

Received: 2010.02.25
Accepted: 2010.04.22
Published: 2010.05.28

Skład i właściwości biochemiczne oraz toksyczność jądów węży

The composition, biochemical properties and toxicity of snake venoms

Ireneusz Całkosiński¹, Ewa Seweryn¹, Arkadiusz Zasadowski²,
Katarzyna Małolepsza-Jarmołowska³, Katarzyna Dzierżba¹,
Agnieszka Bronowicka-Szydełko¹, Magdalena Mierzchała¹,
Ireneusz Ceremuga¹, Joanna Rosińczuk-Tonderys⁴, Maciej Dobrzyński⁵,
Andrzej Gamian^{1,6}

¹ Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Akademia Medyczna we Wrocławiu

² Katedra Patologii i Farmakologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

³ Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku, Akademia Medyczna we Wrocławiu

⁴ Zakład Chorób Układu Nerwowego, Akademia Medyczna we Wrocławiu

⁵ Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Dziecięcej, Akademia Medyczna we Wrocławiu

⁶ Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Każdego roku na świecie odnotowuje się około 2,5 miliona przypadków ukąszeń ludzi przez węże, z których 100 000 ma charakter śmiertelny. Najwięcej takich przypadków zdarza się w Azji oraz w Afryce. Jady węży są naturalnym źródłem wielu substancji biologicznie czynnych, także o potencjalnych właściwościach terapeutycznych. Niektóre doniesienia wykazały, że dochodzi do wzrostu toksyczności znanych typów jądów węży, a także istnieje dość duża zmienność składu wydzielin u tego samego gatunku węża w zależności od strefy geograficznej, z której pochodzi. Składnikami jądów węży są głównie peptydy, białka oraz białka enzymatyczne. Białka o właściwościach enzymatycznych podzielono na pięć podrodzin: białka mające w swojej strukturze motyw trzech palców, inhibitory proteaz serynowych typu Kunitza, fosfolipazy A₂, proteazy serynowe i metaloproteazy. Toksyny z jądów węży powodujące zaburzenie homeostazy układowej i narządowej w organizmie można pogrupować w zależności od wywieranych efektów, takich jak: zaburzenie przekaźnictwa nerwowo-mięśniowego, działanie kardiotoksyczne, działanie powodujące zaburzenia w hemostazie, oddziaływanie na ośrodkowy układ nerwowy, działanie nekrotyczne

Słowa kluczowe:

jady węży • miotoksyny • hemotoksyny • neurotoksyny

Summary

2.5 million cases of snake bites are noticed in the world every year (within 100,000 is mortal). These bites occur frequently in Asia and Africa. Some reports proved the toxicity and composition changes of well-known venoms from the same snake species according to the climatic zone. Snake venom is a natural source of many biologically active substances, including those with potential therapeutic properties. These substances contain peptides, proteins, and enzymes which are divided into five subfamilies: three-finger toxins, serine protease inhibitors of the Kunitz type, phospholipases A₂, serine proteases, and metalloproteases. All snake venoms are grouped depending on their mode of action. They usually cause neurotransmission disorders, cardiotoxic action, hemostasis disorders, and have central nervous system and necrotic activity.

Key words: snake venom • myotoxins • hemotoxins • neurotoxins**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=911067>**Word count:** 4952**Tables:** –**Figures:** 2**References:** 95**Adres autora:** dr hab. Ireneusz Całkoński, Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej AM, ul.T. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław; e-mail: i.calcosinski@wp.pl**Wykaz skrótów:** **3FTx** – motyw trzech palców; **DIC** – zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego; **PLA₂** – fosfolipaza A₂; **TF-FVIIa** – kompleks czynnika krzepnięcia VII z czynnikiem tkankowym; **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń.

WSTĘP

Węże (*Serpentes*) stanowią podrząd gadów. Podzielono je na piętnaście rodzin, które sklasyfikowano w 456 rodzajach i w ponad 3000 gatunkach. Zamieszkują one wszystkie kontynenty poza Antarktydą. Węże jadowite stanowią 10–25% wszystkich gatunków węży [88]. Jad wytwarzany jest przez gruczoły jadowe, które są zmodyfikowanymi gruczołami ślinowymi górnej szczęki, połączonymi z zębami jadowymi za pomocą specjalnych kanałów. U niektórych gatunków węży gruczoły te mogą sięgać okolic szyi, a nawet klatki piersiowej. Wydzieliny te zawierają rozmaite substancje chemiczne, których głównym zadaniem jest unieruchomienie bądź uśmiercenie ofiary, a następnie szybkie ich trawienie. Substancje zawarte w jadach węży odgrywają główną rolę w procesach inaktywacji i immobilizacji, a także w czynnościach związanych z trawieniem [40,47]. Wpływają one również w sposób swoisty na system neuromięśniowy i układ krążenia.

Ponad 95% suchej masy większości toksyn stanowią polipeptydy, wśród których można wyróżnić enzymy i białka nieenzymatyczne [45]. Wszystkie te związki zdolne są do indukowania różnorodnej odpowiedzi na poziomie fizjologicznym u zaatakowanego organizmu. Białka o właściwościach enzymatycznych podzielono na pięć podrodziny: białka mające w swojej strukturze motyw trzech palców (3FTx), inhibitory proteaz serynowych typu Kunitza, fosfolipazy A₂, proteazy serynowe i metaloproteazy [17,18,19,28,29,45]. Wprawdzie białka należące do poszczególnych podrodziny mają podobną strukturę, to znacznie różnią się właściwościami biologicznymi. Białka należące do podrodziny 3FTx działają swoiście i z dużym powinowactwem do różnych receptorów i kanałów jonowych (K_D 10⁻⁹–10⁻¹¹ M) [71]. Neurotoksyny są antagonistami receptorów nikotynowych, do których zaliczane są k-bungarotoksyny rozpoznające neuronalne receptory nikotynowe [35] oraz muskaryny będące selektywnymi agonistami lub antagonistami muskarynowych receptorów acetylocholinowych [44, 53]. Inne toksyny, takie jak fascikuliny hamują aktywność acetylocholinoesterazy [25], kalciseptyny blokują np. kanały wapniowe [22], kardiotoxyny uszkadzają błony komórkowe [12], a dendroaspiny wpływają hamująco na adhezję płytek krwi powodując zmniejszenie krzepliwości krwi [60]. Ciekawym enzymem jest występująca we

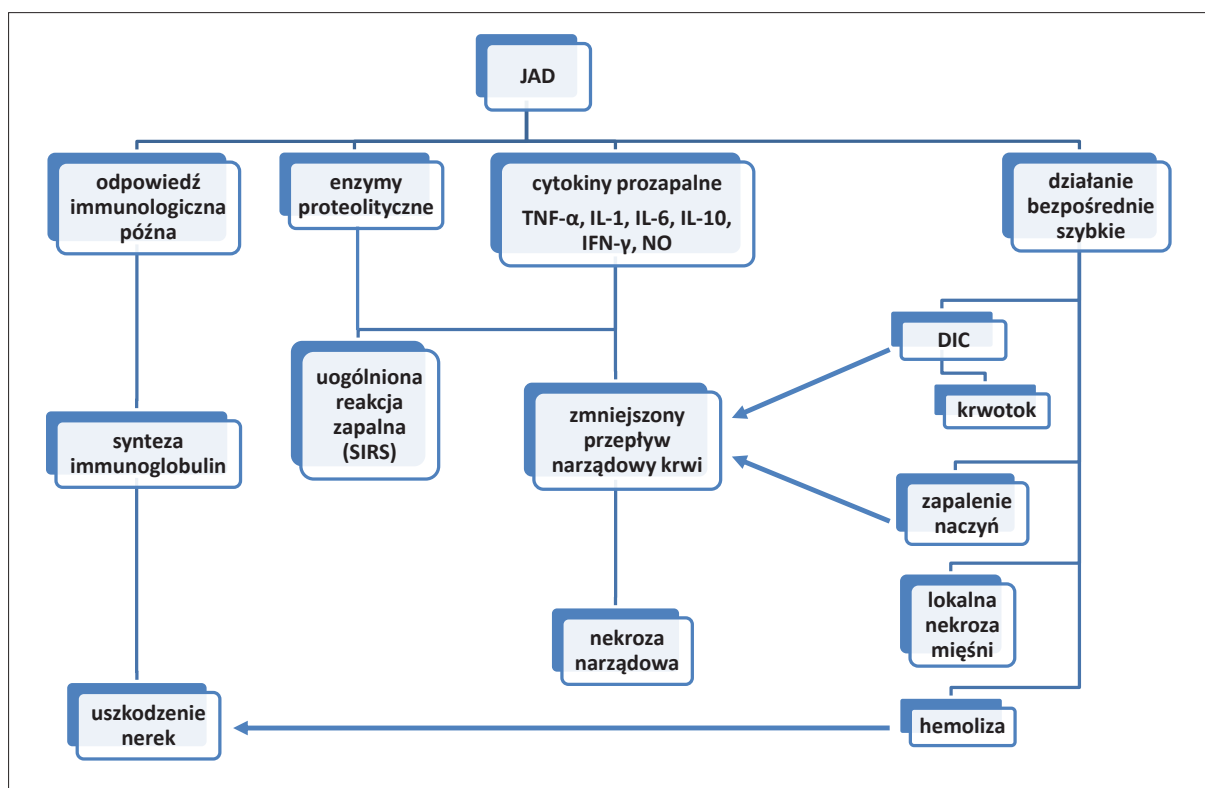
wszystkich jadach węży hialuronidaza, która ułatwia przenikanie innych składników jadu węża do tkanek zaatakowanego organizmu.

