JEDY ŽAB ČELEDI *DENDROBATIDAE* – INSPIRACE PRO BIOORGANICKOU CHEMII

JIŘÍ PATOČKA[a], MARIA CRISTINA ARDILA[b] a MARIO VÍCTOR VÁZQUEZ[c]

[a]Katedra toxikologie, Vojenská lékařská akademie, 500 01 Hradec Králové, patocka@pmfhk.cz, [b]Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, A. A. 7495, Santafé de Bogotá, Colombia, mcardila@ciencias.ciencias.unal.edu.co, [c]Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Apartado Aireo 1226, Medellin, Colombia, mvazquez@matematicas.udea.edu.co

Došlo dne 1.VII.1999

Klíčová slova: toxin, žába, *Dendrobatidae*

Úvod

Některé druhy žab mají v kůži, zejména na hřbetě a na hlavě, četné jedové žlázy, z nichž vylučují vazký jedovatý sekret. Mezi nejjedovatější druhy patří drobné žáby čeledi *Dendrobatidae*, které obývají tropické deštné pralesy Jižní a Střední Ameriky. Jejich jasné barvy, ve kterých převládá červená, modrá, žlutá a oranžová, jsou varovným signálem pro eventuelní predátory a zdá se, že žáby mají v přírodě opravdu jen málo nepřátel. Mají však mnoho obdivovatelů mezi lidmi. Jsou pravými skvosty mezi živočichy, a zejména v poslední době se stávají velmi populární i v Evropě, kde jsou předmětem značného zájmu chovatelů[1]. Hrály a snad ještě i hrají významnou úlohu v životě domorodých indiánů, kteří využívají jejich jedů k lovu menších živočichů, zejména ptáků a opic. Jed těchto žab je velmi účinný a bylo v něm nalezeno velké množství heterocyklických dusíkatých látek. Mnohé z nich jsou nejen velmi toxické, ale mají i zajímavou chemickou strukturu a neméně zajímavé farmakologické účinky. Jsou proto předmětem zájmu mnoha farmaceutických firem i akademických pracovišť. Smyslem tohoto článku je podat stručný přehled dosud izolovaných látek a ukázat, jak inspirativní mohou být pro bioorganickou chemii.

Biologie žab čeledi *Dendrobatidae*

Dnes je známo více než sto druhů žab čeledi *Dendrobatidae*, které se dělí do šesti samostatných rodů: *Dendrobates, Phyllobates, Aromobates, Epipedobates, Minyobates a Colosthethus.* Nové druhy jsou však stále nalézány, jak pokračuje biologický výzkum nových oblastí[2].Tyto žáby jsou obyvateli deštných rovníkových pralesů Jižní a Střední Ameriky a jsou rozšířeny od Nikaragui a Kostariky až po jihovýchodní oblast Brazílie a Bolívie. Některé druhy však žijí i mimo deštný prales, na otevřených savanách a také na kakaových plantážích. Jsou to drobní živočichové, od 1,2 do 5 cm, kteří hýří jasnými barvami. Žába *Dendrobates minutus* se svými 12 mm délky patří mezi nejmenší žáby světa. Jejich barevnost nemá mezi obojživelníky obdoby. Jejich oči však mají vždy černou barvu. Žijí podobně jako jiné stromové žáby na poměrně malém prostoru, který je nejčastěji tvořen tůňkami dešťové vody tvořícími se v broméliích, a jejich nejbližším okolím. Zde kladou samičky několik vajíček, od 1 do 15, a o vylíhlé pulce se potom starají většinou samečci. Vývoj od pulce k dospělé žábě trvá dva až tři měsíce a v průběhu roku žába naklade několik snůšek. Dospělé žáby se živí drobným hmyzem, zejména mouchami a komáry[3].

