

УДК 576.367+577.29

DOI 10.34014/2227-1848-2021-2-147-156

АНТИАПОПТОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТОКСИНОВ ПАУКОВ

Е.В. Юрова, Е.А. Белобородов, Е.Д. Газинцева, Д.Е. Сугак, Е.В. Расторгуева

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Пептидные токсины членистоногих, богатые дисульфидными связями, являются одним из потенциальных источников биоактивных веществ. За счет своей структуры токсины обладают повышенной стабильностью и способны связываться с ионными каналами, блокируя их или изменяя механизм стробирования. Ряд токсинов пауков способен связываться с кальциевыми каналами разных типов. Ионы кальция в свою очередь играют важную роль во многих процессах в клетке, одним из которых является апоптоз.

Цель работы – исследовать влияние ряда токсинов – блокаторов ионных каналов наукообразных – на внутриклеточные процессы, связанные с индукцией апоптоза в клетках млекопитающих.

Материалы и методы. В исследовании использовались токсины ω -hexatoxin-Hv1a, ω -theraphotoxin-Nn12a, которые являются ингибиторами кальциевых каналов L- и P/Q-типов соответственно. Индукция апоптоза проводилась с использованием пептида AC-1001H3. Изучалось влияние токсинов на уровень апоптоза, оксидативного стресса и митохондриального потенциала в клетках линии СНО-К1 с использованием методов флуоресцентной микроскопии.

Результаты. Было установлено, что инкубация клеток с токсинами в концентрации 10 нМ и индуктором апоптоза AC-1001H3 приводила к росту внутриклеточной концентрации активных форм кислорода, что должно индуцировать апоптотические механизмы, однако эффект был противоположным. Кроме того, происходило повышение уровня митохондриального потенциала. Несмотря на это использованные токсины блокировали апоптоз, вызванный AC-1001H3, и снижали уровень естественного апоптоза в культуре клеток СНО-К1.

Выводы. Проведенное исследование продемонстрировало антиапоптотический эффект ряда пептидных токсинов членистоногих. Изученные токсины могут найти применение при лечении патологии, связанной с активацией апоптотических механизмов.

Ключевые слова: апоптоз, токсин паука, пептид.

Введение. В последнее время большой интерес вызывают лекарственные препараты на основе пептидов, полученных из природных источников. Пептиды – это универсальные биорегуляторы, которые контролируют большинство биохимических процессов в организме. Они имеют ряд преимуществ перед низкомолекулярными лекарственными средствами: обладают высоким сродством к целевым участкам, большей эффективностью, селективностью и специфичностью [1–4]. Пептидные токсины членистоногих и головоногих являются одним из потенциальных источников ранее неизвестных терапевтических средств [1].

Большинство токсинов членистоногих имеет уникальную структуру и характеризуется наличием как минимум трех дисульфидных мостиков, которые образуют цистиновый узел, придающий токсинам устойчивость к ферментативной деградации, экстремальным значениям рН и перепадам температуры [5, 6].

Подобные пептиды получили название кноттинов. Кноттины членистоногих, как правило, реализуют свой токсический эффект через блокирование проводимости различных типов ионных каналов на плазматической мембране клеток, в частности Na^+ , K^+ и Ca^{2+} , что приводит к нарушению проводимости нервных и мышечных тканей [6, 7].

Особый интерес представляют кальциевые потенциалзависимые ионные каналы, которые разделяются на несколько типов: L-тип (высокопороговые кальциевые каналы (активируются при высоких значениях мембранного потенциала), чувствительные к антагонистам кальция), P-, Q- и N-типы (высокопороговые кальциевые каналы, нечувствительные к антагонистам), R-тип (промежуточный порог активации) и T-тип (низкопороговые кальциевые каналы) [8]. Из многочисленных исследований известно, что ионы Ca^{2+} являются вторичными мессенджерами во многих про-

цессах в клетке, включающих сокращение, секрецию, метаболизм, экспрессию генов [9–11]. Одним из важных процессов, в которых ключевую роль играют ионы кальция, является апоптоз. Перегрузка цитоплазмы ионами кальция способствует индукции апоптоза.

Активация апоптоза наблюдается при ряде патологических состояний. Например, при атопическом дерматите одним из основных механизмов в развитии патологии является апоптоз кератиноцитов [12], а при инфаркте миокарда и инсульте гибель клеток происходит как в результате некроза, так и в результате апоптоза [13]. Таким образом, некоторые токсины членистоногих, являющиеся ингибиторами Ca^{2+} -ионных каналов, потенциально могут блокировать апоптоз и использоваться в качестве терапевтических средств для лечения патологии, вызванной активацией апоптотических процессов.

Цель исследования. Изучить влияние токсинов ω -hexatoxin-Hv1a (*Hadronyche versuta*) и ω -theraphotoxin-Hhn2a (*Haplopelma hainanum*), блокирующих кальциевые ионные каналы, на внутриклеточные процессы, связанные с индукцией апоптоза в клетках млекопитающих.

