

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Российской академии наук

на правах рукописи

Макарова Яна Владиславовна

**Биологическая активность новых компонентов змеиных ядов:
анализ с использованием культуры трансформированных
нейроэндокринных клеток РС12**

Специальность 03.01.04 Биохимия

Диссертация на соискание учёной степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук

профессор Уткин Ю.Н.

Москва - 2016

Оглавление

1 ВВЕДЕНИЕ.....	4
2 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	10
2.1 Белковые компоненты ядов змей – общие сведения.....	10
2.2 Механизмы действия нейротоксинов ядов змей.....	13
2.3 Трехпетельные токсины, структура и свойства.....	18
2.3.1 α -Нейротоксины.....	19
2.3.2 Нестандартные токсины.....	20
2.3.3 Димерные токсины.....	21
2.3.4 Цитотоксины.....	25
2.3.5 Прочие трёхпетельные токсины.....	31
2.4 Металлопротеиназы.....	33
2.4.1 Биологическая активность.....	33
2.4.2 Структура, классификация.....	34
2.4.3 Механизмы действия.....	34
2.4.4 Фармакологические перспективы.....	38
2.5 Фосфолипазы A2.....	39
2.5.1 Общепринятая классификация.....	41
2.5.2 Классификация нейротоксичных ФЛА2 по четвертичной структуре.....	49
2.5.3 ФЛА2 ядов змей: биологическая активность и механизмы действия.....	50
2.5.4 Нейритогенные свойства ФЛА2.....	53
2.6 Фактор роста нервов.....	54
2.7 Белки змеиных ядов с антипролиферативными свойствами.....	56
2.8 Заключение.....	62
3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	64
3.1 Выделение белков.....	64
3.2 Идентификация выделенных белков.....	68
3.3 Определение фосфолипазной активности.....	68
3.4 Масс-спектрометрическое определение липидов клеточной мембраны.....	68
3.5 Культивирование клеточной культуры PC12.....	69

3.6	Определение цитотоксичности.....	69
3.7	Определение роста нейритов.....	70
4	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	71
4.1	Металлопротеиназа оксиагин.....	72
4.2	Новые трехпетельные токсины.....	74
4.2.1	Структурные особенности и свойства димерных трехпетельных токсинов.....	75
4.2.2	Цитотоксичность трехпетельных токсинов.....	79
4.3	Фосфолипазы A2.....	82
4.3.1	Фосфолипазы: ФГД1 ФГД2 и СМ2.....	83
4.3.2	Фосфолипаза Ti-Nh яда <i>Naja haje</i>	95
4.3.3	Фосфолипазы: Vur-PL2A и Vur-PL2B.....	98
4.3.4	Фосфолипаза <i>Bitis arietans</i>	101
4.3.5	Возможные механизмы нейритогенной активности фосфолипаз ядов змей.....	105
5	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	111
5.1	Выводы.....	113
6	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	114
7	ЛИТЕРАТУРА.....	116

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности проблемы. Анализ биологической активности новых белков представляет собой достаточно сложную задачу вследствие широкого диапазона возможных эффектов. Весьма перспективным является использование для такого анализа культур клеток, поскольку в основных этапах клеточного цикла: пролиферации, дифференцировке, миграции и гибели (некроз или апоптоз) – участвует большое число различных регуляторных систем (ферменты, рецепторы, ионные каналы и т.п.).

Яды змей, проявляющие ярко выраженные биологические эффекты, являются сложными белковыми смесями. Для целого ряда компонентов змеиных ядов достаточно хорошо установлены мишени на организменном или молекулярном уровнях, однако механизмы их действия на клеточном уровне далеки от понимания даже для таких хорошо исследованных белков, как альфа-нейротоксины или фосфолипазы A₂. С другой стороны, развитие новых методов выделения и анализа позволяет обнаружить новые белки, присутствующие в ядах в крайне малых количествах. Анализ биологической активности таких белков значительно упрощается при использовании клеточных культур. Белки и пептиды ядов змей способны влиять на все ключевые процессы жизнедеятельности клетки. Они воздействуют на клеточную мембрану и ассоциированные с ней белки/рецепторы, влияя, тем самым, на передачу сигнала, необходимого для клеточной адгезии, миграции, пролиферации и выживаемости. Компоненты змеиных ядов способны вызывать такие внутриклеточные изменения как дезорганизация цитоскелета, изменение профилей экспрессии регуляторов клеточного цикла и концентрации вторичных мессенджеров (например, ионов

кальция), увеличение экспрессии проапоптозных белков, запуск процессов дифференцировки и ингибирование пролиферации.

Таким образом, для установления или подтверждения механизмов действия новых белков, выделяемых из ядов змей, актуальным является исследование их эффектов на клеточных линиях. Наиболее подходящими для этого являются трансформированные клеточные линии: они относительно легко пролиферируют, сохраняют способность к миграции и дифференцировке. Компоненты ядов, действующие на трансформированные клетки, могут оказаться ценными инструментами для изучения опухолей, а также быть использованы для разработки новых диагностических и лекарственных средств.

Нейроэндокринная клеточная линия РС12 в данном случае как нельзя лучше подходит для нейробиологических исследований процессов дифференцировки и гибели нейронов, а также для изучения белков, связывающихся с различного рода нейрональными рецепторами, экспрессирующимися на мембране клеток РС12. Подобно не нейрональным клеткам, они размножаются, но под действием фактора роста нервов (ФРН) перестают делиться, образуют нейриты и становятся очень похожими на симпатические нейроны. Клетки приобретают электрическую возбудимость, отвечают на ацетилхолин и даже образуют функциональные холинергические синапсы.

Благодаря способности превращаться в нейроноподобные клетки, эта линия используется для исследования веществ, вызывающих дифференцировку нейронов. Подобную дифференцирующую активность на РС12 проявили ФРН из ядов различных видов змей, фосфолипазы А2 из бактерий, грибов и пчелиного яда, сериновая протеаза из яда щитомордника. Еще одна характерная особенность РС12 - синтез катехоламинов, на нейросекрецию которых, способны влиять некоторые токсины. С использованием РС12 исследуется влияние дезинтегринов из ядов змей на клеточную адгезию и миграцию. Также на этих клетках проверяют цитотоксичность различных белков и токсинов.

Цели и задачи работы. Цель данной работы – анализ биологической активности белков змеиных ядов, относящихся к различным структурно-функциональным семействам, с использованием линии нейроэндокринных клеток PC12. Были поставлены следующие задачи:

1. Разработать методику исследования влияния изучаемых веществ на культуру нейроэндокринных клеток опухоли мозгового слоя надпочечников (феохромоцитомы) крысы PC12.
2. Провести скрининг белков из различных структурно-функциональных семейств, выделенных из змеиных ядов, для обнаружения возможной цитотоксической и антипролиферативной активности.
3. Исследовать цитотоксическое и антипролиферативное воздействие белков змеиных ядов на клетки.
4. Провести анализ полученных результатов и предположить возможный механизм действия исследуемых компонентов.

Методы исследования. Для выделения белков в работе применялись различные виды хроматографии, включая гель-фильтрацию и несколько видов высокоэффективной жидкостной хроматографии. Характеристика белков проводилась с использованием метода MALDI масс-спектрометрии и стандартных методов белковой химии, включая автоматическую деградацию по Эдману. Для культивирования клеток применялись стандартные методы, адаптированные для конкретной линии феохромоцитомы крысы PC12. Цитотоксичность определяли с использованием колориметрических методов. Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли в соответствии с общепринятыми алгоритмами.

Научная новизна и практическая ценность работы. При изучении металлопротеиназы оксиагина из яда кобры *Naja oxiana* впервые обнаружена

способность протеиназ этого типа откреплять клетки PC12 от субстрата с последующей их кластеризацией. Взаимоотношения между клетками и компонентами экстрацеллюлярного матрикса служат основополагающим фактором в событиях, происходящих при инвазии опухоли и в механизмах ангиогенеза. Имеющиеся в литературе данные для родственных металлопротеиназ свидетельствуют, что эти белки селективно ингибируют клеточную адгезию опухолевых клеток. Таким образом, оксиагин может представлять интерес для исследований в области онкологии.

Исследование трехпетельных токсинов показало, что альфа-нейротоксины ядов кобр не оказывают сколько-нибудь заметного влияния на клетки феохромоцитомы, в то время как цитотоксины проявляют значительную цитотоксичность. Изучение выделенных из яда кобры *Naja kaouthia* природных гетеродимерных форм трехпетельных токсинов, содержащих цитотоксин и альфа-кобратоксин, показало полное отсутствие цитотоксической активности у гетеродимеров. Это необычное свойство, очевидно возникшее вследствие димеризации, наряду со способностями димеров связываться с нейрональными никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами делает их уникальными инструментами при изучении никотиновых рецепторов и исследовании лиганд-рецепторных взаимодействий.

При изучении фосфолипаз А2 (ФЛА2) змеиных ядов была установлена их способность вызывать дифференцировку клеток PC12 феохромоцитомы крысы. Исследование молекулярных механизмов этого процесса показало наличие двух путей, посредством которых ФЛА2 инициируют рост нейритов. Один из них включает ферментативный гидролиз липидов и проявляется в случае ФЛА2 с высокой ферментативной активностью. Второй путь не зависит от ферментативной активности ФЛА2 и, возможно, включает участие протеинкиназ. В практическом плане полученные для ФЛА2 данные могут являться предпосылками для более детального изучения механизмов, приводящих к дифференцировке опухолевых клеток, и послужить фундаментальной основой

для создания лекарственных препаратов, направленных на подавление роста опухоли, для использования дифференцирующей способности ФЛА2 при лечении нейрональных повреждений или нейродегенеративных заболеваний.

Степень достоверности результатов проведенных исследований.
Выводы, представленные в данной работе, подтверждаются экспериментальными данными. Все эксперименты выполнены в нескольких повторах, достоверность полученных результатов подтверждена данными статистической обработки. Используемые методики исследования и проведенные расчеты корректны и статистически достоверны.

Положения, выносимые на защиту.

1. В результате исследования влияния белков, впервые выделенных из ядов змей и принадлежащих трем различным структурно-функциональным семействам, на пролиферацию клеточной линии PC12 феохромоцитомы крысы выявлены два основных эффекта – цитотоксический и дифференцирующий, величина которых зависела от типа и аминокислотной последовательности исследованных белков.
2. Под действием металлопротеиназы из яда кобры *Naja oxiana* клетки PC12 открепляются от подложки и экстрацеллюлярного матрикса, кластеризуются и теряют жизнеспособность.
3. Показано, что цитотоксины из яда кобры *Naja kaouthia* утрачивают цитотоксическую активность при образовании дисульфид-связанных гетеродимеров с участием альфа-кобратоксина.
4. Установлено, что секретируемые фосфолипазы A2 из ядов кобр *Naja kaouthia* и *Naja haje*, а также гадюк *Vipera nikolskii*, *Vipera ursinii renardi* и *Bitis arietans* стимулируют рост нейритов у недифференцированных нейроэндокринных клеток PC12, то есть приводят к их дифференцировке.

5. Сравнительный анализ цитотоксической и дифференцирующей активности фосфолипаз выявил, что из всех испытанных в работе фосфолипаз А2 наибольшей нейритогенной активностью обладает битанарин, практически не проявляющий цитотоксичности.
6. Предложена гипотеза о существовании двух механизмов дифференцировки, вызываемой фосфолипазами А2: для первого (вероятно, с участием лизофосфатидилхолина) необходима фосфолиполитическая активность, а второй, в котором, возможно, участвуют протеинкиназы, не зависит от ферментативной активности фосфолипаз А2.

Апробация работы. Результаты работы представлялись на следующих симпозиумах и конференциях: Междунар. конф. по физ.-хим. биологии, посвящ. 70-летию со дня рождения ак. Ю.А.Овчинникова (Москва, 2004), научной конференции «Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2005), конференции "Рецепция и клеточная сигнализация" (Пушино, 2005), VIII чтениях, посвященных памяти академика Ю.А.Овчинникова (Москва-Пушино, 2006), 15th World Congr. on Animal, Plant and Microbial toxins (Glasgow, 2006), 16th European Section Meeting of the International Society on Toxinology (Leuven, 2008), 8th IST-Asia Pacific Meeting on Animal, Plant & Microbial Toxins (Hanoi, 2008), XX зимней международной молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва-Пушино, 2008), 16th World Congress of the International Society on Toxinology (Recife 2009). V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Петрозаводск 2011), 9th IST-Asia Pacific Meeting on Animal, Plant & Microbial Toxins, (Vladivostok 2011).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в реферируемых журналах, 11 тезисов в материалах отечественных и зарубежных конференций, получен один патент Российской Федерации.

2 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

2.1 Белковые компоненты ядов змей – общие сведения

Яды представляют собой сложную смесь органических (в основном белковых) и неорганических веществ, вырабатываемую железами некоторых видов змей. Состав и свойства яда различных змей неодинаковы. Токсичность изменяется в широких пределах у различных видов, а также внутри вида в зависимости от места обитания, пола, возраста и времени года [1]. Содержание различных компонентов в ядах неодинаково, так наряду с белковыми соединениями, присутствующими в больших количествах, яды включают также минорные белковые компоненты и ряд органических и неорганических веществ, определяющих в совокупности физиологическую активность и характер токсического действия.

По характеру воздействия яды змей можно разделить на две группы: нейротоксические и гемовазотоксические. К первой группе относятся яды аспидов и морских змей, ко второй - большинство ядов гадюк и гремучих змей.

Нейротоксические яды обладают курареподобным действием, их цель - периферическая нервная система, передача нервного возбуждения на скелетную мускулатуру, в частности. Ингибирование нервно-мышечной передачи ведет к параличу скелетной мускулатуры, включая дыхательную мускулатуру. Именно поэтому изучение воздействия змеиных токсинов на передачу нервного возбуждения на скелетную мускулатуру имеет такое большое практическое значение.

Гемовазотоксические яды вызывают сосудистый спазм, далее — сосудистую проницаемость, а затем отек тканей и внутренних органов. К смерти приводит геморрагия и отек паренхиматозных органов - печени и почек, причем в

пораженной части тела внутренняя потеря крови и плазмы может составить несколько литров [2].

Протеазы ядов гадюк и гремучих змей вызывают местное повреждение тканей, геморрагические отеки, мионекрозы, а также обладают фибриногенолитическим, фибринолитическим, коагулирующим и брадикинин-потенцирующим действием [3]. Гемотоксины ядов гадюк и гремучих змей представлены двумя группами: сериновыми протеазами и металлопротеазами. Сериновые протеазы - термолабильные эндопептидазы; по характеру действия близки к тромбиноподобным ферментам и кининогеназам. Вторые - термолабильные белки, катализирующие гидролиз казеина, гемоглобина, инсулина и др. [3]. Протеазы ядов могут вызывать нарушение свертываемости крови и фибринолиза, приводя к тромбозам или геморрагиям. Действуя на разные звенья гемокоагуляционного каскада, протеазы большинства ядов оказывают двойное действие; вначале наблюдается внутрисосудистое свертывание крови, затем кровь может на длительный период терять способность к свертыванию.

Еще один важный компонент ядов гадюк и гремучих змей – металлопротеиназы (МП). Эти цинк-зависимые протеазы - мультидоменные белки, способные через аутопротеолиз генерировать биологически активные продукты. Они вызывают геморрагию, внося изменения в систему свертывания крови или взаимодействуя с такими основными компонентами экстрацеллюлярного матрикса, как коллаген, ламинин или фибронектин [4].

Уникальные свойства выделенных из яда змей компонентов делают их потенциально удобными инструментами при исследовании биологических процессов в норме и патологии. Большинство таких соединений входит в семейство трёхпетельных токсинов - нейротоксинов и цитотоксинов. Трёхпетельные токсины преобладают над остальными компонентами в составах нейротоксических ядов. Мишенями нейротоксинов являются различные

никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР), что и делает их удобными инструментами при исследованиях самих рецепторов, лиганд-рецепторных взаимодействий и механизма холинергической передачи. Так в начале 70-ых годов с помощью полипептидных нейротоксинов из яда змей был впервые выделен ацетилхолиновый рецептор [5]. Селективность и необратимость связывания токсинов с рецепторами позволяет использовать их для идентификации рецепторов и приготовления аффинных сорбентов.

Цитотоксины или кардиотоксины в отличие от нейротоксинов, не имеют специфических белковых мишеней и проявляют цитотоксичность по отношению ко многим клеткам, в том числе и раковым [6]. Гипотеза о механизме действия цитотоксинов посредством взаимодействия с липидной мембраной остаётся центральной. Исследование цитолитического и антипролиферативного действия компонентов ядов на клетки представляет интерес для создания противоопухолевых препаратов. Цитотоксические фракции яда кобры применяют для изучения различий в функциональной архитектуре мембран нормальных и опухолевых клеток [4, 7].

Фосфолипазы А₂ (ФЛА₂) являются одним из основных токсических компонентов яда змей и как правило обладают различными физиологическими свойствами, включая нейро-, мио- и кардиотоксические. Биологическая активность змеиных фосфолипаз крайне разнообразна и находится в зависимости как от структуры фермента, так и типа клеток, на которые они воздействуют.

Содержание данного обзора сфокусировано на структурных и функциональных особенностях трёх типов компонентов, преобладающих в ядах змей: трёхпетельные токсины, металлопротеиназы и фосфолипазы А₂.

2.2 Механизмы действия нейротоксинов ядов змей

По месту блокировки нервного импульса нейротоксины делят на постсинаптические и пресинаптические [8, 9] (рис. 1, табл. 1).

Пресинаптические нейротоксины. Вмешательство в передачу нервно-мышечного сигнала на пресинаптическом уровне, может происходить через потенциал-зависимые кальциевые и калиевые каналы, SNARE (soluble NSF attachment receptor) белки (белки, которые выполняют доставку синаптических везикул к пресинаптической мембране с последующим слиянием с ней) или нейрональные nAХР [9]. Пресинаптические нейротоксины (из ядов австралийских и азиатских змей) действуют, специфически связываясь с ионными каналами, вследствие чего провоцируют сильные изменения в проницаемости нейрональной плазмалеммы для определенных ионов, приводя к непрямому ингибированию нейроэксцитоза и блокаде передачи нервного сигнала. Пресинаптические токсины проявляют активность фосфолипаз А2 [10]. Они либо сами ФЛА2, либо содержат в своем составе этот фермент [11]. Все вещества, инактивирующие ФЛА2 активность, также инактивировали их нейротоксичность. Гидролиз фосфолипидов пресинаптической мембраны и ее дестабилизация продуктами гидролиза – вероятно ключевой фактор в этих процессах. β -Бунгаротоксин, нотексин (*Australian tiger snake*), кротоксин (*Crotalus durrisus terrificus*) тайпоксин (*taipan*), истощая запасы ацетилхолиновых везикул, игибируют выброс ацетилхолина в окончаниях нейронов и в конечном итоге разрушают окончание двигательного нерва [9].

Постсинаптические нейротоксины. Нервно-мышечная блокировка на постсинаптическом уровне происходит по деполяризованному и недеполяризованному типу [9]. При деполяризованном типе блокаторы (такие как суксаметоний) необратимо связываются с постсинаптическим мышечным nAХР, вызывая чрезмерную деполяризацию [12], наблюдаемую в виде мышечного спазма [13]. Это приводит к таким вторичным изменениям как: десенситизация

рецептора, иннактивация и блокада потенциал-зависимых натриевых каналов и изменения в ионной проницаемости мембраны [14].

Недеполяризованные блокаторы (такие как кураре и его производные) конкурируют с природным лигандом – ацетилхолином (АХ) за два участка связывания в постсинаптическом мышечном нАХР [14]. Они повторно ассоциируют и диссоциируют с ацетилхолин-связывающих сайтов, и потому могут вытесняться с них ацетилхолином. Подобная блокада может происходить и с пресинаптическим нейрональным нАХР [9].

Основные нейротоксические компоненты ядов змей из семейства *Elaphidae* (кобры, крайты, мамбы, щитковые аспиды и австралийские аспиды) и семейства *Hidrophilidae* (морские змеи) блокируют нервно-мышечную передачу, связываясь с постсинаптическими нАХР в скелетной мышечной мускулатуре. Эти нейротоксины, известны в литературе как курареподобные α -нейротоксины [15]. Большинство α -нейротоксинов связывается по недеполяризованному типу практически необратимо [9], однако есть и такие, которые связываются обратимо, например, кандоксин. Структурно кандоксин (*Bungarus candidus*) похож на α -бунгаротоксин, но в отличие от него, имеет способность к обратимому связыванию и к ингибированию пресинаптического нАХР [16].

Некоторые токсины влияют на нервно-мышечную передачу через другие отличные от вышеописанных, механизмы. Например, пресинаптические токсины, такие как дендротоксины (*Dendroaspsis angusticeps*, *D. polylepsis*), ингибируя калиевые каналы, усиливают выброс ацетилхолина из нервного окончания, вызывая блокаду нервно-мышечной передачи, сходную с блокадой по депполяризованному типу [17]. Другие нейротоксины - фасцикулины из ядов мамб (*D. angusticeps.*), ингибируют активность ацетилхолинэстеразы в синапсах нервно-мышечной передачи [9].

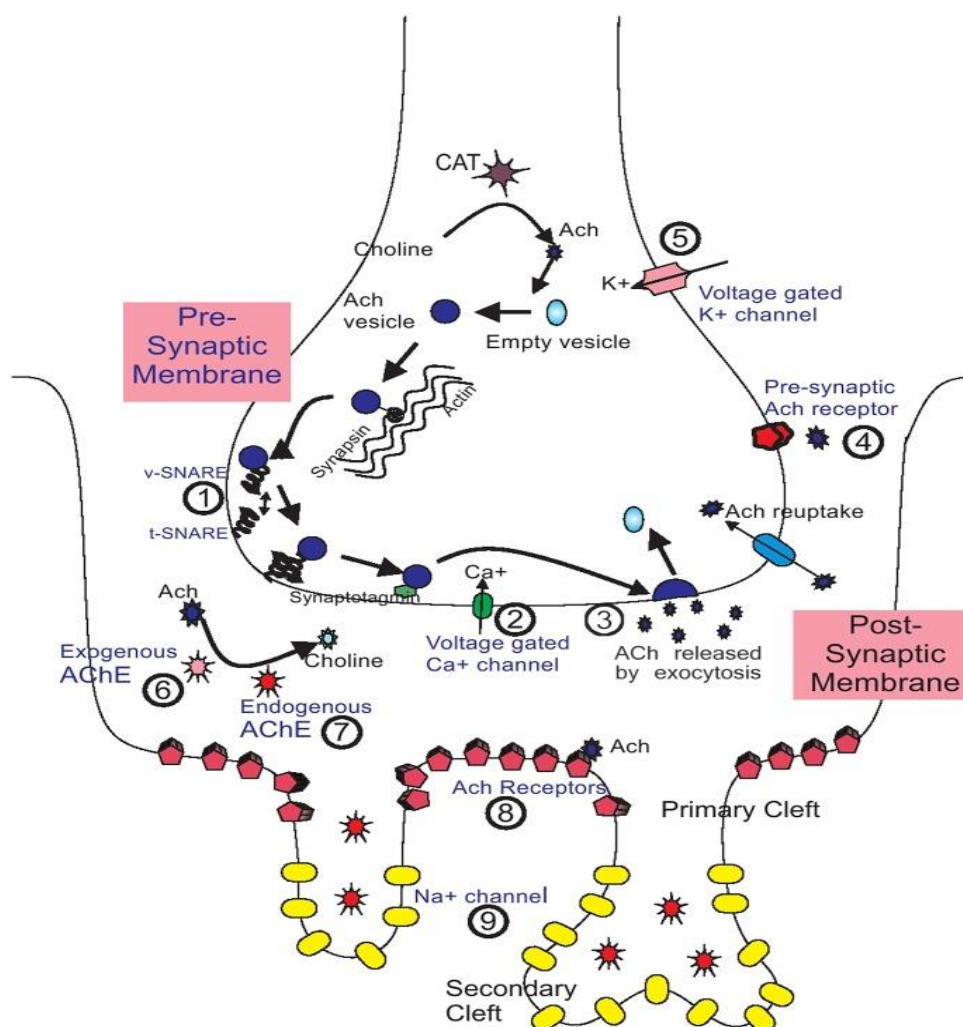


Рисунок 1. Мишени нейротоксинов и других компонентов яда в нервно-мышечном соединении. **1. Синаптические везикулярные белки:** β -бунгаротоксин (*Bungarus spp.*), тайпоксин (*O. scutellatus*). **2. Потенциал-зависимые кальциевые каналы:** кальцисептин (*Dendroaspis spp.*), β -бунгаротоксин (*Bungarus spp.*). **3. Пресинаптическая мембрана:** фосфолипаза A2. **4. Пресинаптический ацетилхолиновый рецептор:** кандоксин (*Bungarus candidus*). **5. Потенциал-зависимые калиевые каналы:** дендротоксин (*Dendroaspis spp.*). **6. Ацетилхолин:** гидролиз экзогенной ацетилхолинэстеразой из яда кобр (*Naja spp.*). **7. Ацетилхолинэстераза:** ингибиторы эндогенной ацетилхолинэстеразы фасцикулины (*Dendroaspis spp.*). **8. Постсинаптический ацетилхолиновый рецептор:** α -бунгаротоксин (*Bungarus spp.*) кандоксин (*B. candidus*), аземиопсин (*A. feae*), ваглерин (*T. Wagleri*). **9. Потенциал-зависимые натриевые каналы:** кротамин (*Crotalus spp.*) [9].

Таблица 1. Примеры разнообразия токсинов в змеиных ядах [9].

Род змей	Виды змей	Токсин	Тип токсина	Нейротоксический эффект
Cobra (<i>Naja</i> spp.)	<i>N. kaouthia</i> ; <i>N. siamensis</i>	α -кобратоксин	Трёхпетельный α -нейротоксин длинного типа	1) Практически необратимо связывается с постсинаптическим мышечным нАХР по недеполяризованному типу; 2) Связывается с нейрональным $\alpha 7$ нАХР
	<i>N. atra</i>	Кобротоксин	Трёхпетельный α -нейротоксин короткого типа	Постсинаптическая недеполяризованная блокада
	<i>N. atra</i>	Кардиотоксин	Трёхпетельный	Блокада аксональной проводимости, цитотоксичность
	<i>N. nigricollis</i>	Токсин- α	Трёхпетельный α -нейротоксин короткого типа	Постсинаптическая недеполяризованная блокада
	<i>N. kaouthia</i>	“Слабый токсин” WTX	Нестандартный нейротоксин	1) Необратимо связывается с постсинаптическим мышечным нАХР по недеполяризованному типу; 2) Связывается с нейрональным $\alpha 7$ нАХР
Krait (<i>Bungarus</i> spp)	<i>B. multicinctus</i>	α -бунгаротоксин	Трёхпетельный α -нейротоксин длинного типа	1) Необратимо связывается с постсинаптическим мышечным нАХР по недеполяризованному типу
	<i>Bungarus</i> spp.	β -бунгаротоксин	ФЛИА2	Пресинаптическая блокада
	<i>B. multicinctus</i>	κ -бунгаротоксин	Трёхпетельный κ -нейротоксин	Блокада нейронального нАХР в автономных ганглиях

	<i>B. candidus</i>	Кандоксин	Нестандартный нейротоксин	1) Обратимо связывается с постсинаптическим мышечным nAХР по недеполяризованному типу; 2) Связывается с нейрональным α_7 nAХР
Russell's viper (<i>Daboia</i> spp.)	<i>D. russelii</i>	Активность ФЛА2	ФЛА2	Пресинаптическая блокада
	<i>D. russelii</i>	Дабойа нейротоксин-1 (DNX-1)	Нейротоксин короткого типа	Постсинаптическая блокада
	<i>D. russelii</i>	Виперотоксин-F	ФЛА2	Пресинаптическая блокада
Mamba (<i>Dendroaspis</i> spp).	<i>D. angusticeps</i> , <i>D. polylepis</i>	Дендротоксины- α, δ, I, K	Трёхпетельные токсины	Блокада нейронального потенциал-зависимого калиевого канала – пресинаптический +/- постсинаптический эффекты
	<i>D. angusticeps</i> , <i>D. polylepis</i>	Фасцикулины	Трёхпетельные токсины	Игибирование АХЭ
	<i>D. angusticeps</i>	Мускариновые токсины	Трёхпетельные токсины	Связываются с мускариновыми рецепторами
	<i>D. polylepis</i>	Кальцисептин		Ингибирование потенциал-зависимых кальциевых каналов
Rattlesnake (<i>Crotalus</i> spp.)	<i>C. durissus</i>	Кротоксин	ФЛА2	1) Пресинаптическая блокада; 2) десенситизация постсинаптического nAХР
	<i>C. scutulatus</i>	Моджаветоксин	ФЛА2	Пресинаптическая блокада ионных каналов

Кротамин из яда южноамериканской гремучей змеи *Crotalus durrisus terrificus*, состоящий из 42 а.о. и трёх дисульфидных связей, действует на натриевые каналы электровозбудимых мембран [18].

Многие виды змей содержат в одном яде токсины различных типов воздействия. Например, яд крайта (*Bungarus spp*) содержит α -бунгаротоксин (постсинаптическое действие), β -бунгаротоксин (пресинаптическое действие) и κ -бунгаротоксин, связывающийся с нейрональными нАХР на постсинаптических холинэргических синапсах автономных ганглиев [19].

2.3 Трехпетельные токсины, структура и свойства

Трехпетельные токсины (ТПТ) представляют собой семейство белков, не обладающих ферментативной активностью. ТПТ отличаются друг от друга длиной полипептидной цепи (60 - 75 аминокислотных остатков) количеством (4 – 5) дисульфидных связей и локализацией дисульфидных связей.

Часть ТПТ, включая кардиотоксины, мускариновые токсины, ингибиторы ацетилхолинэстераз и так называемые α -нейротоксины короткого типа, содержат 4 дисульфидные связи [20]. Эти четыре связи высоко консервативны и встречаются у всех представителей семейства. Структурно эти белки представляют β -складчатый слой, образованный тремя разными петлями. Три петли выступают из центральной части, напоминая три вытянутых пальца одной руки. Эта структура высокостабильна и поддерживается 4-мя дисульфидными связями и гидрофобными взаимодействиями в центральной части [20].

Несмотря на сходную структуру, трехпетельные токсины демонстрируют широкий спектр фармакологической активности, включая нейротоксичность в отношении периферической и центральной нервной системы, цитотоксичность,

кардиотоксичность, ингибирование ферментов, таких как ацетилхолинэстераза, гипотензивный эффект, влияние на агрегацию тромбоцитов [11, 21, 22].

2.3.1 α -Нейротоксины

ТПТ, блокирующие холинэргическую передачу никотинового типа, называют α -нейротоксинами. α -Нейротоксины связываются с разными подтипами никотиновых АХР как в периферической, так и в центральной нервной системе [11]. α -Нейротоксины фиксируются в том регионе нАХР, который чрезвычайно близок и частично перекрывается со связывающим сайтом природного нейротрансмиттера – ацетилхолина. Фармакологическая и структурная характеристика этого важного участка нАХР может существенно помочь в понимании того, как работает этот рецептор, а возможно и в понимании того, как работают и другие лиганд-активируемые ионные каналы.

По своей структуре, на основании длины полипептидной цепи нейротоксины разделяют на нейротоксины короткого (60-62 а. о.) типа (эрабутоксин, токсин- α из *Naja nigricollis*), имеющие 4 дисульфидные связи, и длинного (66-75 а. о.) типа, содержащие 5 дисульфидных связей (рис. 2) [23, 24]. Восстановление дисульфидных связей приводит к полной потере биологической активности, а повторное окисление частично восстанавливает первоначальную активность токсинов [25, 26]. Пятый дисульфидный мостик в длинных нейротоксинах таких как α -бунгаротоксин, α -кобратоксин или κ -бунгаротоксин расположен на конце центральной петли [27].

Из-за своих структурных особенностей, длинные токсины, в отличие от коротких токсинов, также способны связываться с высокой аффинностью (K_d приблизительно 10^{-8} - 10^{-9} М) с нейрональными гомопентамерными никотиновыми рецепторами $\alpha 7$, $\alpha 8$ и $\alpha 9$, а также с гетеропентамерными рецепторами, содержащими субъединицы $\alpha 7$ - $\alpha 10$. Показано, что пятый дисульфид в петле II

является необходимым структурным элементом токсинов, обладающих подобной активностью [28].

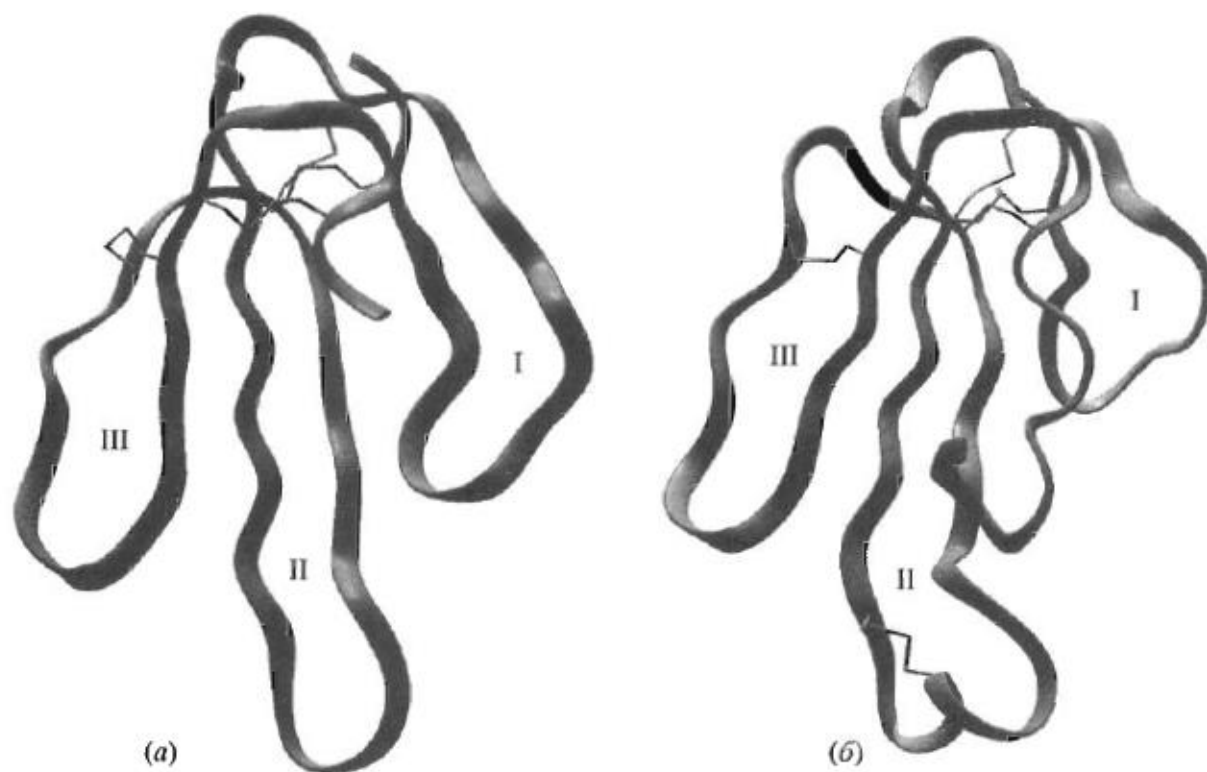


Рисунок 2. Пространственная структура α -нейротоксинов: нейротоксина II *Naja naja oxiana* - (a) и α -кобратоксина - (б) [23].