Žáby čeledi *Dendrobatidae* jako zdroj šípového jedu

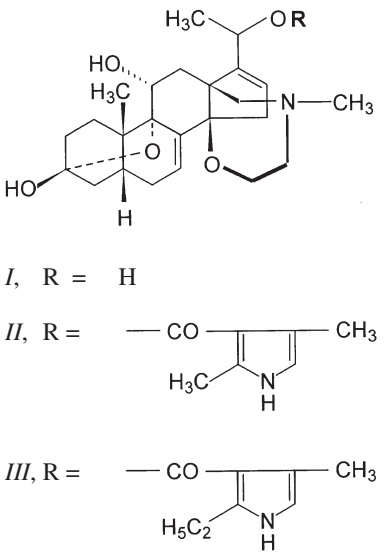
Domorodí obyvatelé deštných pralesů Jižní a Střední Ameriky využívali od pradávna jedovatých sekretů žab čeledi *Dendrobatidae* k napouštění svých šípů, které používají k lovení kořisti pomocí tzv. foukaček. Tento způsob lovu se dosud uchoval mezi kolumbijskými indiány žijícími v oblastech Choco a Noanama. K tomuto účelu je využíváno kolem 20 druhů žab. Za nejjedovatější jsou považovány *Phyllobates terribilis*, *P. aurotoenia* a *P. bicolor.* Žába *P. terribilis,* žijící v Kolumbii v oblasti Chaco je extrémě jedovatá a jed z jedné dospělé žáby je schopen usmrtit až dva tisíce myší[4]. Je to zřejmě nejjedovatější tvor na Zemi. Jen o něco méně jedovatá je žába *P. bicolor*. Obě žáby jsou velké asi 2 cm a mají kovově zlatožlutou barvu, kombinovanou s černou, která je na nohou. Při výrobě šípového jedu postupují domorodci tak, že nabodnou žábu na zašpičatělou větev a otáčejí s ní nad ohněm. Do lepkavé tekutiny, kterou žába vylučuje na kůži, namáčejí potom hroty svých šipek používaných do foukaček. Takto připravené šípy jsou neobyčejně účinné a i větší živočichy jsou schopny usmrtit ve velmi krátké době. Jsou také nebezpečné pro člověka. Svou jedovatost si uchovávají až dva roky. Mechanismus jejich toxického účinku spočívá v modulaci různých typů sodíkových kanálů, spřažených s receptory v buněčných membránách[5]. Smrtící efekt většiny žabích jedů je u savců vyvolán zástavou dechu a selháním srdeční činnosti.

Chemické složení jedů

Po chemické stránce byly až dosud prozkoumány jen některé druhy žab čeledi *Dendrobatidae.* Ve všech případech byly jako toxické či jinak farmakologicky účinné látky identifikovány bazické dusíkaté sloučeniny, charakterizované jako živočišné alkaloidy[6,7]. Jsou to zejména batrachotoxiny, pumiliotoxiny, histrionicotoxiny, gephyrotoxin a epibatidin.

Batrachotoxiny

Batrachotoxiny jsou nejdéle známými a nejvíce prozkoumanými žabími jedy[8]. Jsou to látky se strukturou steroidních alkaloidů a tvoří skupinu podobných sloučenin, jejichž základem je batrachotoxinin A (*I*), poměrně málo toxický (LD_{50} pro myš při s.c. podání je 1 $mg.k^{-1}g$) pregnadienový alkohol s epoxidovým můstkem a oxazepinovým postraním kruhem (obr. 1), jehož estery jako např. batrachotoxin (*II*), homobatrachotoxin



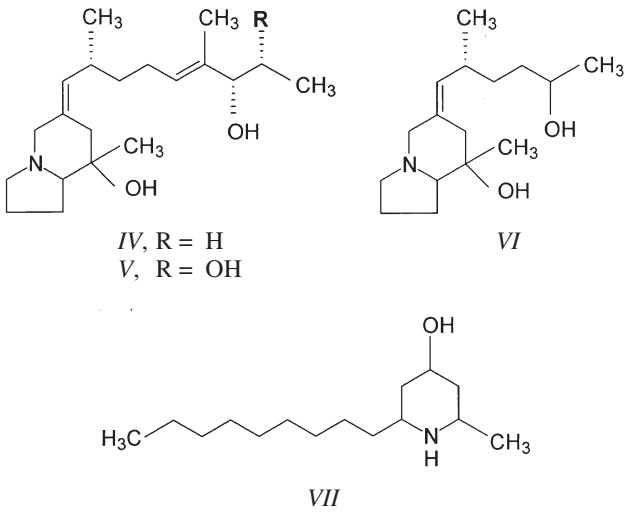
Obr. 1. **Vzorce batrachotoxininu A (*I*), batrachotoxinu (*II*) a homobatrachotoxinu (*III*), hlavních toxických alkaloidů žab rodu Phyllobates**