Kliniczne objawy związane z ukąszeniami ludzi przez węże zależą od dwóch czynników. Po pierwsze jest to tzw. parametr toksyczności właściwej definiowany w wyniku przeprowadzonych testów laboratoryjnych, które uwzględniają krótkotrwałe (zazwyczaj nasilone) i długotrwałe (zazwyczaj przewlekłe) skutki działania substancji toksycznych [51]. Po drugie skutki działania takich substancji zależą od ilości zaaplikowanej toksyny [39,51,77]. I tak najbardziej charakterystycznymi symptomami ukąszenia przez węża, są niedowłady mięśni (paraliż), mioliza, koagulopatia, występowanie krwotoków. Lokalne zniszczenia tkanek są jednym z charakterystycznych cech zatrucia jadem węża [39]. Składa się na to kompleks patologicznych zmian, takich jak: nekroza skóry i mięśni, powstawanie wyprysków, krwotoki, zniszczenie naczyń chłonnych, obrzęk np. płuc i degradacja białek macierzy zewnątrzkomórkowej, a także hipotonia, zmiany hemodynamiczne, ostre zapalenie nerek (ryc. 1). Do mniej częstych skutków ukąszeń przez węże należą hemoliza wewnątrznaczyniowa i ostra niewydolność mięśnia sercowego [36,39,51]. Wielonarządowy krwotok jest jednym z poważniejszych powikłań w przypadku zatrucia jadem u ludzi. Głównymi białkami powodującymi krwotok są metaloproteiny znajdujące się w jadowie węża, które wywołują krwotok w różnych narządach, zwłaszcza w płucach [36,39,51].

1. TOKSYNY WYTWARZANE PRZEZ WĘŻE JADOWITE

Wśród węży jadowitych wyróżnia się pięć głównych rodzin: węże właściwe (*Colubridae*, np.: zaskroniec zwyczajny, gniewosz plamisty, różne gatunki położów), zdradnicowate (*Elapidae*, np. różne gatunki kobry, mambry i taipana), węże wodne (*Hydrophidae*), żmijowate (*Viperidae*, np. żmija zygzakowata) oraz grzechotnikowate (*Crotalidae*) [1,23].

Wystąpienie objawów toksycznych po ukąszeniu przez węża jest związane z miejscem ukąszenia i typem użębienia u węża jadowitych: parzyste zęby jadowe z głębokim rowkiem (*Proteroglyph*) oraz zakrzywione, ruchome zęby jadowe z wewnętrznym kanałkiem połączonym z gruczołem



Ryc. 1. Patomechanizm działania jadów węży

jadowym (*Solenoglypha*). Istnieje także trzeci typ uzębienia, zaliczany do warunkowo jadowitych. Są to zęby jadowe z otwartymi rynienkami jadowymi, znajdujące się z tyłu szczęki górnej węża. Zatrucie następuje dopiero wtedy, gdy część ciała ofiary znajdzie się w głębi szczęki węża [42].

Jady węży z rodziny węży właściwych (*Colubridae*) zawierają substancje inicjujące kaskadę krzepnięcia krwi (prokoagulanty krwi) mające zdolność aktywowania protrombiny oraz czynników krzepliwości V i X. Niektóre z nich działają podobnie do trombiny.

Jady wytwarzane przez węże z rodziny *Elapidae* (zdradnicowate) zawierają toksyny działające na poziomie neuromięśniowym, presynaptycznym i postsynaptycznym [1,94]. Powodują one zwiotczenie mięśni, ophthalmoplegię (np. porażenie przywodzenia gałki ocznej, oczopląs), zaburzenie przełykania, nadmierne wydzielanie śliny, a w następstwie niedowład oraz zaburzenia funkcji oddechowej. Węże z gatunku *Bungarus* wytwarzają np. fosfolipazę A₂ (β-bungarotoksynę), która jest zdolna do blokowania kanałów potasowych. Również węże z gatunku mamb wytwarzają tzw. dendrotoksyny, które wiążąc się do przewężeń *Raniera* blokują kanały potasowe. Wytwarzają one dodatkowo fascikulinę, która hamuje acetylocholinoesterazę [76]. Jad kobra zawiera natomiast kardiotoksyny powodujące np.: blokadę skurczów naczyń krwionośnych. Znane są także właściwości przeciwzapalne niektórych substancji potencjalnie bardzo toksycznych izolowanych z jadów węży z rodzajów *Micrurus* i *Naja*. Zawierają one glikoproteinę COF (*CO*bra venom Factor) o masie 144 kDa, która wykazuje strukturalne podobieństwo i reaktywność krzyżową wobec ludzkiego białka C3, składnika układu dopełniacza. Czynnikiem

COF jest produktem rozpadu białka C3 i doprowadza do aktywacji konwertazy C3 rozkładającej białko C3 na polipeptydy C3a i C3b. Składnik C3b może się przyłączyć do błony komórkowej antygeny i funkcjonować jako opsonina lub może utworzyć kompleks z konwertazą C3, dając konwertazę C5. Enzym ten katalizuje reakcję powstawania białek C5a i C5b, które to z kolei biorą udział we wczesnych etapach reakcji zapalnych bądź podczas uogólnionego zapalenia SIRS (systemic inflammation response syndrome) [13]. Ponadto stan zapalny w obrębie miejsca ugryzienia przez węże może ułatwiać procesy dystrybucji innych toksycznych składników jadu przez tkanki zaatakowanego organizmu. Efekt ten może być również wzmocniony przez udział hialuronidazy, uważanej za czynnik rozprzestrzeniania (spreading factor) [13,87].

Jady wydzielane przez węże wodne są niezmiernie toksyczne. Głównymi ich składnikami są neurotoksyny działające presynaptycznie i postsynaptycznie oraz substancje powodujące zahamowanie uwalniania acetylocholino ze zwojów włókien nerwowego układu autonomicznego [76,94]. Niektóre toksyny, takie jak β-bungarotoksyna (*Bungarus coeruleus*), noteksyna (*Notechis scutatus*), krotoksyna (*Crotalus durissus terrificus*) oraz taipoksyna (*Oxyuranus scutellatus scutellatus*), są zdolne do hamowania uwalniania acetylocholino z neuronów terminalnych i niektórych neuronów cholinergicznego autonomicznego układu nerwowego. Inne toksyny, np. miotoksyny indukują obrzęk i nekrozę włókien mięśniowych, zwłaszcza bogatych w mitochondria.

Jady żmij należących do rodzaju *Atractaspis*, wytwarzają toksyny tzw. safarotoksyny, które w wyniku skurczu naczyń wieńcowych, przyczyniają się do niewydolności serca.

Jady pochodzące od węży z rodziny żmijowatych (*Viperidae*), np. ze żmii łańcuszkowatej (*Daboia russelli*), wywołują hemolizę wewnątrznaczyniową, która może doprowadzić do dysfunkcji nerek. Złogi kolejnych mikrokrzepów w nerce przyczyniają się do ostrej nekrozy kanalików nerkowych, co powoduje śmierć ukąszonego organizmu.

Węże z rodziny grzechotnikowatych (*Crotalidae*) wytwarzają jady wywołujące defibrynogencję, która prowadzi do trombocytopenii i zaburzenia czynności płytek krwi. Obecność hemoragin powoduje więc spontaniczne systemowe krwawienie i niszczenie śródbłonna naczyń krwionośnych. Jady grzechotników wytwarzają również substancje blokujące kanały wapniowe, a dodatkowo mogą zawierać krotaminę, wykazującą swoiste działanie na kanały sodowe w błonach w stanie pobudzonym.

Do szybkich efektów toksycznego działania jądów węży zaliczyć należy porażenie mięśni szkieletowych, który to mechanizm jest złożony oraz zablokowanie akcji oddechowej, jak i znaczne upośledzenie krążenia. Do późniejszych objawów pojawiających się po kilku lub kilkunastu godzinach zalicza się krwotoki wynikające z antykoagulacyjnego działania toksyn, bądź wystąpienia zespołu zużycia czynników krzepnięcia lub pojawienia się zespołu wykrzepiania śródnaczyniowego (DIC). Skutki działania enzymów proteolitycznych zawartych w jadzie są związane z wystąpieniem zmian martwiczych w miejscu ukąszenia. Niejednokrotnie może dochodzić do zużycia inhibitorów proteaz, co powoduje powstanie systemowego zespołu zapalnego (SIRS), który niejednokrotnie prowadzi do zapaści.

2. MIOTOKSYNY

Wiele gatunków węży jadowniczych wytwarza jad, który poprzez uwalnianie miotoksyn prowadzi do szybkiego, rozległego uszkodzenia szczególnie mięśni szkieletowych, czasami również mięśni gładkich i mięśnia sercowego ukąszonej ofiary [21,37,55]. Obecnie znanych jest ponad sto różnych miotoksyn [8,20,63]. Większość tych toksyn to białka o masie cząsteczkowej 14 kDa, które wiążą się z fosfolipazą A_2 , enzymem zawierającym siedem mostków dwusiarczkowych wewnątrz łańcucha [4,20]. Jednym z głównych działań fosfolipazy A_2 , zainicjowanego procesem zapalnym, jest uwalnianie lipidów z błon komórkowych ulegających przemianom do kwasu arachidonowego. Kaskada kwasu arachidonowego prowadzi do powstawania leukotrienów, prostaglandyn, tromboksanu i czynnika aktywującego płytki [13].