Материалы и методы. В экспериментах использовались следующие пептиды:

1) AC-1001H3 [16] в качестве индуктора апоптоза; 2) ω -hexatoxin-Hv1a – токсин из группы гексатоксинов паука *Hadronyche versuta* [14], молекулярная мишень – потенциалзависимые кальциевые каналы L-типа; 3) ω -theraphotoxin-Hhn2a – токсин из группы терафотоксинов паука *Haplopelma hainanum* [15], молекулярная мишень – потенциалзависимые кальциевые каналы P- и Q-типов.

Токсины синтезировались на автоматическом пептидном синтезаторе ResPer SL (Intavis, Германия) на основе твердофазного синтеза с использованием защитной Fmoc-группы на смоле TentaGel в соответствии со стандартным протоколом производителя. После синтеза пептиды отщеплялись от смолы коктейлем: TFA (95 %), TIPS (5 %) для Cys-богатых токсинов и TFA (92,5 %), TIPS (5 %) и деионизированная вода (2,5 %) для AC-1001H3. Далее пептиды осаждались холодным МТВЕ и высушивались.

Очистка и анализ последовательностей производился методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе NGC Quest™ 10 Chromatography System (Bio-Rad, США). Анализ проводился с использованием колонки Agilent PL-SAX 4,6×150 мм, 1000 Å, 10 мМ. Длина волны – 280 нм. Элюирование градиентное, элюент А – деионизированная вода с добавлением 20 мМ Трис-НСl; элюент Б – деионизированная вода с добавлением 20 мМ Трис-НСl и 1 М NaCl. Протокол градиентного элюирования: 2,95 мл – 0 % Б; 10 мл – 0–50 % Б; 3,5 мл – 100 % Б. Масс-спектрометрический анализ производился на программно-аппаратном комплексе MALDI-TOF MS серии FLEX (Bruker Daltonics, Германия).

Исследования проводились на клетках китайского хомячка линии CHO-K1 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Россия). Клеточная линия содержалась в среде DMEM/F12 (Панэко, Россия) с добавлением 10 % FBS (PAA Laboratories GmbH, Австрия) и гентамицина в конечной концентрации 50 мкг/мл при 37 °С и 5 % CO₂ в CO₂-инкубаторе MCO-5AC (Sanyo, Япония).

За 24 ч до эксперимента были произведены пассажи в 48-луночные планшеты для достижения экспоненциальной фазы роста. На каждом этапе эксперимента клетки были разделены на 6 групп по три повтора: 1-я группа – контрольная; 2-я группа обрабатывалась 0,35 мМ пептида AC-1001H3; 3-я и 4-я группы инкубировались совместно с AC-1001H3 и 10 нМ каждого токсина; 5-я и 6-я группы обрабатывались только 10 нМ каждого токсина.

Параметры фиксировались через определенный промежуток времени: для апоптоза – 18 ч, для оксидативного стресса, митохондриального потенциала – 3 ч. Далее клетки инкубировались 20 мин при 37 °С с флуоресцентными красителями: апоптоз – YO-Pro 1 (10 мкМ) [17], митохондриальный потенциал – TMRE (50 нМ) [18]. Оксидативный стресс фиксировался с помощью DCFH-DA (10 мкМ) в процессе 20-минутной инкубации в PBS при 37 °С в темноте с последующим отмыванием свежим PBS и в процессе инкубации в течение 10 мин в холодном PBS при +4 °С в темноте [18]. Затем производился анализ с помощью флуоресцентного микроскопа.

В каждом эксперименте анализировалась флуоресценция более 300 клеток. Все изображения были получены с помощью оптической системы, состоящей из Ti-S microscope Nikon, камеры DS-Qi1MC, объектива Nikon S Plan Fluor ELWD 20×0,45, соответствующего фильтра и ПК с пакетом NIS elements 4.0. Количественный анализ изображений выполнялся с помощью программного обеспечения Image J. Скорректированная общая флуоресценция клеток (ОФК) = интегрированная плотность - (площадь выбранной клетки × средняя флуоресценция фоновых показаний) [19].

Каждый эксперимент был выполнен в трех повторах, результаты выражены как $M \pm SD$. Данные об апоптозе, уровнях оксидативного стресса и митохондриального потенциала обрабатывались с использованием дву-

стороннего теста ANOVA с дополнительным тестом Даннета. Различия считались статистически значимыми, если $p < 0,05$.

Результаты. На рис. 1 показано изменение уровня апоптоза в клеточной линии CHO-K1 при действии одиночного проапоптотического пептида AC-1001 H3, одиночных токсинов, ω -hexatoxin-Hv1a (блокатор Ca-каналов L-типа) и ω -theraphotoxin-Hhn2a (блокатор Ca-каналов P- и Q-типов) и при совместном действии проапоптотического пептида и токсинов через 18 ч инкубации. Уровень апоптоза под действием одиночного пептида AC-1001 H3 возрастает по сравнению с контрольной группой, но при совместной инкубации этого пептида с токсинами уровень апоптоза снижается. Под действием одиночных токсинов уровень апоптоза статистически не отличим от контроля.