2.3.2 Нестандартные токсины

Активно исследуется класс нестандартных трехпетельных токсинов (таких, как кандоксин и букандин (*Bungarus candidus*)). Они состоят из 62-68 аминокислотных остатков и содержат пять дисульфидных мостов. Однако, в отличие от длинных α -нейротоксинов и κ -нейротоксинов, пятый дисульфид находится в первой петле (N-концевая петля). Некоторые работы показывают, что для нестандартных токсинов характерна на порядки более низкая токсичность

(LD50 около 5-80 мг/кг) по сравнению с α -нейротоксинами (LD50 около 0,04-0,3 мг/кг), поэтому в обзорах они также известны как слабые токсины.

Несмотря на это, в то время как некоторые нестандартные токсины из яда кобр (в том числе WTX *Naja kaouthia* и Wtnx-5 *Naja sputatrix*) показывают слабое ингибирование мышечного $(\alpha 1)2\beta 1\gamma\delta$ подтипа nAХР в микромолярной концентрации, кандоксин из яда крайта (*Bungarus candidus*) ингибирует этот подтип nAХР в наномолярной концентрации (IC50 около 10 нМ) [16]. Еще одно отличие кандоксина от WTX и Wtnx – это способность ингибировать, также как и длинные α -нейротоксины, нейрональный $\alpha 7$ nAХР в наномолярных концентрациях (IC50 ~ 50 нМ).

Для WTX показана способность ингибировать нейрональный и мышечный nAХР альфа7 типа, а также мускариновые рецепторы, что говорит о широком спектре мишеней для слабых токсинов [29]. Также было выявлено, что внутривенное введение слабого нейротоксина WTX (*Naja kaouthia*) повышает частоту сердечных сокращений и снижает артериальное давление крыс [30, 31].

2.3.3 Димерные токсины

Ковалентно и нековалентно связанные димерные ТПТ, найденные в ядах, обладают способностью специфически связываться с определенными подтипами nAХР и являются уникальными инструментами для изучения лиганд-рецепторных взаимодействий. Несмотря на природу связи и различную ориентацию протомеров у ковалентно и нековалентно связанных димеров (рис. 3) они все способны связываться с nAХР, и даже проявляют более разнообразную аффинность к различным типам рецепторов, нежели их исходные мономеры.

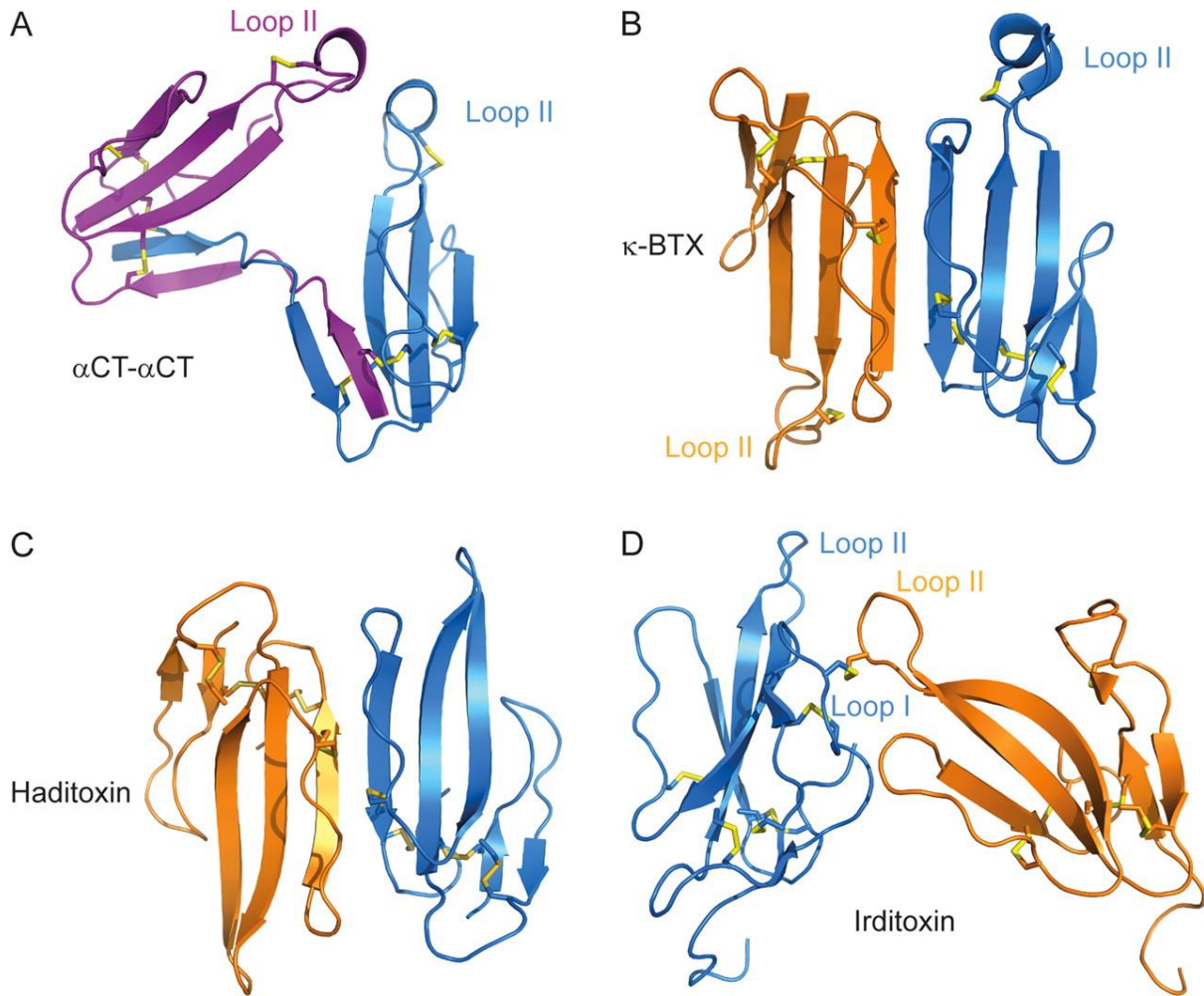


Рисунок 3 Схематическое представление димеров: α CT- α CT (A), нековалентно связанных κ -бунгаротоксина (κ -BTX) (B) и хадитоксина (C), и ковалентно связанного ирдитоксина(D). В κ -бунгаротоксине β -тяж из двух протомеров формирует протяженный антипаралельный складчатый β слой, со вторыми петлями ориентированными в разных направлениях. Подобное расположение наблюдается у хадитоксина. У ирдитоксина дисульфидный мостик связывает первую петлю одного протомера (синий) и вторую второго (оранжевый). В отличие от κ -бунгаротоксина и хадитоксина, но аналогично α CT- α CT, вторые петли двух протомеров направлены друг к другу [32].

Димер α -кобратоксина

Из яда кобры *N. Kaouthia* был выделен ковалентно-связанный димер (α СТ- α СТ) α -кобратоксина (α СТ) [33]. Рентгеноструктурный анализ показал, что две дисульфидных связи скрепляют петли I двух мономерных α СТ: связь образована между Cys³ одного мономера и Cys²⁰ другого и наоборот. Трехпетельная структура мономеров остается прежней, а концы центральных петель располагаются близко друг к другу. Спектр взаимодействия димера α СТ- α СТ с различными никотиновыми рецепторами отличается от такового у мономера α СТ.

Как и мономер, димер α СТ способен связываться с нАХР $\alpha 7$ и мышечного типа, но, в отличие от мономерного, димерный способен блокировать $\alpha 3\beta 2$ нАХР. Ни короткие, ни длинные мономерные α -нейротоксины не способны блокировать гетеропентамерные нейрональные нАХР. Этим свойством α СТ- α СТ похож на димерный к-бунгаротоксин, что доказывает гипотезу о том, что димеризация необходима трехпетельным токсинами для связывания с гетеромерными нейрональными нАХР [32].

к-бунгаротоксин

Димерный к-бунгаротоксин из яда крайта состоит из нековалентно связанных субъединиц [34], каждая из которых структурно сходна с α -нейротоксинами длинного типа. Субъединицы держатся вместе за счет водородных связей и Вандеваальсового притяжения. Участок взаимодействия образован внешней частью третьей петли. Остатки Phe и Ile играют важную роль в образовании димерной структуры [19]. Структурно они схожи с длинными α -нейротоксинами с пятым дисульфидным мостом во второй петле, причем этот дисульфид играет важную роль при связывании с рецептором, но в отличии от α -нейротоксинов, к-бунгаротоксины связываются исключительно с нейрональными нАХР, не взаимодействуя с нАХР мышечного типа. Для рецепторов $\alpha 3\beta 2$ типа $K_d=10^{-8}$ М, $\alpha 7$ и $\alpha 9$ – $K_d=10^{-7}$ - 10^{-8} М и для $\alpha 4\beta 2$ – $K_d=10^{-6}$ - 10^{-7} М [35, 36].

Ирдитоксин

Ирдитоксин представляет собой ковалентный гетеродимер из яда *Boiga irregularis*, каждая субъединица структурно подобна слабым трёхпетельным токсинам и имеет по дополнительному цистеину, который вовлечен в образование межмолекулярной связи. Дополнительный 11-ый остаток цистеина расположен на кончике первой и второй петли в положениях 17 и 42 соответственно для субъединиц А и В. Функционально он является специфичным постсинаптическим α -нейротоксином [37]. Ирдитоксин фармакологически ближе к короткоцепочечным α -нейротоксинам, таким как эрабутоксин а и b, так как проявляет высокую аффинность к мышечным АХР, но не к $\alpha 3\beta 2$ АХР (как к-нейротоксины) или к нейрональным $\alpha 7$ нАХР (как α -нейротоксины длинного типа).

Хадитоксин

Нековалентно связанный гомодимер хадитоксин из яда королевской кобры *Ophiophagus hannah*, состоит из коротких α -нейротоксинов [38]. Протомеры ориентированы также в противоположенные стороны, как и у к-бунгаротоксина. Хадитоксин способен блокировать не только мышечный АХР, что типично для короткоцепочечных α -нейротоксинов, но и $\alpha 7$ и гетеромерные $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 4\beta 2$ нАХР, что в очередной раз подтверждает значимость димеризации токсинов для узнавания гетеромерного нАХР [38]. Хадитоксин блокирует нейрональные АХР в очень высоких концентрациях, возможно из-за отсутствия дополнительного дисульфида во второй петле. Мономерной формы не было обнаружено, а классификация его спорна, потому что хадитоксин имеет большую гомологию с мускариновыми токсинами (75-80%), чем с классическим α -нейротоксином короткого типа – эрабутоксином b.

Анализируя данные по димерам, можно сделать выводы: димеризация способствует их связыванию с гетеромерным нейрональным нАХР;

дисульфидный мостик во второй петле (в как минимум в одном протомере) необходим димерам для узнавания $\alpha 7$ АХР, и его восстановление никак не влияет на связывание с мышечным nАХР. Интересно, что восстановление одного или обоих дисульфидов в петле II усиливают активность димера против гетеромерного $\alpha 3\beta 2$ АХР [32].

В качестве одной из тенденций последних лет необходимо отметить обнаружение первых трехпетельных токсинов с антикоагулянтной активностью, например, гемекстины А и В из *Hemachatus haemachatus*. Антикоагулянтной активностью обладает только субъединица А. Два этих трехпетельных токсина образуют нековалентный синергический комплекс, проявляющий антикоагулянтную активность селективно связываясь с фактором свертывания FVIIa и неконкурентно ингибируя комплекс внешней теназы (FVIIa*TF) [39].

Следует также упомянуть обнаружение ковалентно-связанных токсин-подобных белков, так называемых синергических токсинов. Нетоксичные сами по себе, они усиливают токсичность трёхпетельных токсинов при совместном введении [40].

2.3.4 Цитотоксины

Структура и биологическая активность

Второй крупной группой трехпетельных токсинов после α -нейротоксинов являются цитотоксины, структурно они сходны с короткими α -нейротоксинами: имеют в своем составе 59-62 аминокислотных остатка и 4 консервативных дисульфидных мостика [41, 42]). Это сильно основные амфифильные белки с широким спектром биологической активности, составляющие 40-70% веса сухого яда кобр (*Naja* и *Haemachatus*) [7, 43]. Часть белков из этой группы также принято называть кардиотоксинами, так как в низких концентрациях они увеличивают частоту сердечных сокращений, в более высоких - ведут к остановке сердца.

Цитотоксины имеют широкий спектр биологической активности. Они модулируют активность мембраносвязанных ферментов, деполяризуют возбудимые мембраны клеток сердца и нейронов, ингибируют агрегацию тромбоцитов, вызывают гемолиз, проявляют цитотоксичность, и приводят к остановке сердца. Белки из этой группы обладают цитолитическими эффектами (т.е. разрушают клетку путем формирования проницаемых для ионов пор в липидных мембранах и разрушения мембран). Цитотоксический эффект цитотоксинов был выявлен на клетках разного типа: эритроциты, лимфоциты, миоциты, клетки селезенки и различные раковые клетки [44-46].

Цитотоксическое действие зависит как от типа клеток, так и от структуры цитотоксина. Цитолитическое действие цитотоксина из яда индийской кобры *Naja naja* на опухолевые клетки было значительно сильнее, чем на нетрансформированные клетки, такие как клетки перитонеального экссудата, клетки селезенки и эритроциты [47]. При исследовании цитотоксина Р4 из яда кобры *Naja nigricollis nigricollis* на меланоме крысы, хондросаркоме крысы, мышечных эритроцитах, клетках селезенки и человеческих эритроцитах было обнаружено его более сильное цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Цитотоксины, предварительно смешанные с клетками перед инъекцией животным, также предотвращают развитие меланомы, лейкемии и хондросаркомы *in vivo* [48]. Цитотоксины обладают значительной и селективной антираковой активностью, индуцируя программируемую клеточную смерть через активацию митохондриального пути апоптоза и инактивацию лизосом [7, 49].

Мишени и механизмы действия

На данный момент предложено несколько механизмов действия цитотоксинов, причем методы молекулярного моделирования наравне с методами ЯМР сыграли не последнюю роль в установлении этих механизмов [50]. Цитотоксины способны влиять на мембранные каналы и рецепторы, на саму мембрану и действовать на внутриклеточном уровне. Большинство из

предложенных механизмов предполагает действие цитотоксинов на внешнюю мембрану клетки. Например, кардиотоксин из яда кобры *Naja naja atra* действует на внешнюю поверхность кардиомиоцитов, повышая уровень внутриклеточного Ca^{2+} , что может приводить к активации нелизосомальных протеиназ, разрушающих мембранные структуры [51]. Цитотоксин СТХ-III из *Naja atra*, связываясь с мембраной, индуцирует лизис мононуклеарных клеток. В плазмалемме мононуклеарных клеток были найдены белки массой 92, 77 и 68 кДа, с которыми мог связываться СТХ-III. Было выдвинуто предположение об иммуномодулирующих свойствах цитотоксина СТХ-III, обусловленных взаимодействием с этими белками [52].

Благодаря своей основной природе, цитотоксины проявляют высокую аффинность в связывании с отрицательно заряженными липидами [41, 53-55], причем некоторые цитотоксины подвергаются липид-индуцированной олигомеризации [56]. Взаимодействие с отрицательно заряженными липидами может способствовать димеризации цитотоксинов, которая затем приводит к их олигомеризации. Было выдвинуто предположение, что олигомеризация цитотоксина способствует формированию пор и/или прямому литическому воздействию на мембрану [56, 57].

Помимо общераспространенного мнения о неспецифическом цитолитическом действии цитотоксина на мембраны различных клеток, существуют исследования с помощью флуоресцентно меченного цитотоксина, показывающие внутриклеточное проникновение цитотоксина и его накопление в лизосомах [50]. Такой путь предполагает взаимодействие цитотоксина с плазмалеммой, но это взаимодействие временное. Кинетика и концентрационная зависимость накопления цитотоксина в лизосомах хорошо коррелирует с его цитотоксическим эффектом. Есть предположение, что лизосомы - основная цель литического действия цитотоксинов, в то время как нарушение в мембране – это следствие разрыва лизосом [50], а иммобилизация и активность цитотоксинов на плазмалемме – это дополнительный фактор, способствующий проникновению

цитотоксинов внутрь клетки. Дальнейшие действия цитотоксинов и высвобожденных лизосомальных протеаз в цитоплазме приводят к некрозу и разрыву плазмалеммы. Цитотоксины также способны проникать в ядро, связываться с хроматином и вызывать апоптоз [50].

Цитотоксины демонстрируют селективное ингибирование нескольких ключевых ферментов, таких как Na^+/K^+ -АТФаза и фосфолипид-чувствительная протеинкиназа [58, 59]. Хотя основной молекулярный механизм ингибирования все еще остается неизвестным, имеются данные о том, что кардиотоксины могут эффективно блокировать ферментативную активность Na^+/K^+ -АТФазы и фосфолипид-чувствительной протеинкиназы путем конкурентного связывания с аденозинтрифосфатом (АТФ) в цитоплазме, который является основным субстратом для функционирования этих ферментов. Ингибирование цитотоксинами протеинкиназы С было также объяснено способностью цитотоксинов связываться с нуклеотидтрифосфатами [60].

Цитотоксины *N. oxiana* могут взаимодействовать с липосомами с большим содержанием кардиолипинов (CL), формируя не-бислойные структуры, что является результатом перемещения CL во внешний слой липосомальной мембраны. Цитотоксины формируют внутримембранные токсин-липидные комплексы, напоминающие вывернутые мицеллы. Такие нетипичные комплексы с токсином внутри мицеллы появляются, когда клеточные мембраны двух клеток соприкасаются перед слиянием (рис. 4) [7].

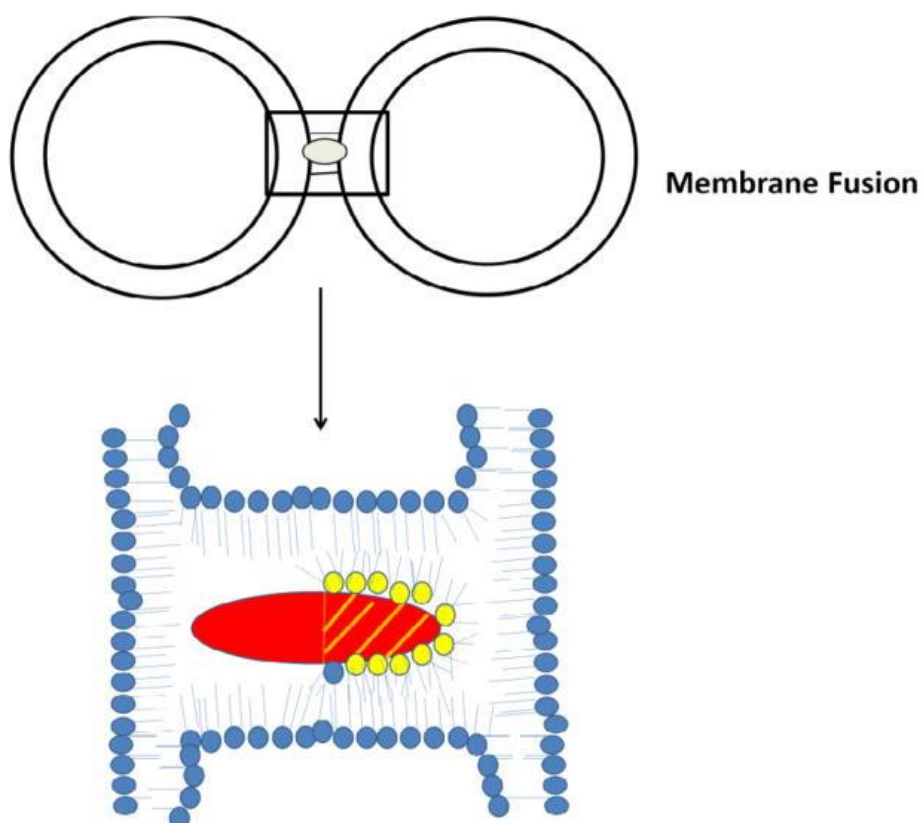


Рисунок 4. Схематическая модель слияния липосом под действием цитотоксина Vc5. Vc5 может одновременно взаимодействовать с двумя липосомами, содержащими смесь фосфатидилхолина и кардиолипина (CL), соприкасаясь со внешними слоями каждой из них. Желтым показаны анионные фосфолипиды (PS и CL). Гидрофильный участок кардиотоксина (основной N-концевой участок, заштрихованный) может вырывать или PS или CL молекулы с одной стороны бислоя (желтые фосфолипидные головки), в то время как гидрофобный участок цитотоксина взаимодействует с алкильными хвостами фосфолипидов [7].

Этот уникальный комплекс также стимулирует временное образование пор [56]. Вследствии мембранного слияния, вывернутые мицеллы с цитотоксином могут встраиваться в бислои слившихся клеток с последующим внедрением цитотоксина в цитозоль (рис. 5) [7].

Цитотоксин (Vc5) во внеклеточном пространстве взаимодействует с клеточной мембраной клетки-мишени. Далее, он проникает в цитозоль неспецифическим способом и может переместиться к митохондрию. При связывании с наружной митохондриальной мембраной (ОММ), цитотоксин вызывает дезорганизацию фосфолипидного бислоя, способствует перемещению кардиолипина (CL) (желтые головки фосфолипидов) во внешний слой, разрывает наружную митохондриальную мембрану из-за разрушения CL контактных сайтов, в которых внутренняя мембрана (ИММ) контактирует с наружной, и которые необходимы для митохондриальной целостности (сайты формируются при взаимодействии Opa1 локализованного на внутренней мембране и других белков с CL), и может формировать неустойчивые вывернутые мицеллы, перемещаемые к внутренней мембране. Кардиотоксин нарушает окислительное фосфорилирование, снижает уровень АТФ, вызывает падение трансмембранного потенциала и разрушение ИММ. Фрагментированная митохондрия может быть утилизирована аутофагосомами, путем лизосомального гидролиза (митофагии) или она может высвобождать цитохром *c*, который инициирует апоптоз. Перемещение CL во внешний слой мембраны ОММ запускает устранение митохондрии путем митофагии, через комплекс легкая цепь 3 (LC3) белка аутофагии ассоциированного с микротрубочками белка-1) с внешним CL. Связь между кардиотоксин-опосредованной токсичностью и митофагией еще не установлена. Необходимы дальнейшие исследования, способные определить, может ли кардиотоксин вызывать митофагию в раковых клетках, путем разрушения ОММ структуры и перемещения CL во внешний слой мембраны [7].

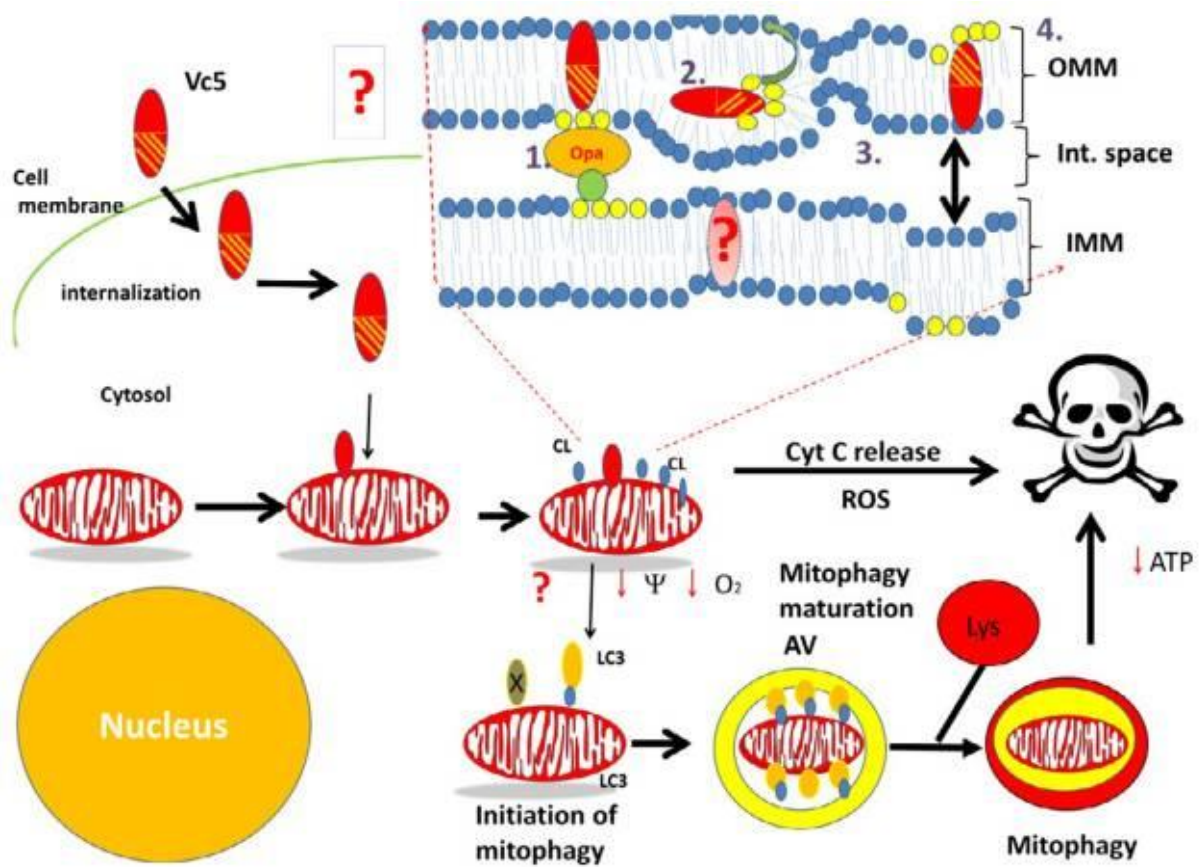


Рисунок 5. Предполагаемая модель взаимодействия цитотоксинов с клеточными мембранами и оказываемые, вследствие проникновения, эффекты на функционирование и целостность митохондрий [7].

2.3.5 Прочие трёхпетельные токсины

Помимо основных групп трехпетельных токсинов, перечисленных выше, в ядах змей имеются в меньших количествах еще несколько типов ТПТ с уникальными структурными и функциональными способностями.

Одни из них ингибируют ацетилхолинэстеразу (АХЭ). Эти токсины вызывают непроизвольные сокращения мышечных волокон (фасцикуляции) в результате накопления ацетилхолина в синаптической щели, поэтому их называют фасцикулинами [61]. Они широко распространены в ядах мамб

(*Dendroaspis spp.*) и структурно схожи с короткими токсинами. Фасцикулины блокируют периферический сайт АХЭ, предотвращая разрушения ацетилхолина [62].

Дендроаспины (мамбины) – содержат трипептид RGD на конце третьей петли, который, как полагают, ответственен за антиадгезивные и антитромбоцитарные свойства этих белков [63].

Кальцисептин – нейротоксин из яда черной мамбы, состоящий из 60 а.о., селективно блокирует кальциевые каналы L-типа в клетках сердца и гладкой мускулатуры [64, 65]. Еще один примечательный блокатор кальциевых каналов был выделен из яда австралийского тайпана *Oxyuranus scutellatus*. Структурно это олигомерный токсин тайкатоксин состоящий из трех различных субъединиц: α -нейротоксин-подобной, фосфолипазной и обладающей активностью ингибиторов сериновых протеаз, связанных нековалентно в стехиометрии 1:1:4 [66].

Некоторые токсины, структурно сходные с цитотоксинами, проявляют уникальные свойства. Трехпетельный β -кардиотоксин из яда королевской кобры, обладает специфическими структурными и функциональными особенностями. Он блокирует адренорецепторы (β_1 и β_2) и, благодаря своей низкой токсичности, может в будущем применяться в медицине в роли блокатора β -адренорецепторов [67].

Мускариновые токсины селективны к мускариновым АХР [68]. Структурно они похожи на α -нейротоксины короткого типа, но их полипептидные цепи состоят из 64-65 а.о. Некоторые мускариновые токсины действуют как агонисты, в то время как другие действуют как антагонисты.

2.4 Металлопротеиназы

2.4.1 Биологическая активность

Белковый анализ ядов змей показал, что металлопротеиназы (МП) представляют собой основной компонент большинства ядов ямкоголовых и гадюковых змей [69]. Наряду с локальной и системной геморрагической активностью, члены семейства МП змеиных ядов также участвуют в гемостазе и проявляют фибрин/фибриноген-литическую активность, действуют, как протромбиновые активаторы, расщепляют ламинин, нидоген, коллаген I и IV типа, активируют фактор свёртывания крови X, обладают апоптозной активностью, ингибируют агрегацию тромбоцитов, активируют провоспалительные факторы и инактивируют ингибиторы плазматических сериновых протеиназ [7, 69, 70].

Вдобавок к геморрагии, МП индуцируют повреждения скелетной мускулатуры, мионекрозы, очевидно, вторичные, при ишемии, вызванной в мышечной ткани в результате кровотечения и ограниченного кровоснабжения. Разрушение микрососудов металлопротеиназами ухудшает скелетно-мышечную регенерацию и приводит к фиброзу и разрушению ткани после укуса. МП участвуют в разрушении компонентов экстрацеллюлярного матрикса и стимулируют локальное воспаление и отёк, после чего активируются собственные матриксные МП [71].

Недавно были описаны мембраносвязанные МП, родственные змеиным МП. Из-за наличия дезинтегринового и металлопротеиназного доменов, эту группу мембранных ферментов млекопитающих назвали ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase domains). Эти ферменты, как и некоторые змеиные МП, вовлечены в отщепление молекул от клеточной поверхности [72].

2.4.2 Структура, классификация

По размеру и доменной структуре МП делятся на 3 класса: Р-I, Р-II и Р-III [4]. В Р-I входят небольшие МП с молекулярной массой 20-30 кДа, которые содержат только металлопротеиназный домен. Класс Р-II представлен МП среднего размера 30-60 кДа, состоящими из протеиназного и дезинтегринового доменов. Большие МП Р-III класса, имеют массу 60-100 кДа и состоят из протеиназного, дезинтегринового и цистеин-богатого доменов [7, 69]. Для ферментативной активности каталитическим доменам МП необходимы двухвалентные катионы, такие как Zn^{2+} , а N- и C-концевые домены связывают ионы Ca^{2+} , который вовлечен в структурную стабилизацию МП [7]. Существуют также гетеротримерные МП с дополнительным доменом, подобным лектинам С-типа, расположенным в С-концевом участке протеиназы. Многие авторы относят их к Р-III классу, обозначая как подкласс Р-III_d [4].

Анализ размещённых в базах данных аминокислотных последовательностей металлопротеиназ кобр, позволяет отнести их к репролизинам, а именно к высокомолекулярным металлопротеиназам, содержащим N-концевой металлопротеиназный домен с консервативным цинк-связывающим мотивом, дезинтегрин-подобный и богатый цистеином домены [73].

2.4.3 Механизмы действия

Несмотря на недавние попытки расшифровать детали патологического эффекта, механизм действия змеиных МП на микроциркуляцию остается неясным. Основные молекулярные мишени геморрагических МП - компоненты базальной мембраны и окружающего экстрацеллюлярного матрикса, обеспечивающие механическую прочность капиллярам, и белки клеточной поверхности [74, 75]

Некоторые МП индуцируют геморрагию, действуя напрямую на капиллярные кровеносные сосуды. Предполагается, что геморрагические ферменты селективно расщепляют пептидные связи компонентов базальной мембраны и присоединенные белки экстрацеллюлярного матрикса, которые играют ключевую роль в механической стабилизации базальной мембраны, таким образом, влияя на взаимодействия между базальной мембраной и эндотелиальными клетками. Отсутствие взаимодействия между эндотелиальными клетками и базальной мембраной ведет к потере сигнала выживания и инициации апоптоза [70]. В итоге между эндотелиальными клетками образуются щели. В условиях нормального тканевого кровоснабжения подобные нарушения приводят к потере прочности, разрыхлению и возможным разрывам капиллярной стенки, через которые и происходит кровоизлияние [74].

Как модель для изучения механизма действия МП широко используется хорошо исследованный представитель Р-III класса - белок джарарагин (jararhagin из яда *Bothrops jararaca*). Эта МП оказывает прямое влияние на эндотелий кровеносных сосудов, субэндотелиальные белки матрикса, тромбоциты, факторы свёртывания крови (фактор фон Виллебранда), фибриноген, рецепторы клеточной поверхности, фибробласты, эпителиальные воспалительные и раковые клетки [70].

Индуцированный джарарагином патогенез в значительной степени зависит от его Zn^{2+} -зависимой каталитической активности. Провоспалительная активность джарарагина падает при инактивации фермента хелатирующими агентами [76]. Протеолиз также важен для блокады сигнала (зависящего от окружающего клетку матрикса) к выживанию в эндотелиальных клетках, что приводит эти клетки к гибели путем апоптоза [77]. Протеолиз β_1 субъединицы интегринового рецептора - ключевой фактор влияния джарарагина на тромбоциты, которые при этом становятся неспособными распознавать коллаген для агрегации.

Как бы то ни было Zn^{2+} -зависимая каталитическая активность не единственное важное свойство джарарагина. Сходная каталитическая активность у геморрагических и негеморрагических МП, даёт основания предположить, что гидролиз базальной мембраны не единственный механизм разрушительного действия на сосуды, запускаемый геморрагическими МП.

Для МП из Р-III класса характерна более высокая геморрагичность и более разносторонняя биологическая активность, чем у МП из Р-I, состоящих только из одного протеиназного домена [78]. Вероятно, это обусловлено присутствием экзосайтов в дополнительных доменах, которые способствуют связыванию МП с соответствующими мишенями в микрососудах. Недавние исследования *in vivo* показали, что геморрагические МП Р-III класса преимущественно локализируются в микрососудах, а негеморрагические в тканях не накапливаются. С другой стороны, структурные детерминанты ответственные за различные геморрагические способности МП из класса Р-I остаются неизвестными.

Более того геморрагические и негеморрагические МП различаются в способности гидролизовать *in vivo* ключевые белки базальной мембраны (коллаген IV типа и перлекан) и другие белки экстрацеллюлярного матрикса, включая коллагены VI и XV типов, играющие решающую роль в связывании компонентов базальной мембраны с околососудистым фибриллярным коллагеном. Вероятно, способность геморрагических МП связываться с коллагеном коррелирует с их способностью накапливаться вокруг капилляров и обуславливает более сильное геморрагическое воздействие по сравнению с МП из Р-I класса, и негеморрагическими МП.

Синтетические пептиды, содержащие последовательность РККН каталитического домена джарарагина, связываются с доменом I α_2 субъединицы интегрин тромбоцита, вызывая конформационные изменения или конкурируя за сайты связывания интегрин с коллагеном [70]. Большинство этих адгезивных

мотивов присутствуют на дезинтегрин-подобном и цистеин-богатом доменах и ингибируют коллаген-зависимую агрегацию тромбоцитов.

Несмотря на отсутствие мотива RGD, структура дезинтегринового домена МП в высшей степени гомологична таковой у дезинтегринов (полипептиды небольшого размера, не обладающие ферментативной активностью, обогащенные остатками цистеина и содержащие мотив RGD). Подобно дезинтегринам, МП способны распознавать интегриновые рецепторы на клеточной поверхности и ингибировать интегрин-опосредованные клеточные реакции [72].

Джарарагин способен связываться с доменом А1 фактора фон Виллебранда, через пептидный мотив расположенным вблизи цистеин-богатого домена [75]. Более того, МП препятствуют взаимодействию тромбоцитов и коллагена, связываясь непосредственно с коллагеновыми волокнами, а участок связывания располагается на дезинтегриновом домене (рис. 6) [70]. Параллельно джарарагин связывается с $\alpha_2\beta_1$ интегринами, используя дополнительный мотив, присутствующий в гипервариабельном районе цистеин-богатого домена.

Пространственная удаленность каталитической щели, интегрин-связывающего и коллаген-связывающего участков (рис. 6), указывает на возможность сборки мультиструктурного комплекса, вклинивающегося в контакт между эндотелиальными клетками и экстрацеллюлярным матриксом и нарушающего фокальные (адгезионные) контакты [70].