Miejsce katalityczne fosfolipazy jadu stanowią cztery główne reszty aminokwasowe: His48, Asp49, Tyr52 i Asp99. Wodór pochodzący z reszty His48 wiąże cząsteczki wody potrzebne do przeprowadzenia hydrolizy, natomiast reszta aminokwasowa Asp49 odgrywa ważną rolę w koordynacji i odpowiednim ułożeniu jonu Ca^{2+} , który podczas hydrolizy wiąże i polaryzuje grupy fosforanowe i karbonylowe sn-2 cząsteczki fosfolipidu [4]. Reszta Asp49 jest zaangażowana w intoksykację komórek mięśni [37], zastąpienie jej inną resztą aminokwasową powoduje utratę możliwości wiązania jonu Ca^{2+} oraz utratę aktywności enzymatycznej. Miotoksyny katalitycznie obojętne mają w pozycji 49 lizynę [55,56]. Głównym miejscem decydującym o toksyczności miotoksyn jest fragment aminokwasowy (115–129) na C końcu fosfolipazy A_2 ,

charakteryzujący się różnorodnością reszt aminokwasowych: dodatnio naładowanych, jak i hydrofobowych i/lub aromatycznych zmieniających spójność błony [20,55].

Istnieją receptory miotoksyn, które wyizolowano z jadu węża *Oxyuranus scutellatus* [54]. Uważa się, że receptorem miotoksyny, zawierającej resztę lizyny w pozycji 49, jest receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) [33,93].

Miotoksyna fosfolipazy A_2 , z resztą kwasu asparaginowego w pozycji 49, jest odpowiedzialna za powstawanie lizofosfolipidów i kwasów tłuszczowych, które rozluźniają błonę neuronów prowadząc do wzrostu stężenia jonu Ca^{2+} w cytosolu [80]. Natomiast miotoksyny z resztą Lys49 są katalitycznie nieaktywnymi homologami fosfolipazy A_2 , zmieniającymi integralność błony, zwiększając tym samym jej przepuszczalność dla jonów Ca^{2+} [37]. Obie miotoksyny fosfolipazy A_2 (aktywna Asp49 i nieaktywna Lys49) wykazują synergistyczne działanie w miotubach.

Z przeprowadzonych badań wynika, że miotoksyny jadu węża działając na sarkolemę uszkadzają komórki mięśniowe. W wyniku działania tych toksyn dochodzi do zmiany przepuszczalności błony, rezultatem czego jest utrata potencjału błonowego i uwolnienie mioglobiny i potasu oraz innych składników cytosolowych, a także ogromnego napływu wapnia z zewnątrz [37,55]. Nadmiar samego wapnia prowadzi do szybkiej nekrotycznej śmierci komórek [63,66].

3. HEMOTOKSYNY

Toksyny z jądów węży wykazują szeroki zakres działania we krwi, zarówno prokoagulacyjne, jak i antykoagulacyjne, interakcje z płytkami krwi zmieniające ich funkcje oraz zdolność uszkodzenia endotelium. Klasyfikacja hemotoksyn jest trudna, jeśli uwzględnimy sposób zatrucia organizmu czy diagnostykę laboratoryjną. Natomiast klasyfikacje oparte na strukturze molekularnej czy biochemicznej oraz funkcjach enzymatycznych mogą być problemem z powodu różnych działań biochemicznych czy fizjologicznych. Jest to utrudnione ze względu na dużą liczbę enzymów trombinopodobnych, które mają jedną lub więcej trombinopodobnych aktywności, takich jak cięcie fibrynogenu i uwalnianie fibrynopeptydów A czy B, aktywację białka C oraz aktywację czynnika V [83,85]. W jadach węży zidentyfikowano co najmniej 67 enzymów o aktywności fibrynolitycznej [85]. Różnią się one od aktywatorów protrombinowych czy innych koagulantów pochodzących z jądów, ponieważ tną fibrynogen i nie powodują powstawania nierozpuszczalnego skrzepu oraz mogą aktywować inne czynniki układu krzepnięcia. Najważniejszymi z nich są metaloproteiny zawierające cynk, tnące łańcuch α -fibrynogenu (α -fibrynogenazy) oraz fibrynolityczne (rozkładające fibrynę) [85]. Kolejną, ważną grupą hemotoksyn są białka antykoagulacyjne z jądów węży, które hamują proces krzepnięcia w wyniku bezpośredniej interakcji z określonymi czynnikami krzepnięcia [49]. Należą do tej grupy białka typu C lektynopodobne, o strukturze homodimerycznej, które mają zdolność aglutynacji erytrocytów. Występują one w kompleksach z metaloproteinami, stanowiąc integralną część białek prokoagulacyjnych, takich jak aktywator czynnika FX z jadu *Daboia russelli* i protrombinowy aktywator z jadu *Echis carinatus* [86,91,92]. Lektynopochodne białka typu

C z jądów węży hamują aktywność czynników krzepnięcia FIX i FX [7]. Białka te wiążą się z czynnikami poprzez ich domenę Gla (kwas γ -karboksylglutamyłowy) i w obecności jonów wapnia [62]. Druga grupa białek należąca do białek typu C lektynopochodnych reaguje z trombiną/protrombiną. Należą tutaj botrojaracyna, wyizolowana i oczyszczona z jadu *Bothrops jararaca* i botroalternina otrzymana z jadu *Bothrops alternatus* [6,15]. Botrojaracyna ma zdolność wiązania się do dwóch, charakterystycznych miejsc zewnętrznych w trombinie, przez co wykazuje działanie allosteryczne [6]. Białko to składa się z dwóch heterodimerów A i B, połączonych mostkiem disiarczkowym. Izoforny tego białka stwierdzono u sześciu gatunków węży *Bothrops* [16]. Botrojaracyna wykazuje działanie antykoagulacyjne także w wyniku hamowania aktywacji zwrotnej czynnika FV kaskady krzepnięcia [5] oraz aktywacji protrombiny do trombiny [64,65].

Do hemotoksyn można zaliczyć również polipeptydy z rodziny białek o charakterystycznej, konserwatywnej strukturze przestrzennej trzech β -strukturalnych pętli i czterech mostkach disiarczkowych [61]. Występują one powszechnie w jadach węży z rodziny zdradnicowatych i węży wodnych oraz ostatnio zidentyfikowano je także u niektórych węży właściwych [31,58]. Ostatnio wyizolowano z jadu węża *Hemachatus haemachatus* kompleks antykoagulacyjny zbudowany z podjednostek – hemeksytyna A i hemeksytyna B [10]. Podjednostki oddzielone reagują na proces krzepnięcia krwi, podjednostka A przedłuża krzepnięcie krwi, natomiast hemeksytyna B nie ma wpływu na ten proces. Jednak w kompleksie wzmacniają działanie antykoagulacyjne hemeksytyny A wydłużając czas protrombinowy [10]. Kompleks, hemeksytyna AB i hemeksytyna A są wysoce swoistymi, naturalnymi inhibitorami niekompetycyjnymi aktywnej postaci czynnika VIIa (TF-FVIIa) [10].

4. METALOPROTEINAZY

Metaloproteinazy z jądów węży są endoproteolitycznymi enzymami zależnymi od jonów Zn^{+2} . Wyróżniono cztery klasy tych enzymów na podstawie rozmiarów i charakterystycznej struktury domenowej [28]. Do klasy P-I należą te enzymy, które zawierają tylko domenę metaloproteinaz. Klasa P-II obejmuje enzymy zawierające oprócz domeny metaloproteinazowej także domenę dezintegryny. Klasa P-III, to proteinazy zawierające domenę metaloproteinaz, domenę dezintegrynopodobną i domenę bogatą w cysteinę. Metaloproteinazy te aktywują protrambinę. Występują one powszechnie w jadach wielu gatunków węży. Najlepiej poznana jest ekaryna (ecarin), wyizolowana z jadu żmii *Echis carinatus* [52]. Katalizuje hydrolizę wiązania peptydowego Arg₃₂₀-Ile₃₂₁ w protrombinie i powstaje meztrombina (meizotrombin), która ulega autokatalizie i tworzy się α -trombina. Enzymy klasy P-IV zawierają wszystkie domeny klasy P-III oraz domenę lektynopodobną [28]. Niektóre z metaloproteinaz hamują koagulację krwi, ale większość jest fibrynogenezami i uwalniają peptydy od C-końca fibrynogenu. Wyróżniono α - i β -fibrynogenezami na podstawie ich powinowactwa do $\alpha\alpha$ czy $\beta\beta$ łańcuchów fibrynogenu [74]. Do dużej podgrupy β -fibrynogenezami należą proteinazy serynowe.

