

آنالیز بیوانفورماتیکی کونوتوکسین در گونه های مختلف حلزون مخروطی (کونوس)

۱- فاطمه رجائی ۲- مجتبی رنجبر ۳- رشید علیجانی اردشیر

۱- دانشجو کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، دانشکده زیست فناوری

۲- دانشیار دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، دانشکده زیست فناوری

۳- استادیار دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، دانشکده زیست فناوری

(نویسنده اول): ft.rejaei@ausmt.ac.ir

(نویسنده دوم): ranjbarf@ausmt.ac.ir

(نویسنده سوم): r.alijani@ausmt.ac.ir

چکیده

امروزه توجه ویژه ای به پپتیدهای طبیعی ضد درد منحصر به فردی به نام کونوتوکسین شده که از نوعی نرم تن دریایی به نام کونوس به دست می آید. به منظور تولید آن ها در مهندسی ژنتیک، ویژگی های تکاملی، ساختاری و فیزیوشیمیایی کونوتوکسین ها بررسی می شود. نتایج نشان داد بیشترین پایداری با شاخص ناپایداری ۱۴/۶۲ مربوط به کونوتوکسینی از گونه *Conus magus* می باشد که مناسب ترین کونوتوکسین برای تولید و کاربرد های دارویی است. از ساختار دوم این پروتئین ها ساختار α helix و Random coil درصد بیشتری را دارند. بر اساس بررسی تکاملی، کونوتوکسین ها به دو کلاستر اصلی تقسیم می شوند که دو کونوتوکسین از *Conus magus* شباهت زیادی دارند.

کلمات کلیدی: کونوتوکسین، پپتیدهای دریایی، ضد درد، *Insilico*

۱. مقدمه و هدف

درد یک سندرم بالینی است که علل مختلفی دارد و همچنین می تواند از بیماری یا آسیب به دستگاه عصبی حسی- پیکری نیز ناشی شود و ممکن است ماهیت مزمن داشته باشد (۱) که همین مسئله درمان موفقیت آمیز آن را دشوار می کند (۲). نوروپاتی های حسی شناخته شده که نوسیسپتور نامیده می شود دارای کانال ها و گیرنده ها مانند کانال های سدیم و کلسیم وابسته به ولتاژ، گیرنده های اپیوئید و غیره هستند که به آنها اجازه می دهد به طور خاص برای تشخیص محرک های آسیب پذیر در

سراسر بدن استفاده شود. کاهش پاسخ درد را می توان با مهار یا تغییر بیان این اهداف درد به دست آورد. اینکه چگونه این گیرنده ها را می توان در سطح مولکولی تحت تاثیر قرار داد، می تواند منجر به توسعه درمان های جدید درد شود (۳). مسکن ها، داروهایی هستند که درد را تسکین می دهند (۴) و به دو دسته غیرافیونی و ضد دردهای اپیوئیدی طبقه بندی می شوند (۵و۶). در بین مواد افیونی، مورفین به عنوان یک داروی مناسب برای تسکین درد معرفی شده اما به دلیل عوارض جانبی از جمله افسردگی و اعتیاد باید به صورت محدود استفاده شود. به این دلیل، تحقیقات به سمت شناسایی و تولید داروهای ضد درد طبیعی بدون عوارض جانبی سوق یافته است (۷).