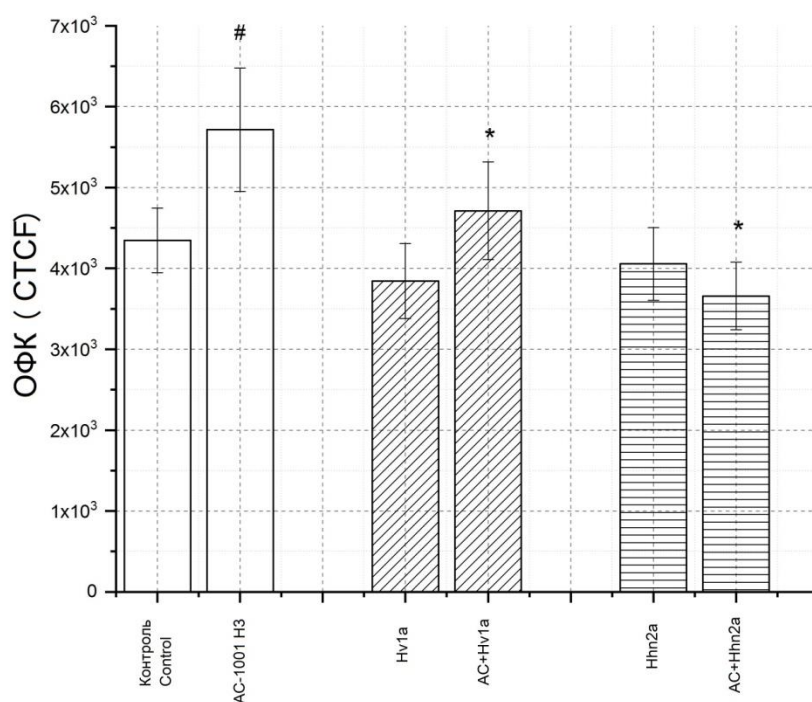


Рис. 1. Влияние проапоптотического пептида AC-1001 H3 в одиночной (0,35 мМ) и совместной инкубации с токсинами (10 нМ) на уровень апоптоза в клеточной линии CHO-K1 через 18 ч: * – достоверное отличие по сравнению с группой с одиночным проапоптотическим пептидом, # – достоверное отличие по сравнению с контрольной группой. Далее обозначения те же

Fig. 1. Effect of the proapoptotic AC-1001 H3 peptide (0.35 mM) and toxins (10 nM) on the apoptosis level in CHO-K1 cells (18 hours after separate or co-intubation): * – difference is significant in comparison with the group treated only with the proapoptotic peptide, # – difference is significant in comparison with the control group. Further, the designations are the same