Эта гипотеза объясняет апоптоз эндотелиальных клеток, индуцированный джарарагином, а также его локализацию вокруг кровеносных сосудов после инъекции, что существенно при геморрагической активности.

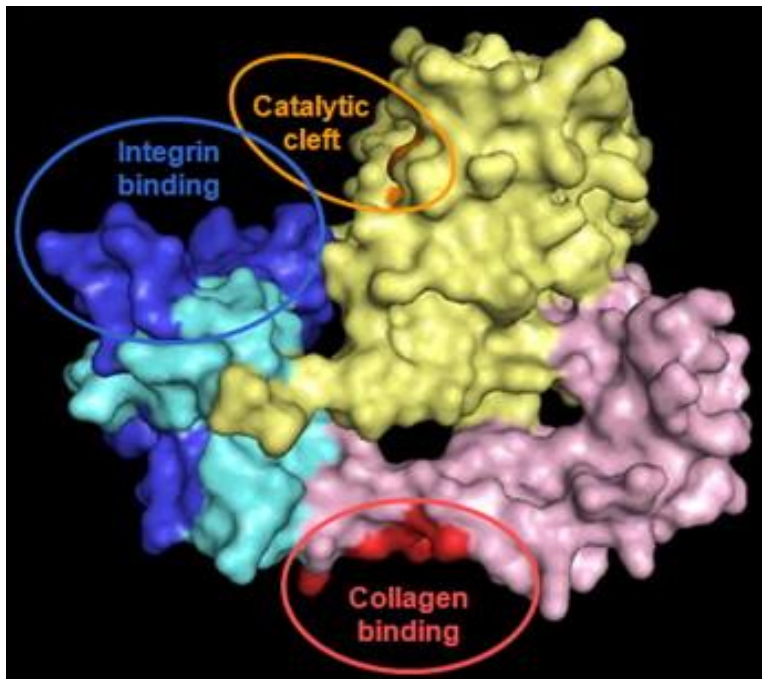


Рисунок 6. Схематическое представление коллаген- и интегрин-связывающих сайтов джарарагина. Металлопроеиназный домен окрашен желтым цветом, дезинтегрин-подобный домен - сиреневым и цистеин-богатый домен - голубым. Цинк-связывающий район окрашен в оранжевый, коллаген-связывающий эпитоп - в красный и интегрин-связывающий фрагмент - в синий [70].

2.4.4 Фармакологические перспективы

Довольно много экспериментов *in vivo* и *in vitro* демонстрируют, что компоненты змеиных ядов могут способствовать разработке лекарств против большого числа заболеваний, включая и рак. Клетки меланомы, обработанные джарарагином (джара) и его аналогом с инактивированным каталитическим доменом (джари), теряли способность к миграции и инвазии, вследствие потери способности прикрепляться к пластику и экстрацеллюлярному матриксу. Также наблюдалось снижение пролиферации и статистически достоверное снижение способности обработанных клеток вызывать легочные метастазы [79]. В

эпителиальных клетках джарарагин ингибировал клеточную адгезию, но стимулировал клеточную миграцию, и вызывал изменения в актиновом цитоскелете. В нейробластоме джарарагин стимулировал рост нейритов и активировал Rac1 ГТФазу. Нейритогенез зависел от протеолитической активности МП [80].

Кровидисин (Crovidisin), МП Р-III класса из яда *Crotalus viridis*, селективно открепляет от субстрата клетки остеосаркомы, но не действует на первично-культивированные остеобласты. Клетки остеосаркомы и остеобластов имеют различия в профилях экспрессии интегринов, коллагена, фибронектина, киназ фокальной адгезии и, вероятно, благодаря этому различию, клетки остеосаркомы более восприимчивы к МП [81].

Некоторые работы акцентируются на таких специфических этапах онкогенеза, как, например, иммунологических аспектах и индукции апоптоза. Клеточная пролиферация - не единственная мишень в борьбе с раком, и следует обратить внимание на способность опухоли проникать в прилежащие ткани и создавать новые кровеносные сосуды. Взаимоотношения между клетками и компонентами экстрацеллюлярного матрикса служат основополагающим фактором в событиях, происходящих при инвазии опухоли и в механизмах ангиогенеза [4].

2.5 Фосфолипазы A2

Фосфолипаза - фермент, гидролизующий фосфолипиды. В зависимости от положения гидролизуемой связи в фосфолипиде различают 4 основных класса фосфолипаз: А, В, С и D (рис. 7) [82].

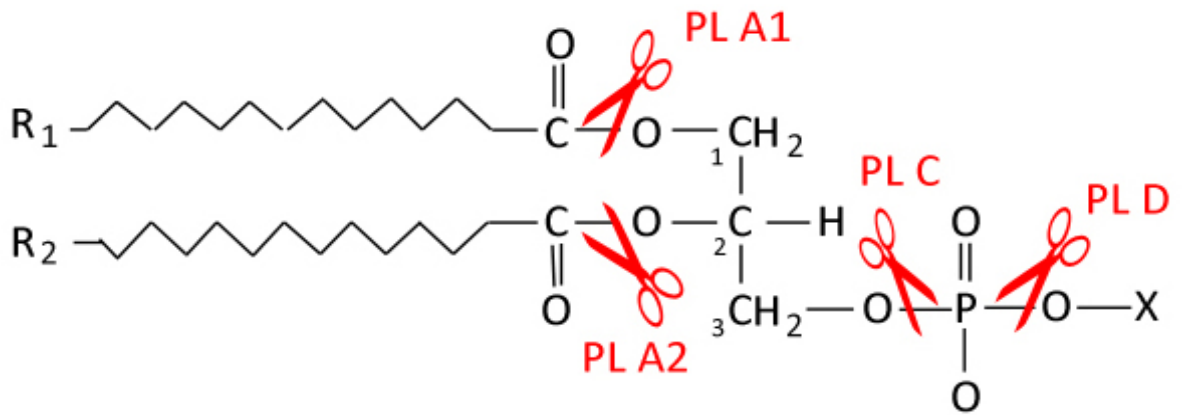


Рисунок 7. Схема фосфолипида и положения эфирных связей, гидролизуемых разными классами фосфолипаз. Фосфолипаза A1 - отщепляет SN-1 ацильную цепь. Фосфолипаза A2 - отщепляет SN-2 ацильную цепь, Фосфолипаза B - отщепляет обе SN-1 и SN-2 ацильные цепи, также называется лизофосфолипаза. Фосфолипаза C - гидролизует связь между глицериновым остатком и полярной группой, при этом образуются диацилглицерин и фосфат-содержащая полярная группа. Фосфолипазы C, высвобождающие вторичный мессенджер инозитол-трифосфат, играют важную роль в передаче сигнала в клетке. Фосфолипаза D - гидролизует связь между фосфатной группой и спиртовой группой, при этом высвобождаются фосфатидная кислота и спирт [82].

Фосфолипазы A2 (ФЛА2) составляют широкое и разнородное семейство ферментов, гидролизующих эфирную связь глицерофосфолипидов в положении Sn2 с образованием лизофосфолипидов и свободных жирных кислот. Оба этих компонента участвуют в генерации физиологически важных вторичных мессенджеров. Арахидоновая кислота (АК) может послужить предшественником эйкозаноидов (простагландины и лейкотриены), а лизофосфолипиды могут конвертироваться в лизофосфатидную кислоту или ацетилироваться с образованием тромбоцит-активирующего фактора (ТАФ) [83].

ФЛА2 являются одним из основных токсических компонентов яда змей, их биологические свойства достаточно хорошо изучены. В отличие от ФЛА2 млекопитающих, многие из них токсичны и проявляют широкий спектр фармакологических эффектов [84, 85]. Семейство ФЛА2 включает в себя быстро растущую группу внутриклеточных и секретируемых фосфолипаз. Существует несколько различных классификаций ФЛА2.

2.5.1 Общепринятая классификация

Согласно общепринятой классификации суперсемейство ФЛА2 состоит из 15 различных идентифицированных групп и многочисленных подгрупп (табл. 2) [86-88]. Деление на группы происходит на основании источника (организма), по первичной последовательности, молекулярному весу, схеме замыкания дисульфидных связей, потребности в Ca^{2+} и т.д. [86, 89]. ФЛА2 можно разбить на пять основных категорий: 1) секретируемые малоразмерные фосфолипазы, 2) большие цитозольные (цФЛА2), 3) Ca^{2+} -независимые, 4) ТАФ ацетилгидролазы (PAF acetylhydrolases) и 5) лизосомальные фосфолипазы [83, 86].

Секретируемые фосфолипазы A2

У млекопитающих секретируемые ФЛА2, расщепляющие фосфолипиды и защищающие от бактериальных инфекций играют важную роль как в нормальных физиологических, так и в патологических процессах. Из-за разрастания суперсемейства ФЛА2, становится все труднее обобщить их многочисленные свойства. В дополнение к хорошо исследованным функциям этих ферментов по расщеплению фосфолипидов и защите от бактериальных инфекций организма хозяина [90], добавляются данные, свидетельствующие о том, что некоторые секретируемые ФЛА2 вовлечены в формирование сигнальных молекул, в частности, арахидоновой кислоты – ключевого предшественника различных эйкозаноидов (простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов), особенно во время воспаления [91]. Эйкозаноиды играют роль в широком наборе физиологических и

патофизиологических процессов, таких, как регуляция иммунного ответа, воспаление и восприятие боли [86], и действуют через связывание со специфическим G-белок-сопряженным рецептором [92].

Лизофосфолипиды служат предшественниками липидных медиаторов, таких как лизофосфатидная кислота (ЛФК) или тромбоцит-активирующий фактор (ТАФ). ЛФК регулирует пролиферацию, выживаемость и миграцию клеток. Она участвует в заживлении ран, развитии мозга, опухолевом росте и устранении повреждения сосудов [93]. ТАФ вовлечен в воспалительный процесс [94]. ЛФК и ТАФ также действуют через связывание с G-белок-сопряженными рецепторами.

ФЛА2 из группы ПА представлены в высокой концентрации в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом [95]. Предположительно, ФЛА2 участвуют в синдроме затрудненного дыхания, воспалении кишечника, панкреатите и сепсисе [96]. При воспалительных заболеваниях концентрация секретируемых ФЛА2 в крови растет. Они способны стимулировать выброс цитокинов из крови и синовиальной жидкости при помощи механизма, независимого от их каталитической активности. Увеличению активности ФЛА2 сопутствует накопление арахидоновой кислоты (АК) [97-99].

Некоторые секретируемые ФЛА2 обладают антикоагулянтной активностью [100, 101]. ФЛА2 человека (групп ПА, ПД и V) и некоторые ФЛА2 ядов содержат основные остатки на поверхности молекулы, участвующие в ингибировании активности протромбиназного комплекса посредством связывания ФЛА2 с фактором Ха. Этот эффект не зависит от гидролиза ФЛ. Однако ФЛА2 могут также ингибировать коагуляцию путем гидролиза или связывания ФЛ, тем самым препятствуя формированию коагулятивного комплекса, которое зависит от интактных ФЛ на мембранной поверхности [100, 101].

Секретируемые ФЛА2 человека (групп ПА, V, X и XII) и крысы (групп ПА, ПД, ПЕ и V) проявляют бактерицидную активность в отношении

грамположительных бактерий [102] и могут участвовать в защите организма хозяина от бактериальной инфекции [102, 103]. Недавние исследования нокаутных по ФЛА2 V мышей показали, что фермент играет важную роль в запуске иммунного ответа против грибковой инвазии [104]. ФЛА2 млекопитающих ПА, V и ПД вызывают дегрануляцию тучных клеток [105]. ФЛА2 групп V и X могут быть вовлечены в иммунную реакцию против аденовирусных инфекций [106].

Недавно была установлена роль секретируемых ФЛА в процессах ноцицепции. ФЛА2 ПА и V экспрессируются в спинном мозге, а специфический ингибитор ФЛА2 снижает гиперальгезический ответ на воспаление у крыс [107].

В печени, тонком кишечнике и почках у человека и мыши, была идентифицирована каталитически неактивная секретируемая ФЛА2 ХПВ с мутацией в активном центре. Эта ФЛА2 не обладала способностью связываться с фосфолипидными рецепторами типа М и не проявляла активности в отношении фосфолипидных субстратов. Подобное отсутствие ферментативной активности дает основание предположить, что ФЛА2 могут выступать в качестве лигандов для еще не идентифицированных рецепторов [108]. Геном млекопитающих кодирует несколько типов белков, связывающих секретируемые ФЛА2 независимо от их липолитической активности [109].

Секретируемые ФЛА2 участвуют в регуляции миграции эндотелиальных клеток [110] и стимуляции роста нейритов [111]. Действие этих ферментов может быть либо результатом прямого гидролиза фосфолипидов и нарушения структуры мембраны, либо, в большинстве случаев, быть опосредованными через вовлечение продуктов гидролиза в пути передачи сигнала [91].

Секретируемые ФЛА2, выделенные из яда кобры, были первыми из охарактеризованных фосфолипаз [112, 113]. Нумерация групп исходно употреблялась для разделения между разными змеиными ядами, так в группу I

входили ФЛА2 из ядов кобры и крайта, а в группу II ФЛА2 из ядов гремучих змей и гадюк, [114], деление основывалось на схеме дисульфидных связей [83]. Секретируемые ФЛА2 - белки небольшого размера (13-18 кДа), Ca^{2+} -зависимы, богаты дисульфидными связями, имеют гистидин в каталитическом центре, найдены в различных ядах змей, скорпионов и т. д, в пищеварительном соке, (вырабатываются ацинарными клетками), суставной синовиальной жидкости, очагах воспаления, различных тканях млекопитающих, микроорганизмах, насекомых, моллюсках, растениях, парвовирусах [85, 87, 115-120].

Таблица 2. Секретируемые ФЛА2 [83].

Группа	Источник	Мол. масса, кДа	Число дисульфидных связей
IA	Кобра и крайт	13-15	7
IB	Человеческая/свиная поджелудочная железа	13-15	7
IIA	Гремучая змея, человеческая синовиальная жидкость	13-15	7
IIB	Габонская гадюка	13-15	6
IIC	Тестикулы крысы/мыши	15	8
IID	Человеческие/мышинные поджелудочная железа/селезенка	14-15	7
IIIE	Человеческие/мышинные мозг/сердце/матка	14-15	7
IIIF	Человеческие/мышинные тестикулы/эмбрион	16-17	6
III	Человек/мышь/пчела/ящерица	15-18 55(человек /крыса)	8

V	Человеческие/мышинные сердце/легкое/макрофаги	14	6
IX	Яд улитки (конодипин-М)	14	6
X	Человеческие селезенка/тимус/лейкоциты	14	8
XIA	Растение, зеленые побеги риса (PLA ₂ -I)	12,4	6
XIB	Растение, зеленые побеги риса(PLA ₂ -II)	12,9	6
XII	Человек/мышь	19	7
XIII	Парвовирус	<10	0
XIV	Симбиотические грибы/бактерии	13-19	2

Цитозольные фосфолипазы

Цитозольные ФЛА2 (цФЛА) составляют IV группу, превосходят секретируемые ФЛА2 по размеру (61-114 кДа) и отличаются по схеме дисульфидных связей. Содержат С2 домен, который направляет фермент к клеточной мембране. Первая цитозольная ФЛА2 была выделена из нейтрофилов и тромбоцитов в 1986г. [83].

Группа IV суперсемейства ФЛА2 состоит из 6 внутриклеточных фосфолипаз: α β γ δ ϵ и ζ (табл. 3). цФЛА2альфа - наиболее исследуемая фосфолипаза из IV группы, экспрессируется в клетках млекопитающих и опосредует продукцию функционально различных липидных продуктов в ответ на внешние стимулы [121].

Таблица 3. Цитозольные ФЛА2 IV группы [83].

Группа	Источник	Мол. масса, кДа	Альтернативное название
IVA	Человек/мышь	85	цФЛА2 α
IVB	Человек	114	цФЛА2 β
IVC	Человек	61	цФЛА2 γ
IVD	Человек/мышь	92-93	цФЛА2 δ
IVE	Мышь	100	цФЛА2 ϵ
IVF	Мышь	96	цФЛА2 ζ

Выяснению клеточных функций цФЛА2 IVA способствовало изучение нокаутных мышей [122, 123]. Выяснилось, что цФЛА2 IVA вовлечены в процессы воспаления, кишечного изъязвления, острых респираторных заболеваний, полипоза, ишемического повреждения мозга, анафилаксии фертильности и родов [124].

Ca²⁺ независимые ФЛА2

Ca²⁺ независимые ФЛА2 составляют VI группу и представлены шестью разными типами (табл. 4). Классическая кальций-независимая ФЛА2 существует в олигомерной форме и имеет несколько сплайс-вариантов, из которых, по крайней мере, два (VIA-1 и VIA-2) обладают ферментативной активностью.

Таблица 4. Ca²⁺ независимые ФЛА2 группы VI [83].

Группа	Источник	Молекулярная масса, кДа
VI A-1	Человек/мышь	84-85
VI A-2	Человек/мышь	88-90

VI B	Человек/мышь	88-91
VI C	Человек/мышь	146
VI D	Человек	53
VI E	Человек	57
VI F	Человек	28

Анкириновые повторы встречаются у нескольких сотен белков, таких как факторы транскрипции, регуляторы клеточного цикла. Считается, что данный мотив участвует в белок-белковых взаимодействиях. Предполагают, что в клетках ФЛА2 VIA присутствует в виде тетрамера и, возможно, анкириновые мотивы участвуют в олигомеризации белка. Фосфолипаза ФЛА2 VIA неспецифична к природе жирных кислот в положении sn-2 и заместителю в положении sn-3 фосфолипида; полностью активна в отсутствие кальция и осуществляет межфазный катализ. Фермент также проявляет лизофосфолипазную активность по положению sn-1, трансацилазную активность и активность, характерную для ТАФ ацетилгидролазы (PAF-AH) [83].

ТАФ ацетилгидролазы

ФЛА2 составляющие VII и VIII группы могут гидролизовать ацетильную группу в sn-2 положении ТАФ и поэтому были оригинально названы ТАФ ацетилгидролазы (PAF acetylhydrolases - PAF-AH) (табл. 5). Активность фермента обусловлена наличием серина в активном центре. Один из этих ферментов - ФЛА2 VIIA – секретируемая, две остальные VIIB и VIII ФЛА2 – внутриклеточные [86].

ФЛА2 группы VIII могут играть роль в развитии мозга [86]. Экспрессия VIIA субъединицы наблюдалась только в эмбриональном и постнатальном крысином мозге. Во время дальнейшего развития экспрессия VIIA ФЛА2 не

наблюдалась. Было выдвинуто предположение, что развитие мозга регулируется через взаимодействие между каталитической и регуляторной субъединицами [125].

Таблица 5. Группа VII и VIII ФЛА2, проявляющие ТАФ ацетилгидролазную активность [83].

Группа	Источник	Мол. масса, кДа	Особенности	Альтернативное название
VIIA	Человек/крыса /свинья/бык	45	Секретируемая α/β гидролаза	Липопротеин - ассоциированная PLA2(Lp-PLA2), PAF-АН плазмы
VIIВ	Человек/бык	40	Внутриклеточная, миристоилированная, α/β гидролаза	PAF-АН II
VIIIA	Человек	26	Внутриклеточная, Ser/His/Asp триада, гомодимер или гетеродимер с VIIВ, ассоциирована с β -субъединицей	PAF-АН Ib ($\alpha 1$ субъединица)
VIIВ	Человек	26	Внутриклеточная, Ser/His/Asp триада, гомодимер или гетеродимер с VIIA, ассоциирована с β -субъединицей	PAF-АН Ib ($\alpha 2$ субъединица)

Лизосомальные ФЛА2 - XV группа

Группа представлена N-гликозилированным белком (масса полипептидной части 45 кДа), выделенным из мозга коровы. Фермент содержит консервативную

Ser/His/Asp триаду и четыре цистеиновых остатка, необходимых для каталитической активности, проявляет фосфолипазную и трансацилазную активность [83].

2.5.2 Классификация нейротоксичных ФЛА2 по четвертичной структуре

Было охарактеризовано более 50 пресинаптических нейротоксинов, обладающих активностью ФЛА2. На основании четвертичной структуры нейротоксины с фосфолипазной активностью могут быть разделены на четыре класса [8]. Класс I включает одноцепочечные ферменты с молекулярной массой в диапазоне от 13 до 15 кДа, имеющие 7 дисульфидных связей. Представители этого класса аммодитоксины из яда *Vipera ammodytes ammodytes*, каудотоксин из *Bitis caudalis*, нотексин из *Notechis scutatus scutat*.

Класс II включает нейротоксичные ФЛА2, состоящие из двух нековалентно связанных гомологичных, но не идентичных субъединиц, по крайней мере одна из которых обладает ферментативной активностью. Например, кротоксин из яда гремучей змеи *Crotalus* - гетеродимер (24 кДа), состоящий из основной ферментативной субъединицы (две измоформы 12 кДа) и кислой субъединицы (4 изоформы, 12 кДа) с неизвестной биологической активностью [126].

Класс III представлен гетеродимерами состоящими из двух неодинаковых субъединиц. Представитель III класса - β -бунгаротоксин (*Bungarus multicinctus*) состоит из фосфолипазной субъединицы (13 кДа), связанной дисульфидной связью с белком (7 кДа), сходным с дендротоксином (нейротоксин, специфически связывающийся с пресинаптическими калиевыми каналами) [127].

Класс IV включает в себя олигомеры из нековалентно ассоциированных гомологичных субъединиц. Примером класса является тайпоксин, состоящий из сильно основной ФЛА2 субъединицы, нетоксической субъединицы и гликопротеиновой субъединицы с 8 дисульфидными связями [8].

2.5.3 ФЛА2 ядов змей: биологическая активность и механизмы действия

ФЛА2 в избытке присутствуют в ядах змей *Elapidae* и *Viperidae*. Они имеют много значимых особенностей, общих с ФЛА2 млекопитающих, таких как механизм катализа, потребность в Ca^{2+} и очень консервативную первичную и третичную структуры. Наряду с вероятной ролью в переваривании жертвы, змеиные фосфолипазы как правило, обладают различными фармакологическими свойствами, включая нейро- мио- и кардиотоксическое действие, а также антикоагулянтный и провоспалительный эффекты [128]. Они влияют на сокращение гладкомышечной мускулатуры, а также вызывают деполяризацию мышечного волокна [129] и могут поляризовать мембрану нервных окончаний [130].

Некоторые белки (β -бунгаротоксин, кротоксин, агкистродоксин, аммодитоксин, каудотоксин) с фосфолипазной активностью представляют собой пресинаптические нейротоксины, блокирующие передачу нервного импульса [8]. Один из возможных механизмов действия нейротоксинов предполагает гидролиз фосфолипидов плазмалеммы после специфического связывания с белковым компонентом мембраны [131].

Змеиные ФЛА2 играют важную роль в экзоцитозе. Две ФЛА2: кротоксин из змеиного яда относящийся к группе ПА PLA2s и синовиальная ПА ФЛА2 индуцируют выброс катехоламинов у клеточной линии феохромоцитомы крысы и гипокампальных нейронов [132]. ФЛА2 IA из *Naja mossaambica mossaambica* стимулирует секрецию инсулина из панкреатических бета-клеток [133].

Антикоагулянтные свойства ФЛА2 зависят от наличия основных остатков в так называемом антикоагулянтном сайте молекулы фермента между 54 и 77 а.о. (рис. 8). ФЛА2 CM-IV (*Naja nigricollis*) с сильными антикоагулянтными свойствами содержит основные остатки в антикоагулянтном сайте, и ингибирует активность протромбиназного комплекса через связывание с фактором Ха. ФЛА2 CM-I и CM-II (*Naja nigricollis*) со слабыми антикоагулянтными свойствами имеют

нейтральные или отрицательно-заряженные остатки в антикоагулянтном регионе, и не могут связываться с факторами коагуляционного каскада. Подобная модель предполагает белок-белковые, а не белок-липидные взаимодействия [100]. Таким образом, СМ-IV, используя ферментативные и неферментативные механизмы, ингибирует как комплекс внешней теназы, так и протромбиназный комплекс, в то время как СМ-I и СМ-II только комплекс внешней теназы и в основном ферментативным способом [134].

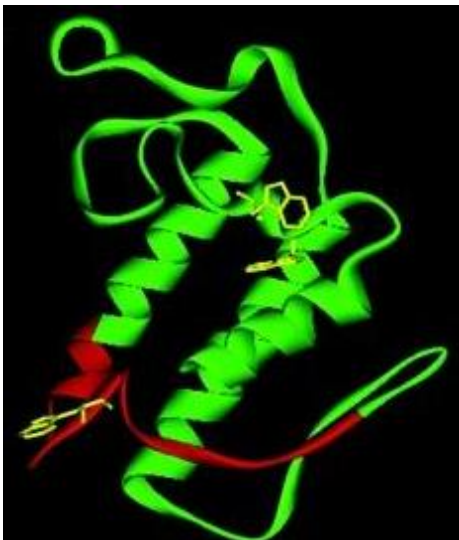


Рисунок 8. Смоделированный антикоагулянтный сайт (красным цветом), располагающийся на поверхности, легкодоступен для взаимодействия [134].

Однако ФЛА2 могут также ингибировать коагуляцию путем гидролиза или связывания ФЛ и тем самым ингибировать формирование коагулянтного комплекса, которое зависит от наличия интактных ФЛ на мембранной поверхности [100, 101].

На основании исследования многообразных патофизиологических эффектов ФЛА2 был предложен механизм их действия, согласно которому, ФЛА2 взаимодействует с белковыми компонентами клеточной мембраны. Подобное некаталитическое взаимодействие с мембранными белками может регулироваться

фармакологически активными участками, далекими от каталитического сайта [7]. Использование ФЛА2 из ядов змей помогло идентифицировать на поверхности клеток млекопитающих два типа ФЛА2 рецепторов, которые также связывали секретлируемые ФЛА2 млекопитающих [128, 135, 136].

Первый тип рецепторов, изначально обнаруженный в мозге, так называемый N (neuronal) тип ФЛА2 рецепторов, проявляет высокую аффинность к большому количеству токсических ФЛА2, например, OS₂, высоко нейротоксичной ФЛА2 из яда тайпана, пчелиной ФЛА2 и нейротоксичной СМ-III из *Naja mossambica mossambica*.

Второй тип рецепторов, изначально идентифицированных в скелетной мышце кролика, относится к М (muscle) типу ФЛА2 рецепторов и с высокой аффинностью связывает OS₂ и OS₁ (OS₁ - нетоксичная ФЛА2 тайпана). Рецептор М типа не способен связываться с СМ-III и пчелиной ФЛА2. Этот рецептор хорошо связывается как с ФЛА2 I группы, так и с ФЛА2 из II группы.

Известно, что эти два типа рецепторов имеют различную субъединичную структуру и располагаются не только исключительно в мозге и мышцах. Предполагается, что эти рецепторы в норме служат мишенями для эндогенных секретлируемых ФЛА2, которые могут работать как гормоны или ростовые факторы [128, 137].

Есть данные о применении змеиных ФЛА2 и синтетических пептидов, сделанных на основе некоторых фосфолипаз, как антираковых и антиангиогенезных агентов. Например, нигексин из *Naja nigricollis* проявляет цитотоксичность в отношении клеток нескольких опухолей, таких как нейробластома, эпителиальный рак и лейкемия. Представляет интерес VRCTC-310–Onco – фармацевтический продукт, в состав которого входят кротоксин и кардиотоксин в эквимольном соотношении. Кротоксин В – основной компонент (14 кДа) нейротоксической фосфолипазы, вдобавок к своей ферментативной

активности, способен связываться и активировать клеточные рецепторы. Пока еще невыясненным способом, он влияет на EGF-рецепторы. Инъекция этого комплексного продукта вызывает увеличение концентрации фактора некроза опухоли [4].

2.5.4 Нейритогенные свойства ФЛА2

Как отмечалось выше, ФЛА2 проявляют целый спектр биологических активностей, и этот спектр постоянно расширяется. Так, недавно было обнаружено, что ФЛА2 бактерий, грибов и пчелиного яда индуцируют рост нейритов у клеток феохромоцитомы крысы линии PC12 [138]. Клеточная линия PC12 представляет собой трансформированные клетки опухоли мозгового слоя надпочечников крысы и является удобной моделью для исследования механизмов, приводящих к нейрональной дифференцировке. Рост нейритов может рассматриваться как показатель клеточной дифференцировки [139].

Существует целый ряд соединений, вызывающих дифференцировку нервных клеток. Наиболее известны факторы семейства нейротрофинов (NGF, BDNF, NT3 и др.) [140], однако, помимо этих белков целый ряд соединений, в частности, некоторые нейромедиаторы [141], могут инициировать этот важный процесс. В работе Nakashima et. al., [139] на основании исследования супернатантов клеточных культур, экспрессирующих различные типы ФЛА2, был сделан вывод, что ФЛА2 млекопитающих, принадлежащие подгруппам V и X, а также ФЛА2 пчелиного яда группа III, вызывают рост нейритов у клеток PC12.

Было высказано предположение, что способность ФЛА2 вызывать рост нейритов коррелирует с энзиматической активностью белка [139, 142]. Было также установлено [115, 142], что рост нейритов PC12 индуцируется лизофосфатидилхолином (ЛФХ), образующимся при расщеплении фосфолипидов мембраны клетки под действием ФЛА2, и различная способность ФЛА2 разных

типов стимулировать рост нейритов находится в прямой зависимости с их способностью высвобождать ЛФХ из клеточной мембраны. Была также исследована роль в нейритогенезе другого продукта гидролиза фосфолипидов - АК, однако её непосредственное добавление к клеткам не провоцировало рост нейритов [115, 138]. Нейритогенез, вызываемый грибной, пчелиной, микробной ФЛА2, а также фосфолипазами млекопитающих V и X групп и экзогенным ЛФХ, останавливался блокаторами Ca^{2+} каналов L типа и был кальций-зависимым [115]. Нейритогенный ответ на действие ФЛА2 вероятно происходит через связывание ЛФХ с G2A рецептором. G2A - G-белковый рецептор, который под действием липолипидного лиганда запускает каскад внутриклеточных реакций, вовлечен в активацию фосфолипазы C и протеинкиназы C, увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо), активацию и ингибирование MAP-киназ [143].

Описанный механизм нейритогенеза отличается от уже известного действия фактора роста нервов (ФРН), стимулирующего рост нейритов посредством взаимодействия со специфическими рецепторами нервных клеток [140]. Более того, ФЛА2 усиливает действие фактора роста нервов и, вероятно, может принимать участие в процессе дифференцировки клеток PC12 [142]. Следует отметить, что ФЛА2 могут вызывать дифференцировку не только нервных клеток. Так, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что ФЛА2 усиливает дифференцировку клеток HL60 в макрофаги под действием диацилглицерина или фоболового эфира [144] и стимулирует созревание дендритных клеток [145].

2.6 Фактор роста нервов

Яды змей, из разных семейств, содержат нейротрофические факторы - полипептиды, способные поддерживать развитие, выживаемость,

нейропластичность и регенерацию нейронов, [146, 147]. Их называют факторами роста нервов (ФРН).

Биологические свойства змеиного фактора роста нервов разнообразны и до конца не изучены. У змеиного ФРН отсутствует энзиматическая активность, его действие обусловлено связыванием со специфическими рецепторами. Для ФРН известно два структурно различных рецептора. Низкоафинный рецептор p75ngfr с константой диссоциации (kd) 1 нМ служит рецептором для всех известных нейротрофинов. Второй рецептор – p140trka - высокоафинный с kd 0,01 нМ, относится к семейству тирозин-киназных рецепторов [148].

Под действием ФРН изменяется морфология нейронов: увеличивается число и длина отростков и усиливается аксональное ветвление. На молекулярном уровне происходят изменения в фосфолипидном метаболизме, токе ионов через плазматическую мембрану и ферментативной активности, повышается синтез белков, вовлечённых в формирование нервных отростков (тубулина, белков нейрофиламента), усиливается синтез и высвобождение нейротрансмитеров.

Всеми этими свойствами обладает ФРН из яда змей, в том числе и кобр [147]. ФРН змей семейства *Elapidae* обнаруживает гомологию с мышинным или человеческим ФРН (число идентичных остатков 65%). ФРН змей семейства *Viperidae* гликозилирован по остатку Asn-21, что типично для ФРН млекопитающих. ФРН кобры обладает более высокой биологической активностью, чем ФРН гадюки и демонстрирует более пролонгированное действие по сравнению с мышиным ФРН. Нейритогенную активность ФРН изучали на клетках РС12 гиперэкспрессирующих рекомбинантный человеческий trkA рецептор. По дифференцирующей активности ФРН располагаются в следующем порядке: рекомбинантный человеческий > мышинный > ФРН кобры > ФРН гадюки [149].

ФРН из яда *Naja kaouthia* вызывает дифференцировку клеток феохромоцитомы крысы PC12 из популяции делящихся хромаффиноподобных клеток в дифференцированные, обладающие свойствами симпатических нейронов. Кроме того, он предотвращает гибель этих клеток в бессывороточной среде в концентрациях, сопоставимых с таковыми 7S-ФРН мыши [150]. Стимуляция тирозин-киназных рецепторов в PC12 ведет к аутофосфолированию и запускает фосфорилирование ряда различных белков (например, тирозин гидроксилазы), что приводит к активации фосфолипазы C, протеинкиназы C, сАМФ-зависимой протеинкиназы фосфатидил инозитол-3-киназы [151, 152].

Змеиные ФРН являются важными фармакологическими инструментами для исследования trkA рецепторов и разработки новых нейротрофических препаратов.

ФРН из яда китайской кобры *N. atra* активно участвует в процессе ранозаживления, особенно при наличии повреждений периферических нервов и оказывает терапевтический эффект при диабетическом неврите [153].

ФРН яда китайской кобры также влияет на репродуктивную систему крыс-самцов, повышая эпидидимальную подвижность сперматозоидов, в результате чего увеличивается частота беременностей самок и количество приплода. Было показано, что ФРН кобры ускоряет созревание половых клеток в тестикулах, это его свойство может оказаться полезным для мужчин, страдающих от бесплодия [153].

2.7 Белки змеиных ядов с антипролиферативными свойствами

Благодаря своим антипролиферативным свойствам, компоненты змеиных ядов находят свое применение в медицине, в частности, в создании противоопухолевых препаратов. Более выраженное цитотоксическое и

цитостатическое влияние этих компонентов на раковые клетки по сравнению с нормальными, предполагает возможность их применения в клинических исследованиях. Эти белки относятся к разным классам и представляют собой металлопротеиназы, дезинтегрины, оксидазы L-аминокислот, сериновые протеазы, лектины С-типа, фосфолипазы А2, трехпетельные токсины.

Цитотоксины

Цитотоксины проявляют свою биологическую активность на различных типах клеток. Механизмы действия цитотоксинов до конца не раскрыты (см. выше, разделы 3.1 и 3.2), но их цитолитическая селективность по отношению к раковым клеткам, делает их ценными инструментами в исследованиях онкогенеза. Известно, что раковые клетки имеют большую склонность к поглощению экзогенных лигандов. Это частично объясняет избирательную токсичность цитотоксинов относительно опухолевых клеток. Предполагается, что цитотоксины связываются с белковыми мишенями на клеточной поверхности перед тем как поглотиться клеткой и, воздействуя на лизосомы и митохондрии, запускают ее разрушение по типу апоптоза или некроза [49, 154].

В качестве примера можно привести антиканцерогенное действие кардиотоксина III из яда *Naja naja atra*, индуцирующего апоптоз у клеток миелоцитарного лейкоза (K562), человеческой лейкемии (HL60), клеток рака молочной железы (MDA-MB-231 и MCF-7), клеток аденокарциномы (A549) [155-158].