مسکن های طبیعی از منابع متنوعی مانند گیاهان، جانوران (عقرب، مار، حلزون های مخروطی) استخراج می شوند. حلزون های مخروطی جانوران دریایی هستند که جزء سمی ترین شکارچیان گوشتخوار دریایی و از بزرگترین جنس های بی-مهرگان در آب های گرمسیری و نیمه گرمسیری سراسر جهان محسوب می شوند و به شدت مورد توجه محققان زیست-داروئی می باشند. حلزون های مخروطی از زهر خود برای شکار یا دفاع از خود استفاده می کنند. همه گونه ها دارای سمی می باشند که از نظر سمیت متفاوت هستند (۸). مجرای زهر در حلزون های مخروطی مقادیر زیادی پپتیدهای منحصر به فرد را ترشح می کند که به این پپتیدها کونوتوکسین گفته می شود. که این گروه از نظر دارویی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. کونوتوکسین ها، پپتیدهایی کوچک با طول ۸ تا ۴۰ آمینو اسید، از پیچیده ترین زهرها هستند. اندازه ی کوچک آن ها، سادگی نسبی سنتز، پایداری ساختاری و اختصاصیت هدف، آنها را به اسید آمینه دارویی ایده آل تبدیل می کند (۹ و ۱۰). کونوتوکسینها به طور کلی به صورت کلاس های α ، μ ، δ ، κ و ω طبقه بندی می شوند (۱۱). اهداف مولکولی کونوتوکسین ها، گیرنده هایی مانند کانال های لیگاندی دریچه دار، کانال های یونی دریچه دار وابسته به ولتاژ، و گیرنده های مرتبط با پروتئین G (محل اتصال جی پروتئین) و یا انتقال دهنده های عصبی هستند که برای اهداف دارویی و مطالعات علوم اعصاب مورد استفاده قرار می گیرند (۱۲). از زمان اولین گزارش در مورد فعالیت ضد درد جنس کونوس (۱۹۷۵)، بسیاری از کونوتوکسین ها با فعالیت ضد درد ثبت شده اند (۱۳). شاخص آن ها یک پپتید کوتاه به نام امگا کونوتوکسین MIIA از زهر کونوس ماگوس^۱ با نام تجاری زیکونوتید که مهار کننده ی قوی و انتخابی برای کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع N است، می باشد. نسخه تجاری و سنتتیک این کونوتوکسین، پریالت^۲ است و به عنوان یک داروی ضد درد قوی غیر اپیوئیدی برای درمان دردهای مزمن به تایید FDA در آمده است و موثرتر از مورفین می باشد و اعتیادآور نیست (۱۴).

در پژوهش حاضر به منظور بیان بهینه و بالای این کونوتوکسین ها با عملکرد های بیولوژیکی متنوع به بررسی ویژگی های تکاملی، ساختار دوم، نقطه ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری و آلفاتیک کونوتوکسین هایی از گونه های *Conus betulinus*، *Conus consors*، *Conus geographus*، *Conus magus* با نرم افزار های بیوانفورماتیکی پرداخته شده است.

۲. تئوری و پیشینه تحقیق

^۱ *Conus magus*

^۲ prialt

کونوتوکسین‌ها، توکسین‌های پپتیدی غنی از پیوند دی‌سولفیدی هستند که بر اساس خانواده و کلاس دارویی اهداف متفاوتی دارند.

طبق مطالعات انجام شده قبلی کونوتوکسین از گونه *Conus marmoreus* فعالیت بازدارنده در برابر پروتئاز دنگی و ویروس نشان داد (۱۵). کونوتوکسین دیگر از گونه *C. californicus* در شرایط آزمایشگاهی رشد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چند دارو را مهار کرد (۱۶). کونوتوکسین از زهر *Conasprella longurionis*، فعالیت کم و بسیار ویژه ای را در برابر *Bacillus megaterium* در غلظت بسیار بالا (۱ میلی مولار) داشت (۱۷).

در مطالعات سان^۳ و همکاران در سال ۲۰۲۰ مشخص شده که α -O-کونوتوکسین GeXIVA از طریق تعامل و مهارگیرنده‌های استیل کولین نیکوتین ۵۹ باعث سرکوب و مهار رشد سلول های سرطان سینه MB-MDA-۱۵۷ را در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (۱۸).

در ایران تبارکی^۴ و همکاران در سال ۲۰۱۴ زهر کونوس تکستایل را از آن گونه جداسازی کردند و به بررسی اثر ضد آن در مدل موشی در مقایسه با مورفین پرداختند. در نهایت نتایج آنها نشان می‌دهد که ده نانوگرم زهر خام کونوس بهترین فعالیت ضد درد را در آزمون فرمالین نشان داد. اثر ضد دردی ۱۰ نانوگرم زهر مانند مورفین برای کاهش درد التهابی بود. در نتیجه زهر تکستایل کونوس خلیج فارس حاوی یک جزء ضد درد برای تسکین درد حاد است که می‌تواند منجر به یافتن مسکن شود (۱۹).