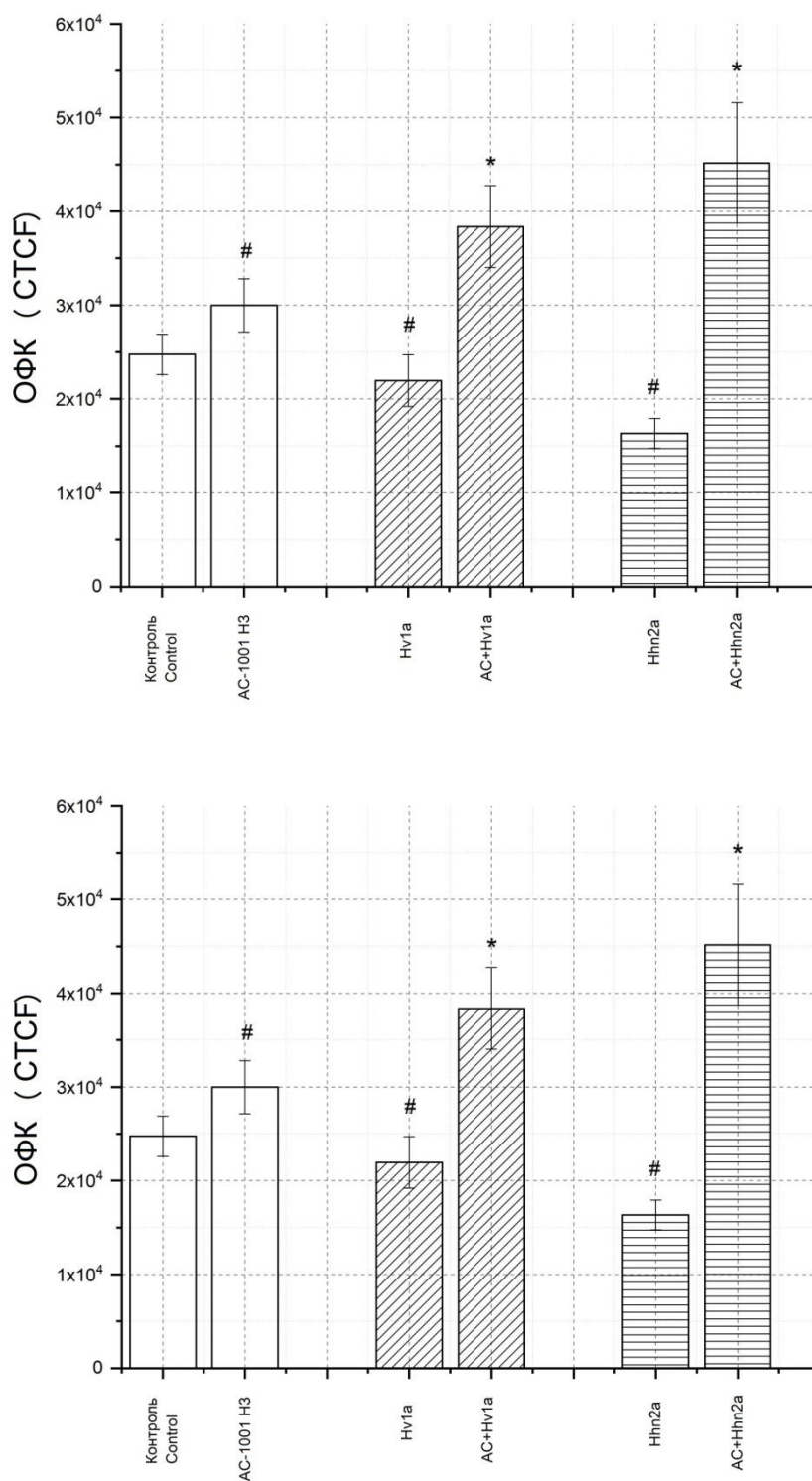


Рис. 2. Влияние проапоптотического пептида AC-1001 H3 в одиночной (0,35 мМ) и совместной инкубации с токсинами (10 нМ) на концентрацию активных форм кислорода в клеточной линии CHO-K1 через 3 ч

Fig. 2. Effect of the proapoptotic AC-1001 H3 peptide (0.35 mM) and toxins (10 nM) on the ROI level in CHO-K1 cells (3 hours after separate or co-intubation)

Рис. 2 демонстрирует изменение уровня внутриклеточного оксидативного стресса при действии проапоптотического пептида AC-1001 НЗ и токсинов ω -hexatoxin-Hv1a и ω -theraphotoxin-Hhn2a при одиночном и совместном действии после 3 ч инкубации. При воздействии проапоптотического пептида

происходит увеличение концентрации АФК по сравнению с контрольной группой, то же происходит и при совместной инкубации с токсинами. При одиночной инкубации с обоими токсинами показатель концентрации, наоборот, опускается ниже контрольного уровня.

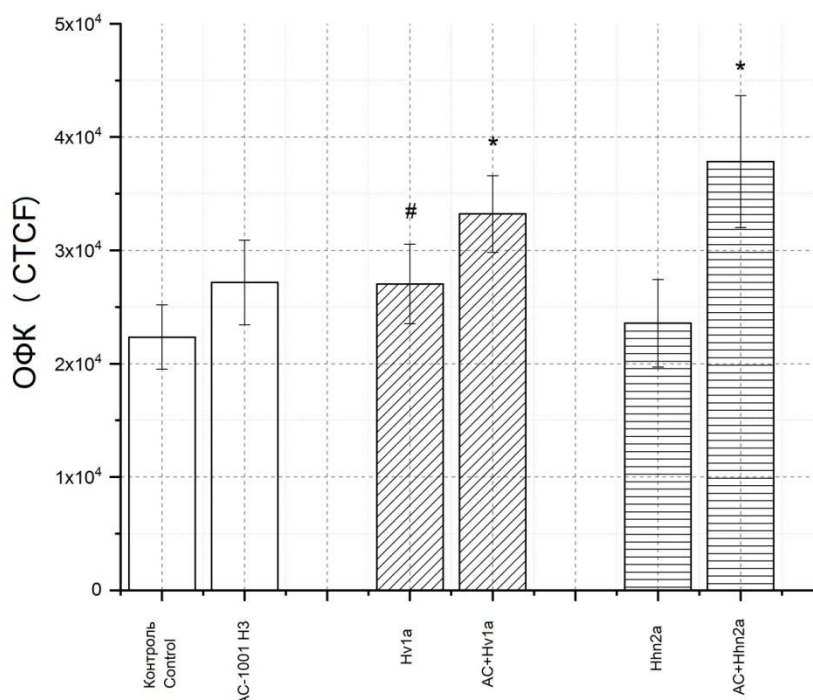


Рис. 3. Влияние проапоптотического пептида AC-1001 H3 в одиночной (0,35 мМ) и совместной инкубации с токсинами (10 нМ) на уровень митохондриального потенциала в клеточной линии CHO-K1 через 3 ч

Fig. 3. Effect of the proapoptotic AC-1001 H3 peptide (0.35 mM) and toxins (10 nM) on the mitochondrial potential level in CHO-K1 cells (3 hours after separate or co-intubation)

На рис. 3 представлено изменение уровня митохондриального потенциала при действии проапоптотического пептида AC-1001 H3 и токсинов ω -hexatoxin-Hv1a и ω -theraphotoxin-Hhn2a при одиночном и совместном действии после 3 ч инкубации. Во всех случаях как при воздействии одного пептида AC-1001 H3, так и при совместной инкубации с токсинами и воздействии отдельных токсинов происходит увеличение уровня митохондриального потенциала по сравнению с контрольной группой, за исключением воздействия одиночного токсина ω -theraphotoxin-Hhn2a, где митохондриальный потенциал остается на уровне контроля.

