

ТОКСИНЫ ЯДА АФРИКАНСКИХ МАМБ (*DENDROASPIS SP.*) КАК АЛЛЕЛОХИМИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ

Д.Б. Гелашвили, Е.Б. Романова*

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского (Нижний Новгород, Россия)

* Эл. почта: romanova@ibbm.unn.ru

Статья поступила в редакцию 20.04.2023; принята к печати 08.06.2023

В обзоре рассмотрено современное состояние исследований уникального набора полипептидов яда африканских мамб. Приведена новейшая структурная классификация выделенных из яда мамб полипептидов: пептиды, стабилизированные тремя дисульфидными связями, – дендротоксины (dendrotoxins), ингибиторы трипсина (trypsin inhibitors), кальциклудин (calcicludein); пептиды, стабилизированные четырьмя дисульфидными связями, гомологичные «трехпальцевым» α -нейротоксином из яда других змей – α -нейротоксины (α -neurotoxins), мускариновые токсины (muscarinic toxins), фасцикулины (fasciculins), токсины ангиустипсина типа (angusticeps type toxins), кальцисептины (calciseptines), мамбалгины (mambalgins). Отдельный класс объединяет полипептиды разных размеров и структур: натрийуретический пептид дендроасписа (Dendroaspis Natriuretic Peptide, DNP), мамбин (mambin: син. dendroaspin), кишечный токсин MIT1 (mamba intestinal toxin1). Обсуждены механизмы действия, разнообразие функций и области применения конкретных полипептидов. Уникальные белки и пептиды яда мамб воздействуют на клеточную мембрану и ассоциированные с ней белки/рецепторы, влияя тем самым на ключевые процессы жизнедеятельности клетки: передачу сигналов, клеточную адгезию, миграцию, пролиферацию и жизнеспособность клеток. Физиологическое действие на органы и ткани делает токсины яда мамб перспективными для использования в качестве лекарственных препаратов, действующих на клеточном и субклеточном уровнях. Успехи в изучении структуры и механизмов действия токсинов на специфические рецепторы в организме приближают к созданию лекарств нового поколения для обезболивания и лечения сердечно-сосудистых заболеваний и других терапевтических средств.

Ключевые слова: африканские мамбы, токсины яда, токсические полипептиды, аллелохимические агенты.

TOXINS FROM THE VENOMS OF AFRICAN MAMBAS (*DENDROASPIS SP.*) AS ALLELOCHEMICAL AGENTS

D.B. Gelashvili, E.B. Romanova*

Nizhniy Novgorod National Research University named after N.I. Lobachevsky
Nizhniy Novgorod, Russia

Email: romanova@ibbm.unn.ru

The current state of affairs in studies of the unique polypeptide composition of the venoms of African mambas is reviewed. The latest structural classification of the polypeptides isolated from mamba venoms is presented: the peptides stabilized by three disulfide bonds α dendrotoxins, trypsin inhibitors, and calcicludein; and the peptides stabilized by four disulfide bonds and homologous to the "triductylous" α -neurotoxins from venoms of other snakes – α -neurotoxins, muscarinic toxins, fasciculins, angusticeps-type toxins, calciseptins, and mambalgins. A separate class comprises peptides having variable sizes and structures: dendroaspis natriuretic peptide (DNP), mambin (dendroaspin), and mamba intestinal peptide (MIT1). The mechanisms of toxic effects, the diversity of functions, and the application fields of specific peptides are discussed. The unique peptides from mamba venoms affect the cell membrane and associated receptor proteins thus impacting key aspects of cell viability including signal transduction, and cell adhesion, migration and vitality. The physiological effects of the toxins make them promising for development of drugs acting at the cellular and subcellular levels. Advances in studying the structure and the mechanisms of action of mamba toxins will help to develop new-generation therapies for pain and cardiovascular and other diseases.

Keywords: African mambas, venom toxins, toxic polypeptides, allelochemical agents.

Введение

1. Токсины, стабилизированные тремя дисульфидными связями (гомологи ВРТИ)
 - 1.1. Дендротоксины (dendrotoxins)
 - 1.2. Ингибиторы трипсина (trypsin inhibitors)
 - 1.3. Кальциклудин (calcicludein).
 2. Токсины, стабилизированные четырьмя дисульфидными мостиками (гомологи «трехпальцевых» α -нейротоксинов змей сем. Elapidae)
 - 2.1. α -Нейротоксины (α -neurotoxins)
 - 2.2. Мускариновые токсины (muscarinic toxins)
 - 2.3. Фасцикулины (fasciculins)
 - 2.4. Токсины ангустицепсинового типа (angusticeps type toxins)
 - 2.5. Кальцисептины (calciseptines)
 - 2.6. Мамбалгины (*Mambalgins*)
 3. Другие токсины
 - 3.1. Натрийуретический пептид дендроасписа (*Dendroaspis Natriuretic Peptide, DNP*)
 - 3.2. Мамбин (mambin: син. dendroaspin)
 - 3.3. Кишечный токсин MIT1 (mamba intestinal toxin 1)
- Заключение
Литература

ВВЕДЕНИЕ

Ядовитость с древнейших времен привлекает внимание ученых. Яды как оружие и как целебные вещества, поиск новых ядов и эффективных противоядий – вот далеко не полный перечень вопросов, над которыми веками работали ученые в разных странах. Яды, вырабатываемые живыми организмами, служат химическими факторами, участвующими в межвидовых (аллелохимических) взаимодействиях [1, 74]. Примеры использования химических веществ для защиты и нападения встречаются как среди животных, так и среди растений. Вещества, участвующие в аллелохимических взаимодействиях и приносящие пользу организму продуценту, называют алломонами. К их числу относятся яды, вырабатываемые животными, – зоотоксины и растениями – фитотоксины. Среди зоотоксинов змеиные яды давно и по праву занимают одно из лидирующих положений. Несмотря на значительные успехи, достигнутые современной медициной в лечении отравлений змеиными ядами, смертность от укусов ядовитыми змеями по-прежнему высока, змеиные укусы представляют собой серьезную угрозу для общественного здравоохранения и вызывают значительную заболеваемость и смертность во всем мире [37]. Наибольшую опасность они представляют в Южной, Юго-Восточной Азии и Африке к югу от Сахары. Но внимание к африканским змеям – мамбам – продиктовано не только и не столько их эпидемиологической опасностью, сколько уникальным составом их яда, ставшим известным в последние десятилетия и открывающим большие перспективы применения в биологии и медицине.

Мамбы (род *Dendroaspis*) – ядовитые древесные змеи из подсемейства Elapinae (Аспиды) [45]. Они встречаются в Африке, к югу от Сахары, и живут в дуплах деревьев, покинутых норах или гудах камней. Будучи активными в дневное время, они охотятся на мелких млекопитающих, птиц, древесных лягушек и ящериц. Передвигаются по земле, в редких случаях поднимаются на деревья и кустарники. В настоящее время в род включают 4 вида:

Dendroaspis angusticeps (Smith, 1849) – узкоголовая мамба;

Dendroaspis polylepis polylepis (Gunter, 1864) – черная мамба;

Dendroaspis viridis (Hallowell, 1844) – зеленая мамба, или западная мамба;

Dendroaspis jamesoni kaimosae (Traill, 1843) – мамба Джеймсона.

D. angusticeps – узкоголовая (или зеленая восточная) мамба – встречается в дождевых лесах в восточной части Южной Африки: в Натале, Мозамбике, Восточной Замбии, Танзании. Средняя длина – 180 см, но иногда змеи вырастают до 250 см. Взрослые особи этого вида имеют, как правило, изумрудно-зеленый цвет.

D. polylepis polylepis – черная мамба – распространена на нескольких разрозненных участках в тропической части Африки. Встречается от Сенегала до Сомали и от Эфиопии до Юго-Западной Африки. Однако она не проникает в тропические дождевые леса бассейна Конго. Черная мамба достигает в длину 2,5–3,0 м, отдельные экземпляры – до 4,5 м. Большинство этих змей имеет темно-оливковую окраску или металлическо-серый цвет, брюшная сторона – светло-коричневая или грязно-белая. Свое название она получила из-за черной окраски внутренней полости пасти, по форме похожей на гроб. Высокая скорость передвижения (17–20 км/ч) в сочетании с агрессивностью делает черную мамбу очень опасной.

D. viridis – зеленая западная мамба – обитает в экваториальных областях Западной Африки: юго-западный Сенегал, Гамбия, Гвинея, Сьерра-Леоне, Либерия, Кот-д’Ивуар, южная Гана, Того и северный Бенин. Это изящного телосложения змея с длинным конусообразным хвостом. Средняя длина взрослой особи варьирует в пределах от 1,8 до 2,1 м. Наиболее крупные экземпляры достигают 2,4 м в длину.

D. jamesoni kaimosae – мамба Джеймсона – является эндемиком Восточной Африки и в основном встречается в западной Кении, а также в Уганде, Руанде и соседней Демократической Республике Конго. Взрослые особи достигают длины от 1,5 до 2,5 м. Тело длинное, стройное и немного сплюснутое. По внешнему виду и окрасу мамба Джеймсона схожа с зеленой мамбой.

Яды мамб в основном состоят из уникального набора полипептидов с молекулярной массой от 6000 до 8000 Да с исключительно большим разнообразием

функций, часть из которых еще не выяснены. Далека до завершения и номенклатура токсинов мамб. Полипептиды яда мамб относятся к двум различным структурным классам [56].