Фосфолипазы А2

Помимо мио- и нейротоксичности, некоторые ФЛА2 проявляют противоопухолевую активность и могут послужить новым классом антираковых препаратов. При исследовании антипролиферативных свойств фосфолипаз используют как нативные ферменты, так и модифицированные, как синтетические пептиды на основе ФЛА2, так и конъюгаты фосфолипазы с кардиотоксином [4].

Механизмы действия ФЛА2 разнообразны и некоторые авторы предполагают, что антиканцерогенный эффект зависит не только от их ферментативной активности [159-161].

ФЛА2, действуя как индукторы апоптоза, проявляют антипролиферативные свойства на таких опухолях как асцитная опухоль Эрлиха, лейкемия (Jurkat) аденокарцинома молочной железы [162]. Помимо антиканцерогенного эффекта, различные ФЛА2 из ядов змей проявляют антиангиогенные свойства, ингибируя клеточную адгезию и миграцию *in vitro* и *in vivo* [163].

Некоторые ФЛА2 проявляют антиинтегриновую активность. Так, например, ФЛА2 из яда гадюки *Macrovipera lebetina* ингибирует клеточную адгезию и миграцию человеческих микроваскулярных эндотелиальных клеток (НМЕС-1), и вызывает нарушения в актиновом цитоскелете и распределении $\alpha\beta3$ интегринов [164]. ФЛА2 из яда гадюки *Daboia russelii siamensis* проявляет непрямую гемолитическую антикоагулянтную и цитотоксическую активности. ФЛА2 ингибирует миграцию и снижает выживаемость клеток меланомы (SK-MEL-28), а также проявляет антиметастазный эффект *in vivo*, уменьшая колонизацию меланомных клеток (B16F10) в легких мышей (BALB/c) [165].

Кротоксин – цитотоксическая фосфолипаза из яда южноамериканской гремучей змеи *Crotalus durissus terrificus*, проявляет цитотоксическую активность против мышинных и человеческих раковых клеточных линий *in vitro*. Эта ФЛА2 особенно селективна к клеточным линиям, экспрессирующим рецептор эпидермального ростового фактора [158]. Кротоксин продемонстрировал высокую антираковую эффективность в экспериментах *in vivo* на карциноме легкого Люиса и раке молочной железы. Обнадёживающие результаты, показывающие эффективность кротоксина, получены после первой фазы клинических испытаний у больных с солидными опухолями (обследовались пациенты с разными видами опухоли: рак груди, рак желудочно–кишечного тракта, мелкоклеточная карцинома легкого, рак простаты и т.д.), трудно

поддающимися общепринятому лечению [166]. Успешно проходит клинические испытания на людях препарат VRCTC-310, состоящий из двух компонентов змеиного яда: кротоксина и кардиотоксина. В некоторых случаях отмечалась регрессия опухоли [167].

Металлопротеиназы

Металлопротеиназы из ядов змей обладают свойством откреплять клетку от окружающего субстрата или экстрацеллюлярного матрикса. Потеря контактов с микроокружением приводит клетку к апоптозу. Ингибирование способности раковой клетки к адгезии, позволяет рассматривать металлопротеиназы в качестве антиметастазных и антипролиферативных средств. Показана их способность вызывать апоптоз у миеломных клеток не путем деградации экстрацеллюлярного матрикса и ингибирования адгезии, а через взаимодействие с интегринами [168]. Механизмы действия металлопротеиназ на клеточном уровне, разнообразны и до конца не исследованы, а их свойства зависят как от структуры фермента, так и от типа клеток-мишеней. Так, хорошо исследованная металлопротеиназа - джарарагин останавливает пролиферацию меланомных клеток и ингибирует легочное метастазирование, но стимулирует миграцию эпителиальных клеток и нейритогенез у клеток нейробластомы (см. выше, раздел 3.4.4).

Оксидазы L-аминокислот

Оксидаза L-аминокислот содержится в ядах нескольких видов змей и представляют собой гомодимерный гликопротеин, катализирующий окислительное дезаминирование L-аминокислот. Для оксидаз характерны цитотоксичность, гемолиз, индукция апоптоза, активация или ингибирование агрегации тромбоцитов, геморрагия [169].

Индукция апоптоза под действием оксидаз, наблюдалась у целого ряда клеток, таких как, человеческие эмбриональные клетки (293T) [170], человеческие клетки промиелоцитарного лейкоза (HL-60) [171], человеческие моноциты (MM6)

[172], крысинные клетки лимфоцитарного лейкоза (L1210) человеческие Т-клетки лейкоза [173]. Цитотоксичность и снижение уровня клеточной пролиферации под действием оксидаз L-аминокислот наблюдалась при раке желудка, мышинной меланоме, фибросаркоме, колотеральном раке и линии клеток яичников китайского хомячка (СНО) [174].

Механизм действия оксидаз неоднозначен и вызывает полемику у исследователей. Один из механизмов запуска апоптоза оксидазами связывают с появлением пероксида водорода в результате окислительных реакций при взаимодействии фермента с клеточной поверхностью [173]. При использовании каталазы, утилизирующей пероксид водорода, было обнаружено, что оксидаза теряет большую часть своей активности, но все же проявляет существенную цитотоксичность, что подтверждает существование других механизмов действия оксидазы [175]. Есть также предположение, что вероятно фермент препятствует адгезии раковых клеток и формированию метастазов.

Лектины

Поливалентные гликопротеины, связывающие остатки углеводов, известны своим влиянием на рост раковых клеток. Лектин ВJcuL выделенный из яда змеи *Bothrops jararacussu*, ингибировал клеточный рост нескольких раковых линий [176]. Лектин С-типа из яда гадюки *Macrovipera lebetina*, предотвращает интегрин-опосредованное прикрепление клеток разных раковых линий (меланома, аденокарцинома) к различным субстратам и проявляет значительную антипролиферативную активность, ингибируя адгезию, миграцию и инвазию опухолевых клеток [177].

ВIL - лектин из яда *Bothrops leucurus*, проявляет цитотоксическую активность на нескольких линиях опухолевых клеток и вызывает апоптоз у клеток миелоцитарного лейкоза (K562) [178].

Дезинтегрины

Дезинтегрины – семейство нетоксичных и неферментативных пептидов с низкой молекулярной массой (5-10 кДа), содержащих RGD последовательность. Пептиды содержатся в змеином яде и характеризуются своей способностью взаимодействовать с интегринами $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, и $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ 11s, которые экспрессируются большим набором различных клеток, среди которых имеются пролиферирующие и раковые.

Наряду с использованием дезинтегринов для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, их также можно рассматривать в качестве потенциальных убийц раковых клеток [72]. Была выявлена способность дезинтегринов ингибировать агрегацию тромбоцитов и подавлять опухолевый ангиогенез через взаимодействие с $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ интегринами [4, 179].

Сериновые протеазы

Сериновые протеазы проявляют ряд биологических функций и вовлечены в такие процессы как переваривание пищи, активация системы комплемента, клеточная дифференцировка, гемостаз и др. Эти ферменты действуют на нескольких этапах процесса свертывания крови, инактивируют факторы свертывания крови, вовлечены в процессы тромбообразования и фибринолиза [4].

Есть данные о противоопухолевых свойствах протеаз. Кроталаза из яда гремучей змеи *Crotalus adamanteus in vivo* ингибировала рост меланомных клеток (B16) после инъекции их в C57BL/6 мышей [180]. Поскольку фибрин способен маскировать опухоль от клеток иммунной системы, вероятно, ключевую роль в канцеростатическом и антиметастазном эффекте играет способность сериновых протеаз вызывать деградацию фибриногена [181].

2.8 Заключение

Яды змей представляют собой многокомпонентную белковую смесь. Компоненты змеиных ядов обладают специфическими и уникальными свойствами. Благодаря биоразнообразию этих свойств, белки змеиных ядов проявляют целый ряд активностей, таких как антираковая, цитолитическая, тромболитическая, антимикробная, антивирусная, антипаразитарная, антигрибковая.

Способность белков змеиных ядов к проявлению избирательной токсичности, наряду с высокой специфичностью и аффинностью к клеткам и тканям делает их пригодными для практического применения в роли фармацевтических агентов. Многие компоненты змеиных ядов проявляют различные полезные фармакологические свойства и могут быть использованы в лечении разных заболеваний таких как рак, гемофилия, сердечнососудистые, аутоиммунные и нейродегенеративные заболевания.

Наряду с традиционными исследованиями применения ядов и их компонентов в медицине развиваются новые методы, основанные на нанотехнологиях. Наночастицы, загруженные лекарственными веществами (антираковыми агентами), могут успешно осуществлять их доставку в раковые клетки, обеспечивая высокую концентрацию лекарств в опухолевой ткани, что повышает эффективность антираковой терапии. Наночастицы с инкапсулированным лекарством поглощаются клеткой эндоцитозом и/или фагоцитозом. Недавно была показана возможность сочетанного действия змеиных ядов с наночастицами. Так, яд кобры *Walteriannessia aegyptia* в комбинации с наночастицами останавливает пролиферацию, индуцируя апоптоз у клеток рака молочной железы, (MDA-MB-231 и MCF-7), клеток рака предстательной железы (PCa), и клеток множественной миеломы (MM). Антиканцерогенные свойства наночастиц, конъюгированных с ядом, были обнаружены и *in vivo* на мышинных моделях опухолей молочной железы и простаты [182, 183].

В обзоре были рассмотрены важнейшие представители белков змеиных ядов: трехпетельные токсины, фосфолипазы A2 и металлопротеиназы. Существует много различных способов их применения в прикладной медицине и фундаментальных исследованиях. С помощью α -нейротоксинов стало возможно исследовать различного рода рецепторы, лиганд-рецепторные взаимодействия и механизмы холинэргической передачи. Имеются указания на возможность их применения при нейродегенеративных расстройствах и болезнях, связанных с нарушениями в нервно-мышечной передаче. Цитотоксины, благодаря своим антираковым свойствам, перспективны в онкологии. Свойства фосфолипаз A2 могут оказаться полезными при создании препаратов, влияющих на процессы воспаления и аутоиммунные заболевания. Участие металлопротеиназ можно рассматривать при заболеваниях, связанных с нарушением гемостаза и нейродегенеративных расстройствах. Существует большое число неосвоенных фармакологических возможностей компонентов змеиных ядов, которые могут привести к разработке новых эффективных лекарственных препаратов.

3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались реактивы следующих фирм: ацетонитрил (Криохром, Россия), водный раствор аммиака, уксусная кислота и гидроксикарбонат аммония (Химмед, Россия), натрия ацетат, KCl, NaHCO₃ (Реахим, Россия), трифторуксусная кислота, 4-винилпиридин, гуанидин гидрохлорид, NaCl (Merck, Германия), Tris-HCl, PEG-6000 (Ferak, Германия), дитиотреитол, трипсин, пепсин, 2,5-дигидроксибензойная кислота (Sigma, США), этанол, 1-пальмитоил-2-(10-пиренилдеcanoил)-sn-глицеро-3-фосфорилхолин (Molecular Probes, Нидерланды), CaCl₂ (Acros, США), краситель трипановый синий (Eugene, США), культуральные среды DMEM RPMI-1610 (Sigma-Aldrich, США; ПанЭко, Россия), раствор Версена (ПанЭко, Россия), эмбриональные сыворотки крови крупного рогатого скота (РАА Laboratories, Австрия; HyClone, США), глутамин (ПанЭко, Россия), гентамицин (КРКА, Словения), амфотерицин В (ПанЭко, Россия), диметилсульфоксид (ПанЭко, Россия), 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ) (ПанЭко, Россия).

3.1 Выделение белков

Для получения яда, змей держали в неволе при 25 – 26°C и кормили крысами и мышами. Змей доили ручным массажем желез, полученный яд высушивали над хлоридом кальция и хранили при –20 С.

Цитотоксины

Цитотоксины CX1, CX2 и CX3 были выделены из яда Тайландской кобры *Naja kaouthia* по методике, описанной в статье [184]. Яд (200-300мг) фракционировали на колонке (2,5 x 90 см) с Сефадексом G-50sf (Pharmacia) в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере, рН 6,2, при скорости потока 10 мл/ч. Фракцию III лиофилизировали и затем разделяли на колонке НЕМА ВЮ 1000 СМ (8 x 250 мм,

Tessek) в линейном градиенте концентрации аммоний-ацетатного буфера, pH 7,5 (от 5 mM до 1 M за 100 мин.) при скорости потока 1,4 мл/мин. или на колонке TSK ODS-120T (7,8 x 300 мм, LKB) в градиенте концентрации ацетонитрила в воде (от 2 до 22% за 20 мин.) в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 1 мл/мин. Полученные в результате хроматографии фракции были лиофилизированы, затем растворены в воде в концентрации 10^{-4} - 10^{-5} M и проанализированы с помощью MALDI масс-спектрометрии.

Димерные токсины выделяли путем гель-фильтрации высушенного яда на колонке (4,5 x 150 см) с Сефадексом G-50sf (Amersham Biosciences) в 0,1 M аммоний-ацетатном буфере, содержащем 0,01% азид натрия pH 6,2. Полученную в результате гель-фильтрации, фракцию II разделяли на катионообменной колонке НЕМА ВЮ СМ (10 x 250 мм, Tessek), используя градиент концентраций аммоний-ацетатного буфера (pH 7,5). Очистку соединений проводили с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ на колонке Phenomenex C18 (4,6 x 250 мм) или на колонке Vydac C18 (10 x 250 мм), используя градиент ацетонитрила (от 15 до 45% за 30 мин.) в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты, при скорости потока 1мл/мин.

Оксиагин

Оксиагин выделяли как описано в [185]. Яд *Naja oxiana* фракционировали на DEAE-Sepharose CL-6B и на CM-Sepharose CL-6B колонках как описано в статье [186]. Фракцию очищали с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac C18 (4,6 x 250 мм), используя градиент ацетонитрила в воде (от 15 до 55% за 40 мин) в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты. Фракцию V, соответствующую оксиагину, использовали для дальнейших исследований.

Выделение фосфолипаз

ФГД-1 и ФГД-2

Выделение фосфолипаз A2 из яда гадюки *V.nikolskii* проводили по методике, описанной в статье [187]. Яд разделяли на колонке НЕМА ВЮ 1000 СМ (8 × 250 мм, Tessek) в градиенте концентраций аммоний-ацетатного буфера от 5 мМ до 1 М (рН 7,5) за 100 мин при скорости потока 1 мл/мин. Очистку белков из фракций 4 и 5 проводили методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac C18 (10 × 250 мм) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила 30 - 40%, в присутствии 0.1% трифторуксусной кислоты, при скорости потока 2 мл/мин.

Для выделения ФЛА2 из яда кобры *N. kaouthia* 1 г высушенного яда фракционировали методом гель-фильтрации на колонке (150 х 4,5см) с Сефадексом G-50 sf в 0,1 М аммонийно-ацетатном буфере (рН 6,2); объем собираемых фракций был равен 9 мл. Основную токсическую фракцию, полученную в результате гель-фильтрации, разделяли на катионообменной колонке НЕМА ВЮ 1000 СМ (Tessek), используя градиент аммоний – ацетатного буфера (рН 7,5) от 5 мМ до 1 М за 100 мин при скорости потока 1,4 мл/мин. Очищенную фосфолипазу A2 получали в результате обращённо-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac C18 (4,6 х 250 мм), используя градиент ацетонитрила в воде (от 15 до 45% за 30 мин) в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 1 мл/мин.

Ti-Nh

Высушенный яд кобры *Naja haje* (800 мг) растворяли в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (рН 6,2), содержащем 0,01% азида натрия яда (1 мл). Раствор фракционировали на колонке с Сефадексом G-50sf (4,5 × 150 см) (GE Healthcare), при скорости потока 60 мл/ч. Полученные в результате гель-фильтрации фракции I–VIII лиофилизировали, а перед тестированием их аликвоты обессаливали и концентрировали на концентраторе Vivaspin-2 (Sartorius). Фракцию V разделяли на колонке НЕМА ВЮ 1000 СМ (8 х 250 мм, Tessek) в градиенте концентраций аммоний-ацетатного буфера от 5 до 600 мМ (рН 7,5) за 60 мин при скорости

потока 1,4 мл/мин. В дальнейшем, фракция V-5 была очищена на колонке Phenomenex C18 (4,6 x 250 мм) в градиенте ацетонитрила от 15% до 45% за 30 мин, в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты, при скорости потока 1мл/мин. Основной пик соответствовал фосфолипазе TI-Nh. Аналитическая ВЭЖХ очищенной TI-Nh была проведена на колонке Vydac C18 (1,6 x 125 мм, 5мкм) в градиенте концентраций ацетонитрила (от 15% до 45% за 30 мин.) в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты, при скорости потока 0,2 мл/мин. Гель фильтрацию осуществляли при двух различных pH (6,5 и 7,5) на колонке Superdex 75 HR 10/30 FPLC (Pharmacia Biotech) уравновешенной 50 mM Трис-НСl буфером, содержащим 0,1 M NaCl, при скорости потока 0,5 мл/мин.

Vur-PL2A u Vur-PL2B

Разделение яда *Vipera ursinii renardi* проводили по методике, описанной выше для фосфолипазы TI-Nh, за исключением изменения времени (за 120 мин) и скорости потока (1 мл/мин) при разделении на колонке НЕМА ВЮ 1000 СМ (8 x 250 мм, Tessek). Для катионообменной рехроматографии фосфолипаз А2, была использована маленькая колонка НЕМА ВЮ 1000 СМ (3 x 30 мм, Tessek). Элюция белков проводилась в градиенте концентраций аммоний-ацетатного буфера (pH 7,5) (от 5 до 600 mM за 120 мин.) при скорости потока 0,4 мл/мин.

Битанарин

Битанарин из яда *Bitis arietans* выделяли как описано в [188]. Цельный яд *B. arietans* (600 мг) растворяли в 0,1 M аммоний-ацетатном буфере (pH 6,2), содержащем 0,01% азида натрия яда (2 мл). Раствор фракционировали на колонке с Сефадексом G-50sf (4,5 × 150 см) (GE Healthcare), при скорости потока 60 мл/ч. Оптическую плотность собранных фракций измеряли на спектрофотометре при длине волны 280 нм. Собранные фракции анализировались на способность подавлять холинергическую передачу в нейронах *L. stagnalis*. Фракция II, обладавшая такой способностью, разделялась на колонке НЕМА ВЮ 1000 СМ (8 × 250 мм, Tessek) при элюции 5 mM Трис-НСl буфером (pH 7,5) в градиенте

концентрации NaCl от 0 до 150 мМ за 60 мин, затем от 150 до 300 мМ за 5 мин, и в конце от 300 до 650 мМ за 35 мин при скорости потока 1мл/мин. Полученные фракции тестировались на блокирующую активность и самые активные очищались на колонке Phenomenex C18 (4,6 x 250 мм) в градиенте концентраций ацетонитрила (от 15% до 60% за 45 мин) в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты, при скорости потока 1мл/мин.

3.2 Идентификация выделенных белков

N-концевые аминокислотные последовательности пиридилэтилированных белков и продуктов их ферментативного гидролиза определяли путем деградации по методу Эдмана с использованием автоматического секвенатора 473A («Applied Biosystems», США). Молекулярные массы выделенных соединений, их производных и пептидных фрагментов определяли на времяпролетных MALDI масс-спектрометрах Vision 2000 («Thermo BioAnalysis Corp», США) и BRUKER REFLEX III («Bruker», Германия) в режиме отражения, используя 2,5-дигидроксibenзойную кислоту в качестве матрицы.

3.3 Определение фосфолипазной активности

Ферментативную активность препаратов определяли, как описано в работе [189] с использованием 1-пальмитоил-2-(10-пиренилдеcanoил) *sn*-глицеро-3-фосфохолина («Molecular Probes», Голландия) в качестве субстрата.

3.4 Масс-спектрометрическое определение липидов клеточной мембраны

Клетки рассеивали в шестилуночный планшет с плотностью 3×10^5 клеток на лунку и культивировали 24 ч в присутствии различных концентраций фосфолипаз ФГД-1 и ФГД-2. В качестве контроля использовалась культивация без ФЛА2. Клетки снимали с планшета раствором Версена, осаждали центрифугированием, трижды промывали фосфатно-солевым буфером (5 мМ фосфат натрия, pH 7,2, 145

мМ NaCl), вновь осаждали и суспендировали в 100 мкл фосфатно-солевого буфера. Липиды экстрагировали смесью хлороформ: метанол (2 : 1) как описано в [190]. После удаления растворителя остаток растворяли в 20 мкл смеси хлороформ : метанол (2 : 1) и анализировали методом MALDI масс-спектрометрии как описано выше.

3.5 Культивирование клеточной культуры РС12

Клетки феохромоцитомы крысы РС12 культивировали при 37° С и 5% CO₂ в среде DMEM или RPMI 1640 («Sigma», США, «Пан Эко» Россия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone) и 2 мМ глутамина. Для исследования действия белков клетки рассевали в 96-луночный планшет («Corning», США) с плотностью 10–50х10³ клеток на лунку (60–70% монослоя). Клетки инкубировали в среде с 1% сывороткой 24 - 48ч, затем добавляли исследуемые белки в различной концентрации и продолжали инкубацию.

3.6 Определение цитотоксичности

Метод МТТ. После инкубации с исследуемыми веществами количество выживших клеток определяли с помощью окрашивания бромидом 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия (МТТ). МТТ добавляли в конечной концентрации 0,5 мг/мл и выдерживали 1–1,5 часа. Живые клетки восстанавливали желтый МТТ до темно-фиолетовых гранул формазана. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в ДМСО или изопропанолу и измеряли оптическую плотность (ОП) на планшетном спектрофотометре (Multiscan) при длине волны 540 нм. Выживаемость клеток в присутствии исследуемого препарата рассчитывали по формуле: $(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}) / (\text{ОП контр. лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%$, где ОП — оптическая плотность.

Метод окраски трипановым синим. Цитотоксичность также оценивали на автоматическом счетчике клеток Countess (Invitrogen). Прибор анализирует суспензии клеток, окрашенных раствором трипанового синего, который

полностью прокрашивает только мёртвые клетки. Суспензию клеток смешивали с раствором трипанового синего (0,4%), наносили аликвоту на камеру Горяева или на стекла для счетчика клеток и в течение 5 мин подсчитали количество клеток под микроскопом, либо на счетчике. Количество живых клеток нормировалось относительно количества в контрольных образцах (без добавок исследуемых компонентов), которое приравнивалось к 100%.

Статистическая обработка данных, а также построение графиков и гистрограмм проводились с помощью программ «Statistica 6.0» «Microsoft Excel» и «OriginPro7,5». Данные представлены в виде: среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента.

3.7 Определение роста нейритов

Клетки PC12 культивировали и инкубировали с белками, как описано для определения цитотоксичности. После инкубационного периода нейритогенез оценивали с помощью микроскопии, фиксируя на фотоснимках морфологические изменения клеток и подсчитывая число клеток с нейритами, длина которых превышала длину тела нейрона.

Для количественного определения нейритогенной активности рассчитывали процент дифференцированных клеток по отношению к общему количеству видимых клеток.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточная линия PC12 представляет собой нейроэндокринные клетки опухоли мозгового слоя надпочечников крысы и является удобной моделью для исследования механизмов нейрональной дифференцировки и действия нейротрофных факторов [191]. Подобно не нейрональным клеткам, клетки PC12 размножаются, но под действием ФРН они перестают делиться, начинается рост нейритов и клетки становятся похожими на симпатические нейроны. Они приобретают электрическую возбудимость, отвечают на ацетилхолин и даже образуют функциональные холинэргические синапсы [192].

Для исследования белков змеиных ядов были опробованы различные методики и условия. Как для постановки экспериментов, так и для культивирования клеток были подобраны оптимальный состав среды и концентрация сыворотки в среде. В поисках биологического эффекта варьировалось и подбиралось время инкубации каждого исследуемого белка с клетками.

Были протестированы несколько вариантов анализа цитотоксичности и антипролиферативных свойств исследуемых белков: витальное окрашивание красителем нейтральным красным, МТТ-тест, окрашивание красителем трипановым синим, оценка пролиферации по включению радиоактивно-меченого ³Н-тимидина и 5-этенил-2'-дезоксинуридина (EdU) в ДНК. В конечном итоге, для оценки жизнеспособности клеток были выбраны МТТ-тест и окрашивание трипановым синим. Были также сделаны попытки количественной оценки нейритогенеза, путем определения мРНК нейрофиламентов с помощью ПЦР с обратной транскрипцией и по детекции белков нейрофиламентов антителами, методом иммуноферментного анализа. Наиболее статистически достоверным

оказался метод определения нейритогенеза с помощью микроскопии, путем прямого подсчета клеток с нейритами.

Яды змей содержат большое количество белков различных структурных и функциональных классов, которые могут оказывать влияние на жизнедеятельность трансформированных клеток. В данной работе мы проверили действие белков, относящихся к классам металлопротеиназ, трехпетельных токсинов и фосфолипаз А2. Белки этих классов являются наиболее представленными в ядах змей.

4.1 Металлопротеиназа оксиагин

Белок оксиагин был выделен из яда среднеазиатской кобры *Naja oxiana* [185]. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей показал, что оксиагин представляет собой металлопротеиназу репролизин, относится к Р-III классу МП и обладает металлопротеиназным, дезинтегрин-подобным и цистеин-богатым доменами.

Изучение влияния оксиагина на клетки РС12 показало, что при концентрации репролизина 10^{-5} - 10^{-6} М наблюдается кластеризация клеток (рис. 9).

Похожий эффект на меланомных клетках наблюдался у белка джарарагина из яда змеи *Bothrops jararaca* [79], также происходило открепление монослойных клеток и формирование клеточных кластеров в суспензии. Кластеризация происходила также и на пластике, покрытом экстрацеллюлярным матриксом (ЕСМ) [79].

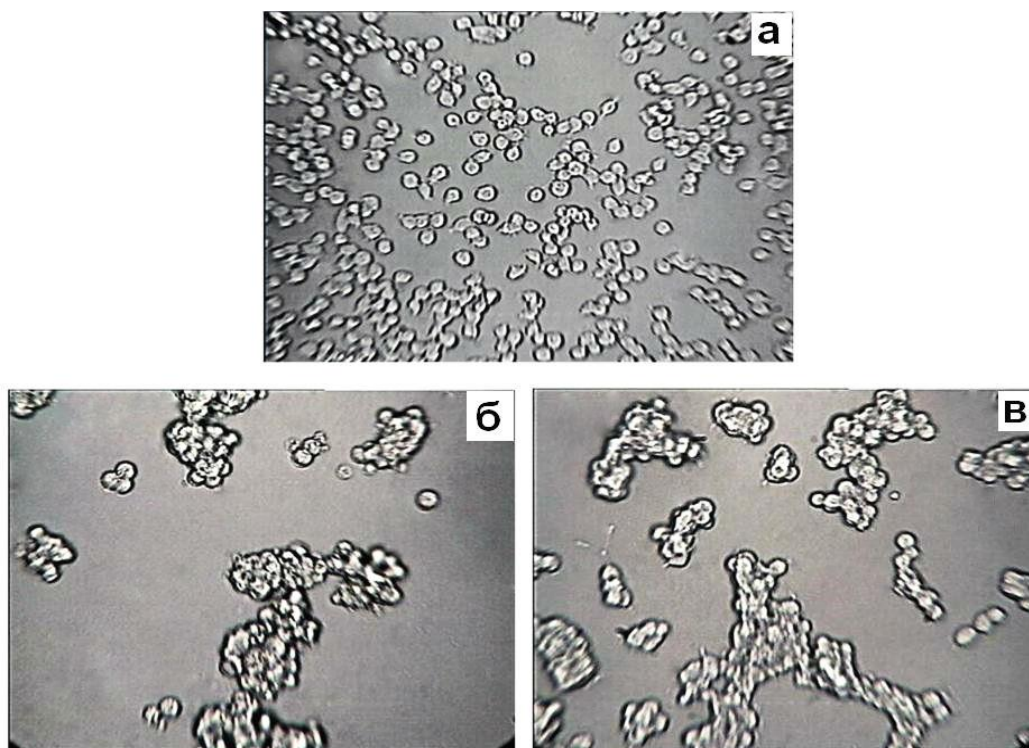


Рисунок 9. Влияние оксиафина на адгезию PC12, а - контроль, б – оксиафин в концентрации 1мкМ и в – оксиафин в концентрации 10мкМ (увеличение в 10 раз).

Можно предположить, что клетки открепляются от субстрата в результате либо металлопротеиназной, либо дезинтегриновой активности белка, либо в результате сочетания обеих.

Как и следовало ожидать, потеря адгезивной способности клеток влечет за собой остановку пролиферации и приводит к гибели клеток, что и было обнаружено в тесте на цитотоксичность (рис. 10).

Как известно, межклеточные взаимодействия, а также интегрин-опосредованное взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом несут огромную информацию для контроля морфогенеза, клеточных миграций, клеточной смерти, тканевой репарации и индуцируют множество различных внутриклеточных ответов.

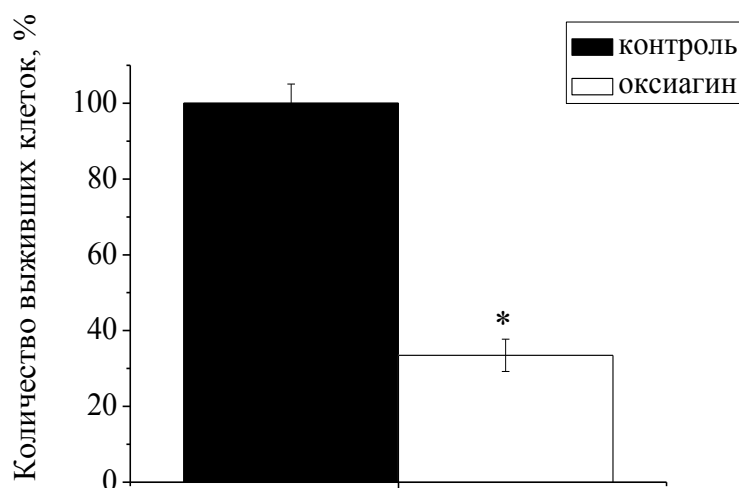


Рисунок 10. Определение цитотоксичности оксиагина (1 мкМ) на автоматическом счетчике клеток (окрашивание трипановым синим), инкубация 96 ч.

Металлопротеиназы расщепляют компоненты внеклеточного матрикса и гидролизуют различные факторы коагуляции в крови, срезают интегриновые рецепторы клеток и/или конкурентно блокируют их, тем самым открепляя клетку от матрикса. В норме открепившаяся клетка, потеряв субстрат, гибнет в результате апоптоза, что показано для многих субстрат-зависимых клеток [7, 77].

4.2 Новые трехпетельные токсины

Основной компонент яда аспидовых змей - ТПТ, состоящие из одной полипептидной цепи длиной 60 - 75 а.о. В яде кобр ТПТ представлены в основном α -нейротоксинами и цитотоксинами. α -Нейротоксины короткого типа (60–62 а.о., 4 дисульфидные связи) блокируют нАХР мышечного типа, а α -нейротоксины длинного типа (65-75 а.о., с дополнительной пятой дисульфидной связью в центральной петле) в дополнение к мышечным блокируют нейрональные нАХР. Цитотоксины (59-62 а.о., 4 дисульфидных мостика) оказывают цитолитическое действие на клетки. Цитотоксины способны олигомеризоваться на плазмалемме,

формируя поры, но в основном, ТПТ представлены в виде мономеров и ковалентно (ирдитоксин) и нековалентно связанных димеров (к-бунгаротоксин, хадитоксин).

4.2.1 Структурные особенности и свойства димерных трехпетельных токсинов

При исследовании минорных компонентов яда кобры *Naja kaouthia* были обнаружены необычные белки, представляющие собой ковалентно-связанные димеры трехпетельных токсинов. Так, был выделен гомодимер α -кобратороксина - α СТ- α СТ с молекулярной массой 15,640 кДа и гетеродимеры: α -кобратороксина с цитотоксинами I - α СТ-СХ1 (14,515 кДа), II - α СТ-СХ2 (14,556 кДа) и III - α СТ-СХ3 (14,528 кДа) (рис. 11).

Исследование биологической активности димеров по отношению к никотиновым холинорецепторам проводили методом радиолигандного анализа с использованием радиоактивно меченного α -бунгаротоксина в качестве лиганда, а также с помощью метода электрофизиологии с использованием ооцитов шпорцевой лягушки *Xenopus*, гетерологически экспрессирующих нейрональные нАХР $\alpha 7$ типа.

Анализ биологической активности показал, что, благодаря наличию α -кобратороксиновой части в молекулах димеров, они сохраняют способность конкурировать с α -бунгаротоксином за связывание с нАХР электрического органа ската *T. californica*, нейрональным $\alpha 7$ нАХР, экспрессированным в клетках GH4C1, а также с ацетилхолинсвязывающим белком (АХБ) из *L. stagnalis*.

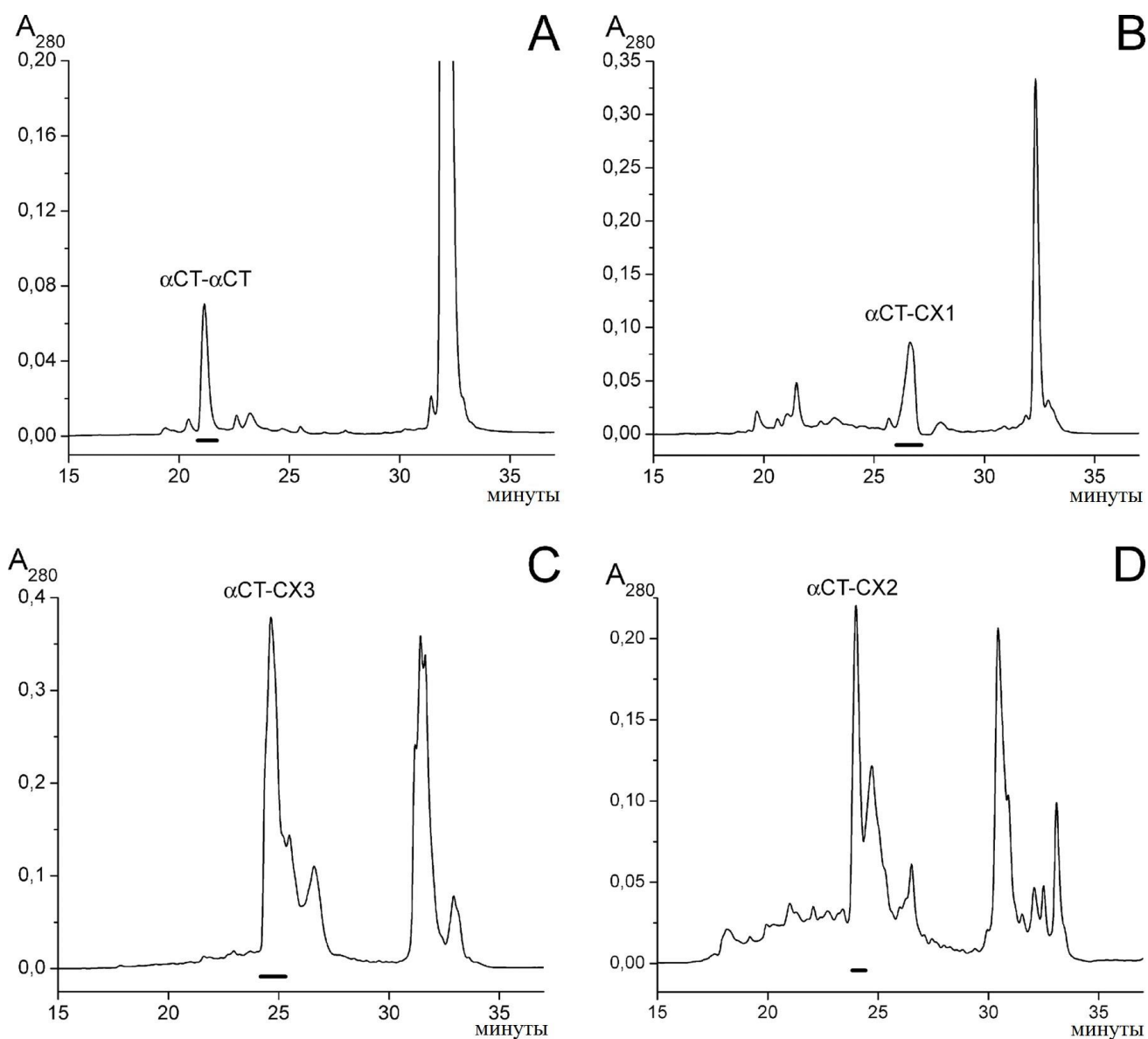


Рисунок 11. Конечная стадия очистки димерных токсинов с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac C18 в градиенте ацетонитрила в присутствии 0.1% трифторуксусной кислоты. Подчеркнутые пики соответствуют новым белкам [33].