Обсуждение. В данном исследовании изучалась возможность ингибирования апоптоза через блокирование проводимости кальциевых каналов разных типов с помощью токсинов ω -hexatoxin-Hv1a и ω -theraphotoxin-Hhn2a. Выводы делались на основании уровня апоптоза и показателей связанных с ним внутриклеточных процессов, таких как концентрация активных форм кислорода и митохондриальный потенциал, при воздействии проапоптотического пептида AC-1001 H3, при одновременном действии AC-1001 H3 и токсинов и при действии одиночных токсинов. Проведённые эксперименты продемонстрировали, что ток-

сины способны блокировать апоптоз клеток линии СНО-К1, индуцируемый проапоптотическим пептидом АС-1001 НЗ (рис. 1). Изученные токсины также снижали уровень естественного апоптоза в культуре клеток СНО-К1.

В нашем исследовании апоптоз клеток вызывался пептидом АС-1001 НЗ, который способен индуцировать апоптоз по внутреннему механизму – через активацию каспазы-9 и индукцию активных форм кислорода [16]. Ранее было продемонстрировано, что в активации каспазы-9 может участвовать каспаза-12 [20], которая в свою очередь активируется при посредничестве калпаина и ионов кальция [21]. Внутренней мишенью связывания для пептида АС-1001 НЗ является бета-актин [20], который также может взаимодействовать с кальпaminaми [22]. Таким образом, модель апоптоза на основе проапоптотического пептида АС-1001 НЗ наиболее близко соответствует условиям, при которых может проявиться антиапоптотический эффект исследуемых токсинов, что и было продемонстрировано нашими экспериментами.

Механизм ингибирования апоптоза токсинами ω -hexatoxin-Hv1a и ω -theraphotoxin-Hhn2a может быть связан с блокированием высвобождения ионов кальция из эндоплазматического ретикулума и, соответственно, с предотвращением активации каспазы-9 и каспазы-12. Однако данные по влиянию токсинов на другие изученные параметры свидетельствуют, что механизмы ингибирования апоптоза могут отличаться.

Взаимосвязь ионов кальция и активных форм кислорода является двунаправленным процессом: с одной стороны, повышение уровня оксидативного стресса вызывает приток ионов кальция из внеклеточной среды и из *эндоплазматической сети*, с другой – повышение уровня Ca^{2+} активирует АФК-генерирующие ферменты и образование свободных радикалов [9]. Токсины ω -hexatoxin-Hv1a и ω -theraphotoxin-Hhn2a немного снижали или не влияли на концентрацию активных форм кислорода (рис. 2). В экспериментах, в которых эти токсины использовались совместно с проапоптотическим пептидом АС-1001 НЗ, уровень АФК был значительно выше, чем в контрольной группе и группе, где использо-

вался один АС-1001 НЗ. Интересным является тот факт, что, несмотря на достаточно большое увеличение внутриклеточной концентрации АФК в группах АС+Hv1a и АС+Hhn2a по сравнению с группой контроля и АС-1001 НЗ, уровень апоптоза оставался ниже. Обычно увеличение внутриклеточной концентрации АФК приводит к индукции апоптоза [23]. Увеличение концентрации АФК токсинами в присутствии пептида АС-1001 НЗ можно объяснить тем, что ионы Ca^{2+} , поступая в митохондрии, снижают выработку АФК комплексами I и III дыхательной цепи, соответственно, при блокировании этого процесса генерация АФК митохондриями увеличивается [24]. По нашему мнению, в стрессовых условиях эти токсины существенно препятствуют поступлению Ca^{2+} в митохондрии, что и приводит к увеличению генерации активных форм кислорода.

Уровень АФК в экспериментах со всеми токсинами коррелировал с ожидаемыми изменениями митохондриального потенциала (рис. 3). Увеличение внутриклеточной концентрации АФК сопровождается ростом митохондриального потенциала, если клетка получает сигналы выживания [25], а если в клетке запускаются патологические процессы, увеличение внутриклеточной концентрации АФК сопровождается снижением митохондриального потенциала [26]. В наших экспериментальных условиях токсины индуцировали процессы, необходимые для выживания, и поэтому увеличение внутриклеточной концентрации АФК в присутствии проапоптотического пептида АС-1001 НЗ не приводило к значительной гибели клеток.