همچنین در سال ۲۰۲۰ رجیبی و همکاران به بررسی اثر ضد درد کنوپپتیدهای مستخرج از سم کونوس کروناتوس و کونوس فریجد جزیره قشم بر روی مدل درد فرمالین و تست صفحه داغ پرداختند. نتایج نشان دهنده‌ی فعالیت ضد درد قابل توجه کنوپپتیدها در این مدل موش ها بود (۲۰).

اخیرا در مهندسی ژنتیک به منظور تولید توکسین پپتیدی و پروتئین هایی با عملکرد بیولوژیکی مختلف، تحقیقات زیادی با هدف بررسی خصوصیات آنها اعم از پایداری، خصوصیات فیزیوشیمیایی و ساختار دوم انجام شده است که می‌توان به پژوهشی توسط ربیعی و همکاران اشاره کرد. آنها با بررسی این خصوصیات و تحلیل آن به تولید پروتئین های توکسینی به نام دیس اینتگرین های مار افعی با خاصیت ضد سرطانی پرداختند که در نهایت منجر به توسعه و تولید پپتیدهای مشابه حتی موثرتر در درمان سرطان شد (۲۱).

در مطالعات ذکر شده با توجه به خاصیت و پتانسیل درمانی کونوتوکسین‌ها، بررسی خصوصیات فیزیوشیمیایی و ساختاری این توکسین‌های پپتیدی چند عملکردی به منظور بیان و تولید آنها حائز اهمیت است.

۳. مواد و روشی ها

^۳ Z. Sun

^۴ N. Tabaraki

اطلاعات مربوط به توالی آمینواسیدی ۱۱ کونوتوکسین در گونه های *Conus betulinus*، *Conus consors*، *Conus geographus*، *Conus magus* با شماره دسترسی مشخص از بانک اطلاعات پروتئین NCBI استخراج و با فرمت FASTA ذخیره گردید (جدول ۱).

جدول ۱- شماره دسترسی توالی های آمینواسیدی کونوتوکسین ها

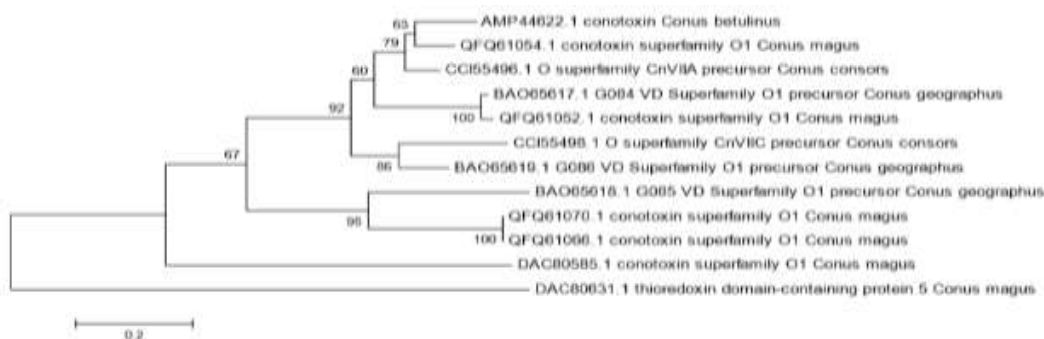
Conus	Protein name	Accession
<i>Conus betulinus</i>	conotoxin	AMP44622.1
<i>Conus consors</i>	Conotoxin(CnVIIA)	CCI55496.1
	Conotoxin(CnVIIC)	CCI55498.1
<i>Conus geographus</i>	Conotoxin-G086	BAO65619.1
	Conotoxin-G085	BAO65618.1
	Conotoxin-G084	BAO65617.1
<i>Conus magus</i>	Conotoxin(QFQ61052.1)	QFQ61052.1
	Conotoxin(QFQ61054.1)	QFQ61054.1
	Conotoxin(DAC80585.1)	DAC80585.1
	Conotoxin(QFQ61070.1)	QFQ61070.1
	Conotoxin(QFQ61066.1)	QFQ61066.1

