

مقایسه ساختار دستگاه تولید سم حلزون مخروطی (*Conus textile*) با استفاده از رنگ آمیزی HE و HEG

فریال منصف^۱، صابر خدابنده^{۲*}، ایرج نبی پور^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۳- استاد، پژوهشکده علوم زیست‌فناوری دریایی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی، بوشهر

دریافت: ۹۲/۰۸/۱۸ پذیرش: ۹۳/۰۴/۲۹

* نویسنده مسئول مقاله: surp78@gmail.com

چکیده:

حلزون‌های دریایی از جنس *Conus* یکی از سمی‌ترین جانوران گوشت‌خوار دریایی در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری محسوب شده که به دلیل ترکیبات دارویی استخراج شده از سموم آن‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. برای بررسی ساختار دستگاه تولید سم با دو روش رنگ‌آمیزی، ۱۲ عدد از گونه *C. textile* از جزیره قشم جمع‌آوری شده و پس از تثبیت در بوئن، درون الکل به آزمایشگاه منتقل شدند. با شکستن صدف دستگاه تولید سم جدا و قسمت‌های مختلف آن پس از قالب‌گیری و برش، با دو روش رنگ‌آمیزی شامل هماتوکسیلین-ائوزین (HE) و هماتوکسیلین-ائوزین-گرین لایت (HEG) رنگ شده و عکس‌برداری شدند. بررسی با لوپ نشان داد که اندام تولید سم شامل بخش تولید سم، بخش انتقال و تزریق سم است. بخش اول شامل حباب سم و مجرای سم و بخش دوم شامل کیسه رادولا و خرطوم بود. مقاطع رنگ شده به هر دو روش رنگ‌آمیزی نشان داد که حباب سم، دارای فیبرهای ماهیچه‌ای بوده و در وسط، مجرای دارد که دارای یک ردیف سلول پوششی است. دیواره مجرای سم از ۳ بخش، شامل لایه خارجی عضله‌ای و لایه داخلی که از سلول‌های اپیتلیالی استوانه‌ای با هسته قاعده‌ای و لومن تشکیل شده‌اند. مقایسه لام‌های رنگ‌آمیزی شده با HEG نشان داد که اجزای سیتوپلاسمی و هسته سلول‌ها خیلی واضح‌تر بوده و به‌خصوص گرانول‌ها به راحتی قابل شمارش و حتی بیومتری هستند. اگرچه روش متداول برای رنگ‌آمیزی یعنی HE به خوبی بخش‌های مختلف غده را نشان می‌دهد، اما به نظر می‌رسد روش HEG علاوه بر تمییز بخش‌های مختلف بافتی، روش مناسبی برای بررسی نقش این اندام در تولید کونوتوکسین‌ها به شکل گرانول‌های ترشحی باشد.

کلید واژگان: کونوس، غده سم، جزیره قشم، هماتوکسیلین-ائوزین، گرین لایت

مقدمه

به طور کلی سلسله جانوران شامل بیش از ۱۰۰۰۰۰ گونه سمی است که در بین شاخه‌های بزرگی مانند طناب‌داران (خزندگان، ماهی‌ها، دوزیستان و پستانداران)، خارپوستان (ستاره‌های دریایی، توتیاها)، نرم‌تنان (حلزون‌های مخروطی، هشت پاها)، کرم‌های حلقوی (زالوها)، کرم‌های روبانی، بندپایان (عنکبوتیان، حشرات، هزارپایان) و کیسه‌تنان (شقایق‌های دریایی، ژله ماهی‌ها و مرجان‌ها) قرار دارند. سم این موجودات اغلب مایعات زیستی بسیار غلیظی هستند که برای خود جانور مزایایی از جمله توانایی ناتوان ساختن طعمه، هضم کارآمد طعمه و دفاع در برابر شکارچیان را دارد (Favreau and Stöcklin, 2009).

حلزون‌های دریایی شکارگر از جنس *Conus*، به دلیل راهبردهای بسیار تکامل یافته شکار که از توکسین‌های پپتیدی با تعداد محدود اسید آمینه برای فلج کردن طعمه استفاده می‌کنند، به مدت طولانی مورد توجه بوده‌اند. سموم این جانوران به کونوتوکسین^۱ یا کونوپپتید^۲ معروف‌اند (Terlau and Olivera, 2004; Olivera, 2006).