Заключение. Проведенное исследование продемонстрировало наличие внутриклеточных мишеней изученных токсинов, способность токсинов ω -hexatoxin-Hv1a и ω -theraphotoxin-Hhn2a препятствовать запуску программы апоптоза в присутствии проапоптотического пептида АС-1001НЗ, а также снижать естественный уровень апоптоза в клеточной культуре СНО-К1. Влияние токсинов на внутриклеточные процессы, ассоциированные с апоптозом, отличается от действия канонических противоапоптотических стимулов. Инкубация клеток с токсинами приводила к росту внутриклеточной концентрации АФК, что

должно индуцировать апоптотические механизмы, однако в нашем случае эффект был противоположным.

Изученные токсины могут найти применение в лечении патологии, связанной с акти-

вацией апоптотических механизмов, например при лечении атопического дерматита и ишемическом повреждении кардиомиоцитов и нейронов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. *Jolene L.L., Michael K.D.* Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg. Med. Chem.* 2018; 26: 2700–2707.
2. *Gentilucci L., Tolomelli A., Squassabia F.* Peptides and Peptidomimetics in Medicine, Surgery and Biotechnology. *Cur. Med. Chem.* 2006; 13: 2449–2466.
3. *Tesaro D., Accardo A., Diaferia C., Milano V., Guillon J., Ronga L., Rossi F.* Peptide-Based Drug-Delivery Systems in Biotechnological Applications: Recent Advances and Perspectives. *Molecules.* 2019; 24: 351.
4. *Stepensky D.* Pharmacokinetics of Toxin-Derived Peptide Drugs. *Toxins.* 2018; 10: 483.
5. *Postic G., Gracy J., Périn Ch., Chiche L., Gelly J.* KNOTTIN: the database of inhibitor cystine knot scaffold after 10 years, toward a systematic structure modeling. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46: D454–D458.
6. *Saez N.J.* Spider-Venom Peptides as Therapeutics. *Toxins.* 2010; 2: 2851–2871.
7. *Lahiani A., Yavin E., Lazarovici P.* The Molecular Basis of Toxins' Interactions with Intracellular Signaling via Discrete Portals. *Toxins.* 2017; 9: 107.
8. *Kondratskiy A., Kondratska K., Skryma R., Prevarskaya N.* Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2015; 1848: 2532–2546.
9. *Görlach A., Bertram K., Hudecova S., Krizanova O.* Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology.* 2015; 6: 260–271.
10. *Kramer I.M.* Intracellular Calcium. In: *Signal Transduction.* 3rd ed. Elsevier Inc.; 2015: 381–439.
11. *Pinto M.C.X.* Calcium signaling and cell proliferation. *Cell. Signal.* 2015; 27: 2139–2149.
12. *Trautmann A., Akdis M., Blaser K., Akdis A.* Role of dysregulated apoptosis in atopic dermatitis. *Apoptosis.* 2000; 5: 425–429.
13. *Krijnen P.A.J., Nijmeijer R., Meijer C.J.L.M., Visser C.A., Hack C.E., Niessen H.W.M.* Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J. Clin. Pathol.* 2002; 55: 801–811.
14. *Chong Y., Hayes J., Sollod B., Wen S., Wilson D., Hains P., Hodgson W., Broady K., King G., Nicholson N.* The ω -atracotoxins: Selective blockers of insect M-LVA and HVA calcium channels. *Biochem. Pharmacol.* 2007; 74: 623–638.
15. *Tang X., Zhang Y., Hu W., Xu D., Tao H., Yang X., Li Y., Jiang L., Liang S.* Molecular Diversification of Peptide Toxins from the Tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) Venom Based on Transcriptomic, Peptidomic, and Genomic Analyses. *J. Proteome Res.* 2010; 9: 2550–2564.
16. *Rabaç A.N., Arruda D.C., Figueiredo C.R., Massaoka M.H., Farias C.F., Tada D.B., Maia V.C., Silva P.I., Girola N., Real F., Mortara R.A., Polonelli L., Travassos L.R.* AC-1001 H3 CDR peptide induces apoptosis and signs of autophagy in vitro and exhibits antimetastatic activity in a syngeneic melanoma model. *FEBS Open Bio.* 2016; 6: 885–901.
17. *Bolaños J.M.G., Morán A.M., Balao da Silva C.M., Rodríguez A.M., Dávila M.P., Aparicio I.M., Tapia J.A., Ferrusola C.O., Peña F.J.* Autophagy and Apoptosis Have a Role in the Survival or Death of Stallion Spermatozoa during Conservation in Refrigeration. *PLoS ONE.* 2012; 7: e30688.
18. *Saenko Y.V., Glushchenko E. S., Zolotovskii I.O., Sholokhov. E., Kurkov A.* Mitochondrial dependent oxidative stress in cell culture induced by laser radiation at 1265 nm. *Laser Med. Sci.* 2016; 31: 405–413.
19. *Khokhlova A., Zolotovskii I., Pogodina E., Saenko Y., Stoliarov D., Vorsina S., Fotiadi A., Liamina D., Sokolovski S., Rafailov E.* Effects of high and low level 1265 nm laser irradiation on HCT116 cancer cells. *Proceedings of the SPIE.* 2019; 10861.
20. *Rao R.V., Castro-Obregon S., Frankowski H., Schuler M., Stoka V., Rio G., Bredesen D., Ellerby H.M.* Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 21836–21842.

