun Proteomics Analysis Of Saliva And Salivary Gland Tissue From The Common Octopus *Octopus Vulgaris*. *J Proteome Res* 2018; 17(11): 3866-76.
76. Kramer RM, Roberts EF, Manetta J, et al. The Ca2 (+)-Sensitive Cytosolic Phospholipase A2 Is A 100-kDa Protein In Human Monoblast U937 Cells. *J Biol Chem* 1991; 266(8): 5268-72.
77. Ghosh M, Tucker DE, Burchett SA, et al. Properties Of The Group IV Phospholipase A2 Family. *Prog Lipid Res* 2006; 45(6): 487-510.
78. Ackermann EJ, Kempner ES, Dennis EA. Ca (2+)-Independent Cytosolic Phospholipase A2 From Macrophage-Like P388D1 Cells. Isolation And Characterization. *J Biol Chem* 1994; 269(12): 9227-33.
79. Schaloske RH, Dennis EA. The Phospholipase A2 Superfamily And Its Group Numbering System. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2006; 1761(11): 1246-59.
80. Gelb MH, Min JH, Jain MK. Do Membrane-Bound Enzymes Access Their Substrates From The Membrane Or Aqueous Phase: Interfacial Versus Non-Interfacial Enzymes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2000; 1488(1-2): 20-7.
81. Karasawa K, Inoue K. Overview Of PAF-Degrading Enzymes. *Enzymes* 2015; 38: 1-22.
82. Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, et al. Anti-Inflammatory Properties Of A Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase. *Nature* 1995; 374(6522): 549-53.
83. Mohler ER, Ballantyne CM, Davidson MH, et al. The Effect Of Darapladib On Plasma Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity And Cardiovascular Biomarkers In