(*III*), isobatrachotoxin či pseudobatrachotoxin jsou mnohem toxičtější. Nejtoxičtější je batrachotoxin (*II*), tedy batrachotoxinin A, esterifikovaný v pozici 20 kyselinou 2,4-dimethylpyrrol-3-karboxylovou (obr. 1), jehož LD_{50} pro myš při s.c. podání je jen 2 $\mu g.kg^{-1}$ (cit.[9]). Zdrojem batrachotoxinů jsou zejména kolumbijské žáby rodu *Phyllobates* (*P. terribilis, P. bicolor, P. aurotaenia*) a šípový jed z nich připravený, patří mezi nejúčinnější.

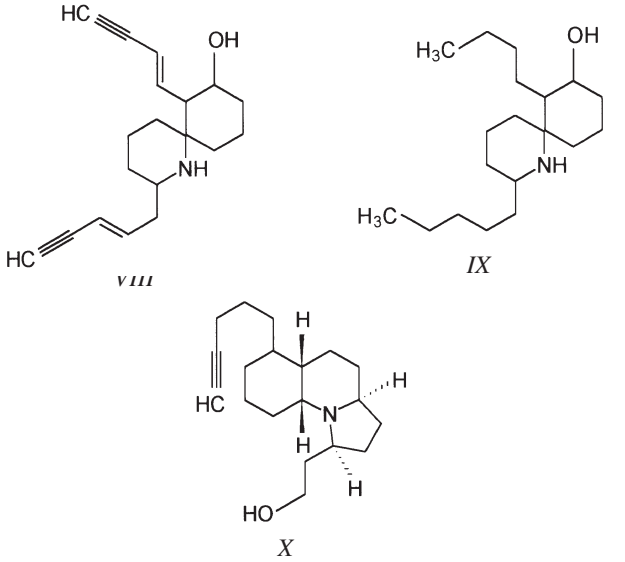
Toxický účinek batrachotoxinů je způsoben jejich vazbou na určité typy sodíkových kanálů savčích buněk, zejména v srdci a mozku, které jejich vlivem zůstávají trvale otevřeny. To vede k depolarizaci excitabilních buněčných membrán[10]. Batrachotoxin je extrémě účinným kardiotoxinem a neurotoxinem[11] s pestrými farmakologickými vlastnostmi. Způsobuje uvolňování acetylcholinu na cholinergních synapsích tím, že destruuje synaptické vesikuly a depolarizuje tak postsynaptickou membránu[10].

P u m i l i o t o x i n y

Dalším typem toxických látek žab čeledi *Dendrobatidae* jsou tzv. pumiliotoxiny, izolované z panamské žáby *Dendrobates pumilio*, nalezené však i v jiných druzích žab rodu *Dentrobates*[12,13], ale také např. v australských žábách čeledi *Myobatrachidae*[14] nebo madagaskarských žábách čeledi *Mantellinae* či brazilských žábách čeledi *Bufonidae*[15] . Jsou to zejména deriváty 1-azabicyklo-[4.3.0]-nonanu, které jsou základem pumiliotoxinů řady A a B (obr. 2), jejichž typickými představiteli jsou pumiliotoxin-A (*IV*) a pumiliotoxin-B (*V*)[12,16] . Pumiliotoxiny řady C jsou deriváty dekahydrochinolinu (pumiliotoxin 267C, *VI*) a pumiliotoxiny řady D jsou deriváty piperidinu (pumiliotoxin 241D, *VII*). Pumiliotoxiny se svou jedovatostí téměř vyrovnají batrachotoxinům. Pumiliotoxinů bylo již izolováno několik desítek[17]. Jejich biologický účinek lze charakterizovat jako kardiotoxický[18] a myotonický[19] a je zprostředkován jejich vazbou na napěťově řízené sodíkové kanály[19,20]. Byla připravena řada syntetických derivátů pumiliotoxinů zajímavých farmakologických vlastností, z nichž některé by mohly nalézt uplatnění v humánní medicině[21]. Mnohé z těchto látek jsou velmi účinnými antagonisty nikotinových receptorů[22].