21. Xu C., Bailly-Maitre B., Reed J.C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 2656–2664.
22. Potter D. A., Tirnauer J.S., Janssen R., Croall D.E., Hughes C.N., Fiacco K.A., Mier J.W., Maki M., Herman I.M. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J. Cell Biol.* 1998; 141: 647–662.
23. Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell. Res.* 2016; 1863: 2977–2992.
24. Brookes P. S., Yoon Y., Robotham J. L., Anders M. W., Sheu S.-S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004; 287: C817–833.
25. Starkov A.A., Fiskum G. Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J. Neurochem.* 2003; 86: 1101–1107.
26. Kim I., Rodriguez-Enriquez S., Lemasters J.J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007; 462: 245–253.

Поступила в редакцию 19.03.2021; принята 19.05.2021.

Авторский коллектив

Юрова Елена Валерьевна – аспирант, младший научный сотрудник НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: urovaev523@gmail.com, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7484-2671>.

Белобородов Евгений Алексеевич – аспирант, младший научный сотрудник НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: beloborodov.evgeniy.a@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5666-5154>.

Тазинцева Елизавета Дмитриевна – младший научный сотрудник НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: tazintsevaed-ulsu@ya.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2320-0043>.

Сугак Дмитрий Евгеньевич – инженер-исследователь НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: dmitriysugak@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3276-8976>.

Расторгуева Евгения Владимировна – старший преподаватель кафедры общей и клинической фармакологии с курсом микробиологии, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: rastorgueva.e.v@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1518-4677>.

Образец цитирования

Юрова Е.В., Белобородов Е.А., Тазинцева Е.Д., Сугак Д.Е., Расторгуева Е.В. Антиапоптотические свойства токсинов пауков. Ульяновский медико-биологический журнал. 2021; 2: 147–156. DOI: 10.34014/2227-1848-2021-2-147-156.

ANTIAPOPTOTIC POTENTIAL OF SPIDER TOXINS

E.V. Yurova, E.A. Beloborodov, E.D. Tazintseva, D.E. Sugak, E.V. Rastorgueva

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

Arthropod peptide toxins rich in disulfide bonds are one of the potential sources of bioactive substances. Due to their structure, toxins have increased stability and are able to bind to ion channels, blocking them or changing the gating mechanism. Some spider toxins bind to different types of calcium channels. Calcium ions, in turn, play an important role in many cellular processes, namely, apoptosis.

The aim of this paper is to investigate the effect of a number of toxins – arachnid ion-channel blockers in – on intracellular processes associated with the induction of apoptosis in mammalian cells.

Materials and Methods. Toxins ω -hexatoxin-Hv1a, ω -theraphotoxin-Hhn2a were used in the study, as they are inhibitors of L- and P/Q-type calcium channels, respectively. Apoptosis was induced using the

AC-1001H3 peptide. The authors used fluorescence microscopy to study the effect of toxins on the apoptosis level, oxidative stress, and mitochondrial potential in CHO-K1 cells.

Results. The authors observed that incubation of cells with toxins (10 nM) and AC-1001H3 peptide led to increased ROI intracellular concentration, which should have induced apoptotic mechanisms. However, the effect was the opposite. In addition, there was an increase in the mitochondrial potential level. Despite this, the used toxins blocked apoptosis caused by AC-1001H3 and reduced the natural apoptosis level in the CHO-K1 cells.

Conclusion. The study demonstrated the antiapoptotic effect of some arthropod peptide toxins. The studied toxins can be used in the treatment of pathologies associated with the activation of apoptotic mechanisms.