5. PROTEINAZY SERYNOWE

Proteinazy serynowe z jądów węży są enzymami należącymi do trypsynowych peptydaz S1 [38]. Występują

w jadach węży z rodzin *Viperidae*, *Crotalidae*, *Elapidae*, *Colubridae* [83]. Wykazują aktywność zarówno fibrynogenezami, jak i fibrynolityczną. Wiele z nich katalizuje charakterystyczne cięcie fibrynogenu, uwalniając fibrynopeptydy A (venombins A) i B (venombins B), zapoczątkowując koagulację krwi. Ponieważ proteinazy serynowe z jądów węży naśladują funkcję trombiny, nazwano je enzymami „trombinopodobnymi” [59,78]. Katalizują proteolizę wiązania peptydowego między Arg16 a Gly17 w α -łańcuchu fibrynogenu A, co prowadzi do uwolnienia fibrynopeptydu A i konwersji fibrynogenu do fibryny. Do enzymów uwalniających fibrynopeptyd A należą batroxobina z *Bothrops atrox*, ancond z *Calloselasma rhodostoma*, crotalaza z *Crotalus adamanteus* [83]. Enzymy te używane są jako związki defibrynolityczne w warunkach klinicznych [11]. Do grupy enzymów uwalniających fibrynopeptyd B należą contortrixobin z jadu *Agkistrodon contortrix* [3]. Natomiast gabonase [79] i bilineobin [70] są enzymami koagulacyjnymi, które uwalniają fibrynopeptydy A i B. Kolejne proteinazy z jądów *Vipera russelli* i *Vipera lebetina* aktywują czynnik V kaskady krzepnięcia [84,89].

Proteinazy serynowe, aktywujące Białko C wyizolowano z jądów węży *Agkistrodon contortrix* [50] i *Agkistrodon halys halys* [9]. Niektóre enzymy z tej grupy wykazują również zdolność agregacji płytek krwi. Trombocytyna z jadu *Bothrops atrox* była pierwszym odkrytym enzymem, o takich właściwościach [69]. Enzym ten aktywuje także czynnik XIII kaskady krzepnięcia w wyniku ograniczonej proteolizy [49].

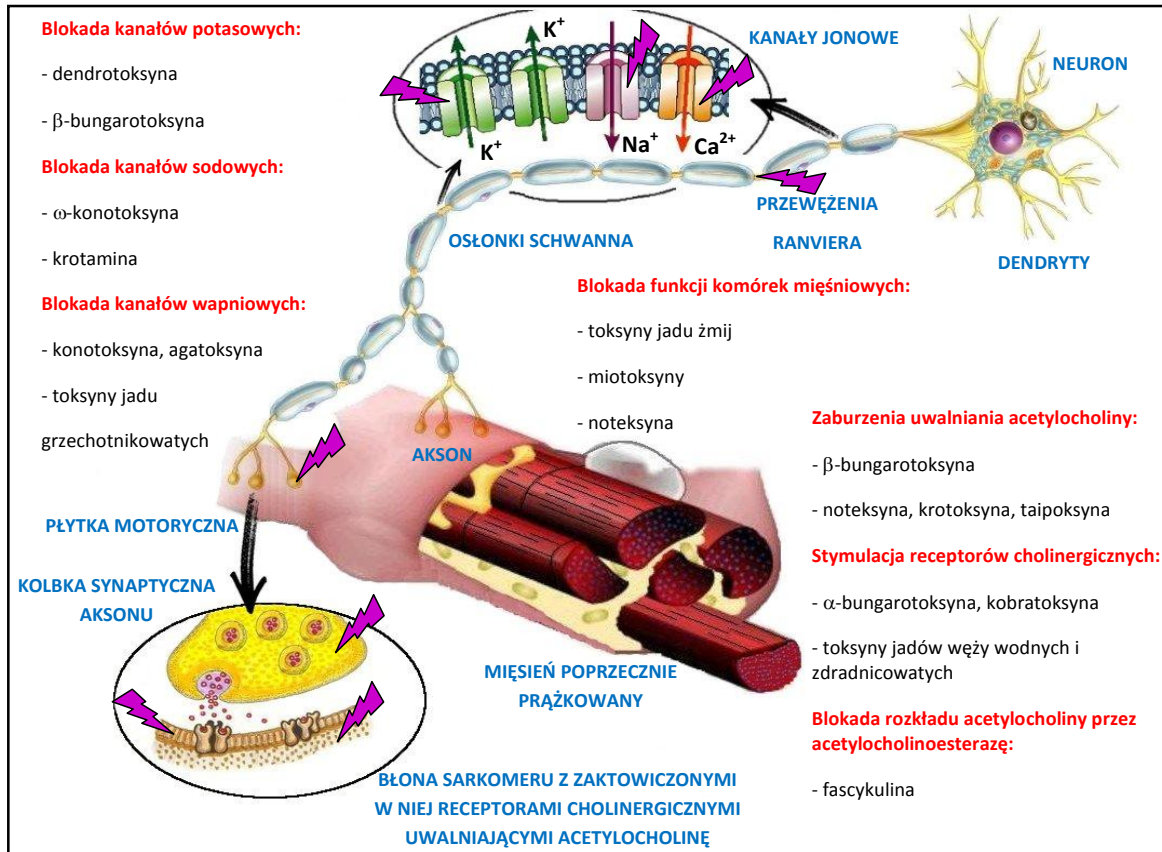
Kolejna grupa proteinaz serynowych tzw. kalikrejinopodobnych ma zdolność uwalniania hipotensyjnej Lys-bradykininy lub bradykininy z kininogenu w wyniku proteolitycznego działania w surowicy i jelitach [83]. Enzymy, takie jak krotolaza, elegaksobina II uwalniają kininę i wykazują aktywność koagulacyjną [75].

Jeszcze inna grupa proteinaz serynowych aktywuje powstawanie plazminy, w wyniku proteolizy wiązania peptydowego między Arg 561 a Val 562 w plazminogenu [95].

6. NEUROTOKSYNY

Węże jadowite zdolne są do wytwarzania neurotoksyn, które oddziałują z różnymi podgrupami receptorów nikotynowych i muskarynowych, umiejscowionych zarówno w obwodowym, jak i w ośrodkowym układzie nerwowym [53,90]. Neuro mięśniowe połączenie mięśni szkieletowych z aksonem, jest pierwszorzędnym miejscem docelowym działania tych substancji (ryc. 2) [76]. Toksyczność neurotoksyn polega na zatrzymaniu neurotransmisji, co doprowadza do porażenia mięśni szkieletowych i mięśni zaangażowanych w proces oddychania, a w konsekwencji do śmierci ukąszonego organizmu [81,82]. Do neurotoksyn należą peptydy wydzielane głównie przez gruczoły jadowe węży wodnych (*Hydrophidae*) i węży z rodziny zdradnicowatych (*Elapidae*). Wśród nich wyróżnia się podgrupę krótkich neurotoksyn (mających 60–62 reszt aminokwasowych) i długich neurotoksyn (70–74 reszt aminokwasowych) [32].

Neurotoksyny mogą się wiązać do receptorów płytek motorycznych, których mediatorem jest acetylocholina



Ryc. 2. Miejsca działania składników jadu węży powodujących zaburzenia przewodnictwa nerwowo-mięśniowego

oddziaływająca na receptory w błonach postsynaptycznych mięśni szkieletowych, przez co uniemożliwiają konkurencyjnie wiązanie acetylocholinyl do tych receptorów [29,72]. Wynikiem interakcji jest zablokowanie wewnątrzkomórkowej transmisji neuroprzeźkaźników między synapsą aksonu, a receptorem komórkowym umiejscowionym w obrębie błony komórki mięśniowej [82]. Neurotoksyny wywołujące takie efekty nazywane są α -neurotoksynami lub kuraromimetykami. Oddziałują one ze sobą w procesie transmisji cholinergicznyl w obrębie płytki motorycznej [29,72]. Interakcja ta charakteryzuje się dużym powinowactwem i dużą selektywnością wobec postsynaptycznych receptorów cholinergicznyl, wywołując blokadę w przekazywaniu neuroprzeźkaźników w obrębie płytki motorycznej [29,72]. Większość α -neurotoksyn pochodzi z jądów węży z rodziny *Elapidae* lub *Hydrophiidae* i zaliczana jest do rodziny toksyn z motywem strukturalnym trzech palców (three-finger toxin family). Inne neurotoksyny biorące udział w procesie neurotransmisji cholinergicznyl, np. fascykuliny. Hamują one aktywność acetylocholinoesterazy obecnej w obrębie płytki nerwowo-mięśniowej i w obrębie synaps w układzie nerwowym [29,72].

Badania znakowanych α -neurotoksyn wykazały, że pokrywają one wszystkie miejsca wiązania acetylocholinyl przez jej receptory. Neurotoksyny te pełnią więc rolę kompetencyjnych inhibitorów receptorów acetylocholinergicznyl. Wykazano również, że wiązanie neurotoksyny do receptorów acetylocholinyl nie indukuje otwierania się kanałów jonowych, czego głównym objawem jest porażenie wiotkie [29,72].

Mięśnie szkieletowe w obrębie płytki motorycznej wrażliwe są także na neurotoksyny po stronie presynaptycznej neuronów. Presynaptyczne toksyny, takie jak β -bungarotoksyna, grupa fosfolipaz A_2 lub kompleks zawierający oba te enzymy, pośredniczą w wywoływaniu efektów neurotoksycznych przez hamowanie uwalniania acetylocholinyl [94].

Jedną z pierwszych wyizolowanych neurotoksyn była α -bungarotoksyna, otrzymana z jadu węży *Bungarus multicinctus*. Należy ona do rodziny α -neurotoksyn charakteryzujących się obecnością motywu strukturalnego trzech palców, który odpowiada za dużą plastyczność białka. Mechanizm działania β -bungarotoksynyl polega na wiązaniu się jej z obwodowym neuronem ruchowym, z którego przenoszona jest do komórek nerwowych pnia mózgu i rdzenia kręgowego. Poprzez synapsy dostaje się do zakończeń presynaptycznych, gdzie powoduje zahamowanie uwalniania inhibitorów przeźkaźnikowych, takich jak np. glicyna czy kwas γ -aminomasłowy. To wywołuje stałe i nadmierne pobudzenie neuronów ruchowych. Konsekwencją takiej reakcji jest wzmożone napięcie i napady skurczów tonicznych mięśni szkieletowych. β -bungarotoksyna zdolna jest do wywołania całkowitej blokady w obrębie płytki motorycznej po upływie 1,5–3 godzin od ukąszenia.