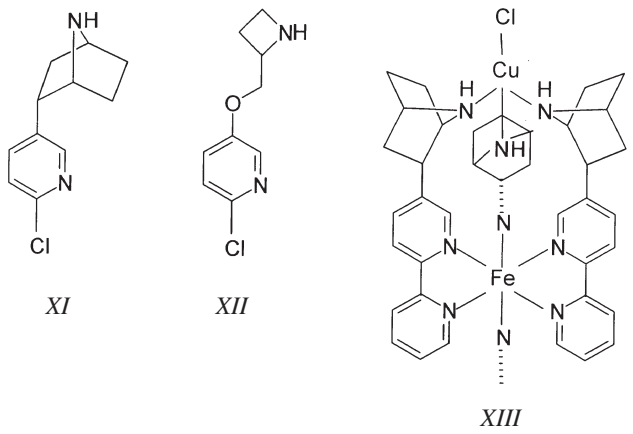
Obr. 2. **Vzorce pumiliotoxinu A (*VI*), pumiliotoxinu B (*V*), pumiliotoxinu 267C (*VI*) a pumiliotoxinu 241D (*VII*), hlavních toxických alkaloidů panamské žáby *Dendrobates pumilio***



Obr. 3. **Vzorce histrionicotoxinu (*VIII*), perhydrohistrionicotoxinu (*IX*) a gephyrotoxinu (*X*), hlavních toxických alkaloidů z jedů kolumbijské žáby *Dendrobates histrionicus***

H i s t r i o n i c o t o x i n y

Jinými typy žabích toxinů jsou histrionicotoxin (*VIII*) a perhydrohistrionicotoxin (*IX*), deriváty 1-azaspiro-[5,5]-undekanu (obr. 3), oba izolované z žáby *Dendrobates histrionicus*[23]. Oba alkaloidy se staly důležitým vědeckým nástrojem pro neurovědy při studiu mechanismu transsynaptického vedení nervového vzruchu[24]. Unikátní struktura azaspiro-[5,5]-undekanového skeletu se stala výzvou pro syntetiky a brzy byly připraveny oba opticky čisté alkaloidy i řada jejich derivátů[25-28].



Obr. 4. **Vzorce epibatidinu (*XI*), hlavního alkaloidu ekvádorské žáby *Epipedobates tricolor*, synteticky připraveného analogu ABT-594 (*XII*) a (pyridylepipatidin)$_3$Cu(I) Fe(II) (*XIII*)**, synteticky připraveného komplexního derivátu epibatidinu s jednomocnou mědí a dvojmocným železem

Histrionicotoxin i perhydrohistrionicotoxin jsou silnými nekompetitivními blokátory nikotinových receptorů a sodíkových, draslíkových a kalciových kanálů neuronálních membrán[29] a blokují tak vedení nervového vzruchu. Perhydrohistrionicotoxin, podobně jako synteticky připravený oktahydrohistrionicotoxin, mají silný lokálně anestetický účinek[30].

G e p h y r o t o x i n

V jedu žaby *Dendrobates histrionicus* byl také nalezen gephyrotoxin (*X*), alkaloid se strukturou indolizidinu[31] (obr. 3). Gephyrotoxin je relativně netoxický, má však řadu zajímavých farmakologických účinků, souvisejících s jeho působením na iontové kanály, spojené s receptory pro acetylcholin[32,33].