Следует, однако, заметить, что эффективность связывания всех димеров была ниже, чем у αCT (рис. 12) [33]. Примечательно, что к $\alpha 7$ АХР гетеродимеры проявили несколько большую аффинность, чем гомодимеры

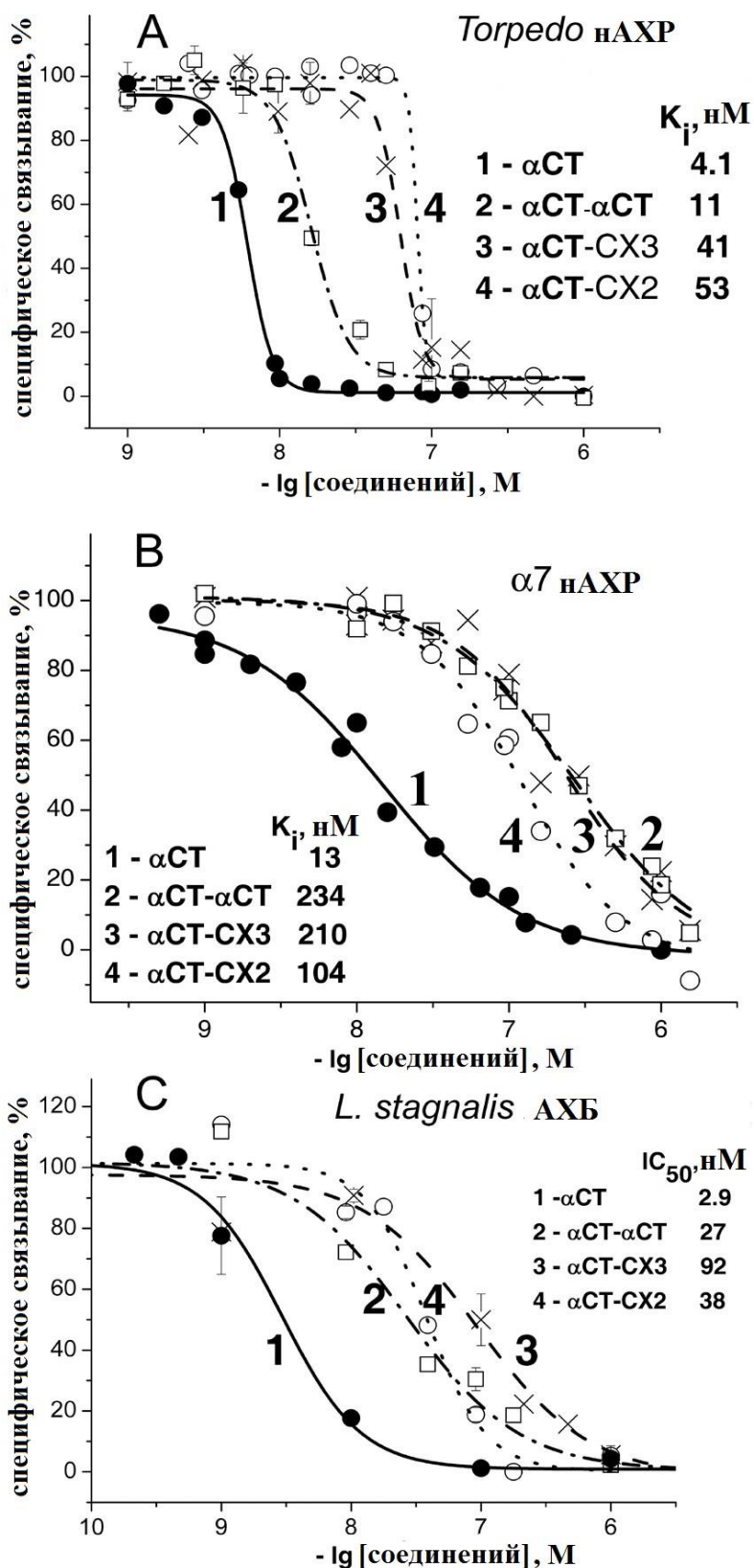


Рисунок 12. Ингибирование димерами α СТ- α СТ, α СТ-СХ2, и α СТ-СХ3 связывания $[^{125}\text{I}]$ α -бунгаротоксина с nAChR электрического ската *T. californica* (A), $\alpha 7$ nAChR в клетках GH4C1 (B), и с АХБ *L. stagnalis* (C) [33].

Следует отметить ключевую роль центральной петли α -нейротоксинов в связывании с АХР и с нейрональными рецепторами в частности: в димерах функционально значимый дисульфид 26-30 во второй петле α -СТ сохранен и оба типа димера (как гомо-, так и гетеродимеры) сохраняют способность конкурировать с α -бунгаротоксином за связывание с нАХР. Восстановление одного дисульфида в α СТ- α СТ не уменьшает его способность ингибировать $\alpha 7$ АХР, но при восстановлении дисульфида в обоих протомерах, ингибирование $\alpha 7$ АХР пропадает, зато неожиданно возрастает сродство к $\alpha 3\beta 2$ нАХР, причем оно выше чем у природного α СТ- α СТ [32].

В гетеродимере α СТ-СХ3, цитотоксин не содержит дополнительного дисульфидного моста во второй петле. Однако, присутствие этого моста в α СТ протомере достаточно для ингибирования $\alpha 7$ АХР (рис. 13) по крайней мере, так же эффективно, как и в случае гомодимера α СТ- α СТ [32].

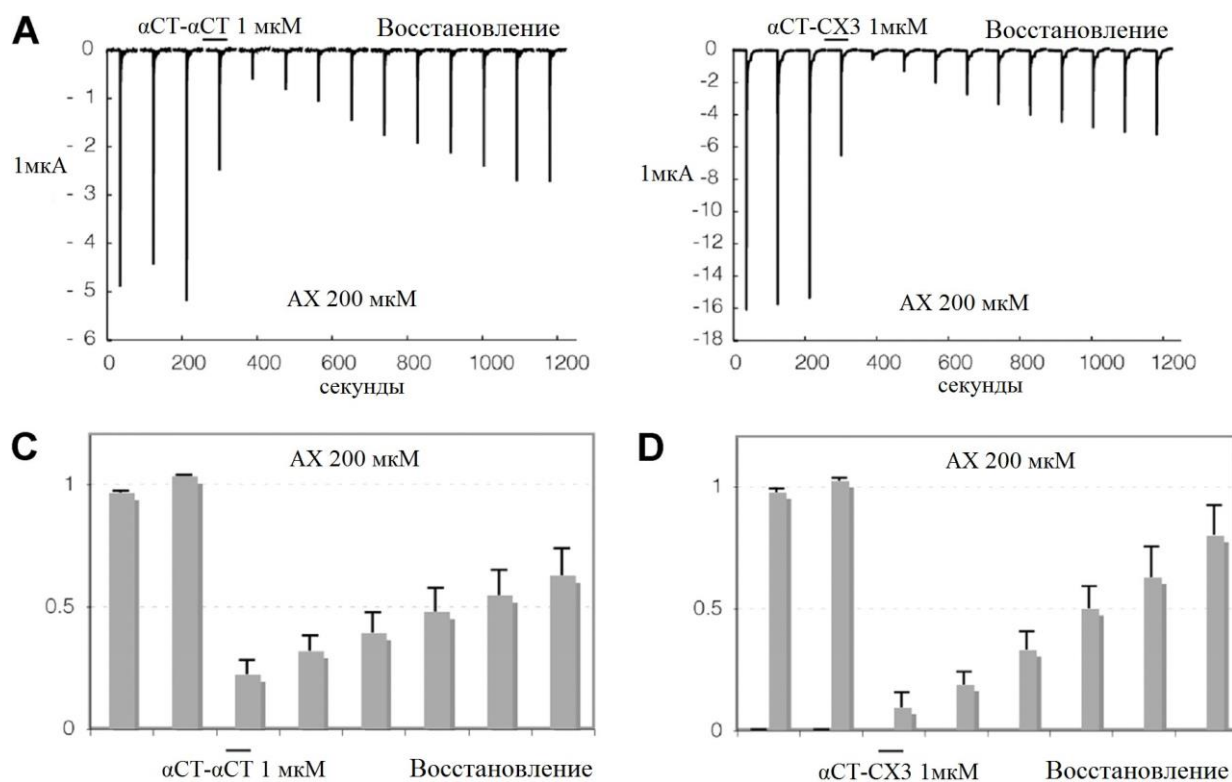


Рисунок 13. Взаимодействие α СТ- α СТ и гетеродимера α СТ-СХ3 с $\alpha 7$ нАХР человека, экспрессированным в ооцитах *Xenopus* [32].

Интересно, что гетеродимер α СТ-СХЗ, проявляющий существенное ингибирование связывания [I^{125}]меченного α -бунгаротоксина с $\alpha 7$ nAХР, не только немного активней чем α СТ- α СТ в связывании с $\alpha 7$ nAChR в электрофизиологических экспериментах на ооцитах (рис. 13), но и существенно превосходит гомодимер в ингибировании $\alpha 3\beta 2$ АХР (рис. 14) [32]. Эти результаты подтверждают, что димеризация необходима для активности трехпетельных токсинов против гетеромерных нейрональных nAХР

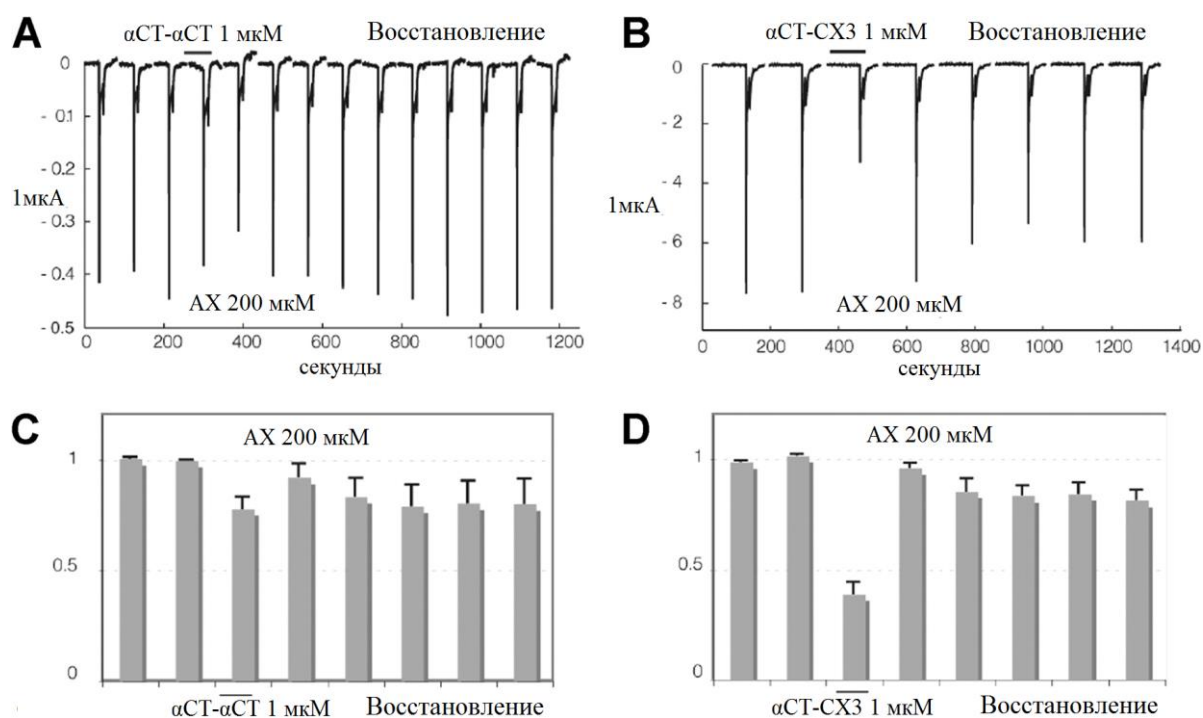


Рисунок 14. Взаимодействие α СТ- α СТ и α СТ-СХЗ с $\alpha 3\beta 2$ АХР человека, экспрессированным в ооцитах *Xenopus* [32].

4.2.2 Цитотоксичность трехпетельных токсинов

На клетках РС12 была исследована цитотоксичность представителей трех различных групп трехпетельных токсинов.

α -Кобратоксин из группы α -нейротоксинов длинного типа не проявил цитотоксического эффекта на клетках в концентрации до 100 μ М. Нейротоксин II

Naja oxiana из группы α -нейротоксинов короткого типа, и слабый токсин из группы нестандартных токсинов - WTX *Naja kaouthia* - не проявили цитотоксического эффекта на клетках в концентрации до 10 мкМ, а OWT из *Naja oxiana* в концентрации до 100 мкМ.

Исследование воздействия цитотоксинов на клетки PC12 показало, что они обладают разной степенью цитолитической активности. Были протестированы цитотоксины из разных ядов: цитотоксин II (CX2) из яда *Naja oxiana*, цитотоксин III (CX3) и цитотоксин V (CX5) из яда *Naja kaouthia*. CX2 и CX3 начинали проявлять цитотоксический эффект при концентрациях выше 0,1 мкМ, а CX5 выше 1 мкМ.

Таким образом, исследование мономерных трехпетельных токсинов показало, что α -нейротоксины ядов кобр не оказывают сколько-нибудь заметного влияния на клетки PC12, в то время как цитотоксины проявляют значительную цитотоксичность.

Исследование влияния гомодимера α СТ- α СТ на клетки PC12 показало, что подобно мономерному α СТ он не токсичен для клеток. При оценке цитотоксичности гетеродимеров, α -СТ-CX2 и α -СТ-CX3 положительным контролем служили цитотоксины II (CX2) из *Naja oxiana* и III (CX3) из *Naja kaouthia*. С этой целью клетки инкубировали с различными концентрациями белков в течение 48 ч и затем определяли количество живых клеток окрашиванием с МТТ и на автоматическом счётчике клеток Countess методом окрашивания трипановым синим (рис. 15). Обнаружено, что оба гетеродимера не оказывали эффекта на выживание клеток PC12 в концентрации до 10 мкМ (рис. 15). Кажущееся увеличение числа выживших клеток в МТТ тесте связано с особенностями метода, который измеряя суммарную активность дыхательных ферментов митохондрий, оценивает интенсивность метаболизма клеток, которая вероятно усиливается под действием исследуемых белков. При изучении цитотоксических и

антипролиферативных свойств исследуемых веществ методом МТТ, следует учитывать влияние этих веществ непосредственно на процесс дыхания [193].

Таким образом, исследуемые гетеродимеры сохранили способность связываться с nAHR мышечного и $\alpha 7$ подтипа, но потеряли цитотоксическую активность.

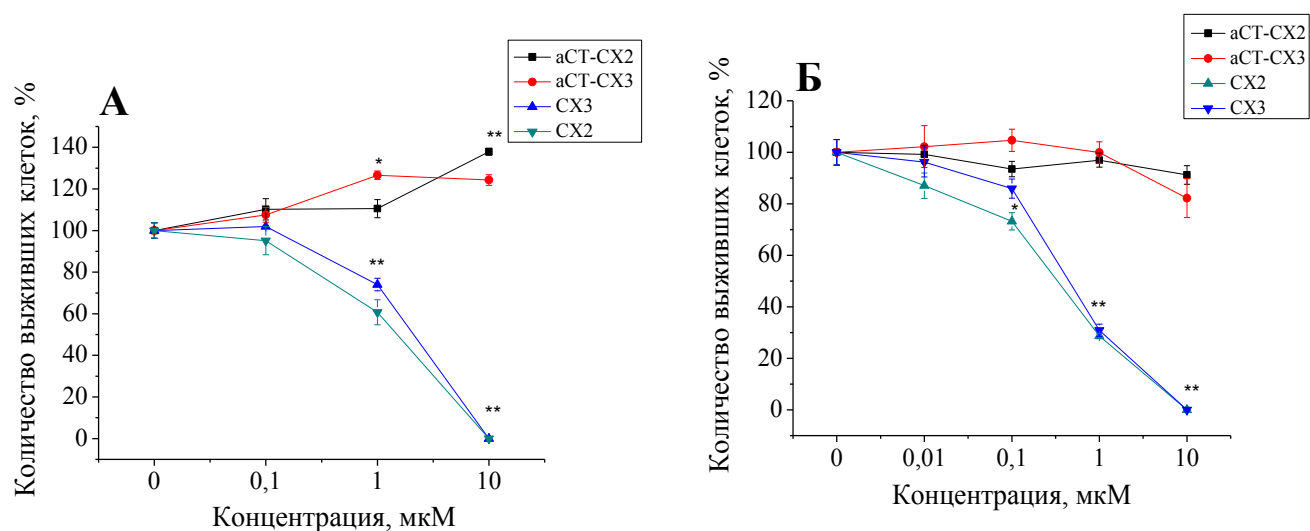


Рисунок 15. Сравнительный анализ цитотоксичности димеров (α -СТ-CX2 и α -СТ-CX3) и цитотоксинов (CX2 и CX3) методом МТТ (А) и с использованием автоматического счетчика клеток (Б, окрашивание трипановым синим). Клетки инкубировали с различными концентрациями токсинов в течение 48 ч, * $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Подобную потерю цитотоксичности наблюдали при исследовании еще одного минорного компонента яда кобры – гликозилированного цитотоксина [194]. Одним из объяснений подобной модификации, уменьшающей цитотоксичность, может быть то, что таким способом клетки, экспрессирующие токсин, защищают себя от их токсического действия [194].

Ранее было установлено, что взаимодействие некоторых цитотоксинов с отрицательно заряженными липидами (такими как фосфатидилсерин или

фосфатидилглицерин) приводит к их нековалентной димеризации – важному промежуточному этапу на пути к олигомеризации цитотоксинов. Было выдвинуто предположение, что олигомеризация цитотоксина способствует формированию пор и/или прямому литическому воздействию на мембрану [56].

В нашем случае, очевидно, что димеризация токсинов приводит к потере цитотоксичности. Возможно, α -СТ в гетеродимере препятствует формированию мембрано-активного цитотоксинового комплекса или закрывает цитотоксину участок, важный для его взаимодействия с мембраной [33]. Потеря цитотоксичности – прекрасный пример изменения биологической активности белка, когда исчезновение одного типа активности (цитотоксичности) компенсируется новым (взаимодействие с $\alpha 3\beta 2$ nAChR).

4.3 Фосфолипазы A2

При скрининге биологической активности компонентов змеиных ядов особое внимание было уделено фосфолипазам A2 (ФЛА2). ФЛА2 обладают различными фармакологическими свойствами, включая нейро- мио- и кардиотоксическое действие, а также антикоагулянтный и провоспалительный эффекты. В частности, они вызывают деполяризацию мышечного волокна, влияют на сокращение гладкомышечной мускулатуры и могут поляризовать мембрану нервных окончаний, блокируя передачу нервного импульса. ФЛА2 вовлечены в формирование сигнальных молекул, в частности, арахидоновой кислоты – ключевого предшественника различных эйкозаноидов (простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов), участвуют в процессах воспаления и коагуляционных каскадах.

ФЛА2 способны регулировать различные клеточные функции, включая миграцию эндотелиальных клеток и стимуляцию роста нейритов. ФЛА2 проявляют антипролиферативные свойства, индуцируя апоптоз, ингибируя клеточную

адгезию и миграцию. Действие этих ферментов может быть либо результатом прямого гидролиза фосфолипидов и нарушения структуры мембраны, либо, в большинстве случаев, быть опосредованными через вовлечение продуктов гидролиза в пути передачи сигнала

Для проведения исследований на клетках PC12 из ядов разных видов змей было выделено семь структурно и функционально различных фосфолипаз: ФГД-1, ФГД-2, SM2, Ti-Nh, Vur-PL2A, Vur-PL2B и битанарин.

4.3.1 Фосфолипазы: ФГД1 ФГД2 и SM2

Структура и каталитические свойства

Ранее было установлено [187], что яд гадюки *V. nikolskii* содержит две различные гетеродимерные фосфолипазы (ФГД-1 и ФГД-2), состоящие из ферментативно активной и неактивной субъединиц. Обращенно-фазовая ВЭЖХ каждой фосфолипазы, приводила к получению очищенных субъединиц, лишь одна из которых обладала фосфолипазной активностью. Ферментативно активные субъединицы, полученные из ФГД-1 и ФГД-2, будут далее обозначаться как ФГД-1Ф и ФГД-2Ф, а неактивные субъединицы как ФГД-1И и ФГД-2И, соответственно.

Фосфолипазная активность изолированных субъединиц ФГД-1Ф (1,25 ммоль /мин на мкмоль белка) и ФГД-2Ф (0,81 ммоль /мин на мкмоль белка), определенная с использованием флуоресцентного субстрата по методике [189], превышала таковую исходных гетеродимерных ферментов ФГД-1 (0,56 ммоль /мин на мкмоль белка) и ФГД-2 (0,31 ммоль /мин на мкмоль белка) соответственно. У субъединиц ФГД-1И и ФГД-2И фосфолипазная активность не обнаружена.

По своему хроматографическому поведению и аминокислотным последовательностям выделенные белки *V. nikolskii* очень похожи на нейротоксические гетеродимерные ФЛА2 випоксин (viroxin) из яда гадюки *V.*

ammodytes [195] и васпин (vaspin) из яда *V. aspis* [196]. Очень близки по свойствам и структуре к этим ферментам также кротоксин (crotoxin) из яда гремучей змеи *Crotalus durissus terrificus* [126] и нейротоксическая ФЛА2 из яда тайваньской гадюки *V. russelli formosensis* [197]. Все эти белки относятся к группе IIА.

Используемая в данной работе ФЛА2 из яда кобры *N. kaouthia* по молекулярной массе и N-концевой аминокислотной последовательности соответствует кислой ФЛА2 СМ2, выделенной ранее из того же яда [198]. Этот фермент относится к группе IА.

Цитотоксичность

Одним из основных биологических свойств ФЛА2 ядов змей является способность вызывать гибель клеток. В наибольшей степени цитотоксичность проявляется при воздействии так называемых миотоксических ферментов на клетки скелетных мышц, токсичность ФЛА2 по отношению к клеткам других типов, как правило, ниже [199].

При изучении влияния гетеродимерных ФЛА2 *V. nikolskii* на жизнеспособность клеток РС12 было установлено, что число выживших клеток уменьшалось по мере роста концентрации ФГД-1 и ФГД-2 в среде (рис. 16), при этом большей цитотоксичностью обладала фосфолипаза ФГД-2 (для всех исследованных концентраций различия с контролем значимы с $p < 0,01$). Цитотоксичность гетеродимерных фосфолипаз гадюки *V. nikolskii* оказалась выше чем токсичность ФЛА2 кобры *N. kaouthia* (для всех исследованных концентраций различия также значимы с $p < 0,01$) (рис. 16).

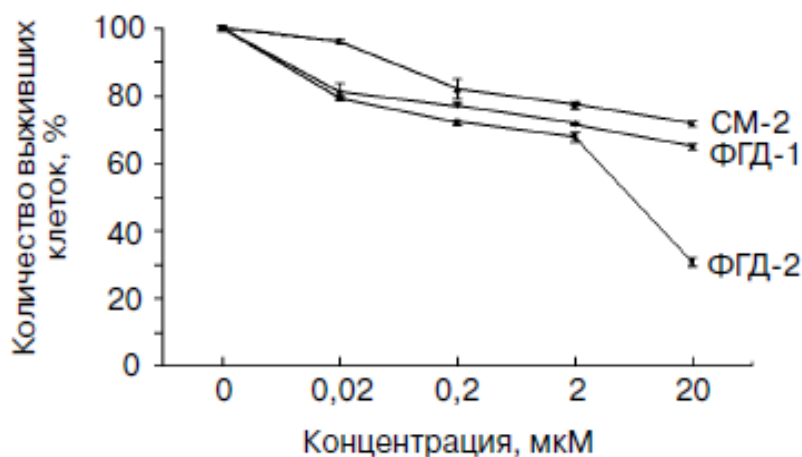


Рисунок 16. Зависимость количества выживших клеток PC12 от концентрации ФЛА2 змеиных ядов. Клетки инкубировали с различными концентрациями ФЛА2 в течение 24 ч и затем определяли количество живых клеток окрашиванием с МТТ.

Исследование индивидуальных компонентов, формирующих гетеродимерные ФЛА2 *V.nikolskii*, показало, что белки ФГД-1И и ФГД-2И не обладали цитотоксичностью. Ферментативно активные субъединицы ФГД-1Ф и ФГД-2Ф (рис. 17), обладающие большей ферментативной активностью (1,25 и 0,81 ммоль /мин на мкмоль белка соответственно), проявляли более высокую цитотоксичность по сравнению с исходными белками ФГД-1 (ферментативная активность - 0,56 ммоль /мин на мкмоль белка) и ФГД-2 (0,31 ммоль /мин на мкмоль белка) соответственно.

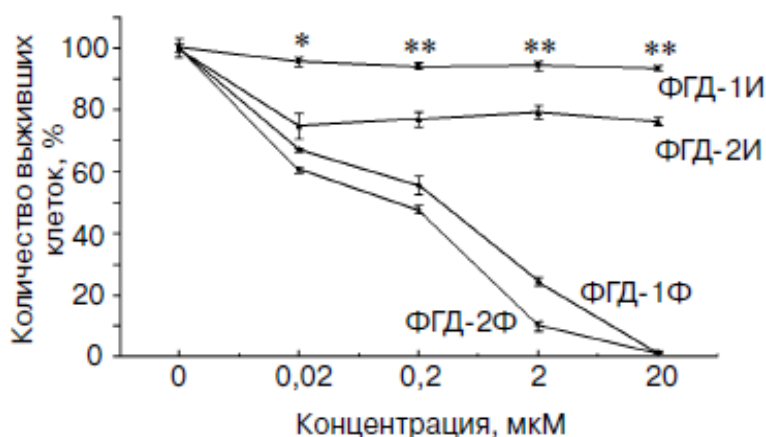


Рисунок 17. Зависимость количества выживших клеток PC12 от концентрации изолированных субъединиц ФЛА2 *V. nikolskii*. Клетки инкубировали с различными концентрациями субъединиц в течение 24 ч и затем определяли количество живых клеток окрашиванием с МТТ. В качестве контроля использовали клетки, инкубировавшиеся без добавления ФЛА2 ($p < 0,01$, $*p < 0,06$ и $**p < 0,02$ по сравнению с контролем, $n = 12$).

Совместная предварительная инкубация белков ФГД-1И и ФГД-2И с белками ФГД-1Ф и ФГД-2Ф, соответственно, значительно снижала токсичный эффект последних (табл. 6).

При этом согласно данным ионообменной хроматографии (рис. 18) в результате взаимодействия индивидуальных субъединиц происходит реконструкция гетеродимерных фосфолипаз ФГД-1 и ФГД-2, которые обладают меньшей цитотоксичностью по сравнению с ферментативно активными субъединицами (ФГД-1Ф и ФГД-2Ф соответственно).

Таблица 6. Подавление цитотоксической активности белков ФГД-1Ф и ФГД-2Ф белками ФГД-1И и ФГД-2И после их совместной инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре. *Белки в концентрации 20 мкМ инкубировали с клетками в течение 24 ч и затем определяли количество выживших клеток окрашиванием с МТТ. ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем. При сравнении попарно активности реконструированных комплексов с активностью отдельных субъединиц (ФГД-1Ф – ФГД-1И + ФГД-1Ф; ФГД-1И – ФГД-1И + ФГД-1Ф; ФГД-2Ф – ФГД-2И + ФГД-2Ф; ФГД-2И – ФГД-2И + ФГД-2Ф) различия в средних значениях величин активности являются статистически значимыми ($p < 0,05$).

Белок	Количество выживших клеток по отношению к контролю, %*
ФГД-1	$68,68 \pm 1,02^{**}$
ФГД-1И	$97,19 \pm 0,77$
ФГД-1Ф	$1,33 \pm 0,22^{**}$
ФГД-1И + ФГД-1Ф	$72,89 \pm 0,67^{**}$
ФГД-2	$40,42 \pm 0,89^{**}$
ФГД-2И	$98,3 \pm 0,7$
ФГД-2Ф	$2,21 \pm 0,12^{**}$
ФГД-2И + ФГД-2Ф	$78,75 \pm 1,99^{**}$

Полученные нами данные о наличии цитотоксичности лишь у ферментативно активных белков находятся в согласии с данными других авторов, полученными для фосфолипаз из иных источников [200, 201]. Так, цитотоксичный эффект кротоксина проявлялся только при диссоциации гетеродимера с образованием ферментативно активной субъединицы В [202]. Таким образом, цитотоксический эффект ФЛА2 для клеток РС12 обусловлен, по-видимому, ферментативной активностью фосфолипаз и вызван, предположительно, нарушением целостности мембраны клетки.

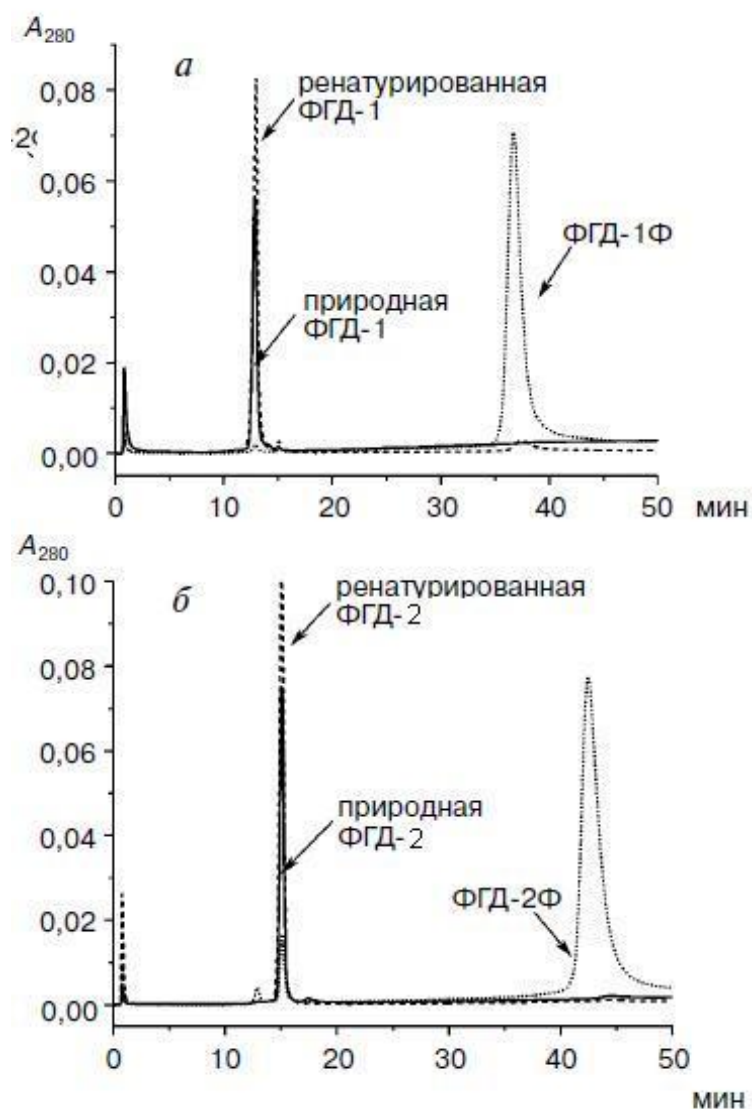


Рисунок 18. а – Ионообменная хроматография природной (сплошная линия) и реконструированной (пунктирная линия) ФГД-1, а также изолированной субъединицы ФГД-1Ф (точечная линия) на колонке НЕМА ВЮ 1000 СМ (3 X 30 мм) в градиенте аммонийно-ацетатного буфера (рН 7,5) от 60 мМ до 1 М за 47 мин при скорости потока 0,3 мл/мин. ФГД-1И в данных условиях не задерживается на колонке. б – ФГД-2 и ФГД-2Ф. Обозначения и условия разделения идентичны ФГД-1 и ФГД-1Ф.

Цитотоксичность реконструированного комплекса ФГД-2И + ФГД-2Ф меньше таковой у нативной фосфолипазы ФГД2 (табл. 6). Подобные различия в

активности, возможно, связаны с частичным нарушением структуры субъединиц при их выделении (Субъединицы выделяли с использованием обращенно-фазовой хроматографии при рН около 2 и в присутствии ацетонитрила). Возможно, при реконструкции комплексы были не так стабильны, как нативные и в отличие от них, хуже останавливали пролиферацию, что и проявилось в различиях выживаемости клеток.

Нейритогенез

Как уже отмечалось в обзоре, секретируемые белки из грибов и бактерий, обладающие фосфолипазной активностью, а также ФЛА2 пчелиного яда (группа III) и мозга эмбрионов мышей (группы V и X), относящиеся к разным группам секретируемых фосфолипаз, индуцируют в разной степени рост нейритов у клеток линии PC12 [138]. При этом максимальный эффект после инкубации клеток с ФЛА2 в течение 48 ч наблюдался при концентрации 10 нМ для фермента пчелиного яда, 0,1 мкМ – для грибкового фермента p15 и 1 мкМ – для фермента Scp15 из *Streptomyces coelicolor* [139]. Важно заметить, что все эти белки по четвертичной структуре относятся к мономерным ФЛА2. Проведенные нами исследования показали, что гетеродимерные ФЛА2 яда гадюки в диапазоне концентраций от 0,2 до 20 мкМ также вызывают рост нейритов у клеток PC12 (рис. 19).

Уменьшение количества клеток с нейритами при концентрации ФГД-1 более 0,2 мкМ (рис. 20) можно объяснить меньшей устойчивостью дифференцированных клеток к цитотоксическому действию этого фермента. Аналогичная проходящая через максимум концентрационная зависимость нейритогенеза наблюдалась для ФЛА2 пчелиного яда [138]. Для ФГД-2 подобного эффекта обнаружено не было. Индукция роста нейритов ФЛА2 яда кобры воспроизводимо наблюдалась лишь при концентрации более 2 мкМ (рис. 20).