- Patients With Stable Coronary Heart Disease Or Coronary Heart Disease Risk Equivalent: The Results Of A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(17): 1632-41.
84. Quinn DM. Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, And Virtual Transition States. *Chem Rev* 1987; 87(5): 955-79.
85. Harel M, Quinn DM, Nair HK, et al. The X-Ray Structure Of A Transition State Analog Complex Reveals The Molecular Origins Of The Catalytic Power And Substrate Specificity Of Acetylcholinesterase. *J Am Chem Soc* 1996; 118(10): 2340-6.
86. Bourne Y, Taylor P, Marchot P. Acetylcholinesterase Inhibition By Fasciculin: Crystal Structure Of The Complex. *Cell* 1995; 83(3): 503-12.
87. Welsh JH. Composition And Mode Of Action Of Some Invertebrate Venoms. *Annu Rev Pharmacol* 1964; 4(1): 293-304.
88. Erspamer V, Boretti G. Identification And Characterization, By Paper Chromatography, Of Enteramine, Octopamine, Tyramine, Histamine And Allied Substances In Extracts Of Posterior Salivary Glands Of Octopoda And In Other Tissue Extracts Of Vertebrates And Invertebrates. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1951; 88(3): 296-332.
89. Axelrod J, Saavedra JM. Octopamine. *Nature* 1977; 265(5594): 501-4.
90. David JC, Coulon JF. Octopamine In Invertebrates And Vertebrates. A Review. *Prog Neurobiol* 1985; 24(2): 141-85.
91. Roeder T. Octopamine In Invertebrates. *Prog Neurobiol* 1999; 59(5): 533-61.
92. Viali M, Erspamer V. Ricerche Sul Secreto Delle Cellule Enterocromaffini. *Z Zellforsch Mik Ana* 1937; 27(1): 81-99.
93. Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: A Review. *J Vet Pharmacol Ther* 2008; 31(3): 187-99.
94. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure And Function Of The Brain Serotonin System. *Physiol Rev* 1992; 72(1): 165-229.
95. McPhee MJ, Wilkens JL. Serotonin, But Not Dopamine Or Octopamine, Modifies Locomotor And Phototactic Behavior Of The Crab, *Carcinus Maenas*. *Can J Zool* 1989; 67(2): 391-3.
96. Welsh JH, Moorhead M. The Quantitative Distribution Of 5-Hydroxy-Tryptamine In The Invertebrates, Especially In Their Nervous Systems. *J Neurochem* 1960; 6(2): 146-69.
97. Boyle P, Rodhouse P. Cephalopods: Ecology And Fisheries. John Wiley & Sons, 2008.
98. Solano F. Melanins: Skin Pigments And Much More Types, Structural Models, Biological Functions, And Formation Routes. *New J Sci* 2014; 2014: 498276.
99. Palumbo A. Melanogenesis In The Ink Gland Of *Sepia Officinalis*. *Pigment Cell Res* 2003; 16(5): 517-22.
100. Prota G. Melanins, Melanogenesis And Melanocytes: Looking At Their Functional Significance From The Chemist's Viewpoint. *Pigment Cell Res* 2000; 13(4): 283-93.
101. Orlow SJ, Osber MP, Pawelek JM. Synthesis And Characterization Of Melanins From Dihydroxyindole-2-Carboxylic Acid And Dihydroxyindole. *Pigment Cell Res* 1992; 5(3): 113-21.
102. Derby CD. Cephalopod Ink: Production, Chemistry, Functions And Applications. *Mar Drugs* 2014; 12(5): 2700-30.
103. Castellano I, Seebeck FP. On Ovothiol Biosynthesis And Biological Roles: From Life In The Ocean To Therapeutic Potential. *Nat Prod Rep* 2018; 35(12): 1241-50.
104. Kornprobst JM. Encyclopedia Of Marine Natural Products. John Wiley & Sons, 2014.
105. Petkovic MV. Determination Of The Antimicrobial Activity Of Purified Melanin From The Ink Of *Octopus Mimus* Gould, 1852 (Cephalopoda: Octopodidae). *Lat Am J Aquat Res* 2013; 41(3): 584-7.
106. Mohanraju R, Marri DB, Karthick P, et al. Antibacterial Activity Of Certain Cephalopods From Andamans, India. *Int J Pharm Biol Sci* 2013; 3(2): 450-5.
107. Vennila R, Rajesh Kumar RK, Kanchana S, et al. Investigation Of Antimicrobial And Plasma Coagulation Property Of Some Molluscan Ink Extracts: Gastropods And Cephalopods. *Afr J Biochem Res* 2010; 5(1): 14-21.