کونوتوکسین‌ها، نوروکسین^۳ هستند که با داشتن سم مؤثر بر دستگاه عصبی، کانال‌های خاصی را در سیستم عصبی شکار بلوکه می‌کنند. وقتی این کانال‌ها بلوکه شدند، ارتباط در سیستم عصبی متوقف و این عمل باعث فلج شکار می‌شود و بر اساس نوع حلزون، توکسین ممکن است انواعی از فلجی را باعث شود (Olivera, 2002; Safavi-Hemami et al., 2011). مطالعات نشان داده است که فرایند تولید سم در یک مجرای پیچ خورده اتفاق می‌افتد؛ قسمت ابتدایی این مجرا به یک حباب عضلانی

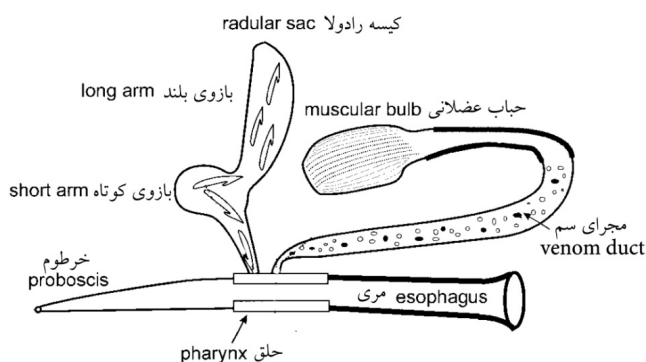
مجهر شده است و بخش انتهایی مجرای تولید سم، در ابتدای مرز بین حلق با مری وارد حلق می‌شود (شکل ۱) (Edean and Duchemin, 1967; Songdahl, 1970; Marshall et al., 2002). کیسه رادولا یک بازوی بلند و یک بازوی کوتاه دارد که دندان‌ها در بازوی بلند ساخته و دندان‌های بالغ در بازوی کوتاه ذخیره می‌شوند و لومن آن‌ها به مرز بین حلق با مری در نزدیکی مجرای تولید سم باز می‌شود (Marsh, 1977). اگرچه مطالعات متعددی روی ساختار اندام تولید سم در گونه‌های مختلف حلزون دریایی انجام گرفته، ولی هنوز در خصوص نقش بخش‌های مختلف این اندام در ساخت، رسیدگی و ذخیره سم اختلاف نظرهایی وجود دارد.

با توجه به کم بودن اطلاعات بنیادی در خصوص حلزون‌های مخروطی خلیج فارس و اهمیت نتایج بافت‌شناسی در شناخت مکان‌ها و مراحل ساخت کونوپپتیدها در اندام تولید سم این آبزیان، به‌کارگیری روش‌های جدید در بررسی ساختار اندام تولید سم در این جانوران لازم است. در این خصوص در حلزون‌های مخروطی خلیج فارس و همچنین با استفاده از روش HEG در رنگ‌آمیزی بخش‌های مختلف اندام سم در حلزون‌های مخروطی جهان، اطلاعاتی یافت نشد بنابراین در تحقیق حاضر تلاش شد ساختار اندام تولید سم در گونه *C. textile* با دو روش HE و HEG بررسی شود.

۱. Conotoxin

۲. Conopeptide

۳. Neurotoxin



شکل ۱ صورت نمادین از دستگاه تولید سم حلزون مخروطی (Marshall et al., 2002)

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه برداری حلزون‌های مخروطی در منطقه سینما دریای جزیره قشم انجام گرفت. در زمان نمونه برداری (در زمستان ۱۳۹۱) سواحل جزرو مدی این ناحیه غنی از گونه‌های مختلف جانوری از جمله کونوس‌ها بودند.

تعداد ۱۲ نمونه هم اندازه از گونه *C. textile* در زمان جزر کامل جمع‌آوری شده و به‌طور کامل در بوئن به مدت ۲۴ ساعت تثبیت شدند. سپس نمونه‌ها به اتانول ۷۰ درصد انتقال داده شده و به آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند.