به منظور ایجاد درخت فیلوژنی و تحلیل و بررسی فاصله ی ژنتیکی و تجزیه کلاستر این توالی ها از نرم افزار MEGA6 و همردیفی با روش ClastalW و از روش اتصال مجاور استفاده شد. هم ردیفی توالی های پپتیدی گونه های مورد مطالعه از طریق نرم افزار `clastalw > megaAlign > DNASTar` بررسی گردید. خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین ها نظیر وزن مولکولی، تعداد آمینواسیدها، نقطه ی ایزوالکتریک، شاخص آلیفاتیک و شاخص ناپایداری آن توسط `protparam server` در سایت Expassy انجام شد. آنالیز ساختار دوم پروتئین ها برای تعیین درصد آلفا هلیکس، مارپیچ بتا، سوپر کویل با استفاده از سایت SOPMA انجام شد. برای بررسی پیوند دی سولفیدی پروتئین ها از وب سایت آنالین `softberry` استفاده می گردد.

۴. نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه کلاستر با نرم افزار MEGA6 نشان داد که دو کلاستر اصلی بین کونوتوکسین های گونه های حاضر مشاهده شد. کلاستر اول (A) شامل کونوتوکسین با شماره دسترسی (DAC80585.1) و کلاستر دوم (B) با Bootstrap ۶۷٪ خود به دو زیر کلاستر B₁ و B₂ تقسیم میشود. زیر کلاستر B₁ با Bootstrap ۹۵٪ به دو زیر کلاستر تبدیل

شد که در یک زیر کلاستر B₁₋₁ دو کونوتوکسین با شماره دسترسی (QFQ61070.1) و (QFQ61066.1) ۱۰۰٪ شباهت دارند و دیگری به تنهایی در زیر کلاستر B₁₋₂ قرار گرفت. (شکل ۱)



شکل ۱- درخت فیلوژنی توالی پپتیدی کونوتوکسین های ۴ گونه کونوس

با توجه به شکل ۲ نتایج حاصل از Distance نشان داد که پپتید از گونه ی ۱۱ و ۱۰ بعد از این گونه های ۶ و ۷ کمترین فاصله ژنتیکی و گونه های ۳ و ۹ بیشترین فاصله را در بین پپتید های گونه حاضر دارند. فاصله ژنتیکی پپتید گونه های ۱۱ و ۱۰، صفر بود. این بررسی تایید کننده Bootstrap درخت فیلوژنی می باشد.

MG: Pairwise Distances (C:\Users\Home\AppData\Local\Temp\PhyloAnalysis.meg)