1. Пептиды, стабилизированные тремя дисульфидными связями, гомологичные основному ингибитору трипсина поджелудочной железы (ВРТИ) (рис. 1). Известный ингибитор сериновых протеаз Кунитца-типа – это бычий панкреатический ингибитор трипсина (*Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*, ВРТИ, аprotинин) – широко применяется в медицине в качестве антипротеолитического, антифибринолитического и гемостатического препарата благодаря способности ингибировать трипсин, химо tripsин, калликреин, плазмин и другие протеазы.

2. Пептиды, стабилизированные четырьмя дисульфидными связями, гомологичные «трехпальцевым» α -нейротоксинам из яда других змей сем. Elapidae, которые блокируют никотиновый рецептор ацетилхолина (рис. 2). α -Нейротоксины называют «трехпальцевыми», или «трехпальцевыми» токсинами (*three-finger toxins*, *3FTxs*), потому что их пространственная структура напоминает три петли или три пальца. Такая укладка (фолдинг) характерна для белков, выполняющих самые разнообразные функции [8].

3. Помимо этих двух основных структурных групп, в яде мамб есть небольшое количество полипептидов разных размеров и структур, которые относят к третьей группе, в том числе: натрийуретический пептид дендроасписа (*Dendroaspis Natriuretic Peptide*, DNP); мамбин (*mambin*: син. *dendroaspin*) и кишечный токсин МИТ1 (*mamba intestinal toxin 1*).

1. ПЕПТИДЫ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ТРЕМЯ ДИСУЛЬФИДНЫМИ СВЯЗЯМИ (ГОМОЛОГИ ВРТИ)

1.1. Дендротоксины (dendrotoxins)

Дендротоксины – это небольшие белки, которые были выделены в конце прошлого столетия из яда мамб (*Dendroaspis*) [20, 23–28, 33, 62 и др.]. Дендротоксины содержат 57–60 аминокислотных остатков (а. о.) и три дисульфидные связи. Они гомологичны ингибитору сериновой протеазы Кунитца-типа (апротинин; ВРТИ). В качестве примера ниже приведены сведения о дендротоксинах, выделенных из ядов *D. angusticeps* и *D. polylepis*.

Так, из яда восточной зеленой мамбы *D. angusticeps* был выделен токсин δ -DTX (син. DaK, токсин K, δ -дендротоксин, $C_{13}S_1C_3$; UniProt² P00982), а также α -DTX (син. токсин DTX, α -дендротоксин, $C_{13}S_2C_3$; UniProt P00980).

Из яда черной мамбы *D. p. polylepis* были выделены три полипептида, названные токсин I (син. DpI, DTX-I, дендротоксин I; UniProt P00979), токсин K (син. DpK, DTX-K, дендротоксин K; UniProt P00981) и токсин DTX-B (син. dendrotoxin B, mambaquaretin-7; UniProt P00983) (табл. 1).

Дендротоксины обладают очень короткой спиралью вблизи N-конца пептида, а также двувитковой альфа-спиралью вблизи C-конца. Двучечечный антипа-

² Здесь и далее первичная структура (аминокислотная последовательность) приводится в соответствии с UniProt (URL: <http://www.uniprot.org/>) – базой данных последовательностей белков, охватывающей различные аспекты анализа белковых последовательностей.

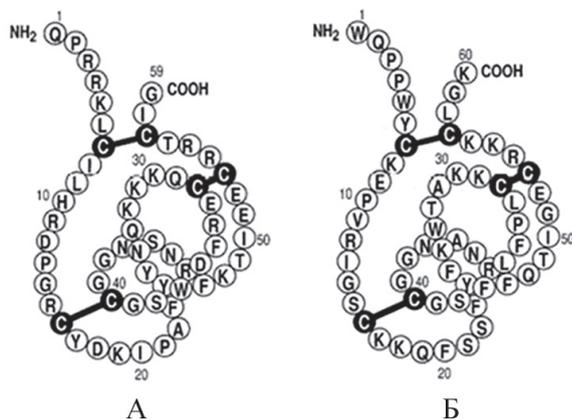


Рис. 1. Представители токсических полипептидов с тремя дисульфидными связями. А – блокатор K^+ -каналов дендротоксин; Б – блокатор Ca^{2+} -каналов кальциклудин [56]. Здесь и далее названия аминокислотных остатков (а. о.) даны в однобуквенном коде



Рис. 2. Представители токсических полипептидов с четырьмя дисульфидными связями. А – «короткий» нейротоксин DpI; Б – блокатор Ca^{2+} -каналов кальцисептин [56]

Характеристики дендротоксинов

| Продуцент | Токсин | Первичная структура | UniProt |
|------------------------|--|--|---------|
| <i>D. angusticeps</i> | δ -dendrotoxin, δ -DTX (Toxin C13S1C3) | AAKYCKLPVR YGPKKKKIPS FYYKWKAKQC LPFDYSGCGG NANRFKTIIEE CRRTC VG Дисульфидные связи: 5–55; 14–38; 30–51 | P00982 |
| <i>D. angusticeps</i> | α -dendrotoxin, α -DTX (Toxin C13S2C3) | QPRRKLCILH RNPGRCYDKI PAFYYNQKKK QCERFDWSGC GGNSNRFKTI EECRRTCIG Дисульфидные связи: 7–57; 16–40; 32–53 | P00980 |
| <i>D. p. polylepis</i> | dendrotoxin I, DTX-I (Dendrotoxin-I) | QPLRKLCILH RNPGRCYQKI PAFYYNQKKK QCEGFTWSGC GGNSNRFKTI EECRRTCIRK Дисульфидные связи: 7–57; 16–40; 32–53 | P00979 |
| <i>D. p. polylepis</i> | dendrotoxin K, DTX-K | AAKYCKLPLR IGPKRKIPS FYYKWKAKQC LPFDYSGCGG NANRFKTIIEE CRRTC VG Дисульфидные связи: 5–55; 14–38; 30–51 | P00981 |
| <i>D. p. polylepis</i> | dendrotoxin B, DTX-B | RPYACELIVA AGPCMFFISA FYYSKGANKC YPFTYSGCRG NANRFKTIIEE CRRTC VV Дисульфидные связи: 5–55; 14–38; 30–51 | P00983 |

раллельный бета-лист занимает центральную часть молекулярной структуры. Все дендротоксины стабилизированы тремя дисульфидными связями, что способствует сохранению их конформаций [28].

Уже первые исследования ядов мамб показали, что они вызывают вялый нервно-мышечный паралич, который объяснялся присутствием токсинов, блокирующих рецепторы ацетилхолина. Хотя яд *D. angusticeps* был менее токсичен, чем яды других мамб, было отмечено, что он усиливает действие ацетилхолина, а некоторые фракции яда *D. angusticeps* вызывали обширные мышечные фибрилляции у мышей, которые были объяснены облегчением высвобождения ацетилхолина под действием компонента яда, названного дендротоксином. Наибольший интерес представляет действие дендротоксинов на ЦНС. У животных при внутрижелудочковом введении дендротоксина в дозе всего несколько наногرامмов на грамм массы тела развивались эпилептиформные судороги с летальным исходом. Позже было показано, что дендротоксины являются мощными и селективными блокаторами потенциал-управляемых калиевых каналов подсемейства Kv1 в нейронах. Следует подчеркнуть, что несмотря на структурное сходство с ВРТИ, дендротоксины практически не обладают антипротеазной активностью, в то время как ВРТИ не блокируют K⁺-каналы.

Исследования с клонированными K⁺-каналами показали, что α -дендротоксин из яда зеленой мамбы

D. angusticeps в наномолярном диапазоне блокирует каналы Kv1.1, Kv1.2 и Kv1.6, в то время как токсин K из яда черной мамбы *D. p. polylepis* преимущественно блокирует каналы Kv1.1. Структурные аналоги дендротоксинов помогли определить молекулярные свойства распознавания различных типов K⁺-каналов, а дендротоксины с радиоактивной меткой оказались полезны, помогая обнаружить токсины из других источников, которые связываются с K⁺-каналами. Будучи маркерами подтипов K⁺-каналов *in vivo*, дендротоксины стали широко использоваться в качестве зондов для изучения функции K⁺-каналов в физиологии и патофизиологии. Так, высокочувствительные акцепторы дендротоксинов обнаружены в синаптических мембранах мозга цыпленка и крысы. Эти участки активно связывают также известный пресинаптический нейротоксин β -бунгаротоксин. Предполагают, что дендротоксин и его аналоги имеют общие участки связывания с β -бунгаротоксином. Кроме того, три гомолога дендротоксина, каликлюдины, выделены из морского анемона *Anemonia sulcata*.

1.2. Ингибиторы трипсина (trypsin inhibitors)

Кроме дендротоксинов в яде мамб содержатся другие гомологи ВРТИ, которые в отличие от дендротоксинов обладают в разной степени ингибирующей трипсин активностью [26, 30, 56, 61, 66 и др.]. Так, из яда *D. p. polylepis* выделены ингибиторы E и B

dendrotoxin E

LQHRTFCKLP AEPGPKASI PAFYYNWAAK KCQLFHYGGC KGNANRFSTI
EKCRHACVG

Дисульфидные связи: 7–57; 16–40; 32–53.

dendrotoxin B

RPYACELIVA AGPCMFFISA FYYSKGANKC YPFTYSGCRG NANRFKTIEE CRRTCIVV

Дисульфидные связи: 5–55; 14–38; 30–51.

Рис. 3. Первичная структура ингибиторов трипсина из яда *D. p. polylepis*: dendrotoxin E (UniProt P00984) и dendrotoxin B (UniProt P00983)

(рис. 3). Ингибитор E (DpE) содержит 59 а. о. (мол. масса 6620 Да), ингибирует трипсин с $K_d = 1$ нМ, но менее активен по отношению к химотрипсину ($K_d = 100$ нМ). Ингибитор E на 49% идентичен DTXI, однако обладает сродством к сайтам связывания DTXI в ЦНС в наномолярном диапазоне, а также связывает ионы переходных металлов, таких как медь и кобальт. Ингибитор B, состоящий из 57 а. о. (мол. масса 6476 Да), напротив, слабо ингибирует трипсин, практически не ингибирует химотрипсин и имеет слабое сродство к K^+ -каналам (IC_{50} 2 мкМ).