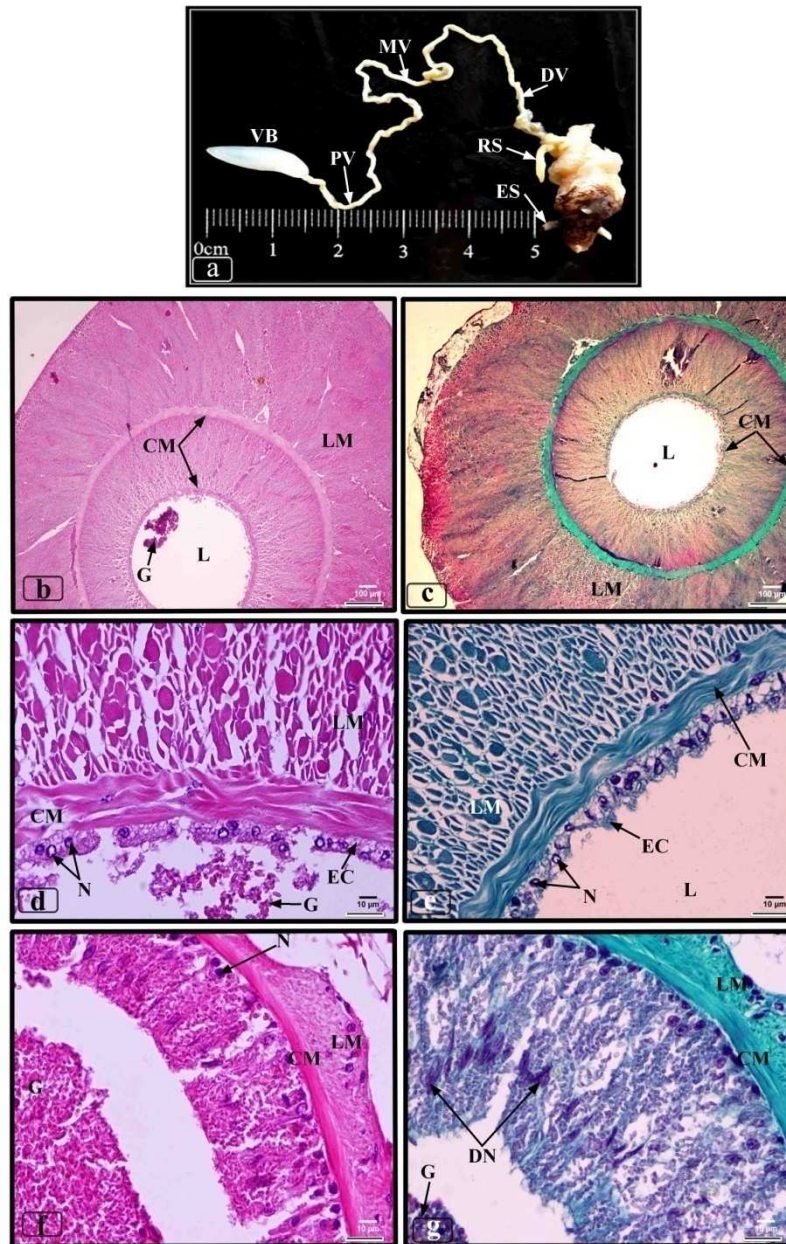
آزمایش‌های بافت‌شناسی

ابتدا صدف حلزون‌ها با گیره آهنی شکسته و جانور با دقت تشریح و اندام تولید سم به‌طور کامل جدا گردید و با لوپ و دوربین عکس برداری شد. برای مطالعات بافت‌شناسی، مراحل آبگیری از اندام تولید سم به‌وسیله سری افزایشی الکل اتانول و در نهایت با بوتانول (۶ ساعت) انجام شد و با حلال آلی زایلن شفاف‌سازی شده، در سری پارافین مایع، پارافینه و قالب‌گیری با پارافین مرک انجام شد. برای اطمینان از تمیزی لام‌ها، ابتدا آن‌ها را ۲۴ ساعت در محلول ۹۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۰ درصد به اضافه ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک قرار دادند و سپس با آب مقطر شستشو داده و به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک کردند. از نمونه‌های قالب‌گیری شده با استفاده از میکروتوم مدل Microds4055

برش‌های ۳-۴ میکرومتری تهیه گردید و به روش HE و HEG رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری مدل Nikon3200 مطالعه و با دوربین OlympusDP72 عکس‌برداری شدند (Martoja and Martoja-Pierson, 1967; Ghanizadeh and Khodabandeh, 2010). از هر نمونه یک قالب پارافینی و در مجموع ۱۲ قالب تهیه و از هر قالب حدود ۱۰۰ لام تهیه شد. برای به‌دست آوردن نتایج طولی، در ۵۰ مقطع طول سلول‌ها اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها استفاده شد. تصاویر تهیه شده و نتایج مربوط به طول با استفاده از نرم‌افزار Image J مطالعه شدند. مطالعه مورفولوژیک و شناسایی گونه با توجه به کلیدهای شناسایی معتبر صورت گرفت (Bosch et al., 1995; Linder, 1999).