E p i b a t i d i n

V jedu ekvádorské žáby *Epipedobates tricolor,* byl nalezen zajímavý derivát 2-chlorpyridinu, nazvaný epibatidin (*XI*) (obr. 4). Jeho farmakologický výzkum prokázal, že látka je dvěstěkrát účinnějším analgetikem než morfin a že jeho analgetická aktivita není blokována naloxonem[34]. Epibatidin je velmi silným a specifickým agonistou centrálních nikotinových receptorů[35] a [^{3}H]-epibatidin[36,37] a zejména [^{125}I]-epibatidin, který je analogem epibatidinu, v němž je atom chloru nahrazen atomem radioaktivního jodu 125 (cit.[38]), jsou ceněny jako specifické radioligandy těchto receptorů, např. pro autoradiografii. Vysoká analgetická aktivita epibatidinu a jeho strukturní podobnost s nikotinem, probudila zájem farmakologů o agonisty nikotinových receptorů, jako o novou skupinu centrálně účinných analgetik a vrhla nové světlo na studium mechanismu vzniku bolesti. V laboratořích americké farmaceutické firmy Abbott byla připravena řada syntetických analogů epibatidinu, z nichž mnohé vykazovaly vysoký analgetický účinek, ale byly méně toxické než výchozí alkaloid[39,40]. Mezi nejúčinnější patří látka označená kodem ABT 594 (*XII*) (obr. 4), která je asi 70krát účinnější než morfin, ale nemá jeho nežádoucí účinky na depresi dýchání a také nevyvolává návyk[41].

Objasnění struktury epibatidinu vyprovokovalo řadu laboratoří k totální syntéze této relativně jednoduché látky[42-48] a blízká příbuznost epibatidinu k nikotinu vzbudila nový zájem o halogenpyridiny[49-53], jako látky zajímavých vlastností[54,55]. Například 2,2'-bipyridiny odvozené od epibatidinu (*XIII*) a podobně i bispyridinové deriváty nikotinu, poskytují stabilní cheláty s řadou kovů[56] a jsou i vhodnými činidly pro syntézu chirálních sloučenin. Chirální bispyridinové komplexy mohou být využity k přípravě definovaných dvourozměrných a třírozměrných struktur, jako jsou micelly, nanotrubičky či monomolekulární filmy[57,58].

Závěr

Jedovatý sekret žab čeledi *Dendrobatidae*, používaný jihoamerickými a středoamerickými indiány k výrobě šípového jedu, je zdrojem řady zajímavých chemických sloučenin, z nichž mnohé patří mezi nejtoxičtější známé látky. Jedná se o pestrou paletu látek, které svou strukturou a přítomností dusíkatých heterocyklů v molekule, připomínají rostlinné alkaloidy a jsou proto někdy označovány jako živočišné alkaloidy. Jsou nejen velmi toxické, ale vykazují i řadu zajímavých farmakologických účinků. Moderní separační a analytické metody ukazují, o jak pestrou skupinu látek se jedná a jak zajímavé chemické struktury zde příroda nabízí. Stávají se proto inspirací pro chemii a vzbuzují zájem organiků a farmaceutických chemiků. Zatím je vědecky prozkoumán jen malý počet druhů těchto zajímavých tvorů deštných pralesů Ameriky a lze proto očekávat, že brzy se výčet těchto látek rozšíří o další, neméně zajímavé sloučeniny. Zájem o ně se totiž v poslední době zvyšuje, protože mnohé druhy jsou ohroženy ničením deštných pralesů a hrozí tak nebezpečí, že vyhynou dříve, než bude moci být prozkoumána jejich biologie a poznány všechny účinné složky jejich jedů.

Autoři děkují panu Krauff Schwanhaeuserovi a slečně Victorii Marini za poskytnuté informace a materiály, kterými bylo možno obohatit tuto práci.

LITERATURA

1. Walls J. G.: *Poison Frogs of the Family Dendrobatidae. Jewels of the Rainforest*. Amazon Com., 1994.
2. Myers C. W., Paolillo A. O., Daly J. W.: Am. Mus. Novitates. *1997*, No. 3002.
3. Myers C. W., Daly J. W.: Am. Mus. Novitates *1980*, No. 2692.
4. Myers C. W., Daly J. W., Malkin B.: Bull. Am. Mus. Nat. Hist. *161*, 311 (1978).
5. Narahashi T.: Ann. N. Y. Acad. Sci. *479*, 133 (1986).
6. Daly J. W.: Fortschr. Chem. Org .Natur. *41*, 205 (1982).
7. Daly J. W., Secunda S. I., Garraffo H. M., Spande T. F., Wisniewski A., Nishihara C., Cover J. F. Jr.: Toxicon *30*, 887 (1992).
8. Albuquerque E. X., Daly J. W., Witkop B.: Science *172*, 995 (1971).
9. Franke S.: *Lehrbuch der Militärchemie*, 2 vyd. Militärverlag der DDR, Berlin 1977.
10. Warnick J. E., Albuquerque E. X., Onur R. Jansson S. E., Daly J., Tokuyama T., Witkop B.: J. Pharmacol. Exp. Ther. *193*, 232 (1975).
11. Daly J. W., Witkop B.: Clin.Toxicol. *4*, 331 (1971).
12. Edwards M. W., Daly J. W., Myers C. W.: J. Nat. Prod. *51*, 1188 (1988).