Из яда *D. angusticeps* выделены четыре токсина (по две изоформы, содержащие 57 и 59 а. о.; UniProt Q7LZE3). «Длинные» токсины (59 а. о.) отличаются от «коротких» токсинов (57 а. о.) N-концевым расширением L-Q (Leu–Gln). Другим структурным отличием является замена Arg/His в позиции 55. Длинная изоформа Arg55 идентична ингибитору трипсина E из яда *D. p. polylepis*. Для этой группы ингибиторов предложено название ϵ -дендротоксины, чтобы следовать номенклатуре дендротоксинов (α , β , γ , δ), предложенной Benishin et al. в 1988 году [11]. ϵ -Дендротоксины избирательно блокируют калиевые каналы в синапсоммах мозга крысы. Структурно ϵ -дендротоксины наиболее похожи на δ -дендротоксины, с которыми они идентичны на 64%. Было высказано предположение, что они представляют собой структурные и функциональные промежуточные звенья между ингибиторами протеаз и нейротропными дендротоксинами.

Кроме того, из яда *D. angusticeps* выделены два полипептида, содержащие 59 и 57 а. о. и названные DaE1³ (59 а. о.; UniProt P0DMJ6) и DaE2 (57 а. о., UniProt P0DMJ6) [70]. Эти полипептиды более чем на 95% идентичны ингибитору трипсина E (DpE) *D. p. polylepis*. Полипептиды DaE ингибируют каналы Kv1.1 со значением IC_{50} 300 нМ. Их можно рассматривать как новые дендротоксины, хотя и с довольно низким сродством по сравнению с α -DTX.

³ Здесь и далее в обозначении шифра токсина первые две буквы – латинское название змеи, например – *Dendroaspis angusticeps*.

1.3. Кальциклудин (calcicludine)

Нейротоксин кальциклудин – (60 а. о., 3 дисульфидные связи, мол. масс. 6986 Да, pI = 10,3; UniProt P81658) – мономерный полипептид Кунитц-типа, выделенный из яда (*D. angusticeps*) [51, 55, 56, 63].

Анализ структуры кальциклудина показывает, что он имеет ингибиторную складку протеазы Кунитц-типа. Его трехмерная структура аналогична структуре змеиных дендротоксинов, блокирующих K^+ -каналы. Конформационные различия с ингибиторами протеазы и дендротоксинами локализованы в α -спирали 3_{10} и петле 1 (сегменты 1–7 и 10–19), крайней точке β -шпильки (сегмент 27–30) и петле 2 (сегмент 39–44). Эти области соответствуют функциональным участкам ингибитора трипсина поджелудочной железы крупного рогатого скота (BPTI) и дендротоксинов. Полагают, что именно различия между кальциклудин и дендротоксином, локализованные в N-концевой части полипептидов, ответственны за селективность этих пептидов для кальциевых и калиевых каналов, соответственно.

Кальциклудин ингибирует активированные потенциал-управляемые высокопороговые Ca^{2+} -каналы (L-, N- и P-типов), являясь высокоэффективным блокаторм Ca^{2+} -каналов L-типа, в том числе в сердечных клетках, угнетая сократительную способность сердца. Кальциклудин не проявляет ингибирующей активности в отношении протеиназ и не модулирует потенциал-зависимые K^+ - и Na^+ -каналы. Особенно эффективно (EC_{50} 0,2 нМ) кальциклудин блокирует Ca^{2+} -каналы L-типа в гранулярных клетках мозжечка, но при этом не влияет на каналы L-типа скелетных мышц крыс. Каналы N-типа спинномозгового ганглия цыпленка (DRG) более чувствительны к кальциклудину, чем каналы N-типа DRG крысы. Кальциклудин блокирует каналы P-типа с EC_{50} в диапазоне 1–5 нМ. На данный момент кальциклудин является единственным известным блокатором кальциевых каналов, имеющим складку Кунитцовского типа.

2. ПЕПТИДЫ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ЧЕТЫРЬМЯ ДИСУЛЬФИДНЫМИ МОСТИКАМИ (ГОМОЛОГИ «ТРЕХПАЛЬЦЕВЫХ» α -НЕЙРОТОКСИНОВ ЗМЕЙ СЕМ. ELAPIDAE)

2.1. α -Нейротоксины (α -neurotoxins)

α -Нейротоксины (α -НТ) – полипептидные токсины, характерные для представителей сем. Elapidae, в том числе мамб. В настоящее время α -НТ классифицируются на «короткие», содержащие 60–62 а. о., стабилизированные четырьмя дисульфидными связями, с мол. массой 6÷7 кДа и «длинные» α -НТ, содержащие 70–74 а. о., стабилизированные пятью дисульфидными связями, с мол. массой 6÷7 кДа. В «длинных» токсинах четыре из пяти дисульфидных связей находятся в гомологичных положениях с позициями «коротких» α -НТ. Пятая участвует в формировании дополнительной петли в пространственной структуре молекулы.

Из яда мамб выделена, секвенирована и охарактеризована группа «коротких» и «длинных» α -НТ [10, 56, 64, 65, 71 и др.]. Так, например, из яда *D. viridis* выделены «короткий» токсин («short neurotoxin 1», 60 а. о., мол. масса 6743 Да; UniProt P01418 и два «длинных» токсина: α -elapitoxin-Dv2a (73 а. о., мол. масса 8054 Да; UniProt P01395) и α -elapitoxin-Dv2b (72 а. о., мол. масса 7970 Да; UniProt P01394).

В яде *D. jamesoni kaimosae* обнаружен «короткий» α -НТ («short neurotoxin 1», 60 а. о., мол. масса 6729 Да; UniProt P01417) и «длинный» α -НТ (α -elapitoxin-Djk2a, 72 а. о., мол. масса 8185 Да; UniProt P01393).

В яде *D. p. polylepsis* также содержатся «короткий» α -НТ («short neurotoxin 1», 60 а. о., мол. масса 6915 Да; UniProt P01416) и два «длинных» α -НТ: α -elapitoxin-Dpp2a (72 а. о.; UniProt P01396) и α -elapitoxin-Dpp2d (72 а. о.; UniProt C0HJD7).

Как известно, α -НТ действуют на постсинаптическом уровне, блокируя, подобно кураре, никотиновый рецептор ацетилхолина (nAChR), что приводит к нарушению нервно-мышечной передачи и к смерти от вялого паралича. Нейротоксины из яда мамб действуют подобно другим α -НТ змей: они снижают чувствительность постсинаптической мембраны мышечных волокон к ацетилхолину, что приводит к медленно обратимой блокаде нервно-мышечной передачи. LD₅₀ α -НТ мамб варьирует от 0,04 до 0,90 мкг на 1 г массы тела мышей при подкожном или внутрибрюшинном способах введения.

Из яда *D. p. polylepsis* был выделен атипичный длинноцепочечный трехпальцевый токсин (3FTxs) α -elapitoxin-Dpp2d (α -EPTX-Dpp2d). Зрелый токсин содержит амидированный С-концевой аргинин – посттрансляционную модификацию, редко наблюдаемую для змеиных 3FTxs. α -EPTX-Dpp2d эффективно ингибирует

nAChR нейронального $\alpha 7$ (IC₅₀ 58 ± 24 нМ) и мышечно-го типа (IC₅₀ 114 ± 37 нМ), но не влияет на nAChR типов $\alpha 3\beta 2$ и изоформы $\alpha 3\beta 4$ в концентрациях около 1 мкМ [71].

Профиль активности и данные по связыванию напоминают классические длинноцепочечные 3FTxs со свободными карбоксильными концами, что позволяет предположить, что амидирование существенно не влияет на селективность токсина. Кристаллическая структура α -EPTX-Dpp2d была определена с разрешением 1,7 Å и показала димерную сборку токсина с антипараллельной ориентацией мономеров, однако в физиологических условиях токсин является мономерным.

2.2. Мускариновые токсины (muscarinic toxins)

Первые пептиды, способные конкурировать с мускариновым антагонистом хинуклидилбензилатом (QNB) за связывание с мускариновыми рецепторами ацетилхолина в мозге крысы, были обнаружены в яде *D. angusticeps* [3, 4]. С тех пор в яде мамб было обнаружено несколько других пептидов, которые проявляют различное сродство к пяти известным мускариновым рецепторам ацетилхолина (m1, m2, m3, m4 и m5) [12, 13, 16, 29, 34, 50, 59, 60 и др.].

Мускариновые токсины – полипептиды, содержащие 65–66 а. о., стабилизированные четырьмя дисульфидными связями и имеющие более 60% идентичности первичной структуры, их мол. масса варьирует от 7000 до 7500 Да. Наиболее полно изучены МТ1–МТ7 из яда *D. angusticeps* и МТ α , МТ β и МТ γ из яда *D. p. polylepsis*⁴.

Вторичная структура МТ близка к трехпальцевым петельным α -НТ элапид. МТ характеризуются N-концевым мотивом «LTCV» и С-концевыми остатками «TDKCNX» (рис. 4). Токсин МТ2, который является наиболее распространенным мускариновым токсином, присутствующим в яде *D. angusticeps*, составляет примерно 50% общего количества токсинов в этом яде и обнаруживается в концентрации до 10 мг/г яда. Напротив, токсин МТ7 является менее распространенным токсином в том же яде и был обнаружен в концентрации примерно в 100 раз меньшей по сравнению с токсином МТ2.