نتایج

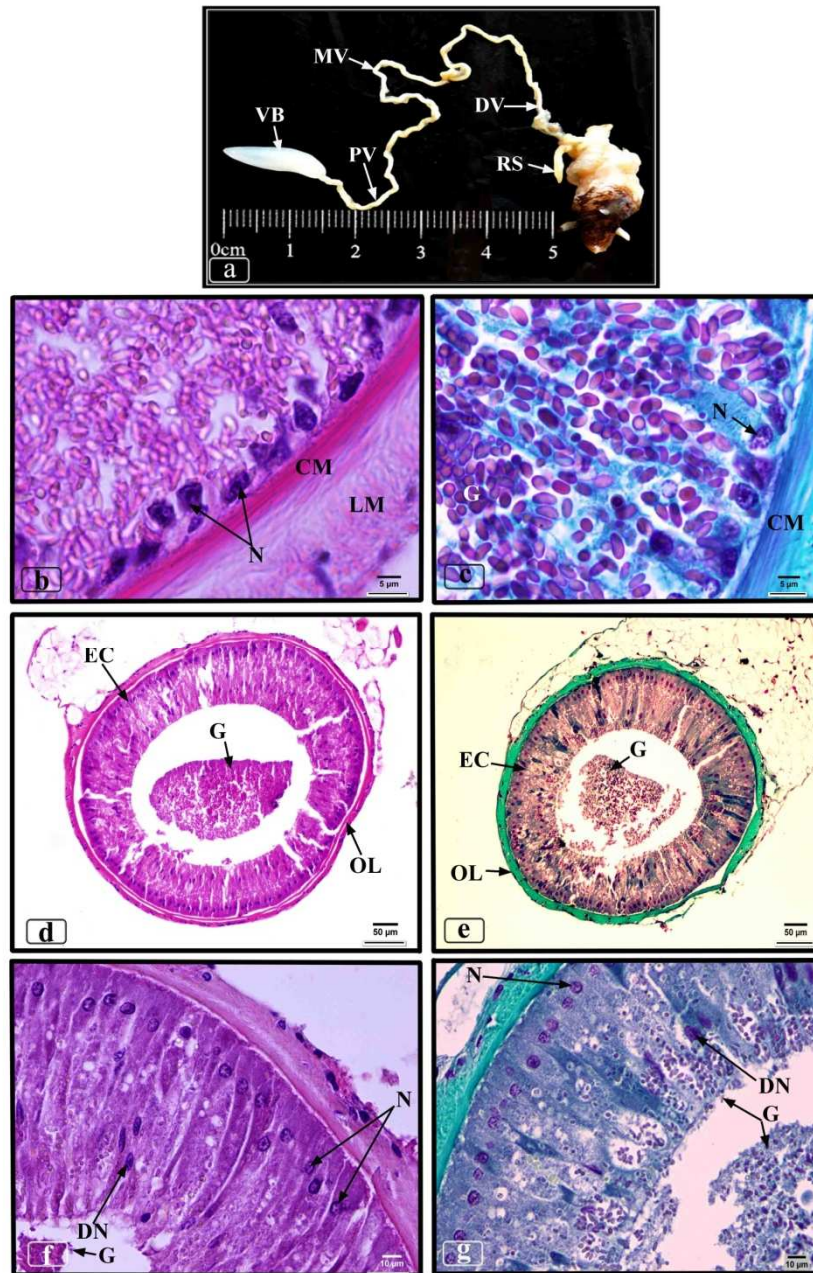
تشریح اندام تولید سم نشان داد ساختار خارجی دستگاه تولید سم در این گونه از سه بخش اصلی تشکیل شده است: (۱) حباب سم که ساختار حبابی یا لامپ مانند و به نسبت شفاف دارد و در نمونه‌هایی با میانگین طول صدف ۶ سانتی‌متر، حدود ۱۵ میلی‌متر است؛ (۲) مجرای سم که قسمت اعظم دستگاه تولید سم را تشکیل داده و به‌صورت مجرای پیچ‌خورده و کرم رنگ و به طول تقریبی ۱۰ سانتی‌متر است و (۳) حلق که در انتهای دستگاه تولید سم قرار دارد و در محل اتصال حلق با مجرای تولید سم، کیسه‌ای به طول تقریبی ۵ میلی‌متر به نام رادولا قرار گرفته است (شکل ۲-a).