108. Fahmy SR, Soliman AM. In Vitro Antioxidant, Analgesic And Cytotoxic Activities Of *Sepia Officinalis* Ink And *Coelatura Aegyptiaca* Extracts. *Afr J Pharm Pharmacol* 2013; 7(22): 1512-22.
109. Hossain MP, Rabeta MS, Husnul Azan T. Medicinal And Therapeutic Properties Of Cephalopod Ink: A Short Review. *Food Res* 2019; 3(3): 188-98.
110. Prota G, Ortonne JP, Voulot C, et al. Occurrence And Properties Of Tyrosinase In The Ejected Ink Of Cephalopods. *Comp Biochem Physiol B* 1981; 68(3): 415-9.
111. Chen S, Xu J, Xue C, et al. Sequence Determination Of A Non-Sulfated Glycosaminoglycan-Like Polysaccharide From Melanin-Free Ink Of The Squid *Ommastrephes Bartrami* By Negative-Ion Electrospray Tandem Mass Spectrometry And NMR Spectroscopy. *Glycoconj J* 2008; 25(5): 481-92.
112. Kamio M, Grimes TV, Hutchins MH, et al. The Purple Pigment Aplysioviolin In Sea Hare Ink Deters Predatory Blue Crabs Through Their Chemical Senses. *Anim Behav* 2010; 80(1): 89-100.
113. Huang F, Yang Z, Yu D, et al. *Sepia* Ink Oligopeptide Induces Apoptosis In Prostate Cancer Cell Lines Via Caspase-3 Activation And Elevation Of Bax/Bcl-2 Ratio. *Mar Drugs* 2012; 10(10): 2153-65.
114. Zhong JP, Wang G, Shang JH, et al. Protective Effects Of Squid Ink Extract Towards Hemopoietic Injuries Induced By Cyclophosphamine. *Mar Drugs* 2009; 7(1): 9-18.
115. Mäthger LM, Denton EJ, Marshall NJ, et al. Mechanisms And Behavioural Functions Of Structural Coloration In Cephalopods. *J R Soc Interface* 2009; 6(Suppl 2): S149-S163.
116. Cai T, Han K, Yang P, et al. Reconstruction Of Dynamic And Reversible Color Change Using Reflectin Protein. *Sci Rep* 2019; 9(1): 1-11.
117. Doucet SM, Meadows MG. Iridescence: A Functional Perspective. *J R Soc Interface* 2009; 6(Suppl 2): S115-S132.
118. Crookes WJ, Ding LL, Huang QL, et al. Reflectins: The Unusual Proteins Of Squid Reflective Tissues. *Science* 2004; 303(5655): 235-8.
119. Guan Z, Cai T, Liu Z, et al. Origin Of The Reflectin Gene And Hierarchical Assembly Of Its Protein. *Curr Biol* 2017; 27(18): 2833-42.

Review Article

Toxinology of Cephalopods: A Review Article

GH. Mohebbi (PhD)^{1*}, A. Maryamabadi (PhD)^{1**}

¹ *The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran*

(Received 31 May, 2021

Accepted 4 Aug, 2021)

Abstract

Most cephalopods are venomous organisms whose major venom constituents include protein toxins, small toxic molecules, enzymes, and amines. Neurotoxic cephalotoxins are protein toxins that were first isolated from this family. They are categorized into SE-cephalotoxins, α -cephalotoxins, and β -cephalotoxins. The SE-cephalotoxin compound is roughly a thousand-fold more toxic than other members of the group. Among the small toxic molecules, tetrodotoxins and tachykinins can be mentioned. Salivary tachykinins of cephalopods can cause severe hypotension and contraction of gastrointestinal muscles in vertebrates. The peptide derivatives of tachykinins in the cephalopod brains have more toxic effects than the simple tachykinins. Chitinases, phospholipases and acetylcholinesterase are the most important integral components of the cephalopod venom. Phospholipase A₂ plays an important role in fat metabolism, in the progression of some diseases, as well as the neurotoxic and myotoxic effects of the venom. Acetylcholinesterase inhibits the stimulation of muscarinic receptors. In addition to epinephrine, norepinephrine, dopamine, serotonin, and histamine, one of the most abundant amines found in octopus saliva is "octopamine". The inks of many species of cephalopods contain significant amounts of melanin, which, in addition to biotechnological applications, have antifungal, antibacterial and anti-cancer effects. Insoluble globules of the complex skin system of cephalopods contain proteins called "reflectin", which are responsible for producing a wide range of colors. Reflectins are exclusively found in cephalopods. In fact, the existing toxinological and biotechnological studies of the venom of this marine life are not commensurate with their diversity as well as their unique composition, and more efforts are needed to succeed in this field.

Keywords: Cephalopods, Cephalotoxins, Tetrodotoxin, Octopamine, Melanin, Reflectin

©Iran South Med J.All right reserved

Cite this article as: Mohebbi GH, Maryamabadi A. Toxinology of Cephalopods: A Review Article. *Iran South Med J* 2021; 24(4): 265-299

Copyright © 2021 Mohebbi et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

****Address for correspondence:** The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran. Email: ammar@pgu.ac.ir

*ORCID: 0000-0003-3393-702X

**ORCID: 0000-0002-0427-0978

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>