МТ первоначально квалифицировались как постсинаптические блокаторы мускариновых рецепторов типа m₁ (локализуются в ЦНС и в вегетативных ганглиях), m₂ (локализуются в сердце) и m₄ (локализуются в сердце, стенке легочных альвеол, ЦНС). Например, токсин МТ7 (UniProt Q8QGR0) связывается с рецептором m₁ в пиколярном диапазоне, то есть его активность по меньшей мере на пять порядков выше, чем по отношению к другим подтипам рецепторов. При этом МТ7 действует как

⁴ Цифровая и буквенная индексация МТ отражает хронологию их обнаружения.

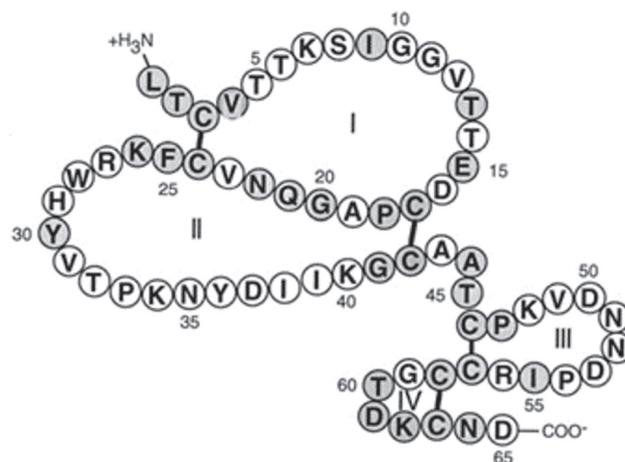


Рис. 4. Пространственная структура токсина MT2. Аминокислотная последовательность MT2. Инвариантные а. о. показаны заштрихованными кружками. Петли, образованные дисульфидными связями, обозначены римскими цифрами с I по IV. Циклы II и III соединены тремя а. о. (43–45), что характерно для «длинных» α -нейротоксинов и кардиотоксинов/цитотоксинов из ряда представителей сем. Elapidae

высокоселективный антагонист подтипа m_1 рецептора благодаря своему высокостабильному взаимодействию с аллостерическим сайтом связывания. Аналогично, токсин MT3 (UniProt P81031) взаимодействует преимущественно с подтипом рецептора m_4 , демонстрируя сродство в наномолярном диапазоне, то есть по меньшей мере на два порядка выше, чем с другими подтипами, являясь конкурентным обратимым блокатором рецепторов этого подтипа.

Напротив, другие токсины: MT1 (UniProt P81030); MT2 (UniProt P60237); MT4 (UniProt Q9PSN1) менее избирательны. Некоторые токсины взаимодействуют с различными подтипами рецепторов с умеренной селективностью; MT α (UniProt P80494) и MT β (UniProt P80495), выделенные из *D. p. polylepis*, демонстрируют несколько более высокую предпочтительность для подтипов m_3 , m_4 и m_5 , чем для m_1 и m_2 .

Позднее выяснилось, что MT обладают весьма различными фармакологическими профилями. Во-первых, было установлено, что токсины MT1 и MT3 не только являются мускаринергическими лигандами, но и конкурируют с адренергическим лигандом за участки связывания на препаратах семянносящих протоков или мембран нейронов коры головного мозга. Во-вторых, в яде мамбы были идентифицированы селективные и мощные адренергические токсины с высокой гомологией с MTs. При этом, если MT7 не обнаруживает связывания с другими рецепторами, кроме m_1 , то синтезированный MT α специфичен для α_{2B} -адренорецепторов, при этом мускариновая активность у него не обнаружена. Кроме того, из яда *D. angusticeps* были выделены селективные блокаторы α -адренорецепторов⁵: ρ -Dalb (ρ -elapitoxin-Dalb; UniProt

⁵ Этот факт послужил основанием в соответствии с рациональной номенклатурой для переименования, например, MT β в ρ -elapitoxin-Dp1a (UniProt P80495) и AdTx1 в ρ -Dala.

P86419) является антагонистом α_{2A} -адренорецепторов, а ρ -Dala (син. AdTx1) является специфичным и селективным пептидным ингибитором α_{1A} Φ -адренорецепторов. Показано, что ρ -elapitoxin-Dalb является антагонистом не только α_2 -адренорецепторов гладких мышц, но и частичным антагонистом дофаминовых рецепторов D3 (рис. 5).

Не исключено, что мускариновая активность может быть обусловлена наличием примеси в образцах токсинов, полученных биохимическими методами. Таким образом, недавняя строгая классификация мускариновых и адренергических токсинов пересмотрена в пользу представлений о способности мускариновых токсинов взаимодействовать одновременно при высоком сродстве с обоими типами рецепторов.

Наглядным примером может служить токсин MT β (ρ -elapitoxin-Dp1a) из яда *D. p. polylepis*, который первоначально был классифицирован как мускариновый токсин, взаимодействующий неселективно и с низким сродством с пятью подтипами мускариновых рецепторов, но который, как было показано впоследствии, очень эффективно взаимодействует с α_{1A} -подтипом α -адренорецепторов.

MTs обнаружены не только в яде видов *Dendroaspis*, но и у других змей. В частности, фракция, взаимодействующая с мускариновыми рецепторами, идентифицирована в яде *Naja n. sputatrix* (сем. Elapidae). Кроме того, показано, что некоторые хроматографические фракции яда кишечнорастных обладают мускариновой активностью.

На основе полифункциональности мускариновых, адренергических и дофаминергических токсинов было выдвинуто предложение об их объединении в одно семейство под названием «аминергические токсины». Не последнюю роль в этом предложении сыграли специфические свойства токсинов из яда мамб.

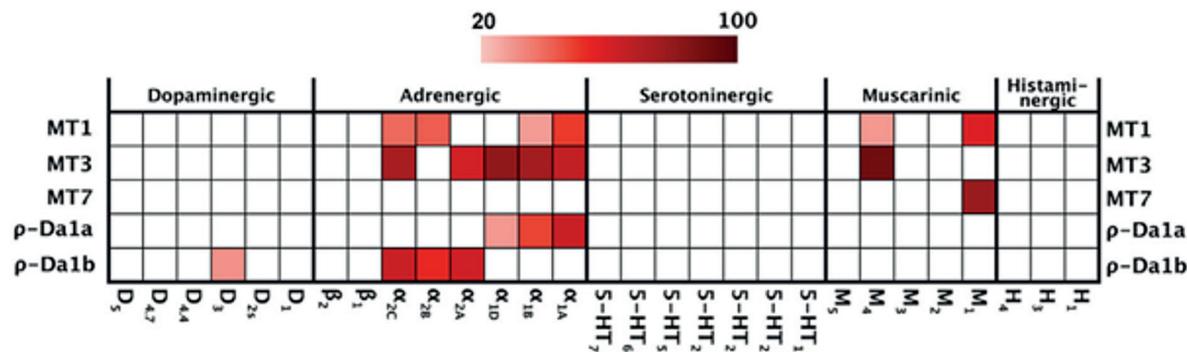


Рис. 5. Фармакологические профили мускариновых токсинов. Тепловая карта представляет результаты скрининга пяти аминергических токсинов (MT1, MT3, MT7, p-Da1a и p-Da1b) на 29 биоаминергических рецепторах. Интенсивность красного цвета пропорциональна связыванию токсина с рецептором (от 20 до 100%) [12]

2.3. Фасцикулины (fasciculins)

Из яда мамбы были выделены четыре пептида с сильной антихолинэстеразной активностью. Их назвали фасцикулинами, поскольку внутрибрюшинное введение нелетальных доз (0,5–3,0 мкг/г) мышам приводит к тяжелым, генерализованным и длительным (5–7 час) фасцикуляциям⁶ с последующим восстановлением. При этом летальная доза, например Fas2 (DL₅₀, внутривенно, мыши), составляет >20 мкг/г. Известны четыре фасцикулина: Fas1 (UniProt P0C1Y9) и Fas2 (UniProt P0C1Z0), выделенные из яда *D. angusticeps*, а также ToxC из яда *D. p. polylepis* и Fas3 из яда *D. viridis* [7, 15, 22, 30, 35, 36, 43, 44, 53 и др.].

Последовательности Fas1 и Fas2 различаются только в положении 47 заменой Tug на Asp. В 1 г яда *D. angusticeps* содержится около 40 мг фасцикулинов, 2/3 из которых составлял Fas2. Фасцикулины содержат 61 а. о., стабилизированы четырьмя дисульфидными связями, имеют мол. массу ~ 7 кДа, принадлежат к тому же структурному типу, что и короткие α-нейротоксины яда змей сем. Elapidae, а также имеют весьма сходную с ними пространственную («трехпальцевую») структуру.

Фасцикулины являются сильными неконкурентными ингибиторами ацетилхолинэстеразы (АХЭ) млекопитающих и электрических органов скатов, блокируют расщепление ацетилхолина в синаптической щели, что приводит к его накоплению в нервно-мышечном синапсе и вызывает подергивание (фасцикуляцию) мышцы. Ki – в диапазоне от пико- до наномолярного. Напротив, АХЭ птиц, насекомых и некоторые другие АХЭ относительно устойчивы к фасцикулинам. Фасцикулины – это единственный известный тип полипептидов со способностью ингибировать АХЭ в естественных условиях. Они более эффективны и более специфичны к АХЭ различного происхождения, чем классические антихолинэстеразные вещества,

⁶ Фасцикуляция – возникающее в расслабленной мышце спонтанное мышечное сокращение («подергивание»).