شکل ۲ تصاویری از دستگاه تولید سمویرش‌های عرضی حباب سم و قسمت ابتدایی مجرای سم در *C. textile* به روش HE و HEG (a) دستگاه تولید سم، که حباب سم (VB) و قسمت ابتدایی مجرای سم (PV) در آن قابل مشاهده است. b,c: برش عرضی حباب سم که لایه‌هایی عضلات طولی و حلقوی در آن قابل مشاهده است (4x). d,e: برش عرضی حباب سم که در آن لایه عضلات حلقوی، طولی و سپس داخلی‌ترین لایه و گرانول‌ها دیده می‌شوند (40x). f,g: برش عرضی مجرای سم در قسمت ابتدایی که در آن سلول‌های ترشحی و هسته‌های جدا شده به وسیله ترشح هولوکرین به‌خصوص در روش HGE (g) دیده می‌شوند (40x). CM: ماهیچه حلقوی، EC: سلول اپیتلیالی، DN: هسته‌های جدا شده، ES: ساقه چشمی G: گرانول سم، L: لومن، LM: ماهیچه طولی، MV: قسمت میانی مجرای سم، N: هسته، P: خرطوم، RS: کیسه رادولا.

اپیتلیالی ستونی بلند با هسته‌های قاعده‌ای کروی قرار گرفته است (شکل ۳). گرانول‌ها هم در سلول‌های تولیدکننده آن‌ها (سلول‌های ستونی) و هم در لومن مجرا به تعداد زیاد مشاهده شدند که در رنگ‌آمیزی با روش HEG، رنگ این گرانول‌ها از سلول‌های اپیتلیالی متفاوت بوده (گرانول‌ها به رنگ صورتی و سلول‌ها به رنگ سبز دیده شدند)، و مشخص‌تر از روش HE (گرانول‌ها و سلول‌ها هر دو به رنگ صورتی هستند)، قابل مشاهده‌اند. همچنین در روش HEG مرز اطراف گرانول‌ها بسیار قابل تشخیص‌تر و به‌راحتی قابل اندازه‌گیری و بیومتری است. در طول سلول‌های ستونی تعداد زیادی هسته جدا شده وجود دارد که کاملاً از شکل دایره‌ای خارج و به شکل کشیده درآمده‌اند. طول سلول‌های ستونی ترشح‌کننده سم حدود ۱۰۰ میکرون و بیش از دو سوم قطر مجرای سم (حدود ۱۲۰ میکرون) است (۳- e و d). همان‌طور که در تصاویر نیز مشاهده می‌شود، در برش‌هایی که با روش HEG رنگ‌آمیزی شده‌اند، هسته‌های سلول‌های اپیتلیالی و همچنین لایه عضلانی حباب سم و مجرای سم بسیار واضح‌تر هستند (۳- g و e).

بررسی تصاویر برش‌های بخش‌های مختلف این اندام با میکروسکوپ نوری نشان داد که حباب سم از عضلات طولی و حلقوی تشکیل شده است؛ به این ترتیب که از خارج به داخل طولی-حلقوی-طولی-حلقوی است. مقطع عرضی لومن در حباب سم دایره‌ای شکل بود (شکل‌های ۲- B و C) و در آخرین لایه از حباب سم به سمت لومن یک ردیف سلول اپیتلیالی تقریباً مربعی با هسته‌های به نسبت درشت به قطر متوسط ۵ میکرومتر دیده شد که این هسته‌ها بیش از نیمی از طول سلول‌ها را اشغال کرده‌اند و در برخی مقاطع گرانول‌های حاوی سم در لومن حباب سم نیز دیده شدند (شکل ۲- e). بیشترین بخش حباب سم را عضلات طولی تشکیل داده و عضلات حلقوی به صورت دو نوار روشن‌تر از بقیه‌ی قسمت‌ها قابل تشخیص‌اند (شکل‌های ۲- B و C). دیواره‌ی خارجی مجرای سم نیز مانند حباب سم عضلانی بوده و از عضلات طولی و حلقوی به همراه بافت همبند، تشکیل می‌شود. لایه داخلی (حلقوی) به قطر تقریبی ۴ میکرون تقریباً یک سوم لایه خارجی (طولی) است که ضخامتی حدود ۱۲ میکرون دارد و به‌خوبی در تصاویر مشخص است (شکل‌های ۲- g و f). پس از دیواره یک ردیف سلول