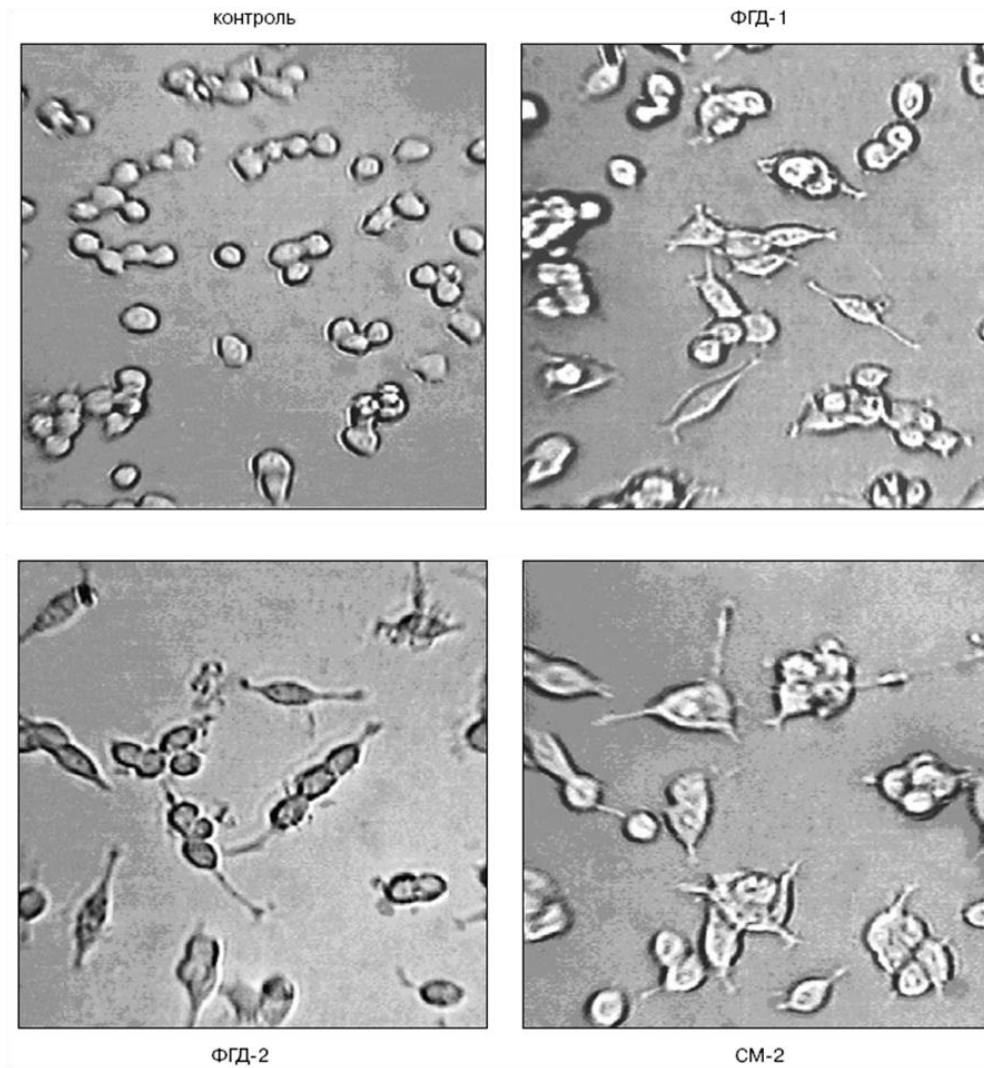


Рисунок 19. Рост нейритов в культуре клеток РС12 после инкубации с ФЛА2 из ядов змей в течение 24 ч. Концентрация ФЛА2: ФГД-1 и СМ-2 – 20 мкМ, ФГД-2 – 2 мкМ (увеличение в 25раз).

Рост нейритов обнаружен как при инкубации клеток с нативными гетеродимерными белками ФГД-1 и ФГД-2, так и после их реконструкции в результате совместной инкубации изолированных субъединиц (данные не представлены).

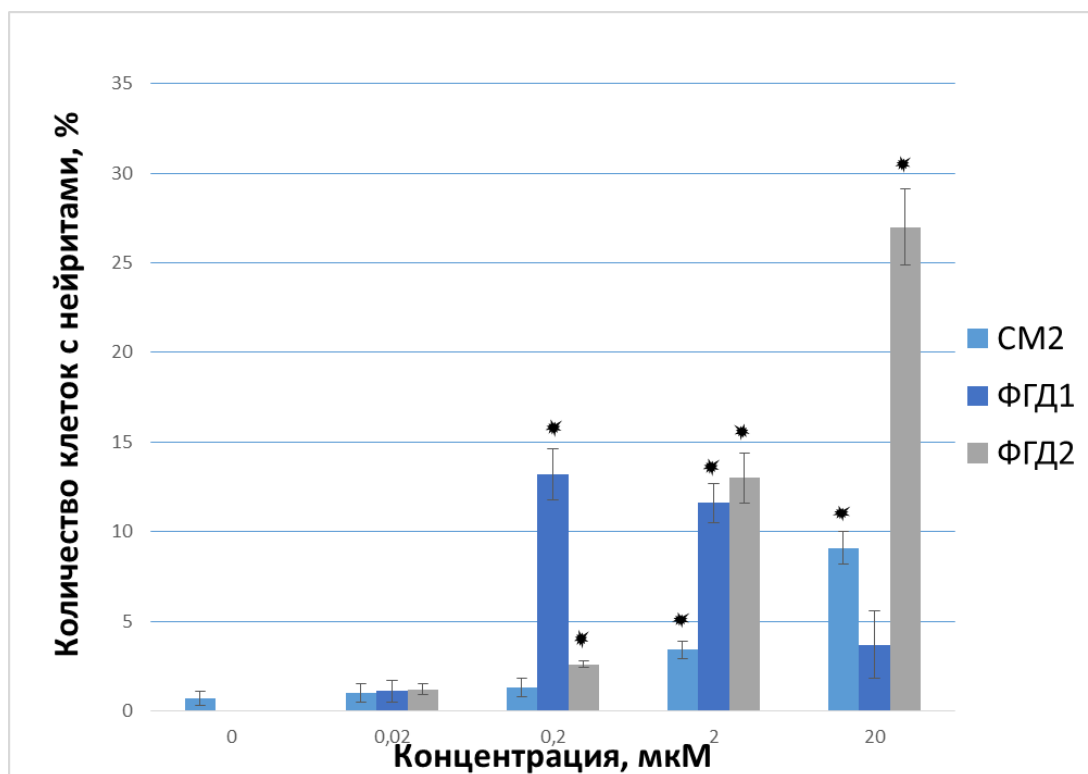


Рисунок 20. Зависимость нейритогенной активности ФЛА2 от концентрации. Клетки инкубировали с белками в течение 24 ч и затем подсчитывали. * $p < 0,01$ по сравнению с контролем. Различия между ФГД-1 и ФГД-2, ФГД-1 и SM-2, ФГД-2 и SM-2 при концентрации 20 мкМ статистически значимы ($p < 0,05$).

Возможный механизм нейритогенеза, индуцированного ФЛА2 *V. nikolskii*

Проведенные исследования [139, 142] показали, что способность ФЛА2 вызывать рост нейритов коррелирует с энзиматической активностью белка. Этот вывод хорошо согласуется с нашими данными об индукции роста нейритов ферментативно активными белками. Обнаружить нейритогенную активность у изолированных субъединиц ФЛА2 гадюки *V. nikolskii* не удалось, поскольку энзиматически активные субъединицы обладают сильной цитотоксичностью, а другие субъединицы не активны вовсе.

Было установлено [115, 142], что рост нейритов РС12 индуцируется лизофосфатидилхолином, образующимся при деградации фосфолипидов мембраны клетки под действием ФЛА2, а различная способность ФЛА2 разных типов стимулировать рост нейритов находится в прямой зависимости от их способности высвободить лизофосфатидилхолин из клеточной мембраны. Возможно, способность ФЛА2 из ядов змей индуцировать рост нейритов при более высоких концентрациях по сравнению с ферментами других групп объясняется меньшей ферментативной активностью змеиных белков по отношению к фосфолипидам клеточной мембраны РС12. Однако, в работах других авторов отсутствуют данные о специфической (удельной) активности ФЛА2, индуцирующих рост нейритов. Поскольку измеренная удельная активность фермента сильно зависит как от природы субстрата, так и от используемого метода, сравнивать эти величины следует с большой осторожностью.

Тем не менее, имеющиеся в литературе данные [189] свидетельствуют о том, что ФЛА2 пчелиного яда при гидролизе флуоресцентных аналогов фосфатидилхолина превосходит по активности кротоксин на 2–3 порядка. Как уже отмечалось выше, исследованные нами ФГД-1 и ФГД-2 структурно весьма схожи с кротоксином, а определенная нами с использованием флуоресцентного аналога фосфатидилхолина фосфолипазная активность ФГД-1 (0,56 ммоль /мин на мкмоль белка) и ФГД-2 (0,31 ммоль /мин на мкмоль белка) очень близка к активности кротоксина (0,69 ммоль /мин на мкмоль белка), определенной с использованием того же метода и субстрата [189].

На основании этих данных можно предположить, что активность ФГД-1 и ФГД-2 при гидролизе фосфатидилхолина клеточной мембраны РС12 также будет меньше активности ФЛА2 пчелиного яда на несколько порядков. Это предположение хорошо согласуется с обнаруженной нами способностью ФГД-1 и ФГД-2 вызывать рост нейритов при более высоких концентрациях, чем это было показано для ФЛА2 пчелиного яда. Для того чтобы установить, действительно ли в случае ФГД-1 и ФГД-2 гидролиз фосфатидилхолина происходит при тех

концентрациях фермента, которые индуцируют рост нейритов, мы анализировали фосфолипиды клеток PC12 методом MALDI-масс-спектрометрии.

На рис. 21 представлены данные, полученные без воздействия ФГД-1 на клетки (а), а также после инкубации клеток с ферментом в концентрации 0,02 мкМ (б) и 0,2 мкМ (в). Следует отметить, что при 0,02 мкМ нейриты практически отсутствуют, а при 0,2 мкМ доля дифференцированных клеток составляет около 13% (рис. 20).

Как видно из рисунка 21, при увеличении концентрации ФГД-1 происходит уменьшение интенсивности сигналов с отношениями массы к заряду молекул в диапазоне от 720 до 830, соответствующих различным подклассам фосфатидилхолина, и возрастание интенсивности сигналов с отношениями массы к заряду молекул в диапазоне от 480 до 550, соответствующих различным подклассам лизофосфатидилхолина.

Сильнее всего возрастает интенсивность сигналов, соответствующих подклассам C16 : 0 (m/z 496) и C18 : 0 (m/z 524), которые, как было показано [115, 142], могут индуцировать рост нейритов. Аналогичная картина наблюдается в случае ФГД-2 (данные не приведены). Таким образом, индукция роста нейритов в клетках PC12 змеиными ФЛА2, повидимому, происходит по тому же механизму, что и в случае ФЛА2 других групп.

Описанный механизм нейритогенеза отличается от уже известного действия фактора роста нервов, стимулирующего рост нейритов посредством взаимодействия со специфическими рецепторами нервных клеток [140]. Более того, ФЛА2 способна усиливать действие фактора роста нервов и, вероятно, может принимать участие в процессе дифференцировки клеток PC12 [142].

Таким образом, ФЛА2 ядов змей способны индуцировать рост нейритов клеток PC12, подобно упоминавшимся выше другим секретиремым

фосфолипазам. Этот эффект впервые обнаружен нами у ФЛА2 групп I и II, в том числе и у гетеродимерных фосфолипаз A2.

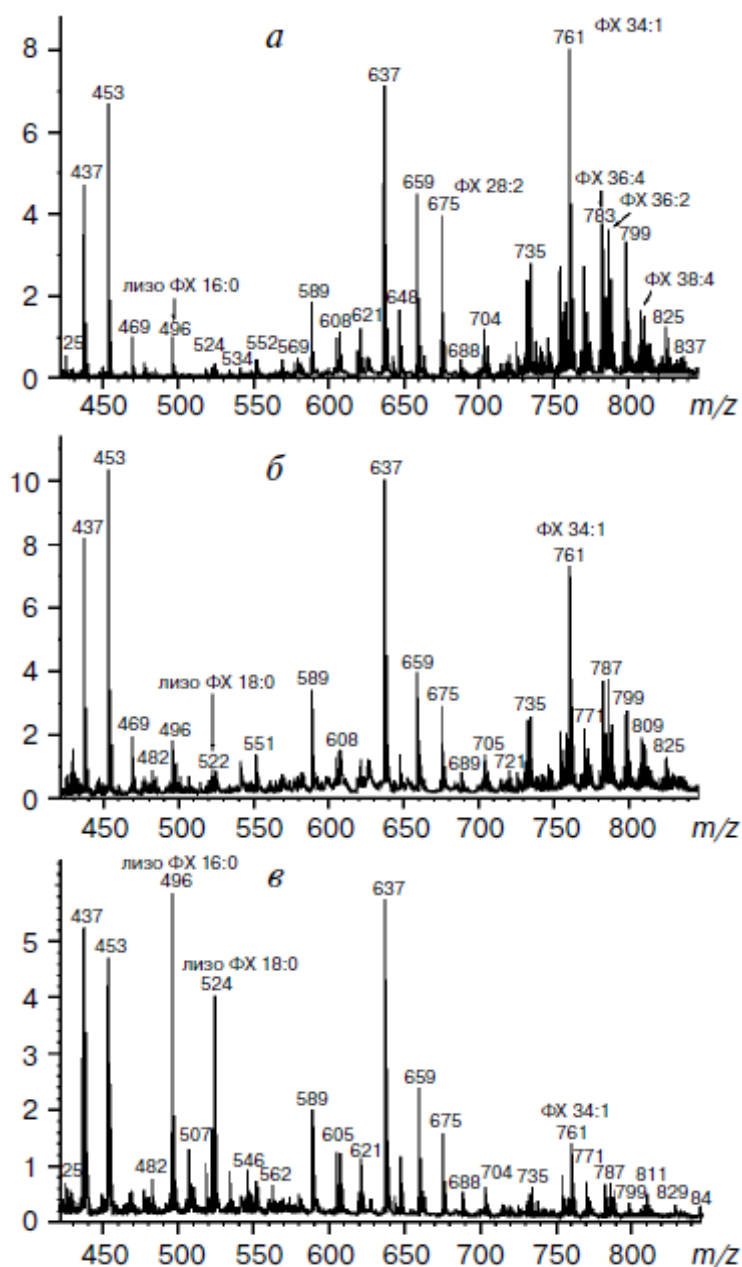


Рисунок 21. Анализ фосфолипидов клеточной мембраны PC12 методом MALDI масс-спектрометрии. *а* – Контроль без обработки клеток ФЛА2; *б* и *в* – после инкубации клеток с ФГД-1 в концентрации 0,02 и 0,2 мкМ соответственно. Отмечены подклассы фосфатидилхолина (ФХ) и лизофосфатидилхолина (лизо ФХ). По оси ординат отложена интенсивность сигнала в относительных единицах, по оси абсцисс – отношение массы к заряду молекул (m/z).

Поскольку фосфолипазы содержатся в ядах в больших количествах (например, суммарное содержание ФГД-1 и ФГД-2 в яде *V. nikolski* более 20%), а их очистка достаточно проста, они могут быть использованы в качестве альтернативы фактору роста нервов при стимуляции клеточной дифференцировки. При этом следует иметь в виду, что при высоких концентрациях начинают проявляться цитотоксические свойства змеиных фосфолипаз.

4.3.2 Фосфолипаза Ti-Nh яда *Naja haje*

Из яда кобры *Naja haje* был выделен белок с молекулярной массой 14 340 Да, обладающий способностью ингибировать тромбин и названный Ti-Nh (**T**hrombin **i**nhibitor from **N**aja **h**aje). Этот белок состоит из одной полипептидной цепи с 14 цистеиновыми остатками, образующими 7 внутримолекулярных дисульфидных мостиков [203]. Структурная характеристика этого белка показала, что он относится к группе IV суперсемейства ФЛА2.

Уникальность данной фосфолипазы состоит в том, что она единственная из фосфолипаз ядов змей семейства *Elapidae* способна подавлять фибриногенолитическую и амидолитическую активность тромбина, и соответственно тромбин-индуцируемую агрегацию тромбоцитов. Ti-Nh – первый тромбиновый ингибитор, выделенный из ядов змей семейства *Elapidae*, и первая ФЛА2, ингибирующая тромбин. ФЛА2 Ti-Nh обладает низкой фосфолипазной активностью. Так скорость гидролиза флуоресцентного субстрата этой ФЛА2 примерно на 5 порядков ниже, чем у CM2 (табл. 7).

Тромбин–ингибиторные свойства Ti-Nh не зависят от его ферментативной активности, и это согласуется с гипотезой Kini [85] о том, что ФЛА2 могут проявлять антикоагулянтный эффект посредством неферментативного белок-белкового взаимодействия.

Таблица 7. Ферментативная активность ФЛА2 змеиных ядов, субстрат - 1-пальмитоил-2-(10-пиренилдеcanoил)-sn-глицеро-3-фосфохолин

ФЛА2	Вид змеи	Активность (ммоль липидов/мин на мкмоль белка)
Ti-Nh	<i>N. haje</i>	0,000017
CM2	<i>N. kaouthia</i>	2,22
ФГД-1	<i>Vipera nikolskii</i>	0,56
Кротоксин	<i>Crotalus durissus</i>	0,096
β- Бунгаротоксин	<i>Bungarus multicinctus</i>	0,000087

По данным МТТ-теста, Ti-Nh в отличие от других ФЛА2 не проявила цитотоксичность по отношению к клеткам РС12 даже в высоких концентрациях (рис. 22). Более того, Ti-Nh стимулирует рост нейритов с активностью, сравнимой с ФЛА2 CM2 (рис. 23; рис. 24). Кажущееся увеличение числа выживших клеток по сравнению с контролем при высоких концентрациях Ti-Nh, можно объяснить усилением интенсивности метаболизма [193] при дифференцировке, вызванной фосфолипазой.

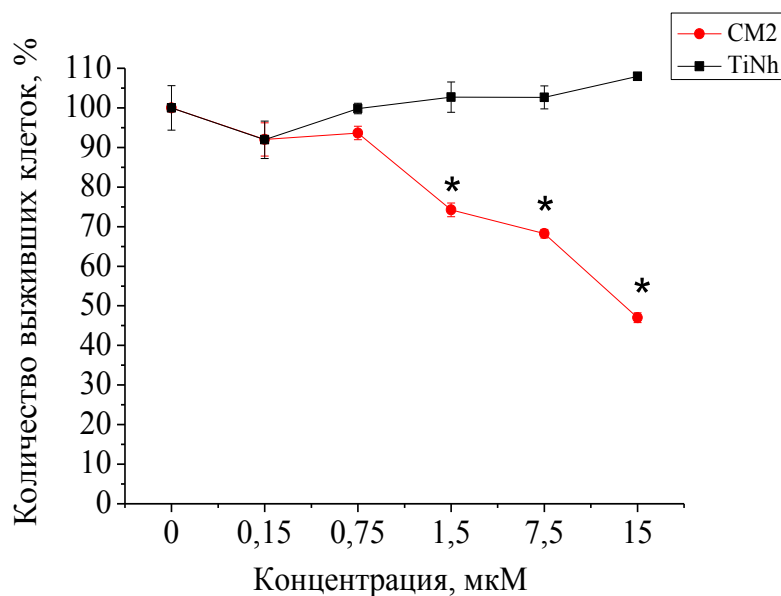


Рисунок 22. Зависимость количества выживших клеток PC12 от концентрации фосфолипаз Ti-Nh и CM2. Клетки инкубировали с различными концентрациями ФЛА2 в течение 48 ч и затем определяли количество живых клеток окрашиванием с МТТ, * $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

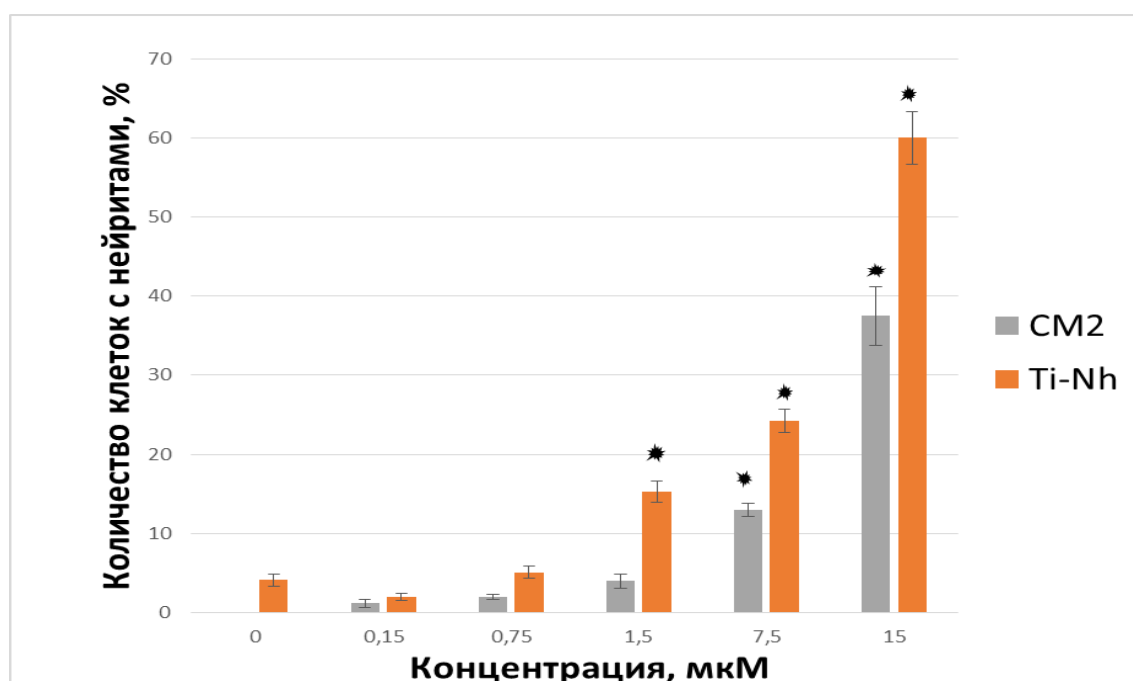


Рисунок 23. Влияние Ti-Nh и CM2 на рост нейритов у клеток PC12, 48ч.

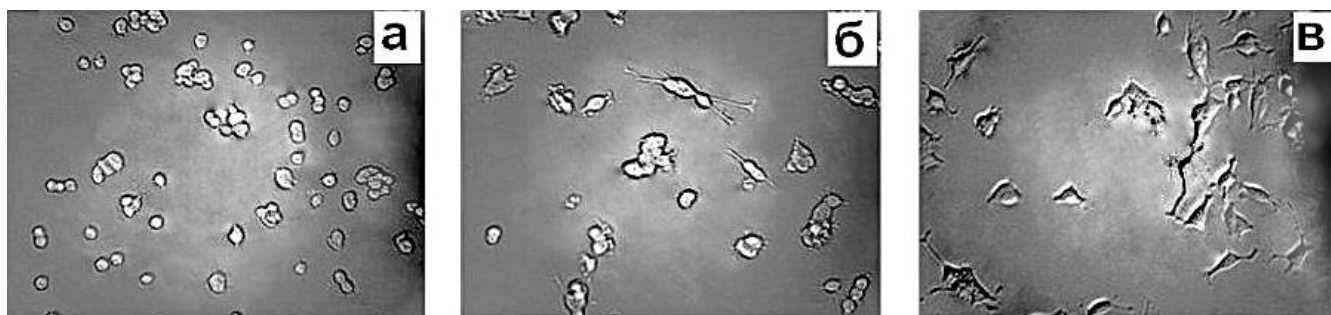


Рисунок 24. Нейритогенез РС12 под действием Ti-Nh. а – контроль, б - 15мкМ, в - 7,5 мкМ, 48 ч (здесь и на следующих рисунках увеличение в 10 раз).

Результаты исследований Ti-Nh выявили ряд интересных особенностей - белок проявляет селективный тромбин-ингибирующий эффект в диапазоне 10 - 100 нМ, но не оказывает цитотоксического эффекта на клетки в концентрациях вплоть до 15 мкМ [203]. Не обладая сильной ферментативной активностью, Ti-Nh индуцирует нейрональную дифференцировку РС12. Учитывая исследования, выявляющие связь ферментативной активности фосфолипаз с процессами дифференцировки, механизм нейрональной дифференцировки при низкой ферментативной активности фосфолипазы Ti-Nh остается не ясным. Можно лишь предположить, что существует альтернативный механизм дифференцировки, независимый от ферментативной активности.

4.3.3 Фосфолипазы: Vur-PL2A и Vur-PL2B

Из яда гадюки *Vipera ursinii renardi* были выделены две изоформы фосфолипазы Vur-PL2: Vur-PL2A и Vur-PL2B, не отличающиеся по аминокислотной последовательности. Они имеют молекулярную массу 13,5 кДа и относятся ко II группе фосфолипаз A2 [204]. По первичной структуре Vur-PL2 близка ФЛА2 аммодитину I из яда *V. ammodytes*. Vur-PL2B обладает сильным антикоагулянтным и антитромбоцитарным свойством, но проявляет слабую цитотоксичность по отношению к РС12 (рис. 25). Это первый случай присутствия

сильного антикоагулянтного аналога аммодинина I в яде гадюк. Способность Vur-PL2B индуцировать рост нейритов сравнима с таковой CM2 (рис. 26; рис. 27).

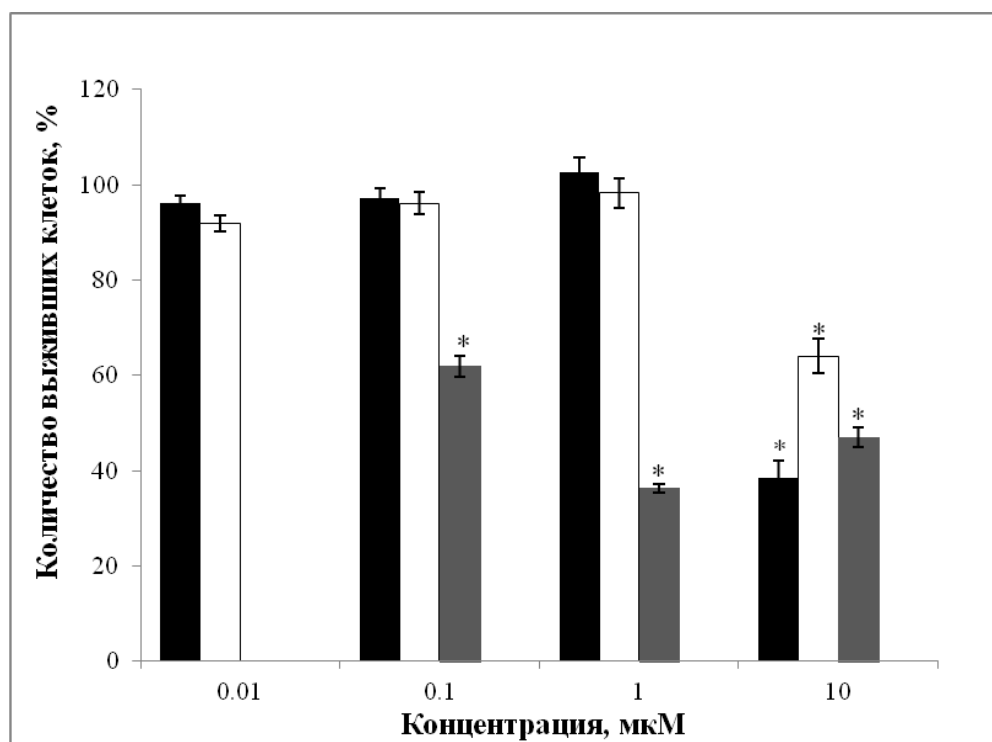


Рисунок 25. Зависимость количества выживших клеток PC12 от концентрации фосфолипаз: Vur-PL2A - черные столбцы, Vur-PL2B - белые столбцы и CM2 - серые столбцы. Клетки инкубировали с различными концентрациями ФЛА2 в течение 48 ч и затем определяли количество живых клеток окрашиванием с МТТ. * $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

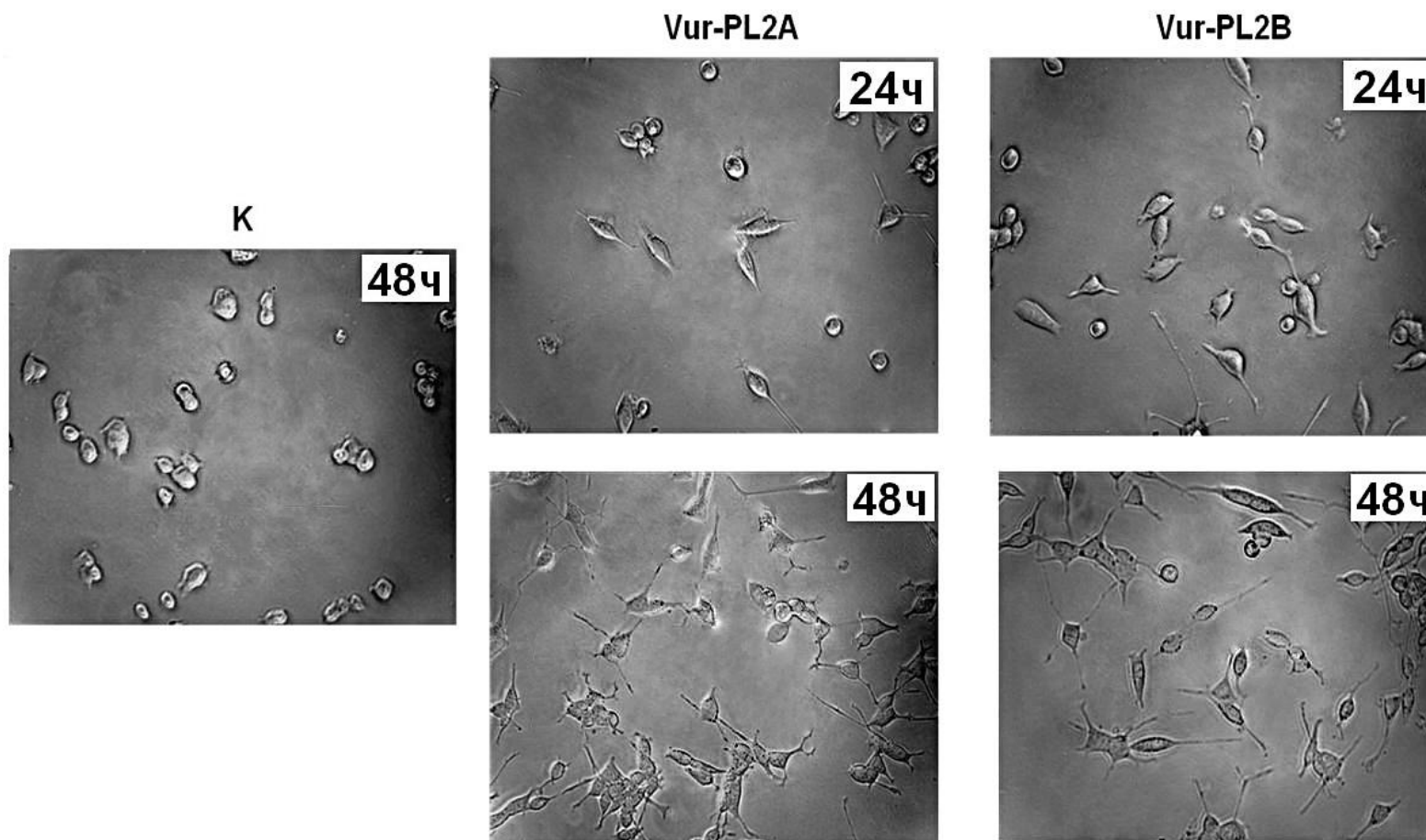


Рисунок 26. Нейритогенез PC12, под действием фосфолипаз Vur-PL2A и Vur-PL2B в концентрации 10 мкМ. К – контроль без ФЛА2. Инкубация 24 (верхний ряд) или 48 (нижний ряд) часов.

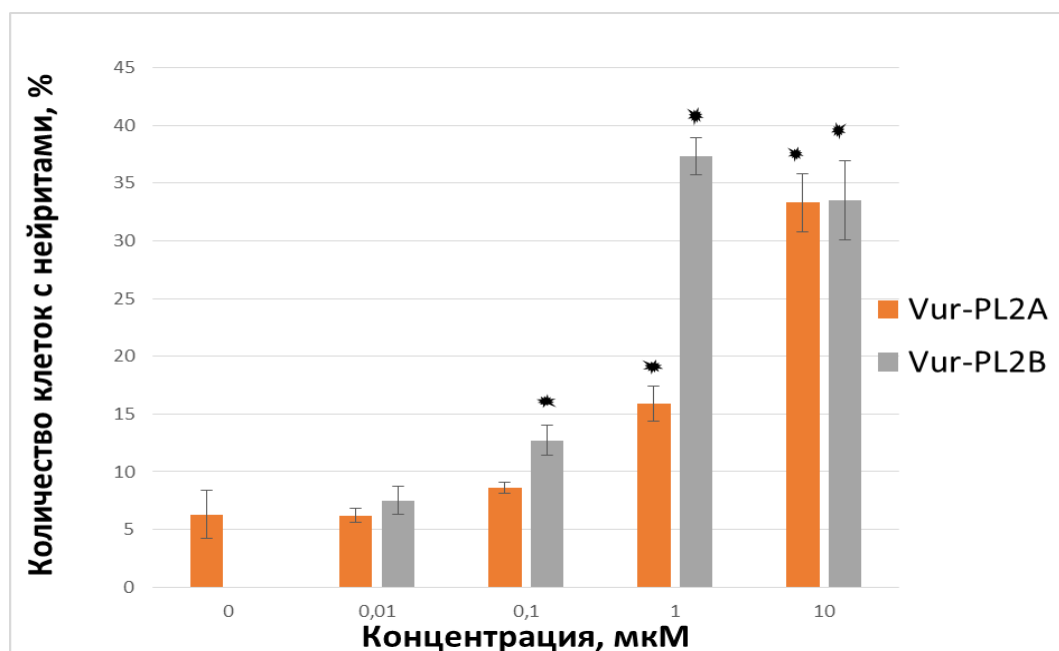


Рисунок 27. Влияние Vur-PL2A и Vur-PL2B на рост нейритов у клеток PC12, 48ч.

4.3.4 Фосфолипаза *Bitis arietans*

Из яда *Bitis arietans* был выделен уникальный белок – битанарин (**Bitis arietans nicotinic acetylcholine receptor inhibitor**) с молекулярной массой 27,4 кДа и 14 дисульфидными мостиками, обладающий фосфолипазной активностью и способностью блокировать нАХР [188]. Это мономерная фосфолипаза, относящаяся к группе ПА ФЛА2. По аминокислотной последовательности битанарин похож на ФЛА2 из *Bothrops asper*. Фосфолипазная активность битанарина (1,95 ммоль /мин на мкмоль белка) близка к активности фосфолипазы кобры SM2 (2,22 ммоль /мин на мкмоль белка).

Исследование влияния битанарина на клетки PC12 показало, что в отличие от фосфолипазы кобры битанарин не проявлял цитотоксичности до концентрации 10 мкМ (рис. 28).

Битанарин стимулировал рост нейритов PC12, однако в отличие от всех других исследованных ферментов, его дифференцирующая активность была очень высока и проявлялась уже при низких концентрациях (рис. 29, рис.30). При

увеличении времени инкубации с фосфолипазами процесс дифференцировки усиливался, происходило ветвление и увеличение длины нейритов (рис. 31).