такие как растительный алкалоид физостигмин (эзерин) или синтетические вещества, такие как фосфорорганические соединения. В ядах мамб фасцикулины действуют синергично с дендротоксинами, увеличивая количество ацетилхолина в нервно-мышечном соединении.

2.4. Токсины ангустицепсинового типа (angusticeps type toxins)

В 1973–1980 годах из яда мамб была выделена и секвенирована группа полипептидов, гомологичных коротким α-нейротоксинам и кардиотоксинам элапид, но гораздо менее токсичных [6, 32, 40, 56]. Так, если при внутрибрюшинных или подкожных инъекциях мышам значения LD₅₀ коротких α-нейротоксинов обычно варьировались от 0,05 до 0,15 мкг/г, а кардиотоксины имели LD₅₀ около 2 мкг/г, то новые полипептиды мамб, названные токсинами ангустицепсинового (angusticeps) типа, обладали гораздо более высокими значениями LD₅₀ (более 250 мкг/г для токсинов DaF8 и DjS5C4, более 40 мкг/г для DaC13S1C1 и более 3,3 мкг/г для Dv4.9.6). В качестве примеров токсинов такого типа из яда различных видов мамб отметим токсин S5C4 (UniProt P01406) из яда *D. jarnesoni kaimosae*; токсин C10S2C2 (UniProt P25684) из яда *D. angusticeps*; токсин F-VIII (DaF8) (UniProt P01404) из яда *D. angusticeps*; токсин FS-2 (UniProt P01414) из яда *D. p. polylepis* [32].

Эти полипептиды иммунологически отличаются не только от α-нейротоксинов и кардиотоксинов, но также друг от друга. На основе степени гомологии между аминокислотными последовательностями токсинов ангустицепсинового типа были выделены три подгруппы, характеризующиеся способностью к синергетическому взаимодействию. Внутри подгруппы токсины характеризуются сходными иммунохимическими реакциями. Токсины подгруппы I являются антихолинэстеразами (ингибиторами ацетилхолинэстеразы) и действу-

латуры, предварительно сокращенной воздействием 40 мМ К⁺. Подобно нифедипину они ингибируют сокращение подвздошной кишки морской свинки, вызванное ацетилхолином. В целом, кальцисептин и его гомологи взаимодействуют с сайтом блокаторов Ca²⁺-каналов L-типа, производных 1,4-дигидропиридина, и ингибируют кальциевый ток. Кальцисептины сохранили общую структуру коротких α -нейротоксинов, но их токсичность значительно ниже; так, DL₅₀ кальцисептина для мышей составляет (мкг/г): 0,25 – при внутривенном; 0,38 – при подкожном и 0,94 – при внутрибрюшинном введении. В опытах *in vitro* синтетические кальцисептин и FS2 вызывают дозозависимое расслабление в предварительно суженной аорте, легочной артерии и трахее крыс. Характер возникновения и продолжительности этих расслабляющих эффектов был аналогичен эффектам, вызываемым нифедипином. В экспериментах *in vivo* с использованием анестезированных крыс кальцисептин и FS2 вызывают гипотензивный эффект более мощный и устойчивый, чем у нифедипина. Эти результаты показывают, что синтетические кальцисептин и FS2 обладают сходной биологической активностью, как у нифедипина, и могут быть уникальными и полезными инструментами для изучения Ca²⁺-каналов.

2.6. Мамбалгины (Mambalgins)

Мамбалгины – группа токсинов, выделенных из ядов черной мамбы *D. p. polylepis* и зеленой мамбы *D. angusticeps* [9, 19, 48, 54, 68].

Первыми в 2012 году из яда *D. p. polylepis* были выделены два пептида (составляющие менее 0,5% общего содержания белка), которые различаются только одним а. о. (Tyr/Phe) в положении 4 и были названы мамбалгин-1 (57 а. о., мол. масса 6554 Да; четыре дисульфидные связи; UniProt P0DKR6) и мамбалгин-2 (57 а. о., мол. масса 6547 Да; четыре дисульфидные связи; UniProt P0DKS3). Ортологический⁷ пептид, который отличается на одну аминокислоту в положении 23 (Thr/Ile), позже был выделен из яда зеленой мамбы *D. angusticeps* и получил название мамбалгин-3 (57 а.о.; мол. масса 6575 Да, 4 дисульфидные связи; UniProt C0HJB0).

Мамбалгины принадлежат к семейству трехпальцевых токсинов (3FTxs), но составляют новое подсемейство с идентичностью последовательности не более чем на 50% с другими змеиными 3FTxs [19]. Их относят к «нетрадиционным» или «слабым» токсинам (weak toxins), таким как CM-2a, CM-3 (*Naja haje aratalifera*) и CM-1b (*Heimachatus haemachatus*), характеризующимися низкой токсичностью (LD₅₀, от

5–80 мг/кг) при сравнении с сильнодействующими α -нейротоксинами (LD₅₀ от 0,04–0,3 мг/кг).

Мамбалгины ингибируют гомомерные кислото-чувствительные ионные каналы (Acid-Sensing Ion Channels, ASIC), в том числе ASIC1a-каналы грызунов и людей, а также гомомерные ASIC1b-каналы и гетеромерные каналы ASIC1a + ASIC2a грызунов [48]. Так, например, мамбалгин-1 предпочтительнее связывается с закрытым каналом и сильно сдвигает кривую pH-зависимости активации в сторону более кислых значений pH. В то же время токсин умеренно сдвигает кривую инактивации в щелочную сторону, стабилизируя тем самым десенситизированное состояние канала и усиливая ингибирование.

Кроме того, мамбалгины ингибируют все основные комбинации ASIC-каналов, экспрессируемые в центральных нейронах. Следует отметить, что специфические полипептидные токсины, нацеленные на ASIC-каналы, выделены также из ядов паука *Psalmopoeus cambridgei* (PcTx1), морского анемона *Anthopleura elegantissima* (APETx2) и коралловой змеи *Micrurus tener tener* (MitTx). Они обычно являются блокаторами ASIC-каналов, за исключением MitTx, который является мощным активатором.

Однако установлено, что мамбалгины эффективнее, чем PcTx1, подавляют ASIC-токи в нейронах спинного мозга, гиппокампа и сенсорных нейронах, что объясняется дополнительным ингибированием мамбалгинами ASIC1b-каналов.

Мамбалгины, селективно блокируя ASIC1-каналы, обеспечивают выраженные анальгетические эффекты *in vivo* у мышей, которые не только не уступают действию морфина, но и устойчивы к налоксону. Этот факт указывает, что обезболивающие механизмы мамбалгинов не вовлекают опиоидную систему и, следовательно, минимизируют опасность развития морфиноподобной зависимости, что делает мамбалгины перспективным терапевтическим средством.

3. ДРУГИЕ ТОКСИНЫ

3.1. Натрийуретический пептид дендроасписа (*Dendroaspis Natriuretic Peptide, DNP*)

Из *D. angusticeps* выделен короткий пептид, содержащий 38 а. о., стабилизированный одной дисульфидной связью, с мол. массой 4193 Да [18, 52, 58]. Пептид получил название натрийуретический пептид дендроасписа (dendroaspis natriuretic peptide, DNP), поскольку гомологичен другим известным натрийуретическим пептидам и содержит кольцевую структуру с 17 а. о., замкнутую дисульфидной связью C7–C23, но отличается концевым удлинением на 15 аминокислот (рис. 7). Как известно, натрийуретические пептиды включают семейство из трех структурно родствен-

⁷ Ортологи – это гомологичные белки из разных организмов, разошедшиеся в процессе видообразования и выполняющие чаще всего одну и ту же функцию.

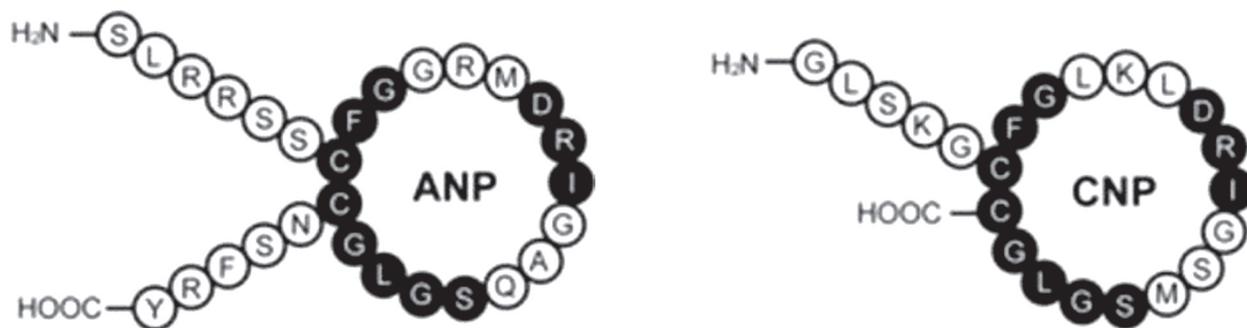


Рис. 7. Кольцевая структура Н-ANP и Н-CNP человека. Черным выделены консервативные а. о. [49]

ных молекул: предсердный натрийуретический пептид (atrial natriuretic peptide, ANP), мозговой натрийуретический пептид (brain natriuretic peptide, BNP) и натрийуретический пептид С-типа (C type natriuretic peptide, CNP). Эти пептиды обладают мощной натрийуретической мочегонной и сосудорасширяющей активностью и участвуют в гомеостазе жидкости в организме и в контроле артериального давления. В отличие от ANP и BNP, CNP не обладает прямой натрийуретической активностью.

Большинство гомологий между DNP и другими натрийуретическими пептидами наблюдается в последовательности 17 а. о., которая разделяет два остатка цистеина. Структура DNP характеризуется наличием 4 остатков пролина, 3 из которых кластеризованы в С-концевой части молекулы. В других натрийуретических пептидах пролин не обнаружен.