13. Jain P., Garraffo H. M., Spande T. F., Yeh H. J., Daly J. W.: J. Nat. Prod. *58*, 100 (1995).
14. Daly J. W., Garraffo H. M., Pannell L. K., Spande T. F., Severini C., Erspamer V.: J. Nat. Prod. *53*, 315 (1990).
15. Daly J. W., Highet. R. J., Myers C. W.: Toxicon *22*, 905 (1984).
16. Daly J. W., Myers C. W., Whittaker N.: Toxicon *25*, 1023 (1987).
17. Daly J. W., Brown G. B., Mensah-Dwumah H., Myers C. W.: Toxicon *16*, 163 (1978).
18. Daly J. W,, McNeal E. T., Gusovsky F.: Biochim. Biophys. Acta *930*, 470 (1987).
19. Gusovsky F., Rossignol D. P., McNeal E. T., Daly J. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *85*, 1272 (1988).
20. Daly J. W., Gusovsky F., McNeal E. T., Secunda S., Bell M., Creveling C. R., Nishizawa Y., Overman L. E., Sharp M. J., Rossignol D. P.: Biochem. Pharmacol. *40*, 315 (1990).
21. Daly J. W., McNeal E. T., Overman L. E., Ellison D. H.: J. Med. Chem. *28*, 482 (1985).
22. Warnick J. E., Jessup P. J., Overman L. E., Eldefrawi M. E., Nimit Y., Daly J. W., Albuquerque E. X.: Mol. Pharmacol. *22*, 565 (1982).
23. Daly J. W., Karle I. L., Myers C. W., Tokuyama T., Waters J. A., Witkop B.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. *68*, 1870 (1971).
24. Codel G. A. (Ed.): *The Alkaloids Acad*, sv. 43, str. 185. Press, San Diego 1993.
25. Corey E. J., Arnett J. F., Widiger G. N.: J. Am. Chem. Soc. *97*, 430 (1975).
26. Evans D. A., Thomas E. W., Cheropeck R. E.: J. Am. Chem. Soc. *104*, 3695 (1982).
27. Winkler J. D., Hershberg P. M.: J. Am. Chem. Soc. *111*, 4852 (1982).
28. Thompson C. M.: Heterocycles *34*, 979 (1992).
29. Bartels-Bernal G., Diaz E., Cadena R., Ramos J., Daly J. W.: Cell. Mol. Neurobiol. *3*, 203 (1983).
30. Lovenberg T., Daly J. W.: Neurochem. Res *11*, 1609 (1986).
31. Spande T. F., Daly J. W., Hart D. J., Tsai Y. M., Macdonald T. L.: Experientia *37*, 1242 (1981).
32. Souccar C., Varanda W. A., Daly J. W., Albuquerque E. X.: Mol. Pharmacol. *25*, 384 (1984).
33. Aronstam R. S., Daly J. W., Spande T. F., Narayanan T. K., Albuquerque E. X.: Neurochem. Res. *11*, 1227 (1986).
34. Badio B., Daly J. W.: Mol. Pharmacol. *45*, 563 (1994).
35. Houghtling R. A., Dávila-García M. I., Hurt S. D., Kellar K. J.: Med. Chem. Res. *4*, 538 (1994).
36. London E. D., Scheffel U., Kimes A. S., Kellar K. J.: Eur. J. Pharmacol. *278*, R1 (1995).
37. Perry D. C., Kellar K. J.: J. Pharmacol. Exp. Ther. *275*, 1030 (1995).
38. Dávila-García M. I., Musachio J. L., Perry D. C., Xiao Y., Horti A., London E. D., Dannals R. F., Kellar K. J.: J. Pharmacol. Exp. Ther. *282*, 445 (1997).
39. Barlocco D., Cignarella G., Tondi D., Vianello P., Villa S., Bartolini A., Ghelardini C., Galeotti N., Anderson D. J., Kuntzweiler T. A., Colombo D., Thoma L.: J. Med. Chem. *41*, 674 (1998).
40. Bannon A. W., Decker M. W., Hollady M. W., Curon P., Donelly-Roberts D., Puttfarcken P. S., Bitner R. S., Diaz A., Dickenson A. H., Porsolt R. D., Williams M., Arneric S. P.: Science *279*, 77 (1998).
41. Decker M. W., Bannon A. W., Buckley M. J., Kim D. J. B., Holladay M. W., Ryther K. B., Lin N.-H., Wasicak J. T., Williams M., Arneric S. P.: Eur. J. Pharmacol. *346*, 23 (1998).
42. Pandey G., Bagul T. D., Lakshmaiah G.: Tetrahedron Lett. *35*, 7439 (1994).
43. Okabe K., Natsume M.: Chem. Pharm. Bull. *42*, 1432 (1994).
44. Dehmlow E. V.: J. Prakt. Chem. *337*, 167 (1995).
45. Xu R., Chu G., Bai D.: Tetrahedron Lett. *37*, 1463 (1996).
46. Bai D., Xu R., Zhu X.: Drugs Fut. *22*, 1210 (1997).
47. Giblin G. M. P., Jones C. D., Simpkins N. S.: Synlett *1997*, 589.
48. Aoyagi S., Tanaka R., Naruse M., Kibayashi C.: Tetrahedron Lett. *39*, 4513 (1998).
49. Chen Z., Trudell M. L.: Tetrahedron Lett. *35*, 9649 (1994).
50. Hiroya K., Uwai K., Ogawara K.: Chem. Pharm. Bull. *43*, 901 (1995).
51. Malpass J. R., Hemmings D. A., Wallis A. L.: Tetrahedron Lett. *37*, 3911 (1996).
52. Larsson A. L. E., Gatti R. G. P., Bäckvall J.-E.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 *1997*, 2873.
53. Pavri N. P., Trudell M. L: Tetrahedron Lett. *38*, 7993 (1997).
54. Zoltewicz J. A. Cruskie M. P. Jr.: Tetrahedron *51*, 3103 (1995).
55. Murata N., Sugihara T., Sakamoto T.: Synlett *1997*, 298.
56. Zoltewicz J. A., Cruskie M. P. Jr.: Tetrahedron *51*, 11393 (1995).
57. Karaborni S., Kesselink K., Hilbers P. A. J., Smit B., Karthäuser J., van Os N. M., Zana R.: Nature *266*, 254 (1994).
58. Castro M. J. L., Kovensky J., Cirelli A. F.: Tetrahedron Lett. *38*, 3995 (1997).