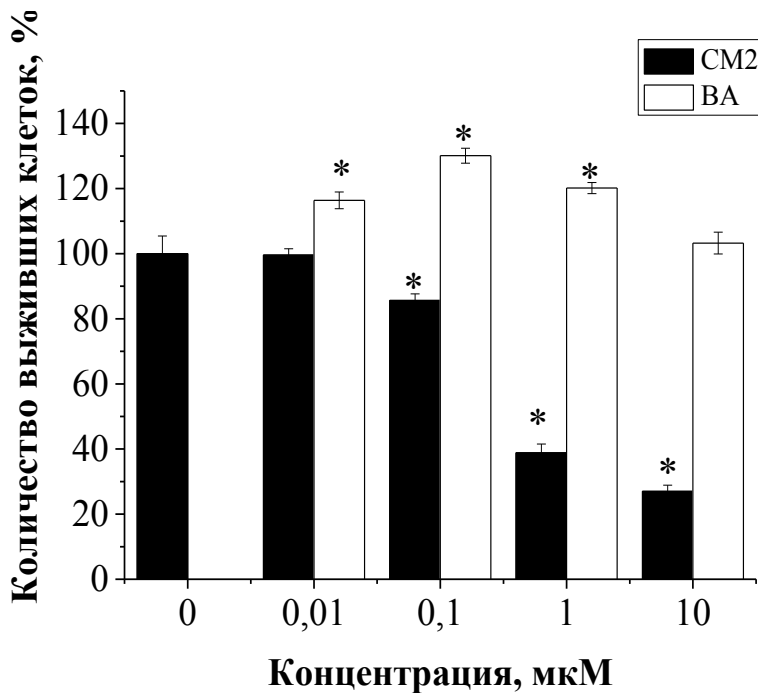


Рисунок 28. Зависимость количества выживших клеток PC12 от концентрации битанарина (белый) и CM2 (черный). Клетки инкубировали с различными концентрациями ФЛА2 в течение 48 ч и затем определяли количество живых клеток окрашиванием с МТТ. * $p < 0,01$ по сравнению с контролем

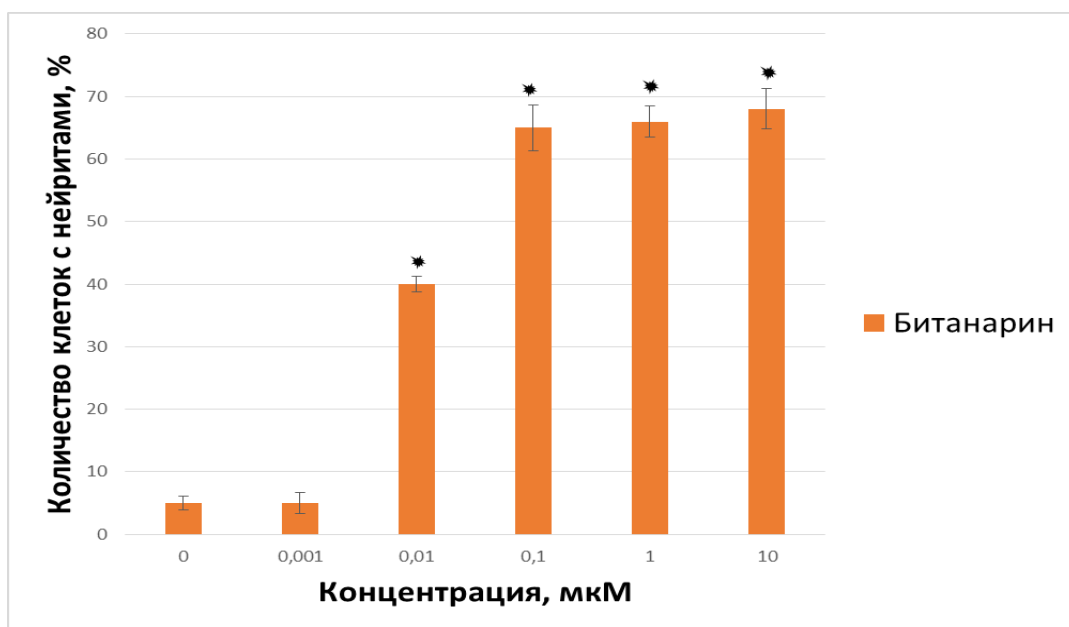


Рисунок 29. Влияние битанарина на рост нейритов у клеток PC12, 48ч.

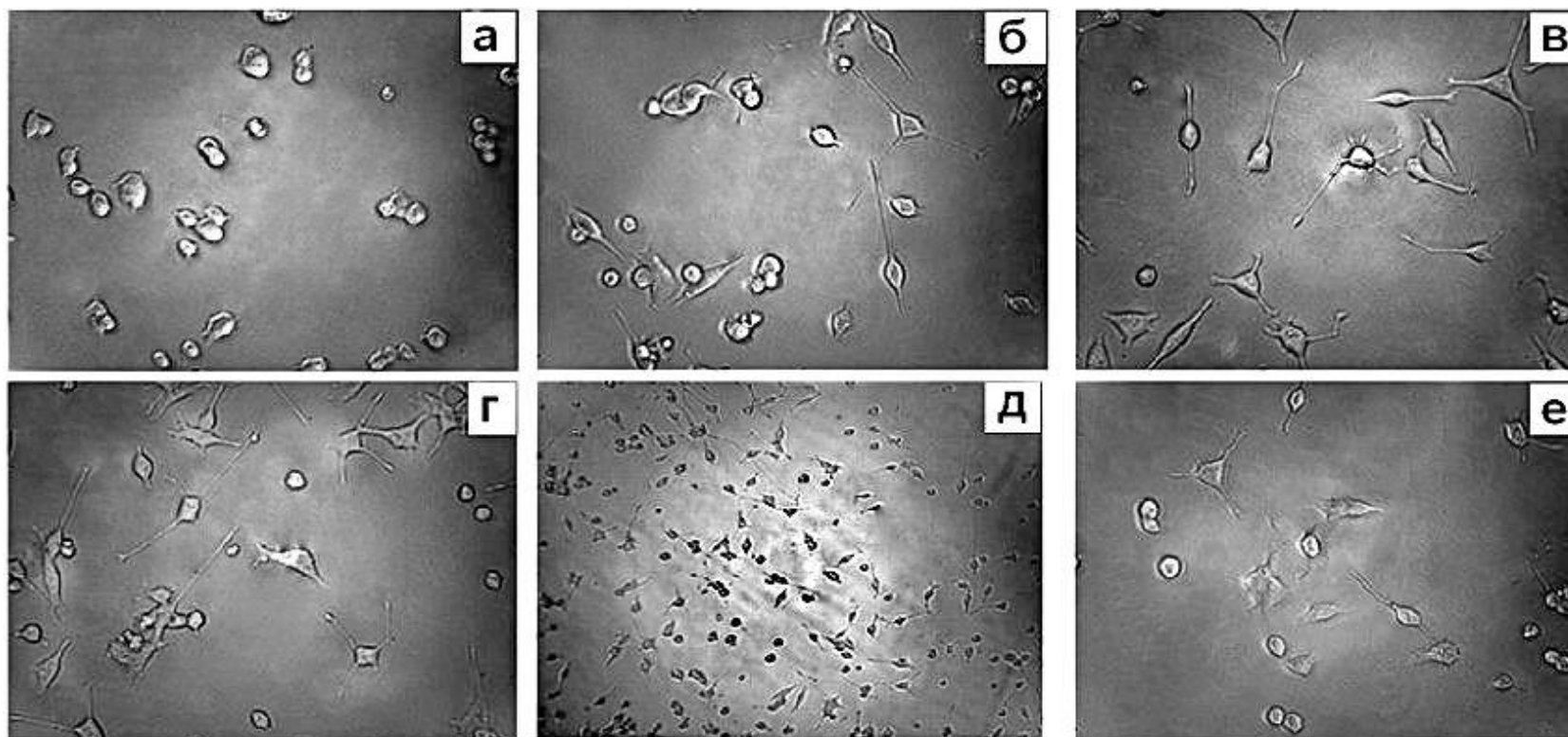


Рисунок 30. Нейритогенез РС12 под действием битанарина в концентрациях: а – 0 (контроль), б – 10 мкМ, в – 1 мкМ, г и д (увеличение в 6,5) - 0,1 мкМ, е - 0,01 мкМ, 48 ч.

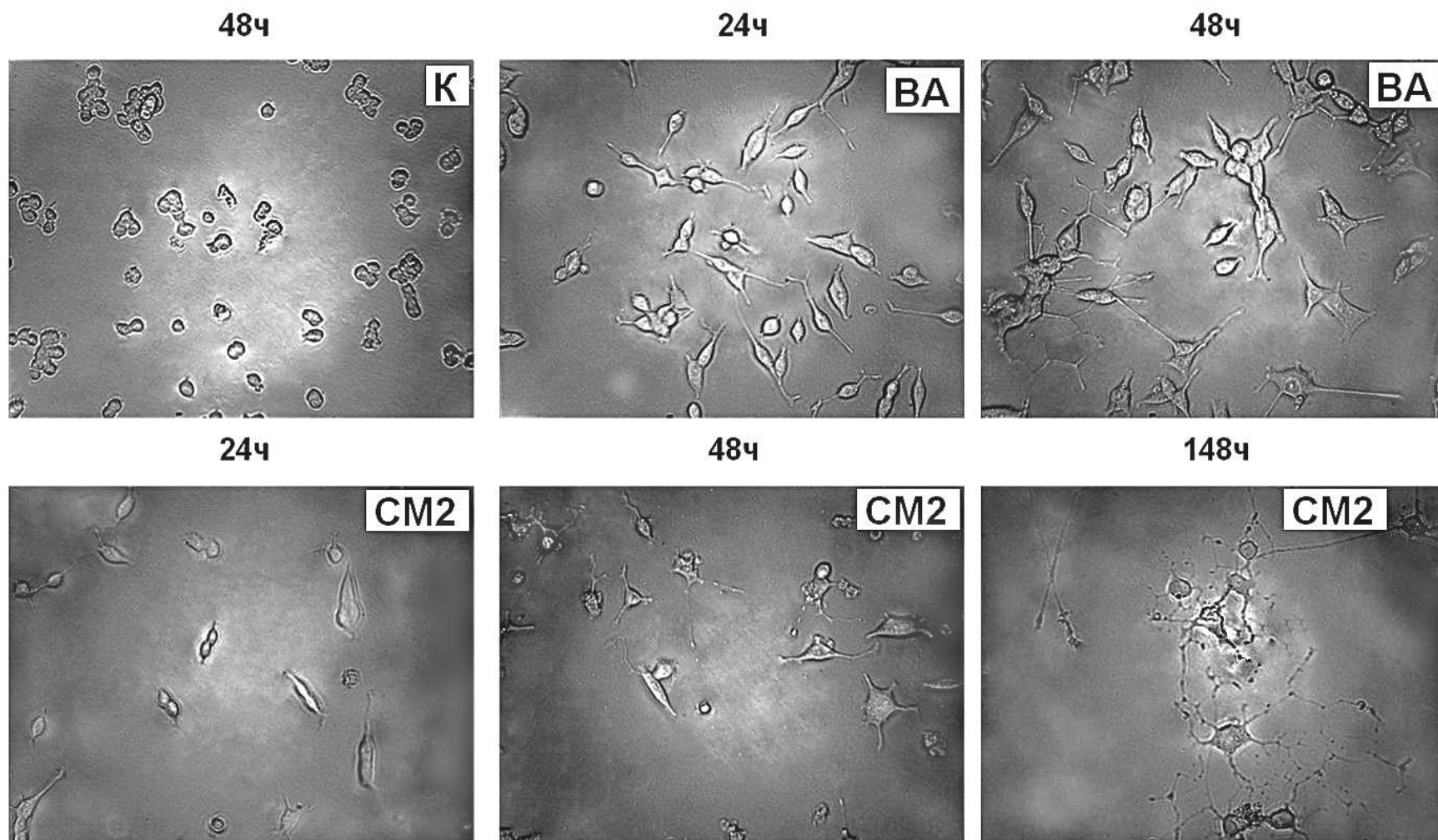


Рисунок 31. Дифференцировка РС12 при разных временах инкубации с ФЛА2 CM2 (нижний ряд) и битанарином (BA, верхний ряд). Концентрация - 10 мкМ. Отмечено время инкубации.

4.3.5 Возможные механизмы нейритогенной активности фосфолипаз ядов змей

Сопоставляя представленные выше данные (табл. 8), можно сделать вывод о неоднозначности влияния различных ФЛА2 на рост нейритов в клетках РС12 и предположить по-крайней мере два механизма нейритогенного воздействия ФЛА2 на клетки:

1) Нейритогенез, зависящий от ферментативной активности ФЛА2.

Ранее уже отмечалось, что ФЛА2 пчелиного яда превосходит по ферментативной активности ФЛА2 кротоксин на 2–3 порядка [189]. ФГД-1 и ФГД-2 имеют ферментативную активность близкую активности кротоксина. Если предположить каталитическую природу нейритогенеза, то активность ФГД-1 и ФГД-2 при гидролизе фосфатидилхолина клеточной мембраны РС12 также будет меньше активности ФЛА2 пчелиного яда на несколько порядков. Это предположение хорошо согласуется с обнаруженной нами способностью ФГД-1 и ФГД-2 вызывать рост нейритов при более высоких концентрациях, чем это было показано для ФЛА2 пчелиного яда. Метод MALDI-масс-спектрометрии также выявил, что катализируемый ФГД-1 и ФГД-2 гидролиз фосфатидилхолина происходит при тех же концентрациях фермента, которые индуцируют рост нейритов (рис. 21) при увеличении концентрации ФГД-1 происходит резкое уменьшение интенсивности сигналов (ионного тока) с отношениями масс к заряду в диапазоне от 720 до 830, соответствующих различным подклассам фосфатидилхолина, и возрастание интенсивности сигналов с отношениями масс к заряду в диапазоне от 480 до 550, соответствующих различным подклассам лизофосфатидилхолина).

Для грибной, пчелиной и ряда других фосфолипаз ферментативная активность необходима для нейритогенеза, который в отличие от нейритогенеза, индуцированного фактором роста нервов, блокируется ингибиторами кальциевых каналов L – типа.

Таблица 8. Свойства ФЛА2 ядов змей.

ФЛА2	Группа	Мол. масса, кДа	Ферментативная активность, ммоль /мин на мкмоль белка	Цитотоксичность. Концентрация белка, при которой гибнет более половины клеток в течение 48 ч, мкМ	Нейритогенез. Максимальное количество клеток с нейритами, длина которых превышает длину тела нейрона, наблюдаемое в диапазоне концентраций 0,01-20 мкМ, инкубация 48 ч, %	Особые свойства
СМ2	IA	13,3	2,22	>1	37,5	
ФГД-1	IIA	27,5	0,56	>10	25	Гетеродимер, состоящий из ферментативно-активной и неактивной субъединиц
ФГД-2	IIA	27,5	0,31	>1	41	
Ti-Nh	IV	14,3	0,000017	-	60	Ингибитор тромбина
Vur-PLA	IIA	13,5		>5	33	Антикоагулянтная, антитромбоцитарная активность
Vur-PLB	IIA	13,5		>10	37	
Битанарин	IIA	27	1,95	-	68	Блокирует нейрональные и мышечные nAHP

Особенную роль в этом нейритогенезе играет лизофосфатидилхолин. Он вовлечен в такие клеточные ответы как активация фосфолипазы C, протеинкиназы C, повышение внутриклеточного Ca^{2+} и воздействие на митоген-активируемую протеинкиназу [143].

Также эффект лизофосфатидилхолина может быть опосредован через сопряженные с G-белком лизофосфатидилхолиновые рецепторы G2A и GPR4, которые индуцируют выброс Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ [115]. Такой механизм действия через кальциевые каналы похож на CAM (cell adhesion molecules)-опосредованный нейритогенез, который в отличие от нейритогенеза, индуцированного ФРН, зависит от активности кальциевых каналов L и N типов, и сопровождается накоплением арахидоновой кислоты (АК). Также в отличие от нейритогенеза, индуцированного ФРН, действие этих ФЛА2 было нечувствительно к ингибитору тирозинкиназ K-252a [115].

2) Помимо нейритогенеза, обусловленного каталитической активностью ФЛА2, имеются данные о нейрональном лиганд-рецепторном воздействии некоторых ФЛА2 [142]. Так, например, Ti-Nh имеет низкую фосфолипазную активность, но довольно хорошо дифференцирует клетки. Из всех исследованных нами фосфолипаз наибольший интерес представляет битанарин. Его ферментативная активность, близка по значению к таковой SM2, однако он обладает самой высокой нейритогенной активностью по сравнению со всеми остальными ФЛА2. Диапазон ее действия самый широкий из представленных здесь ФЛА2 (10^{-5} - 10^{-8} М). Кроме того, в испытанных концентрациях битанарин не обладал цитотоксичностью.

Антитромбиновая активность Ti-Nh и взаимодействие битанарина с nAHP также указывают на способность этих ФЛА2 к белок-белковым взаимодействиям, а следовательно и на существование возможности лиганд-рецепторных взаимодействий. Разнообразие физиологических эффектов

змеиных ФЛА2 связывают с существованием специфических высоко аффинных рецепторов для этих ферментов

Первый тип рецепторов, изначально обнаруженный в мозге, так называемый N (neuronal) тип ФЛА2 рецепторов, проявляет высокую аффинность к большому количеству токсических ФЛА2. Второй тип рецепторов, относится к М (muscle) типу ФЛА2 рецепторов и с высокой аффинностью узнаёт, как токсичные, так и нетоксичные. Этот рецептор хорошо связывается как с ФЛА2 I группы, так и с ФЛА2 из II группы. Известно, что эти два типа рецептора имеют различную субъединичную структуру и располагаются не только исключительно в мозге и мышцах. Предполагается, что эти рецепторы в норме служат мишенями для эндогенных секретируемых ФЛА2, которые могут работать как гормоны или ростовые факторы [128, 137].

Проведенные нами исследования змеиных фосфолипаз вкупе с литературными данными указывают на существование различных механизмов (ферментативного и неферментативного, предположительно, рецепторного) нейритогенного воздействия, детали которых еще предстоит расшифровать.

Для подтверждения гипотезы о нейритогенном воздействии ФЛА2 посредством механизма с участием рецепторных белков мы использовали ингибитор рецепторных тирозинкиназ К-252а. Взаимодействуя с Trk А рецептором этот ингибитор блокирует нейритогенез индуцированный фактором роста нервов. Помимо действия на тирозинкиназный рецептор К-252а влияет также на протеинкиназу С и протеинкиназы, зависимые от циклических нуклеотидов [205, 206]. В экспериментах с использованием битанарина К-252а в концентрации выше 100 нМ блокировал нейритогенез, вызванный этим белком (рис. 32). В качестве контроля был использован ФРН яда кобры, эффект которого также подавлялся К-252а.

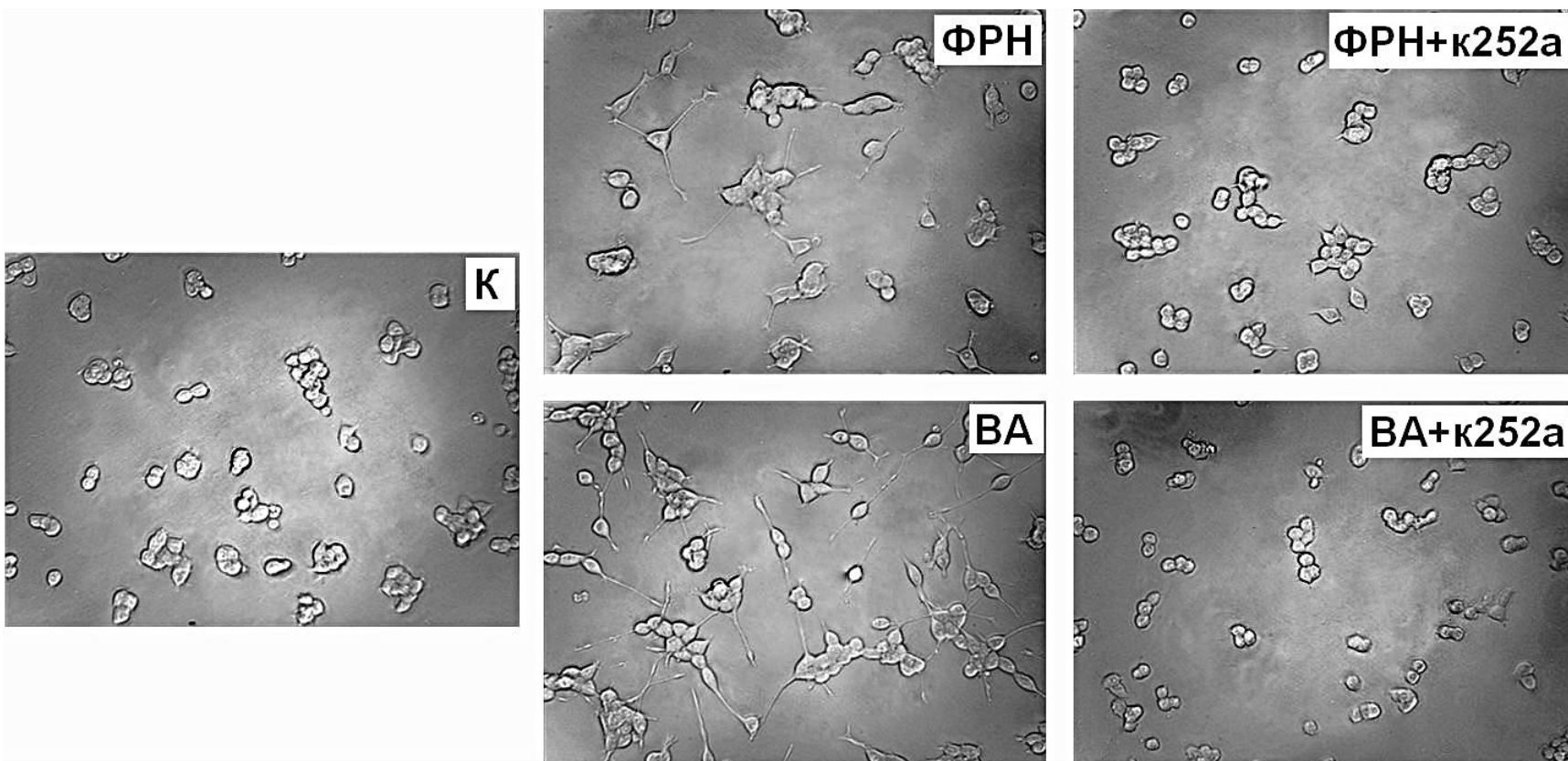


Рисунок 32. Влияние К-252а на дифференцировку РС12, индуцированную фактором роста нервов и битанарином, 48 ч.

На каком этапе K-252a выключает клеточную дифференцировку остаётся пока не ясно. Если проводить аналогию с нейритогенезом, индуцированным ФРН то вполне вероятно, что блокировка происходит на уровне протеинкиназы C, которая принимает участие в передаче сигнала, запускаемого ФРН [152, 205].

5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненной работы нами исследовано действие белков из ядов змей на клеточную культуру PC12 феохромоцитомы крысы. Исследованные белки относятся к наиболее представленным в ядах змей семействам белков: фосфолипазам A2, трехпетельным токсинам и металлопротеиназам.

При изучении металлопротеиназы оксиагина из яда кобры *Naja oxiana* впервые была обнаружена способность металлопротеиназы откреплять клетки PC12 от субстрата с последующей их кластеризацией. Взаимоотношения между клетками и компонентами экстрацеллюлярного матрикса служат основополагающим фактором в событиях, происходящих при инвазии опухоли и в механизмах ангиогенеза. Имеющиеся в литературе данные для родственных металлопротеиназ свидетельствуют, что эти белки селективно ингибировали клеточную адгезию опухолевых клеток. Таким образом, оксиагин может представлять интерес для исследований в области онкологии.

Исследование трехпетельных токсинов показало, что α -нейротоксины ядов кобр не оказывают сколько-нибудь заметного влияния на клетки феохромоцитомы, в то время как цитотоксины проявляют значительную цитотоксичность. Изучение выделенных из яда кобры *Naja kaouthia* природных гетеродимерных форм трехпетельных токсинов, содержащих цитотоксин и α -кобратоксин, показало полное отсутствие цитотоксической активности у гетеродимеров. Это необычное свойство, очевидно возникшее вследствие димеризации, наряду со способностями димеров связываться с нейрональными никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами делает их уникальными инструментами при изучении никотиновых рецепторов и исследовании лиганд-рецепторных взаимодействий.

При изучении фосфолипаз А2 змеиных ядов была установлена их способность вызывать дифференцировку клеток феохромоцитомы крысы РС12. Исследование молекулярных механизмов этого процесса показало наличие двух путей, посредством которых ФЛА2 инициируют рост нейритов. Один из них включает ферментативный гидролиз липидов и проявляется в случае ФЛА2 с высокой ферментативной активностью. Второй путь не зависит от ферментативной активности ФЛА2 и, возможно, включает участие протеин киназ. Что касается совместимости двух путей, то мы не можем полностью исключить наличие второго механизма у ФЛА2, обладающих высокой ферментативной активностью. В практическом плане полученные для ФЛА2 данные могут являться предпосылками для более детального изучения механизмов, приводящих к дифференцировке опухолевых клеток, и послужить фундаментальной основой для создания лекарственных препаратов, направленных на подавление роста опухоли, или же использующих дифференцирующую способность ФЛА2 для лечения нейрональных повреждений или нейродегенеративных заболеваний.

5.1 Выводы

1. Исследовано влияние белков, впервые выделенных из ядов змей и принадлежащих трем различным структурно-функциональным семействам, на пролиферацию клеточной линии PC12 феохромоцитомы крысы. Выявлены два основных эффекта – цитотоксический и дифференцирующий, величина которых зависела от типа и аминокислотной последовательности исследованных белков.
2. Под действием металлопротеиназы из яда кобры *Naja oxiana* клетки PC12 открепляются от подложки и экстрацеллюлярного матрикса, кластеризуются и теряют жизнеспособность.
3. Цитотоксины из яда кобры *Naja kaouthia* утрачивают цитотоксическую активность при образовании дисульфид-связанных гетеродимеров с участием альфа-кобротоксина.
4. Секретируемые фосфолипазы A2 из ядов кобр *Naja kaouthia* и *Naja haje*, а также гадюк *Vipera nikolskii*, *Vipera ursinii renardi* и *Bitis arietans* стимулируют рост нейритов у недифференцированных нейроэндокринных клеток PC12, то есть приводят к их дифференцировке.
5. Сравнительный анализ цитотоксической и дифференцирующей активности фосфолипаз выявил, что из всех испытанных в работе фосфолипаз A2 наибольшей нейритогенной активностью обладает битанарин, практически не проявляющий цитотоксичности.
6. Полученные данные указывают на возможность существования двух механизмов дифференцировки, вызываемой фосфолипазами A2: для первого (вероятно, с участием лизофосфатидилхолина) необходима фосфолиполитическая активность, а второй, в котором, возможно, участвуют протеинкиназы, не зависит от ферментативной активности фосфолипаз A2.

6 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК - арахидоновая кислота

а.о. - аминокислотные остатки

АТФ - аденозинтрифосфат

АХ - ацетилхолин

АХЭ - ацетилхолинэстераза

нАХР - никотиновый ацетилхолиновый рецептор

ВЭЖХ - Высокоэффективная жидкостная хроматография

ЛФХ - лизофосфатидилхолин

МАП - митоген-активируемая протеинкиназа

ТАФ - тромбоцит-активирующий фактор

ТПТ - трёхпетельные токсины

ФЛА2 - фосфолипаза А2

цФЛА2 - цитозольная фосфолипаза

ФЛ - фосфолипиды

ФРН - фактор роста нервов

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

СТХ - кобратоксин

CX - цитотоксин

Kd - константа диссоциации

IC50 - концентрация, оказывающая ингибирование в 50% от максимальной величины

LD50 - доза, вызывающая гибель 50% животных

WTX - слабый нейротоксин моноклевого кобры *Naja kaouthia*

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность всем сотрудникам Лаборатории молекулярной токсикологии и Лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН за содействие и поддержку, в частности, к.х.н. А.В. Осипову за помощь в выделении белков (цитотоксинов, димерных токсинов, металлопротеиназ и фосфолипаз) и д.х.н. И.Е.Кашеверову за помощь в проведении радиолигандного анализа.

Особую благодарность выражаю своему научному руководителю профессору Уткину Ю.Н. за неоценимую помощь в выполнении данной работы, терпение и моральную поддержку. Выражаю признательность за практические советы профессору Цетлину В.И. и д.х.н. Кашеверову И.Е. Отдельное спасибо к.б.н. Киселевскому Д.Б. за помощь в обсуждении результатов работы. Благодарю также всех, кто принимал участие в обсуждении результатов работы.

Выражаю также благодарность проф. Д. Бертрону (HiQScreen, Женева) за электрофизиологические исследования димерных токсинов.

7 ЛИТЕРАТУРА

- [1] Гин А.А., Андржеевская И. Хищники нападают. Книга 2. М.: Вита-Пресс, 2012. 176 с.
- [2] Воздвиженский Д. Яд против яда. Вокруг Света [Электронный ресурс] URL: <http://www.vokrugsveta.ru/vs/article/129/> (дата обращения 05.07.2014).
- [3] Орлов Б.Н., Гелашвили Д.Б. Зоотоксикология (ядовитые животные и их яды). М.: Вышш. шк., 1985. 280 с.
- [4] Calderon L.A, Sobrinho J.C, Zaqueo K.D, de Moura A.A, Grabner A.N, Mazzi M.V, Marcussi S, Nomizo A, Fernandes C.F, Zuliani J.P, Carvalho B.M, da Silva S.L, Stábeli R.G, Soares A.M., Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy, *Biomed. Res. Int.* (2014) 203639.
- [5] Barnard E.A., Wieckowski J., Chiu T.H., Cholinergic receptor molecules and cholinesterase molecules at mouse skeletal muscle junctions, *Nature* 234 (1971) 207-209.
- [6] Konshina A.G, Dubovskii P.V, Efremov R.G., Structure and dynamics of cardiotoxins, *Curr. Protein. Pept. Sci.* 6 (2012) 570-84.
- [7] Gasanov S.E., Dagda R.K., Rael E.D., Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A₂s, and Zn²⁺-dependent Metalloproteinases: Mechanisms of Action and Pharmacological Relevance, *J. Clin. Toxicol.* 4 (2014) 1000181.
- [8] Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C., Neurotoxins affecting neuroexocytosis, *Physiol. Rev.* 80 (2000) 717-766.
- [9] Ranawaka U.K., Lalloo D.G., de Silva H.J., Neurotoxicity in snakebite - the limits of our knowledge, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013) e2302.
- [10] Chang C.C., Neurotoxins with phospholipase A₂ activity in snake venoms, *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B.* 9 (1985) 126-142.
- [11] Nirthanan S., Gwee M.C., Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on, *J. Pharmacol. Sci.* 94 (2004) 1-17.
- [12] Bowman W.C., Neuromuscular block, *Br. J. Pharmacol.* 147 (2006) 277-286.
- [13] Shear T.D., Martyn J.A., Physiology and biology of neuromuscular transmission in health and disease, *J. Crit. Care* 24 (2009) 5–10.

- [14] Fagerlund M.J., Eriksson L.I., Current concepts in neuromuscular transmission, Br. J. Anaesth. 103 (2009) 108–114.
- [15] Karalliedde L., Animal toxins, Br. J. Anaesth. 74 (1995) 319-327.
- [16] Nirthanan S., Charpantier E., Gopalakrishnakone P., Gwee M.C.E., 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. 139 (2003) 832-844.
- [17] Lewis R.L., Gutmann L., Snake venoms and the neuromuscular junction, Sem. Neurol. 24 (2004) 175-179.
- [18] Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 816 с.
- [19] Chiappinelli V.A., Hue B., Mony L., Sattelle D.B., Kappa-bungarotoxin blocks nicotinic transmission at an identified invertebrate central synapse, J. Exp. Biol. 141 (1989) 61–71.
- [20] Tsetlin V., Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins, Eur. J. Biochem. 264 (1999) 281-286.
- [21] Menez A., Functional architecture of animal toxins: A clue to drug design ?, Toxicon 36 (1998) 1557-1572.
- [22] Hodgson W.C., Wickramaratna J.C., In vitro neuromuscular activity of snake venoms, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 29 (2002) 807-814.
- [23] Уткин Ю.Н., Кашеверов И.Е., Цетлин В.И., α -нейротоксины и α -конотоксины – блокаторы никотиновых холинорецепторов, Биоорг. Химия 25 (1999) 805-810.
- [24] Endo T., Tamiya N., Structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms, New York: Pergamon Press (1991) 165-222.
- [25] Уткин Ю.Н., Цетлин В.И., Иванов В.Т., Реокисление восстановленных токсинов яда среднеазиатской кобры *Naja naia oxiana*, Биоорг. Химия 5 (1979) 1033-1044.
- [26] Menez A., Bouet F., Guschlbauer W., Fromageot P., Refolding of reduced short neurotoxins: circular dichroism analysis, Biochemistry 19 (1980) 4166-4172.
- [27] Utkin Y.N., Kukhtina V.V., Kryukova E.V., Chiodini F., Bertrand D., Methfessel C., Tsetlin V.I., “Weak toxin” from *Naja kaouthia* is a nontoxic antagonist of $\alpha 7$ and muscle-type nicotinic acetylcholine receptors, J. Biol. Chem. 276 (2001) 15810-15815.

- [28] Loring R.H., The molecular basis of curarimimetic snake neurotoxin specificity for neuronal nicotinic receptor subtypes, *J. Toxicol. Toxin Rev.* 12 (1993) 105-153.
- [29] Mordvintsev D.Y., Polyak Y.L., Rodionov D.I., Jakubik J., Dolezal V., Karlsson E., Tsetlin V.I., Utkin Y.N., Weak toxin WTX from *Naja kaouthia* cobra venom interacts with both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors, *FEBS J.* 276 (2009) 5065-5075.
- [30] Ржевский Д.И., Мурашев А.Н., Кухтина В.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н., Слабый нейротоксин из яда кобры *Naja kaouthia* снижает артериальное давление у крыс, *Биоорг. Химия* 27 (2001) 221-223.
- [31] Ogay A.Y., Rzhovsky D.I., Murashev A.N., Tsetlin V.I., Utkin Y.N., Weak neurotoxin from *Naja kaouthia* cobra venom affects haemodynamic regulation by acting on acetylcholine receptors, *Toxicon* 45 (2005) 93-9.
- [32] Osipov A.V., Rucktooa P., Kasheverov I.E., Filkin S.Y., Starkov V.G., Andreeva T.V., Sixma T.K., Bertrand D., Utkin Y.N., Tsetlin V.I., Dimeric α -cobratoxin X-ray structure: localization of intermolecular disulfides and possible mode of binding to nicotinic acetylcholine receptors, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 6725-6734.
- [33] Osipov A.V., Kasheverov I.E., Makarova Y.V., Starkov V.G., Vorontsova O.V., Ziganshin R.K., 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.* 283 (2008) 14571-14580.
- [34] Sutcliffe M.J., Dobson C.M., Oswald R.E., Solution structure of neuronal bungarotoxin determined by two-dimensional NMR spectroscopy: calculation of tertiary structure using systematic homologous model building, dynamical simulated annealing, and restrained molecular dynamics, *Biochemistry* 31 (1992) 2962-2970.
- [35] Chiappinelli V.A., Weaver W.R., McLane K.E., Conti-Fine B.M., Fiordalisi J.J., Grant G.A., Binding of native kappa-neurotoxins and site-directed mutants to nicotinic acetylcholine receptors, *Toxicon* 34 (1996) 1243-1256.
- [36] Grant G.A., Luetje C.W., Summers R., Xu X.L., Differential roles for disulfide bonds in the structural integrity and biological activity of kappa-Bungarotoxin, a neuronal nicotinic acetylcholine receptor antagonist, *Biochemistry* 37 (1998) 12166-12171.
- [37] Pawlak J., Mackessy S.P., Sixberry N.M., Stura E.A., Le Du M.H., Ménez R., Foo C.S., Ménez A., Nirthanan S., Kini R.M., Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity, *FASEB J.* 23 (2009) 534-545.