Подобно предсердному натрийуретическому пептиду (ANP), DNP расслабляет гладкомышечные клетки сосудов путем высвобождения цГМФ и распознает рецептор ANP_A. Как и все натрийуретические пептиды, DNP также распознает рецепторы ANP_C (находясь внутри клеток, где, связываясь с ANP, снижают его эффект), но с более низким сродством. Это свойство может усиливать сосудорасширяющее действие DNP *in vivo*, тем самым повышая эффективность действия яда. Установлено, что DNP (IC₅₀ 25,5 нМ) блокирует ток в Ca²⁺-каналах L-типа миоцитов правого желудочка, однако этот эффект блокируется KT5823 (1 мкМ) – селективным блокатором протеинкиназы G (PKG). Это указывает, что DNP ингибирует Ca²⁺-каналы путем фосфорилирования канальных белков с участием PKG. Отмечают, что перспективным является создание химерных натрийуретических пептидов, сочетающих их специфическое действие с устойчивостью к протеолизу, ингибирующим их свойства. Такой химерной молекулой является пептид CD-NP, состоящий из полноразмерного человеческого натрийуретического пептида С-типа (CNP), сшитого с С-концевой частью молекулы (15 а. о.) натрийуретического пептида дендроасписа (DNP).

Полагают, что, поскольку DNP является наиболее протеолитически устойчивым натрийуретическим пептидом, идентифицированным на сегодняшний день, то добавление его С-концевой части придает CNP значительную протеолитическую устойчивость. Такие химерные пептиды имеют увеличенный период полураспада и являются терапевтически более перспективными.

3.2. Мамбин (mambin: син. dendroaspin)

Мамбин (UniProt P28375), выделенный из яда *D. jamesoni kaimose*, и его аналог дендроаспин, полученный независимо из ядов *D. jamesoni kaimose* и яда *D. viridis*, представляют собой мономерные полипептиды, содержащие 59 а. о., стабилизированные четырьмя дисульфидными связями, с мол. массой ~6,7 кДа [31, 41, 42, 46, 69, 73, 75]. Характерной особенностью мамбина является наличие RGD-последовательности (Arg-Gly-Asp), обнаруженной в белковых лигандах (дезинтегрин), которые связываются с гликопротеином GP IIb/IIIa. Аргинилглициласпарагиновая кислота (Arg-Gly-Asp, или RGD-последовательность) – трипептид, который является распространенным элементом распознавания и белок-белкового взаимодействия клеточных белков. Интегрины клетки характеризуются наличием участков взаимодействия с RGD-пептидом. Свободный RGD-пептид часто используется в клеточной биологии и биотехнологии благодаря свойству специфически связываться с интегринными и, таким образом, ингибировать межклеточные связи. Дезинтегрины – пептиды из яда змей, в основном сем. Viperidae. Благодаря наличию RGD-последовательности дезинтегрины взаимодействуют с интегринными групп β-1 и β-3, например, гликопротеином IIb/IIIa (интегрин α_{IIb}β₃). Этот мембранный белок, являющийся димерным интегринном, состоящим из альфа-цепи α_{IIb} и бета-цепи β₃, играет важную роль в агрегации тромбоцитов и является мишенью антитромботических препаратов, в том числе змеиных ядов.

Мамбин имеет около 47% сходства с «короткими» постсинаптическими нейротоксинами, обнаруженными в других ядах змей сем. Elapidae, которые не содержат последовательности RGD и не действуют как антагонисты GPIIb-IIIa. Мамбин имеет β -листовую трехпальцевую структуру, характерную для нейротоксинов. Молекулярное моделирование последовательности мамбина показывает большое сходство со структурой эрабутоксина b (постсинаптический нейротоксин из яда морской змеи *Laticauda semifasciata*) за исключением петли, содержащей последовательность RGD [46].

Полагают, что мамбин может представлять собой генетический гибрид нейротоксичных и гемотоксических белков, обнаруженных в змеином яде.

Вначале мамбин был идентифицирован как «короткий» трехпальцевый нейротоксин S_5C_1 , выделенный из яда *D. jamesoni kaimose*, но характеризующийся малой токсичностью (отсутствие токсичности в дозе 130 мкг/г). Впоследствии идентификация RGD-последовательности позволила объяснить его специфическую активность (как дезинтегрин) в отношении торможения агрегации тромбоцитов. Мамбин ингибирует АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов ($IC_{50} = 172 \pm 22$ нМ) и ингибирует связывание очищенного тромбоцитарного рецептора фибриногена GP IIb/IIIa с иммобилизованным фибриногеном ($IC_{50} = 3,1 \pm 0,8$ нМ). Токсическое действие дезинтегринов объясняется их способностью блокировать свертывание крови из-за ингибирования агрегации тромбоцитов. Это в свою очередь объясняется антиадгезивными свойствами пептидов, которые связываются с интегринами на поверхности клеток и блокируют их функции.

3.3. Кишечный токсин MIT1 (mamba intestinal toxin 1)

Кишечный токсин MIT1 (UniProt P25687) выделен из яда *D. p. polylepis* и представляет собой богатый цистеином полипептид, стабилизированный пятью дисульфидными связями, устойчивый к классическим специфическим эндопротеазам [14, 57]. Трехмерная структура растворимого MIT1 обнаруживает сходство с колипазой⁸, хотя идентичность аминокислотной последовательности не превышает 20% [14].

Эффекты, индуцированные MIT1, нейтрализуются тетродотоксином (1 мкМ) в проксимальном и ди-

⁸ *Колипаза (CLPS)* – представляет собой белковый кофермент, необходимый для оптимальной ферментативной активности панкреатической липазы. Он секретируется поджелудочной железой в неактивной форме проколипазы, которая активируется в просвете кишечника трипсином. Его функция заключается в предотвращении ингибирующего действия солей желчных кислот на катализируемый липазой интрадуоденальный гидролиз пищевых длинноцепочечных триглицеридов.

стальном отделах толстой кишки, но не в продольной мышце подвздошной кишки. MIT1-индуцированное расслабление проксимального отдела толстой кишки обратимо ингибируется ингибитором NO-синтазы L-NAME (200 мкМ). Меченый ^{125}I -MIT1 связывается с высоким сродством как с мембранами подвздошной кишки, так и с мембранами головного мозга ($K_d = 1,3$ мкМ и $0,9$ мкМ, и $V_{max} = 30$ фмоль/мг и 26 фмоль/мг, соответственно). Предполагается, что сайты связывания ^{125}I -MIT1 как в подвздошной кишке, так и в мембранах головного мозга могут быть расположены как пре-, так и постсинаптически; возможно, что они являются еще не идентифицированным K^+ -каналом. Несмотря на структурное сходство с колипазой, MIT1 не активирует липазу, а колипаза, в свою очередь, даже в высокой концентрации (10 масс. %) не оказывает влияния на сокращения кишечника. С учетом гомологии целого ряда компонентов змеиных ядов (фосфолипазы A_2 , протеаз, дендротоксинов) с агентами пищеварительной системы (панкреатической фосфолипазой A_2 , ингибиторами трипсина BPTI), а также, в данном случае, между MIT1 и колипазой, выдвигается гипотеза, что MIT1 может поступать вместе с тканями жертвы (убитой другими токсинами яда мамбы, поскольку MIT1 не токсичен) в кишечник мамбы и стимулировать его перистальтику, способствуя перевариванию жертвы, которая, как известно, заглатывается змеями целиком. Этому в определенной степени может способствовать относительно высокое содержание MIT1 в яде (3,2% в сухом яде) и его устойчивость к классическим пищеварительным ферментам (трипсину, пепсину и карбоксипептидазе Y).

Заключение

Отравления ядом мамб имеют важное эпидемиологическое значение к югу от Сахары. Однако в отличие от родственной змеи кобры, которая обычно удерживает свою жертву в течение некоторого времени после нанесения укуса, мамба быстро отпускает свою жертву и может очень быстро нанести серию повторных укусов. Как известно, яды представителей сем. Elapidae – элапиды (кобры, крайты, мамбы) – в отличие от яда гадюковых и гремучих змей, относящихся к сем. Viperidae, не обладают значительной протеазной активностью и поэтому не вызывают отека или последующего некроза тканей [2]. Покалывание в месте укуса мамбы может быть единственным начальным симптомом, однако затем клиническая картина отравления, как правило, развивается стремительно. На первое место выходят симптомы вялого паралича, который может развиваться в течение 10 минут после укуса. Характерными общими симптомами являются тошнота и рвота, боль в животе, диарея, потливость,

слухоотделение, мурашки по коже. Неврологические симптомы включают нечеткое или ослабленное зрение, парестезию (покалывание на коже), дизартрию (невнятную речь), дисфагию (затрудненное глотание), одышку, мышечные подергивания, атаксию (нарушение произвольных движений), головокружение, сонливость и потерю сознания, хотя некоторые жертвы остаются в сознании до самого конца. Укус черной мамбы может вызвать коллапс у человека в течение 45 минут, и без соответствующего противоядия симптомы обычно прогрессируют вплоть до дыхательной недостаточности, что приводит к сердечно-сосудистому коллапсу и летальному исходу. Наиболее эффективным средством борьбы с последствиями укуса мамб является серотерапия, при условии минимального интервала времени между укусом и введением противозмеиной сыворотки. В Африке в настоящее время впускается несколько видов поливалентных противозмеиных сывороток, защищающих от укусов мамб, а также других африканских змей (*Naja annulifera*, *N. melanoleuca*, *N. mossambica*, *N. nivea*, *Bitis arietans*, *Haemachatus haemachatus*), в том числе: «SAIMR Polyvalent Snake Antivenom» производства «South African Vaccine Producers (Pty) Ltd»; «Snake Venom Antiserum (African)» и Snake Venom Antiserum (Central Africa)» производства «VINS Bioproducts». В плане разработки высокоэффективных противозмеиных сывороток перспективным является использование технологии пептидных микрочипов высокой плотности [21].