شکل ۳ تصاویری از دستگاه تولید سم و برش‌های عرضی مجرای سم در قسمت میانی و انتهایی در *C. textile* به روش HE و HEG. a: دستگاه تولید سم که قسمت میانی (MV) و انتهایی مجرای (DV) سم در آن قابل مشاهده است. b, c: برش عرضی قسمت میانی مجرای سم که در آن سلول‌های استوانه‌ای و گرانول‌های موجود در آن به‌خصوص در تصویر c (روش HEG) قابل مشاهده است (40x). d, e: برش عرضی مجرای سم در قسمت انتهایی که در آن لایه خارجی، سلول‌های اپیتلیالی و هسته‌های آن‌ها به‌ویژه در تصویر e دیده می‌شوند (10x). f, g: برش عرضی بخش انتهایی مجرای سم که در آن لایه عضلات حلقوی، طولی و سلول‌های استوانه‌ای و هسته‌های آن‌ها در قاعده سلول‌ها و گرانول‌ها به‌ویژه در تصویر g (به دلیل تفاوت رنگ گرانول‌ها با سلول) و همچنین هسته‌های جدا شده به‌وسیله ترشح هولوکترین در آن دیده می‌شوند (40x). CC: سلول استوانه‌ای، CM: ماهیچه حلقوی، DN: هسته‌های جدا شده، EC: سلول اپیتلیالی، G: گرانول سم، L: لومن، LM: ماهیچه طولی، N: هسته، OL: لایه خارجی، PV: ابتدای مجرای سم.

بحث

سلول‌های اپیتلیالی و هسته قاعده‌ای آن‌ها و گرانول‌های سم که در سلول‌ها و لومن مجرا و حباب سم قابل مشاهده‌اند و همچنین شکل و قرارگیری فیبرهای ماهیچه‌ای در حباب سم و مجرای سم، با کار Shaw که در سال ۱۹۱۴ بافت‌شناسی گونه‌های *C. tulipa* و *C. Textile* را بررسی کرد، مطابقت دارد. تعداد زیاد گرانول‌های سم در سلول و لومن مجرای سم و همچنین هسته‌های درشت آن‌ها نشان‌دهنده فعالیت ترشحی بسیار زیاد سلول‌های آن‌ها است و مطالعاتی را Marshall و همکاران در سال ۲۰۰۲ بر روی گونه‌ی *C. californicus* با میکروسکوپ الکترونی انجام دادند و در بخش‌هایی از مجرای سم، میتوکندری‌های زیادی که انرژی کافی برای فعالیت‌های ترشحی سلول را فراهم می‌کردند، مشاهده شد.

گرانول‌ها در سلول‌های مختلف با مسیرهای مشخصی ساخته می‌شوند که در این مسیر از قسمت‌های مختلف سلول مانند شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی عبور کرده و به وسیله لیزوزوم‌ها بالغ‌تر شده و در نهایت از سلول خارج می‌شوند که در سلول‌های مختلف به روش‌های متفاوتی مانند هلوکرین، مروکرین، آپوکرین، اگزوکرین، آنوکرین انجام می‌شوند (Guyton, 2006)، همان‌طور که در برش‌های عرضی سرتاسر مجرای سم مشاهده می‌کنید، هسته‌های جدا شده در میانه سلول‌ها به تعداد زیاد وجود دارد (۲-g و ۳-f) که نشان‌دهنده ترشح هولوکرین در این سلول‌هاست. این نتیجه را در گذشته Marshall و همکاران در سال ۲۰۰۲ و همچنین Safavi-Hemami و همکاران در سال ۲۰۱۰ در سه گونه‌ی مختلف هم گزارش داده بودند.

در این بررسی، بخش‌های مختلف سلول در برش‌هایی که با روش HEG رنگ‌آمیزی شده بودند، قابل تشخیص‌تر از روش HE بود که البته این تفاوت در دو روش رنگ‌آمیزی به‌خصوص در گرانول‌ها بسیار مشهود است. به این ترتیب،