6.1. Konformacja strukturalna trzech palców

Konformacja strukturalna trzech palców jest charakterystyczna dla α -neurotoksyn otrzymywanych z jądów węży

z rodziny *Elapidae* i *Hydrophilidae* [72]. Są to zwykle polipeptydy o charakterze nieenzymatycznym, które zawierają 60–74 reszt aminokwasowych [24,27,32,57]. Peptydy te zawierają również co najmniej 4 mostki disiarczkowe [26]. Mają one charakterystyczny układ przestrzenny utworzony przez trzy przyległe do siebie pętle, które wydostają się z globularnego, hydrofobowego rdzenia, który usieciowany jest dodatkowo przez cztery konserwatywne mostki disiarczkowe [30,61,73]. Trzy pętle wystające natomiast z regionu rdzeniowego przypominają trzy rozciągnięte palce ręki. Taka toksyna jest płaską cząsteczką ze smukłą wklęsłością, przypominającą kształtem liść [29,72,73].

Plastyczność motywu strukturalnego trzech palców sprawia, że struktura ta podatna jest na fluktuacje i subtelne odchylenia, związane np. z liczbą struktur β , rozmiarem pętli i długością C-końcowego fragmentu, tzw. ogona białkowego. Różnorodność ta ma znaczenie w kontekście selektywności cząsteczek docelowych i funkcjonalności tych białek oraz może odpowiadać za neurotoksyczność (wobec ośrodków obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego), cytotosycyzność, kardiotosycyzność, a także hamowanie enzymów, np. acetylocholinoesterazy czy proteinaz. Skutkiem jest obniżenie ciśnienia tętniczego i agregacja płytek krwi [46,47]. W zależności od ich sekwencji aminokwasowej, jak i w związku z charakterem ich struktury czwartorzędowej, sklasyfikowano te białka w kilku grupach [72]. Pierwsza grupa α -neurotoksyn to tzw. krótkołańcuchowe α -neurotoksyny. Druga grupa to tzw. długołańcuchowe α -neurotoksyny. Trzecią grupę tych białek stanowią nietypowe długołańcuchowe α -neurotoksyny izolowane z jadów węży wodnych mające 69 reszt aminokwasowych i 4 mostki disiarczkowe [72]. Czwartą grupę natomiast tworzą tzw. niekonwencjonalne długołańcuchowe α -neurotoksyny np. kandoksyna z *Bungarus candidus* zbudowane z 65–67 reszt aminokwasowych, zawierające 5 mostków disiarczkowych o różnym umiejscowieniu [72]. Charakteryzują się one względnie niską wartością medialnej dawki śmiertelnej LD_{50} (5–80 mg/kg) w porównaniu z typowymi α -neurotoksynami, dla których LD_{50} wynosi przeciętnie 0,04–0,3 mg/kg [72]. Motyw trzech palców występuje nie tylko w omówionych wyżej α -neurotoksynach, ale również w takich substancjach jak: kalciseptyny [2,22], kardiotosyny, [12,24], dendroaspiny [60] i białka antykoagulacyjne [10,48].

6.2. Toksyny działające na kanały potasowe

Dotąd zidentyfikowano przynajmniej osiem różnych typów motywów strukturalnych charakterystycznych dla substancji toksycznych oddziałujących zarówno na kanały potasowe, jak i kanały sodowe oraz cztery typy takich struktur dla kanałów wapniowych i jeden związany z kanałem chlorkowym [67,68]. Klasyfikacja ta powstała na podstawie selektywności kanałów jonowych, a nie na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej [67,68].

Substancje toksyczne oddziałujące na kanały potasowe są wytwarzane nie tylko przez węże, ale także przez mięczaki morskie czy ukwiały. Zawierają one 22–60 reszt aminokwasowych oraz dwa lub cztery mostki disiarczkowe, odpowiedzialne za sieciowanie tych białek [43,67]. Ze względu na rodzaj motywu strukturalnego, podzielono je na trzy kategorie. Podział ten wiąże się z obecnością elementów

struktury drugorzędowej, takich jak α -helisy czy β -kartki oraz ich wzajemnych kombinacji. Zwykle motywy te zawierają od dwóch do czterech dobrze zdefiniowanych elementów struktury drugorzędowej. Na przykład układ zawierający trzy elementy typu β -kartki (typ $\beta\beta\beta$) można spotkać u morskich mięczaków, natomiast α -helikalne elementy mogą się charakteryzować różnymi kombinacjami, występują zwykle w toksynach skorpionów czy ukwiałów [67,68]. Kombinacje struktur drugorzędowych zawierających zarówno fragmenty α -helikalne, jak i β -struktury są charakterystyczne dla substancji toksycznych wytwarzanych np.: przez pająki (hanatoksyna), skorpiony (maurotoksyny, charybdotoksyny), węże (dendrotoksyna I) [67,68].

Zwykle struktura drugorzędowa w toksynach oddziałujących na kanały potasowe jest względnie zachowana, ale długość łańcucha peptydowego i usytuowanie mostków disiarczkowych determinuje ich oddziaływanie z białkami docelowymi. Zablockowanie kanałów potasowych przebiega według mechanizmu blokowania ich porów [67,68]. Wiąże się to ze swoistym usytuowaniem głównych reszt pochodzących z polipeptydu o właściwościach toksycznych w obrębie poru kanału. I tak łańcuchy boczne reszt lizylowych komponują się w porze kanału jonowego, podobnie jak reszty o charakterze aromatycznym (Tyr lub Phe) czy alifatycznym (Leu). Reszta lizylova znajduje się w centrum pierścienia utworzonego przez grupy karbonylowe czterech reszt o charakterze kwaśnym (Asp lub Glu), należących do czterech poszczególnych podjednostek α budujących kanały potasowe. Poprzez oddziaływania hydrofobowe dochodzi również do kontaktu między resztami aromatycznymi lub alifatycznymi z klasterem reszt aromatycznych należących do podjednostek α budujących te białka [67,68].

Dendrotoksyna, oddziałująca z kanałami potasowymi wydzielana jest przez gruczoły jadowe mamby pospolitej (*Dendroaspis angusticeps*) zamieszkującej głównie terytory Kenii i Tanzanii. Substancja ta wiąże się przede wszystkim z przewężeniami Ranviera w neuronach motorycznych, blokując aktywność kanałów potasowych bramkowanych napięciem oraz opóźniając repolaryzację błony komórkowej. Substancja ta powoduje więc wydłużenie trwania potencjału czynnościowego i zwiększenie poziomu wydzielanej acetylocholino w obrębie płytki neuromięśniowej, co ostatecznie może prowadzić do nadpobudliwości mięśni i drgawek. Działanie dendrotoksyny otrzymanej z jadu mamby pospolitej jest niemal 500-krotnie silniejsze w porównaniu z 3,4-diaminopirydyną. W sposób synergistyczny do dendrotoksyny działa fascikulina, która mobilizuje pokłady acetylocholino w sąsiedztwie płytki neuromięśniowej oraz w synapsach cholinergicznym w ośrodkowym układzie nerwowym.

6.3. Toksyny działające na kanały sodowe

Dotychczas scharakteryzowano i opisano osiem różnych motywów strukturalnych toksyn zwierzęcych oddziałujących z kanałami sodowymi bramkowanymi napięciem [14,67,68]. Zawierają one struktury drugorzędowe typu β lub α wielokrotnie powtórzone lub ich wzajemne kombinacje, np. typ $\alpha\beta\beta\beta$ charakterystyczny dla protaminy uzyskiwanej z jadu węży. Trzy spośród ośmiu typów motywów strukturalnych – $\beta\beta\beta$, $\alpha\alpha$, $\beta\alpha\beta\beta$ – charakterystyczne

są również dla toksyn rozpoznających kanały potasowe [67,68]. Z punktu widzenia ich budowy, toksyny oddziałujące na kanały sodowe charakteryzują się dłuższymi łańcuchem polipeptydowym niż toksyny blokujące kanały potasowe. Zawierają także mostki disiarczkowe. Ponadto wykorzystują różne mechanizmy działania, klasyfikowane są zwykle jako modyfikatory czynności otwierania i zamykania się kanałów. Dotychczas nie zostały poznane ich krytyczne reszty aminokwasowe oddziałujące z docelowymi kompleksami białkowymi [67,68].

6.4. Toksyny działające na kanały wapniowe

Toksyny oddziałujące z kanałami wapniowymi klasyfikowane są zazwyczaj do czterech typów motywów strukturalnych. Są to struktury typu $\beta\beta$, $\beta\beta\beta$ (ω -konotoksyna) lub $\beta_1\beta_2\beta_3\beta_4$ (toksyna z jadu mamby), a także kombinacje struktur drugorzędowych typu α i β [67,68]. Niektóre z tych toksyn wykazują jednak reaktywność krzyżową wobec innych typów kanałów jonowych. Toksyny tego typu nie tylko są czynnikami modyfikującymi mechanizm otwierania się i zamykania tych kanałów, ale mogą także być czynnikami blokującymi funkcjonalny por [67,68]. Ponadto motyw strukturalny typu $\beta\alpha\beta\beta$ jest wspólny dla wszystkich typów kanałów jonowych, co świadczy o sprawnej adaptacji tych toksyn względem różnych typów kanałów jonowych, czyniąc je substancjami mniej selektywnymi, a w konsekwencji bardziej niebezpiecznymi [67,68].