J. Patočka[a], M. C. Ardila[b], and M. V. Vásquez[c] *([a]Department of Toxicology, Military Medical Academy, Hradec Králové, [b]Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Columbia, Santafé de Bogotá, Colombia, [c]Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medelín, Colombia):* ***Dendrobatidae*** **Frog Poisons – Inspiration for Bioorganic Chemistry**

Poison dart frogs of family *Dendrobatidae* are colorful small frogs, which live in tropical rainforests of Central and South America. Their poison is used by American Indians in darts for hunting monkeys and other small animals. The poison of the frogs contains toxins which dull nerves and can produce heart and respiratory failure. The poison secreted by some species ranks among the most powerful animal poisons known. Chemically, it contains animal alkaloids with a wide range of pharmacological activities. More than one hundred alkaloids have been identified in extracts from frog skins. They include batrachotoxins (potent activators of sodium channels), pumiliotoxins (showing myotonic and cardiotonic activity), histrionicotoxins (noncompetitive blockers of nicotinic receptor channels and potassium channels), gephyrotoxin (blocking nicotinic acetylcholine receptor-ion channel complex), and epibatidine (extremely potent and selective nicotinic agonist with strong analgetic activity). Chemical structures of frog toxins are a good inspiration for bioorganic chemistry in seeking biologically active compounds.