در گذشته با مطالعه‌ای که shaw بر روی گونه‌های *C. textile* و *C. tulipa* انجام داد، اعلام کرد که سم در حباب سم تولید می‌شود. پس از آن Hinegardner در سال ۱۹۵۷ در بررسی خود اعلام کرد که حباب سم از مایعی پر شده که این مایع فشار لازم برای خارج کردن سم از دستگاه تولید سم را تأمین می‌کند. در سال ۲۰۱۰، Safavi-Hemami و همکاران در تحقیقی بر روی گونه‌های *Conus novaehollandiae* و *C. victoriae*، نقش حباب سم را بررسی کردند که در آن به دلیل میزان فراوان اکتین و میوزین در حباب سم که در ماهیچه‌های حرکتی وجود داشت و شباهت این عضلات با عضلات متل^۴ اسکوئید^۵، نقش پمپ عضلانی را برای حباب سم پیشنهاد کردند. همان‌طور که در تصاویر مشاهده شد، حباب سم به‌عنوان قسمت ابتدایی دستگاه تولید سم حلزون مخروطی دارای عضلات طولی و حلقوی به‌همراه بافت پیوندی و یک ردیف سلول به‌نسبت مربع شکل در قسمت وسط خود به سمت لومناست. هسته‌های این سلول‌ها نسبتاً درشت بوده و بیش از نیمی از طول سلول را اشغال کرده است و به نظر می‌رسد که کاملاً فعال بوده و ترشح داشته باشند. از آنجایی که ترتیب قرارگیری عضله و شکل قرارگیری سلول‌های لایه داخلی حباب سم مشابه مجرای سم است، به نظر می‌رسد این سلول‌ها تحلیل رفته سلول‌های ستونی باشند و ممکن است در گذشته مانند سلول‌های ترشحی مجرای سم، نقش ترشح سم را داشتند؛ اما به مرور زمان این نقش در آن‌ها کم‌رنگ شده ولی از بین نرفته و با رشد عضلات طولی و حلقوی، وظیفه کمک به خروج سم در زمان شکار یا دفاع را نیز به‌عهده گرفته‌اند. شکل استوانه‌ای کشیده

۴. mantle

۵. squid

منابع

Bosch, D. T., Dance, S. P., Moolenberk, R. G. and Oliver, P. G. 1995. Seashells of eastern Arabia. Motivate Publishing, pp 296.

Endean, R. and Duchemin, C. 1967. The Venom Apparatus of *Conus magus*. *Toxicon*, 4(4): 275-278.

Favreau, P. and Stöcklin, R. 2009. Marine Snail Venoms: Use and Trends in Receptor and Channel Neuropharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(5): 594-601.

Ghanizadeh, E. and Khodabandeh, S. 2010. Effects of Ultraviolet Radiation on Skin Structure and Ultrastructure in Caspian Sea Salmon, *Salmo trutta Caspius*, During Alevin Stage. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92(5): 903-914.

Guyton, A. C. and Hall, J.E. 2006. Textbook of Medical Physiology. *Elsevier Sounder*, International Edition, ISBN: 0-8069-0240-1 45-56.

Hinegardner, R. T. 1957. The Venom Apparatus of the Cone Shell. *Hawaii Med, J.* 17: 533-536.

Linder, G. 1999. Guide des Coquillages Marins. Delachaux and Niestlé- Lausanne SUISSE, pp316.

Marsh, H. 1977. The Radular Apparatus of *Conus*. *Journal of Molluscan Studies*, 43: 1-11.

Marshall, J., Kelley, W. P., Rubakhin, S. S., Bingham, J. P., Sweedler, J. V. and Gilly, W. F. 2002. Anatomical Correlates of Venom Production in *Conus californicus*. *The Biological Bulletin*, 203(1): 27-41.

Martoja, R. and Martoja-Pierson, M. 1967. Initiation Aux Techniques de l Histologie Animale. *Paris Masson et Cie*, 345.

Olivera, B. M. 2002. *Conus* Venom Peptides: Reflections from the Biology of Clades and Species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25-47.

Olivera, B. M. 2006. Handbook of Biologically Active Peptides (chapter 55: *Conus* snail venom peptides). *Elsevier*, 381-388.

Safavi-Hemami, H., Young N. D., Williamson N. A. and Purcell A. W. 2010. Proteomic Interrogation of Venom Delivery in Marine Cone Snails, Novel Insights into the Role of the Venom Bulb. *Journal of Proteome Research*, 9: 5610-5619.