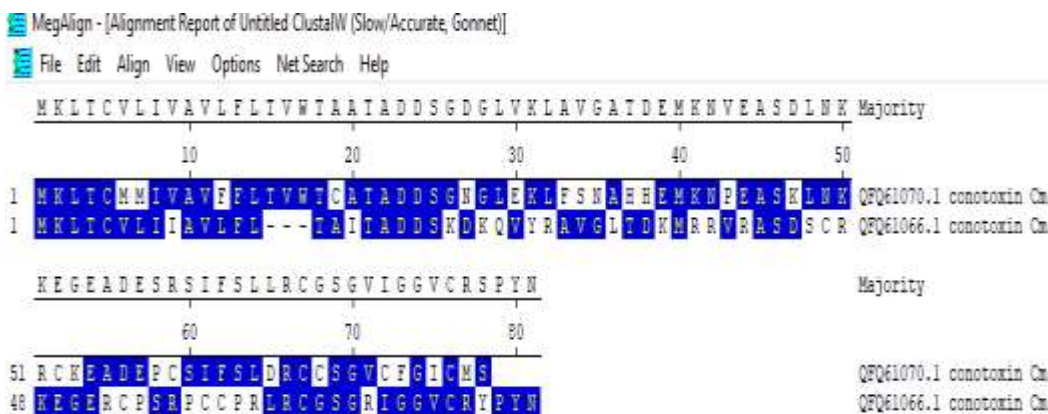
File Display Average Caption Help

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. AMP44622.1 conotoxin Conus betulinus												
2. CCI55496.1 O superfamily CrI/A precursor Conus consors	0.173											
3. CCI55498.1 O superfamily CrI/C precursor Conus consors	0.506	0.480										
4. BAO65619.1 G086 VD Superfamily O1 precursor Conus geographus	0.382	0.336	0.272									
5. BAO65618.1 G085 VD Superfamily O1 precursor Conus geographus	0.885	0.811	0.924	0.709								
6. BAO65617.1 G084 VD Superfamily O1 precursor Conus geographus	0.382	0.293	0.454	0.405	0.965							
7. QFQ61052.1 conotoxin superfamily O1 Conus magus	0.405	0.314	0.454	0.405	0.965	0.032						
8. QFQ61054.1 conotoxin superfamily O1 Conus magus	0.173	0.154	0.430	0.314	0.811	0.314	0.336					
9. DAC80585.1 conotoxin superfamily O1 Conus magus	1.052	1.052	1.253	1.147	1.099	1.147	1.147	1.199				
10. QFQ61070.1 conotoxin superfamily O1 Conus magus	0.885	0.811	0.847	0.776	0.506	0.885	0.847	0.811	1.008			
11. QFQ61066.1 conotoxin superfamily O1 Conus magus	0.885	0.811	0.847	0.776	0.506	0.885	0.847	0.811	1.008	0.000		
12. DAC80631.1 TPA inf: thioresoxin domain-containing protein 5 Conus magus	1.658	1.504	1.658	1.745	1.946	1.745	1.745	1.578	1.745	1.841	1.841	

شکل ۲- فاصله ژنتیکی بین کونوتوکسین های گونه های کونوس

نتایج مرتبط با همردیفی نشان داد که کونوتوکسین با شماره دسترسی (QFQ61070.1) در طی تکامل کوتاه تر شده و سه آمینواسید کمتر از کونوتوکسین (QFQ61066.1) از همان گونه *Conus magus* دارد. توالی بالایی در مجموع ۲۴

جاگزینی آمینواسیدی نسبت به توالی پایینی داشت که ازین تعداد ۱۱ جایگزینی از نوع هیدروفیل با هیدروفیل، ۹ تا مربوط به هیدروفوب با هیدروفوب، ۲ تا هیدروفیل با هیدروفوب و ۲ تا هیدروفوب با هیدروفیل می باشد.



Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid bright cobalt) residues that match the Consensus exactly.

شکل ۳-همردیفی توالی پپتیدی دو کونوتوکسین از گونه *Conus magus*

محدوده‌ی تعداد آمینواسید در این کونوتوکسین ها ۷۱ تا ۷۸ و وزن مولکولی ۷۵ تا ۸۸ کیلودالتون بود. نقطه‌ی ایزوالکتریک این پپتیدها در محدوده‌ی ۶/۰۴ - ۹/۶۳ بدست آمد. بیشتر این کونوتوکسین ها در محدوده نقطه ایزوالکتریک قلیایی قرار داشتند و بیشترین درصد قلیایی مربوط به کونوتوکسین با شماره دسترسی (DAC80585.1) است که برابر با ۹/۶۳ بود. در میان کونوتوکسین ها فقط یک پپید با نقطه ایزوالکتریک اسیدی برابر با ۶/۰۴ یافت شد که مربوط به کونوتوکسین با شماره دسترسی (QFQ61070.1) بود. در این مطالعه شاخص ناپایداری شاخص ۱۴/۶۲ تا ۴۸/۳۹ بدست آمد که به ترتیب مربوط به کونوتوکسین با شماره (QFQ61052.1) در گونه *Conus magus* و کونوتوکسین در گونه *Conus betulinus* بود. این پپتیدها پایدارترین و ناپایدارترین پپتید در بین گونه‌های کونوس مورد مطالعه بودند. در این مطالعه کونوتوکسین با شماره دسترسی BAO65619.1 در گونه *Conus geographus* بیشترین شاخص آلیفاتیک را داشت که برابر با ۹۷/۶۰ بود. بر اساس شاخص GRAVY کونوتوکسین با شماره QFQ61066.1 در *Conus magus* هیدروفوب‌ترین و کونوتوکسین در *Conus betulinus* هیدروفیل‌ترین بود (جدول ۲).