Особенности течения клинической картины отравления ядом мамб обусловлены уникальными компонентами, входящими в состав яда. Яд мамб является одним из самых токсичных змеиных ядов, но состав его довольно нетипичен. Так, протеомный анализ показал, что яд *D. polylepis* в основном состоит из молекул ВРТИ типа Кунитца, которые включают дендротоксины (63%), ЗФТх токсины (31%) и металлопептидазы (всего лишь 3%) [38]. Фармакологическое изучение токсинов яда мамб показало, что мускариновые/адренергические/дофаминергические ингибирующие свойства аминергических токсинов (предлагаемых в качестве новой функциональной группы) во многом объясняют наблюдающиеся при отравлении сердечно-сосудистые/гипотензивные эффекты у жертвы. В яде мамб присутствуют токсины, являющиеся селективными лигандами ионных каналов: K^+ -, Ca^{2+} - и ASIC1-, соответственно, дендротоксины, кальциклудин и кальцисептин, мамбалгины. Кроме того, в яде обнаружены неконкурентные ингибиторы АХЭ (фасцикулины), а также модуляторы агрегации тромбоцитов (мамбин) и активности гладкомышечных клеток (DNP и MIT1).

Такой набор токсинов обуславливает развитие сложной двухступенчатой картины отравления. Пептиды пресинаптического действия ингибируют потенциал-управляемые калиевые каналы, что приводит к устойчивому высвобождению нейротрансмиттеров и вызывает тетанические спазмы. Параллельно с этим, фасцикулины ингибируют способность ацетилхолинэстеразы расщеплять свободный ацетилхолин, что приводит к мышечным фасцикуляциям. Более медленно наступающий второй этап включает блокирование постсинаптических рецепторов, что приводит к вялому параличу. Таким образом, мишенью действия токсинов мамб в нервно-мышечном синапсе являются все три ключевых участка синаптической передачи: пресинаптическое окончание, синаптическая щель и постсинаптическая мембрана. Подобная политропность может показаться избыточной. Но если учесть биологические особенности мамб, которые охотятся на подвижных жертв разного размера (птиц и древесных млекопитающих), то для их гарантированного и эффективно обездвиживания такая комбинация селективных токсинов вполне могла поддерживаться давлением отбора. Все это делает яд мамб богатейшим природным источником биологически активных молекул, которые могут использоваться в современных компьютерных технологиях, объединяемых в общий подход, часто называемый «рациональное конструирование лекарств» (drug design), обеспечивающий ускорение и оптимизацию процесса нахождения новых биологически активных соединений – базовых структур новых фармакологических средств. Современная токсинология, изучающая яды животных, растений и микроорганизмов, активно использует передовые «омиксные» технологии на основе достижений геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики, то есть наук, которые изучают, как устроен геном и как реализуется закодированная в нем информация. В частности, Международное общество токсинологии (International Society on Toxinology, IST) выступило с инициативой прогрессивного и амбициозного проекта «Геном ядовитых систем» (venomics, веномика) [47]. Проект направлен на изучение компонентного разнообразия ядов у 5–6 модельных видов, включая одного представителя перепончатокрылых, одного моллюска конуса, одной или двух ядовитых змей, одного скорпиона и одного паука с использованием высокопроизводительных методов геномики, транскриптомики и протеомики. Предполагается, что в результате реализации проекта научное сообщество получит самый большой объем информации, когда-либо собранной в мире о ядах и их эволюции, а также о генетике ядовитых систем.

Литература

Список русскоязычной литературы

1. Гелашвили ДБ. Природные токсины в меж- и внутривидовых взаимодействиях человека. Журнал общей биологии. 2002;63(3):258-69.
2. Гелашвили ДБ, Крылов ВН, Романова ЕБ. Зоотоксикология: биоэкологические и биомедицинские аспекты. Нижний Новгород: Изд-во ННГУ; 2015.

Общий список литературы/References

1. Gelashvili DB. [Natural toxins in inter- and intraspecific interaction of human beings (Elements of Ethnotoxinology)]. Zhurnal Obshey Biologii. 2002;63(3):258-69. (In Russ.)
2. Gelashvili DB, Krylov VN, Romanova YeB. Zootoksinologiya: Bioekologicheskiye i Biomeditsinskiye Aspekty. [Zootoxinology: Bioecological and Biomedical Aspects]. Nizhniy Novgorod: Izdatelstvo Nizhegorodskogo Gosudarstvennogo Universiteta; 2015. (In Russ.)
3. Adem A, Asblom A, Johansson G, Mbugua PM, Karlsson E. Affiliations expand toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* that inhibit the binding of quinuclidinyl benzilate to muscarinic acetylcholine receptors. Biochim Biophys Acta (BBA) Mol Cell Res. 1988;968(3):340-5. doi:10.1016/0167-4889(88)90025-0.
4. Adem A, Karlsson E. Muscarinic receptor subtype selective toxins. Life Sci. 1997;60:1069-76. doi:10.1016/s0024-3205(97)00049-0.
5. Albrand JP, Blackledge MJ, Pascaud F. 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;34:5923-37. doi:10.1021/bi00017a022.
6. Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Valerio LG. Onchidal and fasciculins. In: R. Gupta (Ed.). Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. Academic Press; 2015. P. 411-20. doi:10.1016/b978-0-12-800159-2.00030-0.
7. Anderson AJ, Harvey AL, Mbugua PM. Effects of fasciculin 2, an anticholinesterase polypeptide from green mamba venom, on neuromuscular transmission in mouse diaphragm preparations. Neurosci Lett. 1985;54:123-8. doi:10.1016/s0304-3940(85)80066-5.
8. Barber CM, Isbister GK, Hodgson WC. Alpha neurotoxins. Toxicon. 2013;66:47-58. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.019.
9. Baron A, Diochot S, Salinas M, Deval E, Noël J, Lingueglia E. Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. Toxicon. 2013;75:187-204. doi:10.1016/j.toxicon.2013.04.008.
10. Bechis G, Granier C, Rietschoten J, Jover E, Rochat H, Miranda F. Purification of six neurotoxins from the venom of *Dendroaspis viridis*. Primary structure of two long toxins. Eur J Biochem. 1976;68:445-56. doi:10.1111/j.1432-1033.1976.tb10832.x.
11. Benishin CG, Sorensen RG, Brown WE, Krueger BK, Blaustein MP. Four polypeptide components of green mamba venom selectively block certain potassium channels in rat brain synaptosomes. Mol Pharmacol. 1988;34:152-9. PMID: 2457792.
12. Blanchet G, Collet G, Mourier G, Gilles N, Fruchart-Gaillard C, Marcon E, Servent D. Polypharmacology profiles and phylogenetic analysis of three-finger toxins from mamba venom: Case of aminergic toxins. Biochimie. 2014;103:109-17. doi:10.1016/j.biochi.2014.04.009.
13. Blanchet G, Upert G, Mourier G, Gilquin B, Gilles N, Servent D. New α -adrenergic property for synthetic MT β and CM-3 three-finger fold toxins from black mamba. Toxicon. 2013;75:160-7. doi:10.1016/j.toxicon.2013.04.017.
14. Boisbouvier J, Albrand J-P, Blackledge M, Jaquinod M, Schweitz H, Lazdunski M, Marion D. A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. J Mol Biol. 1998;283:205-19. doi:10.1006/jmbi.1998.2057.
15. Bourne Y, Taylor P, Marchot P. Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: Crystal structure of the complex. Cell. 1995;83:503-12. doi:10.1016/0092-8674(95)90128-0.
16. Bradley KN. Muscarinic toxins from the green mamba. Pharmac Therap. 2000;85:87-109. doi:10.1016/s0163-7258(99)00064-9.
17. De Weille JR, 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. 1991;88:2437-40. doi:10.1073/pnas.88.6.2437.
18. Dickey DM, Potter LR. *Dendroaspis* natriuretic peptide and the designer natriuretic peptide, CD-NP, are resistant to proteolytic inactivation. J Mol Cell Card. 2011;51:67-71. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.03.013.
19. Diochot S, Baron A, Salinas M, Douguet D, Scarzello S, Dabert-Gay A-S, Debayle D, Friend V, Alloui A, Lazdunski M, Lingueglia E. Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. Nature. 2012;490:552-5. doi:10.1038/nature11494.