- [38] Roy A., Zhou X., Chong M.Z., D'hoedt D., Foo C.S., Rajagopalan N., Nirthanan S., Bertrand D., Sivaraman J., Kini R.M., Structural and functional characterization of a novel homodimeric three-finger neurotoxin from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra), *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 8302-815.
- [39] 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.* 280 (2005) 42601-42611.
- [40] Joubert F.J., Taljaard N., Snake venoms. The amino-acid sequence of protein S2C4 from *Dendroaspis jamesoni kaimosae* (Jameson's mamba) venom, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360 (1979) 571-580.
- [41] Dufton M.J., Hider R.C., Structure and pharmacology of elapid cytotoxins, *Pharmacol. Ther.* 36 (1988) 1-40.
- [42] Bilwes A., Rees B., Moras D., Ménez R., Ménez A., X-ray structure at 1.55 Å of toxin gamma, a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion into membranes, *J. Mol. Biol.* 239 (1994) 122-136.
- [43] Kumar T.K.S., Jayaraman G., Lee C.S., Arunkumar A.I., Sivaraman T., Samuel D., Yu C., Snake venom cardiotoxins-structure, dynamics, function and folding, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 15 (1997) 431-463.
- [44] Stevens-Truss R., Messer W.S., Hinman C.L., Heart and T-lymphocyte cell surfaces both exhibit positive cooperativity in binding a membrane-lytic toxin, *J. Membr. Biol.* 150 (1996) 113-122.
- [45] Harvey A.L., Marshall R.J., Karlsson E., Effects of purified cardiotoxins from the Thailand cobra (*Naja naja siamensis*) on isolated skeletal and cardiac muscle preparations, *Toxicon* 20 (1982) 379-396.
- [46] Chen Y.H., Hu C.T., Yang J.T., Membrane disintegration and hemolysis of human erythrocytes by snake venom cardiotoxin (a membrane-disruptive polypeptide), *Biochem. Int.* 8 (1984) 329-338.
- [47] Iwaguchi T., Takechi M., Hayashi K., Cytolytic activity of cytotoxin isolated from Indian cobra venom against experimental tumor cells, *Biochem. Int.* 10 (1985) 343-349.
- [48] Chaim-Matyas A., Borkow G., Ovadia M., Isolation and characterization of a cytotoxin P4 from the venom of *Naja nigricollis nigricollis* preferentially active on tumor cells, *Biochem. Int.* 24 (1991) 415-421.
- [49] Wu M., Ming W., Tang Y., Zhou S., Kong T., Dong W., The anticancer effect of cytotoxin 1 from *Naja atra* Cantor venom is mediated by a lysosomal cell death pathway

involving lysosomal membrane permeabilization and cathepsin B release, *Am. J. Chin. Med.* 41 (2013) 643-663.

[50] Feofanov A.V., Sharonov G.V., Astapova M.V., Rodionov D.I., Utkin Y.N., Arseniev A.S., Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage, *Biochem. J.* 390 (2005) 11-18.

[51] Tzeng W.F., Chen Y.H., Suppression of snake-venom cardiotoxin-induced cardiomyocyte degeneration by blockage of Ca^{2+} influx or inhibition of non-lysosomal proteinases, *Biochem. J.* 256 (1988) 89-95.

[52] Su S.H., Su S.J., Lin S.R., Chang K.L., Cardiotoxin-III selectively enhances activation-induced apoptosis of human CD8⁺ T lymphocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 193 (2003) 97-105.

[53] Takechi M., Tanaka Y., Hayashi K., Binding of cardiotoxin analogue III from Formosan cobra venom to FL cells, *FEBS Lett.* 205 (1986) 143-146.

[54] Vincent J.P., Balerna M., Lazdunski M., Properties of association of cardiotoxin with lipid vesicles and natural membranes. A fluorescence study, *FEBS Lett.* 85 (1978) 103-107.

[55] Dufourcq J., Faucon J.F., Specific binding of a cardiotoxin from *Naja mossambica mossambica* to charged phospholipids detected by intrinsic fluorescence, *Biochemistry* 17 (1978) 1170-1176.

[56] Forouhar F., Huang W.N., Liu J.H., Chien K.Y., Wu W.G., Hsiao C.D., Structural basis of membrane-induced cardiotoxin A3 oligomerization, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 21980-21988.

[57] Sue S.C., Rajan P.K., Chen T.S., Hsieh C.H., Wu W., Action of Taiwan cobra cardiotoxin on membranes: binding modes of a beta-sheet polypeptide with phosphatidylcholine bilayers, *Biochemistry* 36 (1997) 9826-9836.

[58] Kuo J.F., Raynor R.L., Mazzei G.J., Schatzman R.C., Turner R.S., Kem W.R., Cobra polypeptide cytotoxin I and marine worm polypeptide cytotoxin A-IV are potent and selective inhibitors of phospholipid-sensitive Ca^{2+} -dependent protein kinase, *FEBS Lett.* 153 (1983) 183-186.

[59] Raynor R.L., Zheng B., Kuo J.F., Membrane interactions of amphiphilic polypeptides mastoparan, melittin, polymyxin B, and cardiotoxin. Differential inhibition of protein kinase C, Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and synaptosomal membrane Na,K-ATPase, and Na⁺ pump and differentiation of HL60 cells, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 2753-2758.

- [60] Jayaraman G., Krishnaswamy T., Kumar S. and Yu C., Binding of nucleotide triphosphates to cardiotoxin analogue II from the Taiwan cobra venom (*Naja naja atra*). Elucidation of the structural interactions in the dATP-cardiotoxin analogue ii complex, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 17869-17875.
- [61] Cervenansky C., Dajas F., Harvey A.L., Karlsson E., Snake Toxins, Pergamon Press (1991) 303-321.
- [62] Eastman J., Wilson E.J., Cerveñansky 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.* 270 (1995) 19694-19701.
- [63] 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* 31 (1992) 4766-4772.
- [64] 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. U.S.A.* 88 (1991) 2437-2440.
- [65] Pringos E., Vignes M., Martinez J., Rolland V., Peptide Neurotoxins that Affect Voltage-Gated Calcium Channels: A Close-Up on ω -Agatoxins, *Toxins (Basel)* 3 (2011) 17-42.
- [66] Possani L.D., Martin B.M., Yatani A., Mochca-Morales J., Zamudio F.Z., Gurrola G.B., Brown A.M., Isolation and physiological characterization of taicatoxin, a complex toxin with specific effects on calcium channels, *Toxicon* 30 (1992) 1343-1364.
- [67] Rajagopalan N., Pung Y.F., Zhu Y.Z., Wong P.T., Kumar P.P., Kini R.M., Beta-cardiotoxin: a new three-finger toxin from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom with beta-blocker activity, *FASEB J.* 21 (2007) 3685-3695.
- [68] Adem A., Asblom A., Johansson G., Mbugua P.M., Karlsson E., Toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* that inhibit the binding of quinuclidinyl benzilate to muscarinic acetylcholine receptors, *Biochim. Biophys. Acta* 968 (1988) 340-345.
- [69] Markland F.S., Swenson J.S., Snake venom metalloproteinases, *Toxicon* 62 (2013) 3-18.
- [70] Moura-da-Silva A.M., Baldo C., Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*, *Toxicon* 60 (2012) 280-289.

- [71] Gutierrez J.M., Rucavado A., Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage, *Biochimie* 82 (2000) 841-850.
- [72] Kamiguti A.S., Zuzel M., Theakston R.D., Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31 (1998) 853-862.
- [73] Bjarnason J.B., Fox J.W., Snake venom metalloendopeptidases: reprotlysins, *Methods Enzymol.* 248 (1995) 345-368.
- [74] Escalante T., Rucavado A., Fox J.W., Gutiérrez J.M., Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases, *J. Proteomics* 74 (2011) 1781-1794.
- [75] Serrano S.M., Kim J., Wang D., Dragulev B., Shannon J.D., Mann H.H., Veit G., Wagener R., Koch M., Fox J.W., The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 39746-39756.
- [76] Costa E.P., Clissa P.B., Teixeira C.F., Moura-da-Silva A.M., Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation, *Inflammation* 26 (2002) 13-17.
- [77] Tanjoni I., Weinlich R., Della-Casa M., Clissa P.B., Saldanha-Gama R.F., Freitas M.S., Barja-Fidalgo C., Amarante-Mendes G.P., Moura-da-Silva A.M., Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells, *Apoptosis* 10 (2005) 851-861.
- [78] Takeda S., Takeya H., Iwanaga S., Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1824 (2012) 164-176.
- [79] Corrêa M.C., Maria D.A., Moura-da-Silva A.M., Pizzocaro K.F., Ruiz I.R., Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin, *Toxicon* 40 (2002) 739-748.
- [80] Costa E.P., Del Debbio C.B., Cintra L.C., Costa L.F., Hamassaki D.E., Santos M.F., Jararhagin, a snake venom metalloprotease-disintegrin, activates the Rac1 GTPase and stimulates neurite outgrowth in neuroblastoma cells, *Toxicon* 52 (2008) 380-384.
- [81] Tang C., Yang R., Liu C., Huang T., Fu W., Differential susceptibility of osteosarcoma cells and primary osteoblasts to cell detachment caused by snake venom metalloproteinase protein, *Toxicon* 43 (2004) 11-20.
- [82] Фосфолипазы. Энциклопедия на Академикe. [Электронный ресурс] URL: <http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/1168972> (дата обращения 8.07.2014).

- [83] Burke J.E., Dennis E.A., Phospholipase A2 biochemistry, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23 (2009) 49-59.
- [84] Kudo I., Murakami M., Phospholipase A2 enzymes, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69 (2002) 3-58.
- [85] Kini R.M., Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes, *Toxicon* 42 (2003) 827-840.
- [86] Schaloske R.H., Dennis E.A., The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 1246-1259.
- [87] Six D.A., Dennis E.A., The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization, *Biochim. Biophys. Acta* 1488 (2000) 1-19.
- [88] Dennis E.A., Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 13057-13060.
- [89] Antonopoulou G., Barbayianni E., Magrioti V., Cotton N., Stephens D., Constantinou-Kokotou V., Dennis E. A., Kokotos G., Structure-activity relationships of natural and non-natural amino acid-based amide and 2-oxoamide inhibitors of human phospholipase A(2) enzymes, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 10257-10269.
- [90] de Oliveira Junior N.G., e Silva Cardoso M.H., Franco O.L., Snake venoms: attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes, *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (2013) 4645-4658.
- [91] Balsinde J., Winstead M.V., Dennis E.A., Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization, *FEBS Lett.* 531 (2002) 2-6.
- [92] Tsuboi K., Sugimoto Y., Ichikawa A., Prostanoid receptor subtypes, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69 (2002) 535-556.
- [93] Moolenaar W.H., Van Meeteren L.A., Giepmans B.N.G., The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling, *BioEssays* 26 (2004) 870-881.
- [94] Prescott S.M., Zimmerman G.A., Stafforini D.M., McIntyre T.M., Platelet-activating factor and related lipid mediators, *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 419-445.
- [95] Seilhamer J., Pruzanski W., Vadas P., Plant S., Miller J., Kloss J., Johnson L., Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 5335-5338.
- [96] Nevalainen T.J., Haapamaki M.M., Gronroos J.M., Roles of secretory phospholipases A₂ in inflammatory diseases and trauma, *Biochim. Biophys. Acta* 1488 (2000) 83-90.

- [97] Triggiani M., Granata F., Oriente A., Gentile M., Petraroli A., Balestrieri B., Marone G., Secretory phospholipases A₂ induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes, *Eur. J. Immunol.* 32 (2002) 67-76.
- [98] Granata F., Petraroli A., Boilard E., Bezzine S., Bollinger J., Del Vecchio L., Gelb M.H., Lambeau G., Marone G., Triggiani M., Activation of cytokine production by secreted phospholipase A₂ in human lung macrophages expressing the M-type receptor, *J. Immunol.* 174 (2005) 464-474.
- [99] Mandal A.K., Zhang Z., Chou J.Y., Mukherjee A.B., Pancreatic phospholipase A₂ via its receptor regulates expression of key enzymes of phospholipid and sphingolipid metabolism, *FASEB J.* 15 (2001) 1834-1836.
- [100] Kini R.M., Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms, *Toxicon* 45 (2005) 1147-1161.
- [101] Mounier C.M., Bon C., Kini R.M., Anticoagulant venom and mammalian secreted phospholipases A₂: protein- versus phospholipid-dependent mechanism of action, *Haemostasis* 31 (2001) 279-287.
- [102] Koduri R.S., Gronroos J.O., Laine V.J., Le Calvez C., Lambeau G., Nevalainen T.J., Gelb M.H., Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 5849-5857.
- [103] Beers S.A., Buckland A.G., Koduri R.S., Cho W., Gelb M.H., Wilton, D.C., The antibacterial properties of secreted phospholipases A₂: a major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pI of the enzyme to allow penetration of the bacterial cell wall, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 1788-1793.
- [104] Satake Y., Diaz B.L., Balestrieri B., Lam B.K., Kanaoka Y., Grusby M.J., Arm J.P., Role of group V phospholipase A₂ in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 16488-16494.
- [105] Enomoto A., Murakami M., Valentin E., Lambeau G., Gelb M.H., Kudo I., Redundant and segregated functions of granule-associated heparin-binding group II subfamily of secretory phospholipases A₂ in the regulation of degranulation and prostaglandin D₂ synthesis in mast cells, *J. Immunol.* 165 (2000) 4007-4014.
- [106] Mitsuishi M., Masuda S., Kudo I., Murakami M., Group V and X secretory phospholipase A₂ prevents adenoviral infection in mammalian cells, *Biochem. J.* 393 (2006) 97-106.
- [107] Svensson C.I., Lucas K.K., Hua X.Y., Powell H.C., Dennis E.A., Yaksh T.L., Spinal phospholipase A₂ in inflammatory hyperalgesia: role of the small, secretory phospholipase A₂, *Neuroscience* 133 (2005) 543-553.

- [108] Rouault M., Bollinger J.G., Lazdunski M., Gelb M.H., Lambeau G., Novel mammalian group XII secreted phospholipase A2 lacking enzymatic activity, *Biochemistry* 42 (2003) 11494-11503.
- [109] Lambeau G., Gelb, M.H., *Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2*, *Annu. Rev. Biochem.* 77 (2008) 495-520.
- [110] Rizzo M.T., Nguyen E., Aldo-Benson M., Lambeau G., Secreted phospholipase A(2) induces vascular endothelial cell migration, *Blood* 96 (2000) 3809-3815.
- [111] Traynor A.E., The relationship between neurite extension and phospholipid metabolism in PC12 cells, *Brain Res.* 316 (1984) 205-210.
- [112] Fairbairn D., The phospholipase of the venom of the cottonmouth moccasin (*Agkistrodon Piscivorus L.*), *J. Biol. Chem.* 157 (1945) 633-644.
- [113] Stephens W.W., Walker J.L., Myers W., The action of cobra poison on the blood: a contribution to the study of passive immunity, *J. Pathol. Bacteriol.* 5 (1898) 279-301.
- [114] Heinrikson R.L., Krueger E.T., Keim P.S., Amino acid sequence of phospholipase A2-alpha from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipases A2 based upon structural determinants, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 4913-4921.
- [115] Ikeno Y., Konno N., Cheon S.H., Bolchi A., Ottonello S., Kitamoto K., Arioka M., Secretory phospholipases A2 induce neurite outgrowth in PC12 cells through lysophosphatidylcholine generation and activation of G2A receptor, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 28044-28052.
- [116] Kuchler K., Gmachl M., Sippl M.J., Kreil G., Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes, *Eur. J. Biochem.* 184 (1989) 249-254.
- [117] Lee H.Y., Bahn S.C., Shin J.S., Hwang I., Back K., Doelling J.H., Ryu S.B., Multiple forms of secretory phospholipase A2 in plants, *Prog. Lipid Res.* 44 (2005) 52-67.
- [118] McIntosh J.M., Ghomashchi F., Gelb M.H., Dooley D.J., Stoehr S.J., Giordani A.B., Naisbitt S.R., Olivera B.M., Conodipine-M, a novel phospholipase A2 isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 3518-3526.
- [119] Murakami M., Kudo I., Secretory phospholipase A2, *Biol. Pharm. Bull.* 27 (2004) 1158-1164.

- [120] Zadori Z., Szelei J., Lacoste M.C., Li Y., Gariépy S., Raymond Y.P., Allaire M., Nabi I.R., Tijssen P., A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity, *Dev. Cell* 1 (2001) 291-302.
- [121] Ghosh M., Tucker D.E., Burchett S.A., Leslie C.C., Properties of the Group IV phospholipase A2 family, *Prog. Lipid Res.* 45 (2006) 487-510.
- [122] Uozumi N., Kume K., Nagase T., Nakatani N., Ishii S., Tashiro F., Komagata Y., Maki K., Ikuta K., Ouchi Y., Miyazaki J., Shimizu T., Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition, *Nature*, 390 (1997) 618-622.
- [123] Bonventre J.V., Huang Z., Taheri M.R., O'Leary E., Li E., Moskowitz M.A., Sapirstein A., Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2, *Nature* 390 (1997) 622-625.
- [124] Uozumi N., Shimizu T., Roles for cytosolic phospholipase A2alpha as revealed by gene-targeted mice, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69 (2002) 59-69.
- [125] Manya H., Aoki J., Watanabe M., Adachi T., Asou H., Inoue Y., Arai H., Inoue K., Switching of platelet-activating factor acetylhydrolase catalytic subunits in developing rat brain, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18567-18572.
- [126] Faure G., Bon C., Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities, *Biochemistry* 27 (1988) 730-738.
- [127] Kondo K., Narita K., Lee C. Y., Chemical properties and amino acid composition of beta1-bungarotoxin from the venom of *Bungarus multicinctus* (Formosan banded krait), *J. Biochem.* 83 (1978) 91-99.
- [128] Lambeau G., Ancian P., Nicolas J.P., Beiboer S.H., Moinier D., Verheij H., Lazdunski M., Structural Elements of Secretory Phospholipases A₂ Involved in the Binding to M-type Receptors *J Biol Chem.* 270 (1995) 5534-5540.
- [129] Fatehi M., Rowan E.G., Harvey A.L., Harris J.B., The effects of five phospholipases A2 from the venom of king brown snake, *Pseudechis australis*, on nerve and muscle, *Toxicon* 32 (1994) 1559-1572.
- [130] Fatehi M., Harvey A.L., Rowan E.G., Characterization of the effects of depolarising toxins on nerve terminal action potentials: apparent block of presynaptic potassium currents, *Toxicon* 36 (1998) 115-129.
- [131] Paoli M, Rigoni M, Koster G, Rossetto O, Montecucco C, Postle A.D., Mass spectrometry analysis of the phospholipase A(2) activity of snake pre-synaptic neurotoxins in cultured neurons, *J. Neurochem.* 111 (2009) 737-744.

- [132] Wei S., Ong W.Y., Thwin M.M., Fong C.W., Farooqui A.A., Gopalakrishnakone P., Hong W., Group IIA secretory phospholipase A2 stimulates exocytosis and neurotransmitter release in pheochromocytoma-12 cells and cultured rat hippocampal neurons, *Neuroscience* 121 (2003) 891-898.
- [133] Juhl K., Efanov A.M., Olsen H.L., Gromada J., Secretory phospholipase A2 is released from pancreatic beta-cells and stimulates insulin secretion via inhibition of ATP-dependent K⁺ channels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310 (2003) 274-279.
- [134] Kini R.M., Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism, *J. Biochem.* 397 (2006) 377-387.
- [135] Valentin E., Lambeau G., Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1488 (2000) 59-70.
- [136] Hanasaki K., Arita H., Phospholipase A2 receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A2, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69 (2002) 71-82.
- [137] Lambeau G., Ancian P., Nicolas J.P., Cupillard L., Zvaritch E., Lazdunski M., A family of receptors for secretory phospholipases A2, *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 190 (1996) 425-435.
- [138] Nakashima S., Ikeno Y., Yokoyama T., Kuwana M., Bolchi A., Ottonello S., Kitamoto K., Arioka M., Secretory phospholipases A2 induce neurite outgrowth in PC12 cells, *Biochem. J.* 376 (2003) 655-666.
- [139] Nakashima S., Kitamoto K., Arioka, M., The catalytic activity, but not receptor binding, of sPLA2 plays a critical role for neurite outgrowth induction in PC12 cells, *Brain Res.* 1015 (2004) 207-211.
- [140] Kalb R., The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons, *Trends Neurosci.* 28 (2005) 5-11.
- [141] Van Kesteren R.E., Spencer, G.E., The role of neurotransmitters in neurite outgrowth and synapse formation, *Rev. Neurosci.* 14 (2003) 217-231.
- [142] Masuda S., Murakami M., Takanezawa Y., Aoki J., Arai H., Ishikawa Y., Ishii T., Arioka M., Kudo I., Neuronal expression and neuritogenic action of group X secreted phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 23203-23214.
- [143] Xu Y., Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine: G protein-coupled receptors and receptor-mediated signal transduction, *Biochim. Biophys. Acta* 1582 (2002) 81-88.

- [144] Asaoka Y., Yoshida K., Sasaki Y., Nishizuka Y., Potential role of phospholipase A2 in HL-60 cell differentiation to macrophages induced by protein kinase C activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 4917-4921.
- [145] Ramoner R., Putz T., Gander H., Rahm A., Bartsch G., Schaber C., Thurnher M., Dendritic-cell activation by secretory phospholipase A2, *Blood* 105 (2005) 3583-3587.
- [146] Sunagar K., Fry B.G., Jackson T.N., Casewell N.R., Undheim E.A., Vidal N., Ali S.A., King G.F., Vasudevan K., Vasconcelos V., Antunes A., Molecular evolution of vertebrate neurotrophins: co-option of the highly conserved nerve growth factor gene into the advanced snake venom arsenal, *PLoS One.* 8 (2013) e81827.
- [147] Kostiza T., Meier J., Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance, *Toxicon* 34 (1996) 787-806.
- [148] Meakin S.O., Shooter E.M., The nerve growth factor family of receptors, *Trends Neurosci.* 15 (1992) 323-331.
- [149] Katzir I., Shani J., Goshen G., Sela J., Ninary E., Dogonovski A.M., Shabashov D., Inoue S., Ikeda K., Hayashi K., Gorinstein S., Deutsch J., Lazarovici P., Characterization of nerve growth factors (NGFs) from snake venoms by use of a novel, quantitative bioassay utilizing pheochromocytoma (PC12) cells overexpressing human *trkA* receptors, *Toxicon* 42 (2003) 481-490.
- [150] Kukhtina V.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N., Inozemtseva L.S., Grivennikov I.A., Two forms of nerve growth factor from cobra venom prevent the death of PC12 cells in serum-free medium, *J. Nat. Toxins* 10 (2001) 9-16.
- [151] Wu Y.Y., Bradshaw R.A., Effect of nerve growth factor and fibroblast growth factor on PC12 cells: inhibition by orthovanadate, *J. Cell Biol.* 121 (1993) 409-422.
- [152] Cremins J., Wagner J.A., Haleboua S., Nerve growth factor action is mediated by cyclic AMP- and Ca²⁺/phospholipid-dependent protein kinases, *J. Cell Biol.* 103 (1986) 887-893.
- [153] Li X.B., Chen M.J., Lei D.Q., Yang B., Liao G.S., Shu Y.Y., Tang S.X., Bioactivities of nerve growth factor from Chinese cobra venom, *J. Nat. Toxins* 8 (1999) 359-362.
- [154] Borkow G., Chaim-Matyas A., Ovadia M., Binding of cytotoxin P4 from *Naja nigricollis nigricollis* to B16F10 melanoma and WEHI-3B leukemia cells, *FEMS Microbiol. Immunol.* 5 (1992) 139-145.
- [155] Yang S., Lu M., Chien C., Tsai C.H., Lu Y.J., Hour T.C., Lin S.R., Induction of apoptosis in human leukemia K562 cells by cardiotoxin III, *Life Sci.* 76 (2005) 2513-2522.

- [156] Chien C.M., Yang S.H., Yang C.C., Chang L.S., Lin S.R., Cardiotoxin III induces c-jun N-terminal kinase-dependent apoptosis in HL-60 human leukaemia cells, *Cell Biochem. Funct.* 26 (2008) 111-118.
- [157] Lin K.L., Su J.C., Chien C.M., Chuang P.W., Chang L.S., Lin S.R., Down-regulation of the JAK2/PI3K-mediated signaling activation is involved in Taiwan cobra cardiotoxin III-induced apoptosis of human breast MDA-MB-231 cancer cells, *Toxicon* 55 (2010) 1263-1273.
- [158] Jain D., Kumar S., Snake venom: a potent anticancer agent, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13 (2012) 4855-4860.
- [159] Chwetzoff S., Tsunasawa S., Sakiyama F., Menez A., Nigexine, a phospholipase A₂ from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. Purification, amino acid sequence, and biological properties, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 13289-13297.
- [160] Kini R.M., Evans H.J., A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂, *Toxicon* 27 (1989) 613-635.
- [161] Costa L.A., Fornari M.C., Berardi V.E., Miles H.A., Diez R.A., In vivo effect of snake phospholipase A₂ (crotoxin + cardiotoxin) on serum IL-1 α , TNF- α and IL-1ra level in humans, *Immunol. Lett.* 75 (2001) 137-141.
- [162] Roberto P.G., Kashima S., Marcussi S., Pereira J.O., Astolfi-Filho S., Nomizo A., Giglio J.R., Fontes M.R., Soares A.M., França S.C., Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from Bothrops jararacussu venom, *Protein J.* 23 (2004) 273-285.
- [163] Kessentini-Zouari R., Jebali J., Taboubi S., Srairi-Abid N., Morjen M., Kallech-Ziri O., Bezzine S., Marvaldi J., El Ayeb M., Marrakchi N., Luis J., CC-PLA2-1 and CC-PLA2-2, two *Cerastes cerastes* venom-derived phospholipases A₂, inhibit angiogenesis both in vitro and in vivo, *Lab. Invest.* 90 (2010) 510-519.
- [164] Bazaa A., Pasquier E., Defilles C., Limam I., Kessentini-Zouari R., Kallech-Ziri O., El Battari A., Braguer D., El Ayeb M., Marrakchi N., Luis J., MVL-PLA₂, a snake venom phospholipase A₂, inhibits angiogenesis through an increase in microtubule dynamics and disorganization of focal adhesions, *PLoS One* 5 (2010) e10124.
- [165] Khunsap S., Pakmanee N., Khow O., Chanhom L., Sitprija V., Suntravat M., Lucena S.E., Perez J.C., Sánchez E.E., Purification of a phospholipase A₂ from *Daboia russelii siamensis* venom with anticancer effects, *J. Venom Res.* 2 (2011) 42-51.
- [166] Cura J.E., Blanzaco D.P., Brisson C., Cura M.A., Cabrol R., Larrateguy L., Mendez C., Sechi J.C., Silveira J.S., Theiller E., de Roodt A.R., Vidal J.C., Phase I and

pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA(2), NSC-624244) in patients with advanced cancer, *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 1033-1041.

[167] Costa LA, Miles H, Araujo CE, González S, Villarrubia VG., Tumor regression of advanced carcinomas following intra- and/or peri-tumoral inoculation with VRCTC-310 in humans: preliminary report of two cases, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 20 (1998) 15-25.

[168] Araki S., Masuda S., Maeda H., Ying M.J., Hayashi H., Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1, *Toxicon* 40 (2002) 535-542.

[169] Du X., Clemetson K.J., Snake venom L-amino acid oxidases, *Toxicon* 40 (2002) 659-665.

[170] Torii S., Naito M., Tsuruo T., Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from western diamondback rattlesnake venom, *Biochemistry* 39 (2000) 3197-3205.

[171] Torii S., Naito M., Tsuruo T., Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from western diamondback rattlesnake venom, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 9539-9542.

[172] Ali S.A., Stoeva S., Abbasi A., Alam J.M., Kayed R., Faiqle M., Neumeister B., Voelter W., Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom, *Arch. Biochem. Biophys.* 384 (2000) 216-226.

[173] Suhr S., Kim D., Identification of the snake venom substance that induces apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 (1996) 134-139.

[174] Ahn M.Y., Lee B.M., Kim Y.S., Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*), *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (1997) 911-919.

[175] Zhang Y., Wang J., Lee W., Wanq Q., Liu H., Zhenq Y.T., Zhang Y., Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309 (2003) 598-604.

[176] Pereira-Bittencourt M., Carvalho D.D., Gagliardi A.R., Collins D.C., The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation, *Anticancer Res.* 19 (1999) 4023-4025.

[177] Sarray S., Srairi N., Luis J., Marvaldi J., El Ayeb M., Marrakchi N., Lebecetin, a C-lectin protein from the venom of *Macrovipera lebetina* that inhibits platelet aggregation and adhesion of cancerous cells, *Haemostasis* 31 (2001) 177-182.

- [178] Nunes E.S., Souza M.A.A., Vaz A.F.M., Silva T.G., Aguiar J.S., Batista A.M., Guerra M.M., Guarnieri M.C., Coelho L.C., Correia M.T., Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines, *Toxicon* 59 (2012) 667-671.
- [179] Kang I., Lee Y., Kim D., A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis, *Cancer Res.* 59 (1999) 3754-3760.
- [180] Markland F.S. Jr., Antitumor action of crotalase, a defibrinogenating snake venom enzyme, *Semin. Thromb. Hemost.* 12 (1986) 284-290.
- [181] Shibuya M., Niitani H., Aoyama A., Kawachi S., Nukariya N., Baba M., Iizuka K., Sakai S., Ohtsuka M., Antimetastatic effect of defibrinogenation with batroxobin depends on the natural killer activity of host in mice, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 116 (1990) 168-172.
- [182] Al-Sadoon M.K., Abdel-Maksoud M.A., Rabah D.M., Badr G., Induction of apoptosis and growth arrest in human breast carcinoma cells by a snake (*Walterinnesia aegyptia*) venom combined with silica nanoparticles: crosstalk between Bcl2 and caspase 3, *Cell Physiol. Biochem.* 30 (2010) 653-665.
- [183] Badr G., Al-Sadoon M.K., Rabah D.M., Therapeutic efficacy and molecular mechanisms of snake (*Walterinnesia aegyptia*) venom-loaded silica nanoparticles in the treatment of breast cancer- and prostate cancer-bearing experimental mouse models, *Free Radic. Biol. Med.* 65 (2013) 175-189.
- [184] Кухтина В.В., Вайзе К., Осипов А.В., Старков В.Г., Титов М.И., Есипов С.Е., Овчиникова Т.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н., MALDI-масс-спектрометрия для идентификации новых белков в яде змей, *Биорг. Химия* 26 (2000) 803-807.
- [185] Shoibonov B.B., Osipov A.V., Kryukova E.V., Zinchenko A.A., Lakhtin V.M., Tsetlin V.I., Utkin Y.N., Oxiagin from the *Naja oxiana* cobra venom is the first reprotolysin inhibiting the classical pathway of complement, *Mol. Immunol.* 42 (2005) 1141-1153.
- [186] Kozlov L.V., Shoibonov B.B., Antonov V.K., Major complement inhibiting factors from the venom of the Central Asian cobra *Naja naja oxiana*, *Biokhimiya* 54 (1989) 1919-1926.
- [187] Gao W., Starkov V.G., Tsetlin V.I., Utkin Y.N., Lin Z., Bi R., Isolation and preliminary crystallographic studies of two new phospholipases A₂ from *Vipera nikolskii* venom, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61 (2005) 189-192.
- [188] Vulfius C.A., Gorbacheva E.V., Starkov V.G., Osipov A.V., Kasheverov I.E., Andreeva T.V., Astashev M.E., Tsetlin V.I., Utkin Y.N., An unusual phospholipase A₂

from puff adder *Bitis arietans* venom - a novel blocker of nicotinic acetylcholine receptors, *Toxicon*. 57 (2011) 787-793.

[189] Radvanyi F., Jordan L., Russo-Marie F., Bon C., A sensitive and continuous fluorometric assay for phospholipase A2 using pyrene-labeled phospholipids in the presence of serum albumin, *Anal. Biochem.* 177 (1989) 103-109.

[190] Bligh E.G., Dyer W.J., A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911-917.

[191] Green L.A., Tischler S.A., Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73 (1976) 2424-2428.

[192] Хухо Ф. Нейрохимия: Основы и принципы, Научное издание. Перевод с англ. М.: Мир, 1990. 384 с.

[193] Шамова О.В., Сакута Г.А., Орлов Д.С., Зенин В.В., Штейн Г.И., Колодкин Н.И., Афонина И.В., Кокряков В.Н., Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре, *Цитология* 49 (2007) 1000-1010.

[194] Osipov A.V., Astapova M.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N., The first representative of glycosylated three-fingered toxins Cytotoxin from the *Naja kaouthia* cobra venom, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 2018-2027.

[195] Mancheva I., Kleinschmidt T., Aleksiev B., Braunitzer G., Sequence homology between phospholipase and its inhibitor in snake venom. The primary structure of phospholipase A2 of vipoxin from the venom of the Bulgarian viper (*Vipera ammodytes ammodytes*, *Serpentes*), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368 (1987) 343-352.

[196] Guillemin I., Bouchier C., Garrigues T., Wisner A., Choumet V., Sequences and structural organization of phospholipase A2 genes from *Vipera aspis aspis*, *V. aspis zinnikeri* and *Vipera berus berus* venom. Identification of the origin of a new viper population based on ammodytin II heterogeneity, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 2697-2706.

[197] Wang Y.M., Lu P.J., Ho C.L., Tsai I.H., Characterization and molecular cloning of neurotoxic phospholipases A2 from Taiwan viper (*Vipera russelli formosensis*), *Eur. J. Biochem.* 209 (1992) 635-641.

[198] Joubert F.J., Taljaard N., Purification, some properties and amino-acid sequences of two phospholipases A (CM-II and CM-III) from *Naja naja kaouthia* venom, *Eur. J. Biochem.* 112 (1980) 493-499.

- [199] Gutierrez J.M., Ownby C.L., Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity, *Toxicon* 42 (2003) 915-931.
- [200] Andriao-Escarso S.H., Soares A.M., Rodrigues V.M., Angulo Y., Diaz C., Lomonte B., Gutierrez J.M., Giglio J.R., Myotoxic phospholipases A₂ in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*, *Biochimie.* 82 (2000) 755-763.
- [201] Soares A.M., Andriao-Escarso S.H., Bortoleto R.K., Rodrigues-Simioni L., Arni R.K., Ward R.J., Gutierrez J.M., Giglio J.R., Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom, *Arch. Biochem. Biophys.* 387 (2001) 188-196.
- [202] Corin R.T., Viskatis L.J., Vidal J.C., Etcheverry M.A., Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells in vitro, *Invest. New Drugs* 11 (1993) 11-15.
- [203] Osipov A.V., Filkin S.Y., Makarova Y.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N., A new type of thrombin inhibitor, noncytotoxic phospholipase A₂, from the *Naja haje* cobra venom, *Toxicon* 55 (2010) 186-194.
- [204] Tsai I.H., Wang Y.M., Cheng A.C., Starkov V., Osipov A., Nikitin I., Makarova Y., Ziganshin R., Utkin Y., cDNA cloning, structural, and functional analyses of venom phospholipases A₂ and a Kunitz-type protease inhibitor from steppe viper *Vipera ursinii renardi*. *Toxicon* 57 (2011) 332-341.
- [205] Hashimoto S., K-252a, a potent protein kinase inhibitor, blocks nerve growth factor-induced neurite outgrowth and changes in the phosphorylation of proteins in PC12h cells, *J. Cell Biol.* 107 (1988) 1531-1539.
- [206] Kase H., Iwahashi K., Nakanishi S., Matsuda Y., Yamada K., Takahashi M., Murakata C., Sato A., Kaneko M., K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142 (1987) 436-440.