جدول ۲-نتایج حاصل از آنالیز ویژگی فیزیکوشیمیایی کونوتوکسین‌ها در گونه‌های کونوس

Source(conus)	Protein name	Sequence length	Moulcoula r weight	pI	(A sp + Gl u)	(Ar g + Lys)	Instabilit y index	Aliphati c index	GRAVY
<i>Conus betulinus</i>	conotoxin	72	7752.17	8.93	2	7	48.39	83.89	0.368

Conus consors	Conotoxin(CnVIIA)	73	7811.25	9.22	4	11	44.39	80.14	0.032
	Conotoxin(CnVIIC)	71	7568.96	9.54	3	12	32.47	78.31	-0.020
Conus_geographus	Conotoxin-G086	75	8150.76	9.13	3	10	23.38	97.60	0.325
	Conotoxin-G085	78	8390.89	9.10	4	10	34.92	92.56	0.167
	Conotoxin-G084	78	8886.43	8.15	9	11	23.02	91.28	-0.010
Conus magus	Conotoxin(QFQ61052.1)	72	7887.31	8.95	5	10	14.62	89.44	0.037
	Conotoxin(QFQ61054.1)	72	7829.27	9.12	4	10	17.89	89.44	0.081
	Conotoxin(DAC80585.1)	71	7687.04	9.63	3	12	31.55	72.82	-0.139
	Conotoxin(QFQ61070.1)	78	8617.08	6.04	9	8	21.92	67.56	0.115
	Conotoxin(QFQ61066.1)	78	8726.29	9.61	7	16	36.18	78.72	-0.268

در بررسی ساختار دوم کونوتوکسین ها ، ساختار مارپیچ آلفا در محدوده % ۳۶/۳۸-۵۳/۳۳ Extended ، strand در محدوده % ۱۲/۸۲-۰/۰۰ Beta turn در محدوده % ۸۶/۹-۲/۷۸ و Random coil در محدوده % ۵۰/۶۸-۳۲/۳۹ بود. بر اساس نتایج بدست آمده از ساختار دوم کونوتوکسین ها، درصد ساختار مارپیچ آلفا به نسبت ساختار های دیگر در مجموع بیشتر است و کونوتوکسین با شماره BAO65619.1 در *Conus geographus* بیشترین درصد ساختار مارپیچ آلفا را در بین کونوتوکسین های مورد بررسی داشت. همچنین کونوتوکسین (QFQ61066.1) دارای کمترین درصد Extended strand (% ۰/۰۰) و بیشترین درصد Random coil (% ۵۰/۶۸) در بین کونوتوکسین ها بود(جدول ۳) .

جدول ۳- آنالیز ساختار دوم کونوتوکسین های گونه های کونوس

source	Protein name	Alpha helix (%)	Extended strand(%)	Beta turn(%)	Random coil (%)
Conus betulinus	Conotoxin	41.67%	5.56%	2.78%	50.00%
Conus consors	Conotoxin(CnVIIA)	38.36%	6.85%	4.11%	50.68%
	Conotoxin(CnVIIC)	43.66%	5.63%	8.45%	42.25%
Conus_geographus	Conotoxin-G086	53.33%	2.67%	8.00%	36.00%
	Conotoxin-G085	44.87%	5.13%	5.13%	44.87%

	Conotoxin-G084	44.87%	10.26%	3.85%	41.03%
Conus magus	Conotoxin(QFQ61052.1)	48.61%	6.94%	2.78%	41.67%
	Conotoxin(QFQ61054.1)	52.78%	2.78%	2.78%	41.67%
	Conotoxin(DAC80585.1)	47.89%	9.86%	9.86%	32.39%
	Conotoxin(QFQ61070.1)	48.72%	12.82%	3.85%	34.62%
	Conotoxin(QFQ61066.1)	42.31%	0.00%	3.85%	53.85%

با بررسی پیوند دی سولفیدی کونوتوکسین‌هایی با همولوژی ۱۰۰٪ در آنالیز فیلوژنتیکی گونه *Conus magus*، از وب سایت آنالیز softberry، این پروتئین‌ها احتمالاً ۳ الگوی تشکیل پیوند دی سولفیدی دارند که این پل‌های دی سولفیدی برای عملکرد بیولوژیکی این پپتیدها ضروری می‌باشند. بررسی‌های دیگر گویای آن بود که در این کونوتوکسین‌ها، الگوی اتصال و جفت شدن احتمالی سیستئین‌ها برای تشکیل پیوند دی سولفیدی متفاوت است (۲۱).