20. Dufton MJ, Harvey AL. Dendrotoxins: How does structure determine function? *J Toxicol Tox Rev.* 1998;17:161-82. doi:10.3109/15569549809009248.
21. Engmark M, Andersen MR, Laustsen AH, Patel J, Sullivan E, De Masi F, Hansen CS, Kringelum JV, Lomonte B, Gutierrez JM, Lund O. High-throughput immuno-profiling of mamba (*Dendroaspis*) venom toxin epitopes using high-density peptide microarrays. *Sci Rep.* 2016;6(1):36629. doi:10.1038/srep36629.
22. Harel M, Kleywegt GJ, Ravelli RB, Silman I, Sussman JL. Crystal structure of an acetylcholinesterase-fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target. *Structure.* 1995;3:1355-66. doi:10.1016/s0969-2126(01)00273-8.
23. Harvey A, Robertson B. Dendrotoxins: structure-activity relationships and effects on potassium ion channels. *Curr Med Chem.* 2004;11:3065-72. doi:10.2174/0929867043363820.
24. Harvey AL. Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. *Gen Pharmacol Vasc Syst.* 1997;28:7-12. doi:10.1016/s0306-3623(96)00173-5.
25. Harvey AL. Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon.* 2001;39:15-26. doi:10.1016/s0041-0101(00)00162-8.
26. Harvey AL, Anderson AJ. Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. *Pharmacol Ther.* 1985;31:33-55. doi:10.1016/0163-7258(85)90036-1.
27. Harvey AL, Karlsson E. Protease inhibitor homologues from mamba venoms: facilitation of acetylcholine release and interactions with prejunctional blocking oxins. *Br J Pharmacol* 1982;77:153-61. doi:10.1111/j.1476-5381.1982.tb09281.x.
28. Imredy JP, MacKinnon R. Energetic and structural interactions between δ -dendrotoxin and a voltage-gated potassium channel. *J Molec Biol.* 2000;296:1283-94. doi:10.1006/jmbi.2000.3522.
29. Jolkkonen M, Giersbergen PLM, Hellman U, Wernstedt C, Oras A, Satyapan N, Adem A, Karlsson E. Muscarinic toxins from the black mamba *Dendroaspis polylepis*. *Eur J Biochem.* 1995;234:579-85. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.579_b.x.
30. Joubert FJ, Strydom DJ. Snake venoms. The amino-acid sequence of trypsin inhibitor E of *Dendroaspis polylepis* polyepis (black mamba) venom. *Eur J Biochem.* 1978;87:191-8. doi:10.1111/j.1432-1033.1978.tb12366.x.
31. Joubert FJ, Taljaard N. Some properties and the complete primary structures of two reduced and S-carboxymethylated polypeptides (S5C1 and S5C10) from *Dendroaspis jamesoni kaimosae* (Jameson's mamba) venom. *Biochim Biophys Acta.* 1979;579:228-33. doi:10.1016/0005-2795(79)90101-6.
32. Joubert FJ, Taljaard N. The complete primary structures of two reduced and S-carboxymethylated angusticeps-type toxins from *Dendroaspis angusticeps* (green mamba) venom. *Biochim Biophys Acta.* 1980;623:449-56. doi:10.1016/0005-2795(80)90274-3.
33. Joubert FJ, Taljaard N. Snake Venoms. The amino acid sequences of two proteinase inhibitor homologues from *Dendroaspis angusticeps* venom. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1980;361(1):661-74. doi:10.1515/bchm2.1980v.361.1.661.
34. Karlsson E. Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie.* 2000;82:793-806. doi:10.1016/s0300-9084(00)01176-7.
35. Karlsson E, Mbugua PM, Rodriguez-Ithurralde D. Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps*. *J Physiol (Paris).* 1984;79:232-40. PMID: 6530667.
36. Karlsson E, Mbugua PM, Rodriguez-Ithurralde D. Anticholinesterase toxins. *Pharmacol Ther.* 1985;30:259-76. doi:10.1016/0163-7258(85)90051-8.
37. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, Savioli L, Lalloo DG, de Silva HJ. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.* 2008;5(11):e218. doi:10.1371/journal.pmed.0050218.
38. Kodama RT, Kuniyoshi AK, da Silva CCF, Cajado-Carvalho D, Duzzi B, Mariano DC, Pimenta DC, Borges R, da Silva WD, Portaro FCV. A Kunitz-type peptide from *Dendroaspis polyepis* venom as a simultaneous inhibitor of serine and cysteine proteases. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2020;26:e20200037. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0037>.
39. Kuroda H, Chen YN, Watanabe TX, Chen YN, Watanabe TX, Kimura T, Sakakibara S. Solution synthesis of calciseptine, an L-type specific calcium channel blocker. *Pept Res.* 1992;5:265-8. PMID: 1450521.
40. Lee CY, Tsai MC, Tsaur ML, Lin WW, Carlsson FH, Joubert FJ. Pharmacological study on angusticeps-type toxins from mamba snake venoms. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985;233:491-8. PMID: 3158733.
41. Lu X, Sun Y, Shang D, Wattam B, Egglezou S, Hughes T, Hyde E, Scully M, Kakkar V. Evaluation of the role of proline residues flanking the RGD motif of dendroaspin, an inhibitor of platelet aggregation and cell adhesion. *Biochemical J.* 2001;355(3):633-8. doi:10.1042/bj3550633.
42. Lu X, Davies J, Lu D, Xia M, Wattam B, Shang D, Sun Y, Scully M, Kakkar V. The effect of the single

- substitution of arginine within the RGD tripeptide motif of a modified neurotoxin dendroaspin on its activity of platelet aggregation and cell adhesion. *Cell Commun Adhes.* 2006;13(3):171-83. doi:10.1080/15419060600726183.
43. Marchot P, Khelif A, Ji Y-H, Mansuelle P, Bougis PE. Binding of 125I-fasciculin to rat brain acetylcholinesterase. The complex still binds diisopropyl fluorophosphates. *J Biol Chem.* 1993;268(17):12458-67. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31411-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31411-X).
 44. Marchot P, Bougis PE. Elapidae Toxins: The fasciculins, and their interaction with acetylcholinesterase. *Animal Toxins.* 2000:246-75. doi:10.1007/978-3-0348-8466-2_16.
 45. McDiarmid RW, Campbell JA, Toure TA. Snake Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference. (Vol. 1). Herpetologists League, Washington, D.C., 1999.
 46. McDowell RS, Dennis MS, Louie A, Shuster M, Mulkerrin MG, Lazarus RA. Mambin, a potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor structurally related to the short neurotoxins. *Biochemistry.* 1992;31:4766-72. doi:10.1021/bi00135a004.
 47. Menez A, Stöcklin R, Mebs D. «Venomics» or: The venomous systems genome project. *Toxicon.* 2006;7(3): 255-9. doi:10.1016/j.toxicon.2005.12.010.
 48. Mourier G, Salinas M, Kessler P, Stura EA, Leblanc M, Tepshi L, Besson T, Diochot S, Baron A, Douguet D, Lingueglia E, Servent D. Mambalgins-1 pain-relieving peptide, stepwise solid-phase synthesis, crystal structure, and functional domain for acid-sensing ion channel 1a inhibition. *J Biol Chem.* 2016;291:2616-29. doi:10.1074/jbc.m115.702373.
 49. Nagai-Okatani C, Kangawa K, Minamino N. Three molecular forms of atrial natriuretic peptides: quantitative analysis and biological characterization. *J Pept Sci.* 2016;23:486-95. doi:10.1002/psc.2969.
 50. Näreoja K, Kukkonen J, Rondinelli S, Toivola DM, Meriluoto J, Näsman J. Adrenoceptor activity of muscarinic toxins identified from mamba venoms. *Br J Pharmacol.* 2011;164:538-50. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01468.x.
 51. Nishio H, Katoh E, Yamazaki T, Inui T, Nishiuchi Y, Kimura T. Structure-activity relationships of calciclude and dendrotoxin-I, homologous peptides acting on different targets, calcium and potassium channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;262:319-21. doi:10.1006/bbrc.1999.1198.
 52. Park S-A, Kim T-G, Han M-K, Ha K-C, Kim S-Z, Kwak Y-G. Dendroaspis natriuretic peptide regulates the cardiac L-type Ca²⁺ channel activity by the phosphorylation of α 1c proteins. *Exp Mol Med.* 2012;44:363-8. doi:10.3858/emmm.2012.44.6.041.
 53. Rodriguez-Ithurralde D, Silveira R, Barbeito L, Dajas F. Fasciculin, a powerful anticholinesterase polypeptide from *Dendroaspis angusticeps* venom. *Neurochem Int.* 1983;5:267-74. doi:10.1016/0197-0186(83)90028-1.
 54. Salinas M, Besson T, Delettre Q, Diochot S, Boulakirba S, Douguet D, Lingueglia E. Binding Site and Inhibitory Mechanism of the Mambalgins-2 Pain-relieving Peptide on Acid-sensing Ion Channel 1a. *J Biol Chem.* 2014;289:13363-73. doi:10.1074/jbc.m114.561076.
 55. Schweitz H, Heurteaux C, Bois P, Moinier D, Romey G, Lazdunski M. Calciclude, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold Ca²⁺ channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:878-82. doi:10.1073/pnas.91.3.878.
 56. Schweitz H, Moinier D. Mamba toxins. *Persp Drug Discov Design.* 1999;15:83-110. doi:10.1023/A:1017043518954.
 57. Schweitz H, Pacaud P, Diochot S, Moinier D, Lazdunski M. MIT1, a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *FEBS Lett.* 1999;461:183-8. doi:10.1016/s0014-5793(99)01459-3.
 58. Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem.* 1992;267:13928-32. doi:10.1016/s0021-9258(19)49658-0.
 59. Servent D, Blanchet G, Mourier G, Marquer C, Marcon E, Fruchart-Gaillard C. Muscarinic toxins. *Toxicon.* 2011;58:455-63. doi:10.1016/j.toxicon.2011.08.004.
 60. Servent D, Fruchart-Gaillard C. Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *J Neurochem.* 2009;109:1193-202. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06092.x.
 61. Sigle R, Hackett M, Aird SD. Primary structures of four trypsin inhibitor E homologs from venom of *Dendroaspis angusticeps*: structure-function comparisons with other dendrotoxin homologs. *Toxicon.* 2002;40:297-308. doi:10.1016/s0041-0101(01)00227-6.
 62. Skarżynski T. Crystal structure of α -dendrotoxin from the green mamba venom and its comparison with the structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J Mol Biol.* 1992;224:671-83. doi:10.1016/0022-2836(92)90552-u.
 63. Stotz SC, Spaetgens RL, Zamponi GW. Block of voltage-dependent calcium channel by the