گرانول‌هایی که با روش HEG رنگ‌آمیزی شده بودند به دلیل اینکه رنگ‌شان متفاوت با بافت اطراف بوده، بسیار واضح و مرز کاملاً مشخصی دارد که برای مطالعات بیومتری و دیگر مطالعات که در آن شمارش و اندازه‌گیری این گرانول‌ها برای مشاهده بلوغ گرانول‌ها یا تفاوت اندازه آن‌ها در گونه‌های مختلف انجام می‌گیرد، می‌تواند استفاده شود.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ساختار کلی دستگاه تولید سم از سه قسمت اصلی حباب سم، مجرای سم و کیسه رادولا تشکیل شده است. حباب سم دارای ماهیچه‌های طولی و عرضی است و یک ردیف سلول در داخلی‌ترین لایه آن به سمت لومن قرار دارد که در این گونه به نظر می‌رسد نقش ترشحی نیز داشته باشند. مجرای سم دارای سلول‌های استوانه‌ای کشیده با هسته‌های درشت قاعده‌ای است که گرانول‌های فراوانی در درون خود دارد. در درون لومن مجرای سم نیز تعداد زیادی گرانول وجود دارد که به وسیله ترشح هولوکترین جدا شده‌اند. در برش‌هایی که با روش HEG رنگ‌آمیزی شده بودند، گرانول‌های سم و هسته سلول‌ها مشخص‌تر از برش‌هایی هستند که به تنهایی با روش HE رنگ‌آمیزی شدند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در آزمایشگاه دانشگاه تربیت مدرس (دانشکده علوم دریایی نور) و با مشارکت پژوهشکده علوم زیست فناوری دریایی خلیج فارس در بوشهر انجام شده است. از تمام مسئولان و کارکنان آزمایشگاه دانشگاه تربیت مدرس و همکاران از پژوهشکده علوم زیست فناوری دریایی خلیج فارس و همچنین از خانواده محترم ملاحی بابت کمک‌های بی‌دریغ‌شان بسیار سپاسگزاریم.

Songdahl, J. H. 1970. The Venom and Venom Apparatus of The Atlantic cone, *Conus spuriusatlanticus* (Clench). *Bulletin of Marine Science*, Sci. 23: 600–612.

Terlau, H. and Olivera, B. M. 2004. *Conus* Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides. *Physiological Reviews*, 84(1): 41-68.

Safavi-Hemami, H., Siero, W. A., Gorasia, D. G., Young, N. D., MacMillan, D., Williamson, N. A. and Purcell, A. W. 2011. Specialisation of the Venom Gland Proteome in Predatory Cone Snails Reveals Functional Diversification of the Conotoxin Biosynthetic Pathway. *Journal of Proteome Research*, 3904–3919.

Shaw, H. Q. 1914. On the Anatomy of *Conustulipa*Linn., and *Conus textile* Linn. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, Sci. 60: 1–60.



A comparative study of venom apparatus structure in cone snail (*Conus textile*) by Hematoxylin-Eosin and Greenlight

Ferial Monsef¹, Saber Khodabandeh^{2*} and Iraj Nabipour³

1- M.Sc. graduated of marine biology, faculty of marine sciences, Tarbiat Modares University, Noor.

2- Associate Prof., department of marine biology, faculty of marine sciences, Tarbiat Modares University, Noor.

3- Institute of Persian Gulf marine biotechnology, University of Medical Sciences, Booshehr.

Received: 09/11/2013

Accepted: 20/07/2014

* Corresponding author: surp78@gmail.com

Abstract:

Cone snails of the genus *Conus* are one of the most toxic species of carnivorous marine invertebrates in tropical and subtropical areas. They are highly regarded, due to their medicinal compounds, which derived from their toxins. In order to examine the venom apparatus structure, 12 specimens of *C. textile* were collected from the coastal zone of Gheshm Island and then they fixed in Bouin's for 48 hours and transferred to laboratory in ethanol. After breaking of shellfish, the venom apparatus were isolated and their different parts (after molding and cutting) were stained by HE and HEG and photographed by Nikon microscope. The stereomicroscope observation showed that the venom apparatus was included: (1) toxin production part (venom duct), (2) toxin transmission part (venom bulb), and (3) injection part (radula and propocis). Photographs of sections showed that the venom bulb was completely muscular, consisting of longitudinal and transverse muscle fibers, and in their middle part a channel with epithelial cells was observed. Venom duct walls composed of 3 parts including the outer layer of muscle an inner layer of columnar epithelial cells with basal nucleus and the inner lumens which filled by the granules. HEG stained slides showed a much sharper cytoplasmic and nuclear implementation, particularly granules containing toxins were easily countable and measurable. Although the conventional HE staining method clearly showed different parts of the gland, but HEG method in addition to distinguishing different sections of tissue, seemed to be a suitable technique for studying the role of different parts of the organ in producing conotoxin in the form of secretory granules.

Keywords: *Conus*, Gheshm Island, *C. textile*, HE, HEG.