باتوجه به آنالیز بیوانفورماتیکی مطالعه حاضر، از بین این کونوتوکسین‌ها، Conotoxin (QFQ61052.1) بالاترین میزان پایداری را دارد. بررسی‌های ساختار دوم نشان داد که به علت وجود میزان بالای ساختار مارپیچ آلفا، انعطاف پذیری پروتئین کم و در نتیجه پایداری آن بیشتر می‌شود و همچنین در این کونوتوکسین تعداد آمینواسید زیادی با الگوی محتمل در ایجاد پیوند دی سولفیدی مشاهده شد که تاییدی بر شاخص ناپایداری این پپتید مبنی بر پایداری آن بود. بنابراین قبل از جداسازی ژن مورد نظر از گونه موجود و بیان آن در میزبان مناسب باید آنالیزهای بیوانفورماتیکی به منظور بررسی خصوصیات ساختاری و فیزیکی شیمیایی گونه‌های مختلف انجام گیرد. مطالعه ما نشان داد که کونوتوکسین گونه‌های مختلف از نظر این خصوصیات متفاوت می‌باشند و باید ابتدا قبل از شروع همسانه سازی و بیان، بهترین گونه را بر اساس صفات نظیر پایداری، نقطه ایزوالکتریک، پیوند دی سولفیدی، شاخص آلیفاتیک و غیره مورد بررسی قرار گیرند.

۵. پیشنهادات

کونوتوکسین در درمان درد و بیماری‌های مختلف کاربرد دارد. بنابراین ما براساس یافته‌های این مطالعه، پیشنهاد می‌دهیم که این پروتئین با این خصوصیات و با عملکرد بیولوژیکی متنوع در میزبان بیانی تولید شود. باتوجه به خاصیت و پتانسیل درمانی کونوتوکسین‌ها، پیشنهاد می‌شود که از گونه *Conus magus* در مهندسی ژنتیک برای تولید پروتئین نوترکیب کونوتوکسین با شماره (QFQ61052.1) استفاده شود.

۶. مراجع

1. Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain: Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Second edition. [Internet]. IASP Press. 1994 [cited 2022 Jan 29]. 222 p. Available from: <https://psycnet.apa.org/record/1987-31773-001>