Keywords: apoptosis, spider toxin, peptide.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jolene L.L., Michael K.D. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg. Med. Chem.* 2018; 26: 2700–2707.
2. Gentilucci L., Tolomelli A., Squassabia F. Peptides and Peptidomimetics in Medicine, Surgery and Biotechnology. *Cur. Med. Chem.* 2006; 13: 2449–2466.
3. Tesauro D., Accardo A., Diaferia C., Milano V., Guillon J., Ronga L., Rossi F. Peptide-Based Drug-Delivery Systems in Biotechnological Applications: Recent Advances and Perspectives. *Molecules.* 2019; 24: 351.
4. Stepensky D. Pharmacokinetics of Toxin-Derived Peptide Drugs. *Toxins.* 2018; 10: 483.
5. Postic G., Gracy J., Périn Ch., Chiche L., Gelly J. KNOTTIN: the database of inhibitor cystine knot scaffold after 10 years, toward a systematic structure modeling. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46: D454–D458.
6. Saez N.J. Spider-Venom Peptides as Therapeutics. *Toxins.* 2010; 2: 2851–2871.
7. Lahiani A., Yavin E., Lazarovici P. The Molecular Basis of Toxins' Interactions with Intracellular Signaling via Discrete Portals. *Toxins.* 2017; 9: 107.
8. Kondratskiy A., Kondratska K., Skryma R., Prevarskaya N. Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2015; 1848: 2532–2546.
9. Görlach A., Bertram K., Hudecova S., Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology.* 2015; 6: 260–271.
10. Kramer I.M. Intracellular Calcium. In: *Signal Transduction*. 3rd ed. Elsevier Inc.; 2015: 381–439.
11. Pinto M.C.X. Calcium signaling and cell proliferation. *Cell. Signal.* 2015; 27: 2139–2149.
12. Trautmann A., Akdis M., Blaser K., Akdis A. Role of dysregulated apoptosis in atopic dermatitis. *Apoptosis.* 2000; 5: 425–429.
13. Krijnen P.A.J., Nijmeijer R., Meijer C.J.L.M., Visser C.A., Hack C.E., Niessen H.W.M. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J. Clin. Pathol.* 2002; 55: 801–811.
14. Chong Y., Hayes J., Sollod B., Wen S., Wilson D., Hains P., Hodgson W., Broady K., King G., Nicholson N. The ω -atracotoxins: Selective blockers of insect M-LVA and HVA calcium channels. *Biochem. Pharmacol.* 2007; 74: 623–638.
15. Tang X., Zhang Y., Hu W., Xu D., Tao H., Yang X., Li Y., Jiang L., Liang S. Molecular Diversification of Peptide Toxins from the Tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) Venom Based on Transcriptomic, Peptidomic, and Genomic Analyses. *J. Proteome Res.* 2010; 9: 2550–2564.
16. Rabaç A.N., Arruda D.C., Figueiredo C.R., Massaoka M.H., Farias C.F., Tada D.B., Maia V.C., Silva P.I., Girola N., Real F., Mortara R.A., Polonelli L., Travassos L.R. AC-1001 H3 CDR peptide induces apoptosis and signs of autophagy in vitro and exhibits antimetastatic activity in a syngeneic melanoma model. *FEBS Open Bio.* 2016; 6: 885–901.
17. Bolaños J.M.G., Morán A.M., Balao da Silva C.M., Rodríguez A.M., Dávila M.P., Aparicio I.M., Tapia J.A., Ferrusola C.O., Peña F.J. Autophagy and Apoptosis Have a Role in the Survival or Death of Stallion Spermatozoa during Conservation in Refrigeration. *PLoS ONE.* 2012; 7: e30688.
18. Saenko Y.V., Glushchenko E. S., Zolotovskii I.O., Sholokhov. E., Kurkov A. Mitochondrial dependent oxidative stress in cell culture induced by laser radiation at 1265 nm. *Laser Med. Sci.* 2016; 31: 405–413.
19. Khokhlova A., Zolotovskii I., Pogodina E., Saenko Y., Stoliarov D., Vorsina S., Fotiadi A., Liamina D., Sokolovski S., Rafailov E. Effects of high and low level 1265 nm laser irradiation on HCT116 cancer cells. *Proceedings of the SPIE.* 2019; 10861.

20. Rao R.V., Castro-Obregon S., Frankowski H., Schuler M., Stoka V., Rio G., Bredesen D., Ellerby H.M. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 21836–21842.
21. Xu C., Bailly-Maitre B., Reed J.C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 2656–2664.
22. Potter D.A., Tirnauer J.S., Janssen R., Croall D.E., Hughes C.N., Fiacco K.A., Mier J.W., Maki M., Herman I.M. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J. Cell Biol.* 1998; 141: 647–662.
23. Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell. Res.* 2016; 1863: 2977–2992.
24. Brookes P. S., Yoon Y., Robotham J. L., Anders M. W., Sheu S.-S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004; 287: C817–833.
25. Starkov A. A., Fiskum G. Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J. Neurochem.* 2003; 86: 1101–1107.
26. Kim I., Rodriguez-Enriquez S., Lemasters J.J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007; 462: 245–253.

Received 19 March 2021; accepted 19 May 2021.

Information about the authors

Yurova Elena Valer'evna, Postgraduate Student, Junior Researcher, Institute of Science and Technology named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: urovaev523@gmail.com, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7484-2671>.

Beloborodov Evgeniy Alekseevich, Postgraduate Student, Junior Researcher, Institute of Science and Technology named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: beloborodov.evgeniy.a@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5666-5154>.

Tazintseva Elizaveta Dmitrievna, Junior Researcher, Institute of Science and Technology named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: tazintsevaed-ulsu@ya.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2320-0043>.

Sugak Dmitriy Evgen'evich, Research Engineer, Institute of Science and Technology named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: dmitriysugak@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3276-8976>.

Rastorgueva Evgeniya Vladimirovna, Senior Lecturer, Chair of General and Clinical Pharmacology with a Course in Microbiology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: rastorgueva.e.v@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1518-4677>.

For citation

Yurova E.V., Beloborodov E.A., Tazintseva E.D., Sugak D.E., Rastorgueva E.V. Antiapoptoticheskie svoystva toksinov paukov [Antiapoptotic potential of spider toxins]. *Ulyanovskiy mediko-biologicheskij zhurnal.* 2021; 2: 147–156. DOI: 10.34014/2227-1848-2021-2-147-156 (in Russian).