7. NEUROTOKSYNY POSTSYNAPTICZNE

Jest to grupa nieenzymatycznych polipeptydów izolowanych z jądów węży głównie z rodziny *Elapidae* i *Hydrophiidae* [41]. Zbudowane są one z 60–74 reszt aminokwasowych i zawierają 4–5 mostków disiarczkowych [77,94]. Substancje te są zdolne do blokowania przekazu cholinergicznego w miejscach postsynaptycznych obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego. Są one antagonistami receptora muskarynowego w obrębie mięśni szkieletowych [94]. Charakteryzują się różną kinetyką wiązania swoich substratów i różnym powinowactwem wobec receptorów cholinergicznym. W związku z ich selektywnością receptorową dzielą się na neurotoksyny kuraromimetyczne (α -neurotoksyny), toksyny k i toksyny muskarynowe [29,41,72]. Toksyny kuraromimetyczne (neurotoksyny krótkołańcuchowe zawierające 60–62 reszt aminokwasowych z 4 mostkami dwusiarczkowymi oraz neurotoksyny długołańcuchowe zawierające 70–74 reszt aminokwasowych z 5 mostkami dwusiarczkowymi) łączą się z receptorami płytki motorycznej w mięśniach szkieletowych, blokując transmisję acetylocholinę przez co zaburzają przekaz nerwowo-mięśniowy, a tym samym imitują działanie kurary [29,72]. Neurotoksyny tego typu charakteryzują się dużym powinowactwem wobec tych receptorów (K_D 10^{-12} – 10^{-9} mol/L) i dużą swoistością wobec miejsc wiązania acetylocholinę w receptorach muskarynowych umiejscowionych w mięśniach szkieletowych. Receptory te są heteropentamerycznymi białkami zawierającymi pięć podjednostek typu $2\alpha 1$, $1\beta 1$, 1γ oraz 1δ oraz dwa miejsca wiązania neuroprzekaznika umiejscowione na powierzchni pomiędzy łańcuchami $\alpha 1$ i γ oraz $\alpha 1$ i δ . α -neurotoksyny wiążąc się zamiennie z acetylocholiną powodują zahamowanie procesu otwierania się kanału jonowego umiejscowionego w obrębie receptora, co powoduje blokadę transmisji odpowiednich neuroprzekazników w mięśniach

szkieletowych, skutkiem czego jest porażenie. Jeżeli taka reakcja dotyczy np. mięśni układu oddechowego, to dochodzi do ich porażenia i ostatecznie do śmierci [29,41,72].

Dotąd wyizolowano i określono sekwencję aminokwasową niemal 100 neurotoksyn postsynaptycznych. Do grupy tych związków należą długołańcuchowe polipeptydy np. α -bungarotoksyna z *Bungarus multicinctus* oraz krótkołańcuchowe polipeptydy np. α -kobratoksyna z *Naja kaouthia*. Pozycje czterech mostków disiarczkowych zarówno w polipeptydach krótko- i długołańcuchowych są wspólne, natomiast lokalizacja piątego mostku disiarczkowego przypada na reszty Cys-30 i Cys-34 w obrębie neurotoksyn długołańcuchowych [77,94]. Funkcjonalne różnice między dwoma typami α -neurotoksyn związane są przede wszystkim z kinetyką asocjacji i dysocjacji z receptorami acetylocholinergicznymi w mięśniach szkieletowych. Krótkołańcuchowe neurotoksyny charakteryzują się bowiem tendencją do asocjacji z receptorami 6–7 razy szybciej i do dysocjacji 5–9 razy szybciej w porównaniu z neurotoksynami długołańcuchowymi. Wykazano również, że długołańcuchowe neurotoksyny wiążą się z neuronalną podjednostką $\alpha 7$ receptora z większym powinowactwem w porównaniu z neurotoksynami krótkołańcuchowymi [41,72].

Wiele badań funkcjonalnych przeprowadzono dzięki erabutoksynie, krótkołańcuchowej neurotoksynie wyizolowanej z jadu węży z gatunku *Laticauda semifasciata*. Dzięki zastosowaniu eksperymentów mutagenyzy kierunkowej wykazano, że zastąpienie jednej tylko reszty Ser-8, Lys-27, Trp-29, Asp-31 lub Arg-33 powoduje wielokrotne obniżenie powinowactwa wiązania się tej toksyny do białek docelowych. Potwierdzono również, że reszty aminokwasowe erabutoksyny Gln-7, Gln-10, Ile-36, Glu-38 i Lys-47 są istotne do określenia wartości stałej wiązania z mięśniowymi receptorami płytki motorycznej w mięśniach szkieletowych. Te same reszty aminokwasowe znajdujące się w obrębie trzech pętli tworzą tzw. miejsce funkcjonalne związane z osiągnięciem dużego powinowactwa względem substratu [29,41,72].

Natomiast toksyny typu k, zbudowane zwykle z 66 reszt aminokwasowych, zawierające 5 mostków disiarczkowych, wiążą się z receptorami acetylocholinergicznymi w neuronach i jako jedyne z tej grupy toksyn tworzą dimery [29,72].

Natomiast toksyny o działaniu muskarynopodobnym oddziałują z różnymi podtypami receptorów muskarynowych, np. powodują stymulację receptorów M_1 i M_2 objawiającą się zwężeniem naczyń krwionośnych. Ich zablokowanie powoduje zaś obniżeniem oporu naczyniowego, natomiast aktywacja receptorów M_3 i M_5 powoduje rozszerzenie naczyń [29,72].

Chociaż poznano już niemal 100 neurotoksyn o charakterze postsynaptycznym, to tylko nieliczne scharakteryzowano farmakologicznie. Niektóre z nich przyporządkowano do grupy substancji działających postsynaptycznie jedynie na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej lub zaobserwowaniu paraliżu u myszy poddanych ich działaniu [41].

8. NEUROTOKSYNY PRESYNAPTICZNE

Neurotoksyny presynaptyczne są to toksyny wchodzące w skład jądów węży z rodziny *Crotalidae*, *Elapidae*,

Hydrophiidae i *Viperidae*. Dzieli się one na toksyny typu PLA₂, ze względu na aktywność fosfolipazy A₂ oraz na denrotoksyny i fascikuliny [41,63,94]. Odgrywają one główną rolę w procesach trawiennych. Ich działanie neurotoksyczne jest związane z zdolnością do hydrolizowania fosfolipidów zakotwiczonych w błonach komórek [41,63,81].

Toksyny typu PLA₂ zawierają fosfolipazę A₂, która może tworzyć kompleksy z kwaśnymi, zasadowymi lub obojętnymi podjednostkami białkowymi. W badaniach na myszach, ustalono toksyczność niektórych neurotoksyn wyznaczając parametr LD₅₀ [81]. I tak wykazano, że tekstilotoksyna (*P. textilis*) i taipoksyna (*Oxyuranus scutellatus*) w dawce odpowiednio 1 i 2 µg/kg m.c., pseudeksyna A (*P. porphyriacus*) w dawce 1300 µg/kg m.c. oraz krotoksyna (*Crotalus durissus terrificus*) w dawce 110 µg/kg m.c. powodują efekt letalny u zwierząt laboratoryjnych [81].

Toksyny presynaptyczne są zbudowane z pojedynczego łańcucha (np. kaudoksyna z jadu *Bitis caudalis*, noteksyna z *Notechis scutatus*, ammodytoksyna z *Vipera ammodytes*), bądź z dwóch łańcuchów polipeptydowych (β-bungarotoksyna z *Bungarus multicinctus*). Mogą również tworzyć kompleksy dwupodjednostkowe (np.: krotoksyna z jadu *Crotalus durissus terrificus*), bądź kompleksy wielopodjednostkowe (np. trójpodjednostkowa tajpoksyna z jadu tajpana czy pięciopodjednostkowa tekstilotoksyna z *Pseudonaja textilis*). Większość z nich zawiera kilka izoform różniących się nieznacznie sekwencją aminokwasową. Chociaż nie udowodniono jak dotąd bezpośredniego związku między strukturą łańcucha polipeptydowego, a ich siłą działania, to przypuszcza się, że jest taka korelacja charakterystyczna dla struktury określonego polipeptydu względem sposobu jego wiązania [81,94].

Toksyny o charakterze presynaptycznym działają kompleksowo, zwykle w sposób trójfazowy. Początkowo obserwuje się krótkie zahamowanie uwalniania neuroprzekazników z zakończeń nerwowych, takich jak acetylocholina. Pierwszy etap jest więc niezależny od aktywności fosfolipazowej. W drugiej fazie ich uwalnianie wzrasta ze względu

na działanie fosfolipazy, wreszcie w ostatniej fazie dochodzi do całkowitej blokady procesu neurotransmisji [81,94].