2. Abd-Elseyed A, Deer TR. Different Types of Pain. In: Pain. Springer International Publishing; 2019. p. 15–6.
3. Nikolenko VN, Shelomentseva EM, Tsvetkova MM, Abdeeva EI, Giller DB, Babayeva J V., et al. Nociceptors: Their Role in Body's Defenses, Tissue Specific Variations and Anatomical Update. *J Pain Res* [Internet]. 2022 [cited 2022 Jun 28];15:867. Available from: /pmc/articles/PMC8982820/
4. Hena S, Znad H. Membrane Bioreactor for Pharmaceuticals and Personal Care Products Removal From Wastewater. In: *Comprehensive Analytical Chemistry* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jan 29]. p. 201–56. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166526X18300060>
5. Munir MA, Enany N, Zhang JM. Nonopioid Analgesics [Internet]. Vol. 25, *Anesthesiology Clinics*. Elsevier; 2007 [cited 2022 Jan 29]. p. 761–74. Available from: <http://www.anesthesiology.theclinics.com/article/S193222750700064X/fulltext>
6. Kumar M, Shete A, Akbar Z. A Review on Analgesic: From Natural Sources. *Int J Pharm Biol Arch*. 2010;1(2):95–100.
7. Cui JM, Zhao L, Wang ZJ, Ma MT, Wang Y, Luo KY, et al. MEL endomorphins act as potent inflammatory analgesics with the inhibition of activated non-neuronal cells and modulation of pro-inflammatory cytokines. *Neuropharmacology*. 2020 May 15;168:107992.
8. Ravinesh R, Kumar ABA, Zootaxa AK-, 2018 U, Kohn AJ. Conidae (Mollusca, Gastropoda) of Lakshadweep, India. *Zootaxa* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jan 29];4441(3):467–94. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Ravinesh-R/publication/326032099_Conidae_Mollusca_Gastropoda_of_Lakshadweep_India/links/5b6d70e445851546c9fa1dc6/Conidae-Mollusca-Gastropoda-of-Lakshadweep-India.pdf
9. Gao B, Peng C, Yang J, Yi Y, Zhang J, Shi Q. Cone snails: A big store of conotoxins for novel drug discovery [Internet]. Vol. 9, *Toxins*. 2017 [cited 2022 Jan 29]. Available from: <https://www.mdpi.com/244176>
10. Halai R, Craik DJ. Conotoxins: Natural product drug leads [Internet]. Vol. 26, *Natural Product Reports*. 2009 [cited 2022 Jan 29]. p. 526–36. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2009/np/b819311h>
11. Bjørn-Yoshimoto WE, Ramiro IBL, Yandell M, McIntosh JM, Olivera BM, Ellgaard L, et al. Curses or Cures: A Review of the Numerous Benefits Versus the Biosecurity Concerns of Conotoxin Research. *Biomed* 2020, Vol 8, Page 235 [Internet]. 2020 Jul 22 [cited 2022 Jan 27];8(8):235. Available from: <https://www.mdpi.com/2227-9059/8/8/235/htm>
12. Lewis RJ, Dutertre S, Vetter I, Christie MJ. Conus Venom Peptide Pharmacology. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2022 Jun 28];64(2):259–98. Available from: <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/64/2/259>
13. Rajendra W, Armugam A, Jeyaseelan K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. *Toxicon*. 2004 Jul 1;44(1):1–17.
14. Miljanich GP. Ziconotide: Neuronal Calcium Channel Blocker for Treating Severe Chronic Pain. *Curr Med Chem*. 2012 Nov 5;11(23):3029–40.
15. Xu S, Li H, Shao X, Fan C, Ericksen B, Liu J, et al. Critical effect of peptide cyclization on the potency of peptide inhibitors against Dengue virus NS2B-NS3 protease. *J Med Chem* [Internet]. 2012 Aug 9 [cited 2022 Jun 28];55(15):6881–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22780881/>
16. Akondi KB, Muttenthaler M, Dutertre S, Kaas Q, Craik DJ, Lewis RJ, et al. Discovery, synthesis, and structure-activity relationships of conotoxins. *Chem Rev* [Internet]. 2014 Jun 11 [cited 2022 Jun 28];114(11):5815–47. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr400401e>
17. Lebbe EKM, Ghequire MGK, Peigneur S, Mille BG, Devi P, Ravichandran S, et al. Novel Conopeptides of Largely Unexplored Indo Pacific Conus sp. *Mar Drugs* 2016, Vol 14, Page 199 [Internet]. 2016 Oct 27 [cited 2022 Jun 28];14(11):199. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-3397/14/11/199/htm>
18. Sun Z, Zhangsun M, Dong S, Liu Y, Qian J, Zhangsun D, et al. Differential expression of nicotine acetylcholine receptors associates with human breast cancer and mediates antitumor activity of α O-conotoxin gexiva. *Mar Drugs*. 2020;18(1).
19. Tabaraki N, Shahbazzadeh D, Moradi AM, Vosughi G, Mostafavi PG. Analgesic effect of persian gulf conus textile venom. *Iran J Basic Med Sci*. 2014;17(10):793–7.

20. Rajabi H, Zolgharnein H, ... MR-A journal of, 2020 undefined. *Conus coronatus and Conus frigidus Venom: A New Source of Conopeptides with Analgesic Activity*. ncbi.nlm.nih.gov [Internet]. [cited 2022 Jul 12]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7368110/>
۲۱. ربیعی مریم و محمدی فارسانی فرزانه. بررسی اسید آمینه محتوای ای ساختار ، و ارتباطات فیلوژنتیکی توکسینهای دیس اینتگرین گونه های افعی مار. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، سال ۱۳۹۸ : شماره ۳
22. Craik DJ, Adams DJ. *Chemical modification of conotoxins to improve stability and activity*. ACS Chem Biol [Internet]. 2007 Jul [cited 2022 Jun 28];2(7):457–68. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cb700091j>