WNIOSKI

Badanie takich związków, jak toksyny z jądów węży staje się także pomocne w próbach rozszyfrowywania różnych mechanizmów komórkowych na poziomie molekularnym. Ponadto przyczynia się do projektowania nowych czynników terapeutycznych, które w przyszłości mogłyby być stosowane w leczeniu chorób układu krążenia oraz schorzeń hematologicznych. Chociaż mechanizmy działania niektórych z nich zostały już poznane, to niezbędne jest prowadzenie kolejnych badań w kierunku określenia zależności między strukturą, a funkcją nowych białek antykoagulacyjnych. Może się to przyczynić również do określenia punktów regulacyjnych w kaskadzie krzepnięcia krwi, co może za sobą pociągać próby projektowania nowatorskich strategii w rozwoju czynników terapeutycznych o charakterze antykoagulacyjnym.

Swoistość neurotoksyn jest tak bardzo perfekcyjna, że są one zdolne do rozpoznawania subtelnych różnic w obrębie miejsc wiązania pojedynczej subpopulacji białka receptorowego. Przykładem tego są miejsca wiązania neurotoksyn umiejscowione w obrębie powierzchni podjednostek białkowych α1/γ lub α1/δ budujących mięśniowy receptor acetylocholinowy. Białko to składa się z podjednostek α, β, γ i δ w następującej kolejności (α1)2β1γδ. Tego typu substancje pozyskiwane z jądów węży, charakteryzujące się znaczącymi właściwościami farmakologicznymi, są niezwykle ważnym i interesującym narzędziem stosowanym w badaniach funkcjonalności receptorów i kanałów jonowych.

Lepsze zrozumienie charakterystycznych motywów strukturalnych niektórych substancji toksycznych może się przyczynić do projektowania nowych cząsteczek o bardzo unikalnych funkcjach biologicznych, zwłaszcza że białka te zwykle nie ulegają degradacji i są odporne na czynniki mutagenne [34]. Mogą także w przyszłości stać się doskonałymi składnikami nowych leków zaprojektowanych do stosowania klinicznego.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Alape-Girón A., Persson B., Cederlund E., Flores-Díaz M., Gutiérrez J.M., Thelestam M., Bergman T., Jörnvall H.: Elapid venom toxins: multiple recruitments of ancient scaffolds. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 259: 225–234
- [2] Albrand J.P., Blackledge M.J., Pascaud F., Hollecker M., Marion D.: NMR and restrained molecular dynamics study of the three-dimensional solution structure of toxin FS2, a specific blocker of the L-type calcium channel, isolated from black mamba venom. *Biochemistry*, 1995; 34: 5923–5937
- [3] Amiconi G., Amoresano A., Boumis G., Brancaccio A., De Cristofaro R., De Pascalis A., Di Girolamo S., Maras B., Scaloni A.: A novel venom B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. *Biochemistry*, 2000; 39: 10294–10308
- [4] Ami R.K., Ward R.J.: Phospholipase A2 – a structural review. *Toxicon*, 1996; 34: 827–841
- [5] Arocas V., Lemaire C., Bouton M.C., Bezeaud A., Bon C., Guillin M.C., Jandrot-Perrus M.: Inhibition of thrombin-catalyzed factor V activation by bothrojaracin. *Thromb. Haemost.*, 1998; 79: 1157–1161
- [6] Arocas V., Zingali R.B., Guillin M.C., Bon C., Jandrot-Perrus M.: Bothrojaracin: a potent two-site-directed thrombin inhibitor. *Biochemistry*, 1996; 35: 9083–9089
- [7] Atoda H., Ishikawa M., Mizuno H., Morita T.: Coagulation factor X-binding protein from *Deinagkistrodon acutus* venom is a Gla domain-binding protein. *Biochemistry*, 1998; 37: 17361–17370
- [8] Azevedo-Marques M.M., Cupo P., Coimbra T.M., Hering S.E., Rossi M.A., Laure C.J.: Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*, 1985; 23: 631–636
- [9] Bakker H.M., Tans G., Yukelson L.Y., Janssen-Claessen T.W., Bertina R.M., Hemker H.C., Rosing J.: Protein C activation by an activator purified from the venom of *Agkistrodon halys halys*. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 1993; 4: 605–614
- [10] Banerjee Y., Mizuguchi J., Iwanaga S., Kini R.M.: Hemextin AB complex, a unique anticoagulant protein complex from *Hemachatus haemachatus* (African ringhals cobra) venom that inhibits clot initiation and factor VIIa activity. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 42601–42611
- [11] Bell W.R. Jr.: Defibrinogenating enzymes. *Drugs*, 1997; 54(Suppl.3): 18–30
- [12] Bilwes A., Rees B., Moras D., Ménez R., Ménez A.: X-ray structure at 1.55 Å of toxin γ, a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion into membranes. *J. Mol. Biol.*, 1994; 239: 122–136

- [13] Całkosiński I., Dobrzyński M., Całkosińska M., Seweryn E., Bronowicka-Szydelko A., Dzierzba K., Ceremuga I., Gamian A.: Characterization of an inflammatory response. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2009; 63: 395–408
- [14] Całkosiński I., Zasadowski A., Bronowicka-Szydelko A., Dzierzba K., Seweryn E., Dobrzyński M., Gamian A.: Amphibian skin secretions as a new source of antibiotics and biologically active substances. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2009; 63: 537–548
- [15] Castro H.C., Dutra D.L., Oliveira-Carvalho A.L., Zingali R.B.: Bothroalernin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*, 1998; 36: 1903–1912
- [16] Castro H.C., Fernandes M., Zingali R.B.: Identification of bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops species* and *Lachesis muta*. *Toxicon*, 1999; 37: 1403–1416
- [17] Chang L., Chung C., Huang H.B., Lin S.: Purification and characterization of a chymotrypsin inhibitor from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 283: 862–867
- [18] Chang L.S., Wang J.J., Cheng Y.C., Chou W.M.: Genetic organization of *Bungarus multicinctus* protease inhibitor-like proteins. *Toxicon*, 2008; 51: 1490–1495
- [19] Chen C., Hsu C.H., Su N.Y., Lin Y.C., Chiou S.H., Wu S.H.: Solution structure of a Kunitz-type chymotrypsin inhibitor isolated from the elapid snake *Bungarus fasciatus*. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 45079–45087
- [20] Chioato L., Ward R.J.: Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A2 by sequence analysis and site directed mutagenesis. *Toxicon*, 2003; 42: 869–883
- [21] Cintra-Francischinelli M., Pizzo P., Rodrigues-Simioni L., Ponce-Soto L.A., Rossetto O., Lomonte B., Gutiérrez J.M., Pozzan T., Montecucco C.: Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of acceptors. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009; 66: 1718–1728
- [22] de Weille J.R., Schweitz H., Maes P., Tartar A., Lazdunski M.: Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 2437–2440
- [23] Du X.Y., Sim D.S., Lee W.H., Zhang Y.: Blood cells as targets of snake toxins. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2006; 36: 414–421
- [24] Dufton M.T., Hider R.C.: Structure and pharmacology of elapid cytotoxins. *Pharmacol. Ther.*, 1988; 36: 1–40
- [25] Eastman J., Wilson E.J., Cervensky C., Rosenberry T.L.: Fasciculin 2 binds to the peripheral site on acetylcholinesterase and inhibits substrate hydrolysis by slowing a step involving proton transfer during enzyme acylation. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 19694–19701
- [26] Endo T., Tamiya N.: Current view on the structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. *Pharmacol. Ther.*, 1987; 34: 403–451
- [27] Endo T., Tamiya N.: Structure-function relationships of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. In: *Snake Toxins*. Pergamon Press, 1991: 165–222
- [28] Fox J.W., Serrano S.M.: Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, 2005; 45: 969–985
- [29] Fruchart-Gaillard C., Mourier G., Marquer C., Ménez A., Servent D.: How three-finger-fold toxins interact with various cholinergic receptors. *J. Mol. Neurosci.*, 2006; 30: 7–8
- [30] Fry B.G., Wüster W., Kini R.M., Brusic V., Khan A., Venkataraman D., Rooney A.P.: Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. *J. Mol. Evol.*, 2003; 57: 110–129
- [31] Fry B.G., Wüster W., Ramjan R.S., Jackson T., Martelli P., Kini R.M.: Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxicological implications. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003; 17: 2047–2062
- [32] Fujimi T.J., Nakajyo T., Nishimura E., Ogura E., Tsuchiya T., Tamiya T.: Molecular evolution and diversification of snake toxin genes, revealed by analysis of intron sequences. *Gene*, 2003; 313: 111–118
- [33] Fujisawa D., Yamazaki Y., Lomonte B., Morita T.: Catalytically inactive phospholipase A2 homologue binds to vascular endothelial growth factor receptor-2 via a C-terminal loop region. *Biochem. J.*, 2008; 411: 515–522
- [34] Gilquin B., Bourgoïn M., Ménez R., Le Du M.H., Servent D., Zinn-Justin S., Ménez A.: Motions and structural variability within toxins: implication for their use as scaffolds for protein engineering. *Protein Sci.*, 2003; 12: 266–277
- [35] Grant G.A., Chiappinelli V.A.: κ -Bungarotoxin: complete amino acid sequence of a neuronal nicotinic receptor probe. *Biochemistry*, 1985; 24: 1532–1537
- [36] Gutiérrez J.M., Escalante T., Rucavado A.: Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 2009; 54: 976–987
- [37] Gutiérrez J.M., Ownby C.L.: Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, 2003; 42: 915–931
- [38] Halfon S., Craik C.S.: Introduction: serine peptidases and their clans. W: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Red.: Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F., Academic Press, London, 1998; 3–4
- [39] Harris J.B., Goonetilleke A.: Animal poisons and the nervous system: what the neurologist needs to know. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2004; 75(Suppl.3): iii40–iii46
- [40] Harvey A.L.: Presynaptic effects of toxins. *Int. Rev. Neurobiol.*, 1990; 32: 201–239
- [41] Hodgson W.C., Wickramaratna J.C.: *In vitro* neuromuscular activity of snake venoms. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2002; 29: 807–814
- [42] Jaroniewski W.: *Jadowite węże świata*. Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne. Warszawa 1992
- [43] Jenkinson D.H.: Potassium channels – multiplicity and challenges. *Br. J. Pharmacol.*, 2006; 147(Suppl.1): S63–S71
- [44] Jerusalinsky D., Harvey A.L.: Toxins from mamba venoms: small proteins with selectivities for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1994; 15: 424–430
- [45] Karalliedde L.: Animal toxins. *Br. J. Anaesth.*, 1995; 74: 319–327
- [46] Kini R.M.: Molecular moulds with multiple missions: functional sites in three-finger toxins. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2002; 29: 815–822
- [47] Kini R.M.: Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem. J.*, 2006; 397: 377–387
- [48] Kini R.M., Haar N.C., Evans H.J.: Non-enzymatic inhibitors of coagulation and platelet aggregation from *Naja nigricollis* venom are cardiotoxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988; 150: 1012–1016
- [49] Kirby E.P., Niewiarowski S., Stocker K., Kettner C., Shaw E., Brudzynski T.M.: Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. I. Purification and characterization of the enzyme. *Biochemistry*, 1979; 18: 3564–3570
- [50] Kisiel W., Kondo S., Smith K.J., McMullen B.A., Smith L.F.: Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix* contortrix venom. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 12607–12613
- [51] Koh D.C., Armugam A., Jeyaseelan K.: Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006; 63: 3030–3041
- [52] Kornalik F., Blombäck B.: Prothrombin activation induced by Ecarin – a prothrombin converting enzyme from *Echis carinatus* venom. *Thromb. Res.*, 1975; 6: 57–63
- [53] Kukhtina V.V., Weise C., Muranova T.A., Starkov V.G., Franke P., Hucho F., Wnendt S., Gillen C., Tsetlin V.I., Utkin Y.N.: Muscarinic toxin-like proteins from cobra venom. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 6784–6789
- [54] Lambeau G., Lazdunski M.: Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1999; 20: 162–170
- [55] Lomonte B., Angulo Y., Calderón L.: An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*, 2003; 42: 885–901
- [56] Lomonte B., Angulo Y., Sasa M., Gutiérrez J.M.: The phospholipase A2 homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. *Protein Pept. Lett.*, 2009; 16: 860–876
- [57] Low B.W., Preston H.S., Sato A., Rosen L.S., Searl J.E., Rudko A.D., Richardson J.S.: Three dimensional structure of erabutoxin b neurotoxic protein: inhibitor of acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976; 73: 2991–2994
- [58] Mackessy S.P.: Biochemistry and pharmacology of colubrid snake venoms. *J. Toxicol. Toxin. Rev.*, 2002; 21: 43–83
- [59] Markland F.S.: Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 1998; 36: 1749–1800
- [60] McDowell R.S., Dennis M.S., Louie A., Shuster M., Mulkerrin M.G., Lazarus R.A.: Mambin, a potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor structurally related to the short neurotoxins. *Biochemistry*, 1992; 31: 4766–4772
- [61] Ménez A.: Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? *Toxicon*, 1998; 36: 1557–1572

- [62] Mizuno H., Fujimoto Z., Atoda H., Morita T.: Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 7230–7234
- [63] Montecucco C., Gutiérrez J.M., Lomonte B.: Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008; 65: 2897–2912
- [64] Monteiro R.Q., Zingali R.B.: Inhibition of prothrombin activation by bothrojaracin, a C-type lectin from *Bothrops jararaca* venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000; 382: 123–128
- [65] Monteiro R.Q., Zingali R.B.: Bothrojaracin, a proexosite I ligand, inhibits factor Va-accelerated prothrombin activation. *Thromb. Haemost.*, 2002; 87: 288–293
- [66] Mora R., Maldonado A., Valverde B., Gutiérrez J.M.: Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A2 homologue on a lymphoblastoid cell line. *Toxicon*, 2006; 47: 75–86
- [67] Mouhat S., Andreotti N., Jouirou B., Sabatier J.M.: Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Curr. Pharm. Des.*, 2008; 14: 2503–2518
- [68] Mouhat S., Jouirou B., Mosbah A., De Waard M., Sabatier J.M.: Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.*, 2004; 378: 717–726
- [69] Niewiarowski S., Kirby E.P., Brudzynski T.M., Stocker K.: Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. *Biochemistry*, 1979; 18: 3570–3577
- [70] Nikai T., Ohara A., Komori Y., Fox J.W., Sugihara H.: Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995; 318: 89–96
- [71] Nirthanan S., Charpantier E., Gopalakrishnakone P., Gwee M.C., Khoo H.E., Cheah L.S., Kini R.M., Bertrand D.: Neuromuscular effects of candoxin, a novel toxin from the venom of the Malayan krait (*Bungarus candidus*). *Br. J. Pharmacol.*, 2003; 139: 832–844
- [72] Nirthanan S., Gwee M.C.: Three-finger α -neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J. Pharmacol. Sci.*, 2004; 94: 1–17
- [73] Osipov A.V., Kasheverov I.E., Makarova Y.V., Starkov V.G., Vorontsova O.V., Ziganshin R.Kh., Andreeva T.V., Serebryakova M.V., Benoit A., Hogg R.C., Bertrand D., Tsetlin V.I., Utkin Y.N.: Naturally occurring disulfide-bound dimers of three-fingered toxins: a paradigm for biological activity diversification. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 14571–14580
- [74] Ouyang C., Teng C.M.: Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquatus* venom. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976; 420: 298–308
- [75] Oyama E., Takahashi H.: Purification and characterization of a thrombin like enzyme, elegaxobin II, with lys-bradykinin releasing activity from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-Habu). *Toxicon*, 2003; 41: 559–568
- [76] Peng H.B., Xie H., Rossi S.G., Rotundo R.L.: Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *J. Cell. Biol.*, 1999; 145: 911–921
- [77] Phui Yee J.S., Nanling G., Afifyan F., Donghui M., Siew Lay P., Armugam A., Jeyaseelan K.: Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy. *Biochimie*, 2004; 86: 137–149
- [78] Pirkle H.: Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. *Thromb. Haemost.*, 1998; 79: 675–683
- [79] Pirkle H., Theodor I., Miyada D., Simmons G.: Thrombin-like enzyme from the venom of *Bitis gabonica*. Purification, properties, and coagulant actions. *J. Biol. Chem.*, 1986; 261: 8830–8835
- [80] Rigoni M., Pizzo P., Schiavo G., Weston A.E., Zatti G., Caccin P., Rossetto O., Pozzan T., Montecucco C.: Calcium influx and mitochondrial alterations at synapses exposed to snake neurotoxins or their phospholipid hydrolysis products. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 11238–11245
- [81] Rossetto O., Rigoni M., Montecucco C.: Different mechanism of blockade of neuroexocytosis by presynaptic neurotoxins. *Toxicol. Lett.*, 2004; 149: 91–101
- [82] Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C.: Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.*, 2000; 80: 717–766
- [83] Serrano S.M., Maroun R.C.: Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, 2005; 45: 1115–1132
- [84] Siigur E., Samel M., Tonismägi K., Subbi J., Reintamm T., Siigur J.: Isolation, properties and N-terminal amino acid sequence of a factor V activator from *Vipera lebetina* (Levantine viper) snake venom. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1429: 239–248
- [85] Swenson S., Markland F.S. Jr.: Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon*, 2005; 45: 1021–1039
- [86] Takeya H., Nishida S., Miyata T., Kawada S., Saisaka Y., Morita T., Iwanaga S.: Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X). A novel metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 14109–14117
- [87] Tambourgi D.V., dos Santos M.C., Furtado Mde F., de Freitas M.C., da Silva W.D., Kipnis T.L.: Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. *Br. J. Pharmacol.*, 1994; 112: 723–727
- [88] Tamiya T., Fujimi T.J.: Molecular evolution of toxin genes in Elapidae snakes. *Mol. Divers.*, 2006; 10: 529–543
- [89] Tokunaga F., Nagasawa K., Tamura S., Miyata T., Iwanaga S., Kisiel W.: The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom. Identification of isoproteins RVV-V α , -V β , and -V γ and their complete amino acid sequences. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263: 17471–17481
- [90] Tsetlin V.I., Hucho F.: Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Lett.*, 2004; 557: 9–13
- [91] Yamada D., Morita T.: Purification and characterization of a Ca²⁺-dependent prothrombin activator, multactivase, from the venom of *Echis multisquamatus*. *J. Biochem.*, 1997; 122: 991–997
- [92] Yamada D., Sekiya F., Morita T.: Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in *Echis carinatus* venom with a unique catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 5200–5207
- [93] Yamazaki Y., Matsunaga Y., Nakano Y., Morita T.: Identification of vascular endothelial growth factor receptor-binding protein in the venom of eastern cottonmouth. A new role of snake venom myotoxic Lys49-phospholipase A2. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 29989–29992
- [94] Yang L., Li Q.: Prediction of presynaptic and postsynaptic neurotoxins by the increment of diversity. *Toxicol In Vitro*, 2009; 23: 346–348
- [95] Zhang Y., Wisner A., Xiong Y., Bon C.: A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 10246–10255

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.