

ЯД ЗМЕИ *Macrovipera lebetina obtusa* КАК ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ МОДУЛЯТОР В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ САРКОМЫ S-180¹

© 2021 г. N. Ghazaryan^{a, b, *}, N. Movsisyan^{b, c}, J. C. Macedo^d, S. Vaz^d,
N. Ayvazyan^a, L. Pardo^b, E. Logarinho^d

^aLaboratory of Toxinology and Molecular Systematics, Institute of Physiology, Yerevan, 0028 Armenia

^bOncophysiology Group, Max Planck Institute for Experimental Medicine, Göttingen, 37075 Germany

^cGöttingen Graduate School for Neurosciences, Biophysics, and Molecular Biosciences, Göttingen, 37075 Germany

^dAging and Aneuploidy Laboratory, Instituto de Biologia Molecular e Celular, Instituto de Investigação e Inovação em Saúde – i3S, Universidade do Porto, Porto, 4200-135 Portugal

*e-mail: naringhazaryan@gmail.com

Поступила в редакцию 11.06.2020 г.

После доработки 14.08.2020 г.

Принята к публикации 17.08.2020 г.

Macrovipera lebetina obtusa (MLO) – ядовитая змея, эндемичная для Ближнего Востока. В исследовании описан терапевтический потенциал яда змеи MLO. На модели мышей с саркомой S-180 показано, что яд MLO ингибирует рост опухоли на 50%. Обработка эндотелиальных клеток микрососудов кожи человека (HMVEC-D) ядом MLO приводила к повышению экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), в то время как уровень каспазы-8 не изменялся. В клетках HMVEC-D яд MLO индуцировал некроптоз, а не апоптоз. Обработка хориоаллантаической мембраны куриного эмбриона (CAM) ядом MLO вызывала ингибирование FGF2-индуцируемого ангиогенеза на 22%. В целом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что яд MLO обладает сильной цитотоксической активностью. Регулируемый путь некроптической гибели клеток, в который вовлечен яд змеи MLO, может стать новой мишенью в противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: яд змеи, саркома, ангиогенез, некроптоз

DOI: 10.31857/S0026898421030071

ВВЕДЕНИЕ

Саркома мягких тканей – это редкий тип опухоли, развивающейся в тканях, соединяющих, поддерживающих и окружающих другие органы тела [1–3]. К этим тканям относятся мышцы, жир, кровеносные сосуды, нервы, сухожилия и выстилка суставов. Описано более 50 подтипов саркомы мягких тканей. Некоторые типы чаще поражают детей, а другие – в основном взрослых. Эти опухоли часто трудно диагностировать, так как их можно принять за другие типы новообразований [2].

Опухоль может распространяться на соседние или отдаленные органы, создавая опасность для жизни состояние. Опухолевые клетки метастазируют: проникая в кровеносные или лимфатические сосуды, они циркулируют по внутренним сосудам, а затем делятся в другом месте [4–12]. Рост сосудистой сети важен для метастатического

распространения раковой ткани. Процесс формирования новых кровеносных сосудов – ангиогенез – играет важную роль в формировании новой сосудистой сети для доставки питательных веществ, кислорода и иммунных клеток, а также для удаления продуктов жизнедеятельности [4]. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) – мощный ангиогенный агент, присутствующий не только в неопластических, но и в нормальных тканях. Под влиянием определенных цитокинов и других факторов роста семейство белков VEGF появляется в раковой ткани и прилегающей строме и играет важную роль в неоваскуляризации [13, 14].

На сегодняшний день разработано множество антиангиогенных препаратов, но их терапевтическая эффективность ограничена и часто связана с токсичным побочным действием. Обтустатин, известный как KTS (Lys-Thr-Ser), представляет

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

Принятые сокращения: CAM (chick embryo chorioallantoic membrane) – хориоаллантаическая мембрана куриного эмбриона; HMVEC-D (human dermal microvascular endothelial cells) – эндотелиальные клетки микрососудов кожи человека; MLO – *Macrovipera lebetina obtusa*.

собой мономерный дезинтегрин, обнаруженный в яде змеи *Macrovipera lebetina obtusa* (MLO) [15–19]. Этот небольшой пептид оказывает сильное терапевтическое действие на прогрессирующую меланому и, как показано нами недавно, ингибирует рост саркомы S-180 в мышечной модели [20–22]. Онкостатический эффект KTS связан с подавлением процесса ангиогенеза, что, возможно, обусловлено ингибированием интегрина- $\alpha 1\beta 1$ в эндотелиальных клетках [20]. Однако, учитывая результаты наших предыдущих исследований [22] и всей истории использования змеиного яда в медицинских целях, следует сказать, что во многих случаях терапевтический эффект сырого змеиного яда оказывается сильнее, чем его отдельных компонентов.

Яд змеи MLO содержит 38 белков, которые принадлежат к нескольким основным семействам, включая ферменты и белки без ферментативной активности. Насколько нам известно, с биохимической точки зрения змеиный яд представляет собой сложную смесь фармакологически активных белков и полипептидов. Все эти компоненты действуют согласованно. Синергетическое действие белков змеиного яда может усиливать их активность или способствовать распространению токсинов. Синергизм особенно важен для яда змей рода *Vipera*, потому что в нем нет настоящих токсинов (таких как трехпальцевые токсины Elapidae или цитотоксины гадюк). Почти все ферменты *Vipera* представляют собой паралоги ферментов млекопитающих. В большинстве случаев ферменты змеиного яда действуют как мономеры; в таком виде они проявляют оптимальные фармакологические свойства и вносят свой вклад в токсичность. Но в случае яда змей рода *Vipera* они образуют комплексы с другими неферментными белками для достижения более высокой эффективности за счет синергии. Так, известно, что очищенные компоненты яда змеи MLO проявляют менее 1% токсичности “полного многокомпонентного яда” [19].

Нами проанализировано влияние сырого яда змеи MLO на экспрессию белка VEGF и нескольких каспаз в мышечной модели саркомы S-180. Кроме того, исследован антиангиогенный эффект зметного яда в хориоаллантаической мембране куриного эмбриона (CAM) *in vivo*, а также в эндотелиальных клетках микрососудов кожи человека (HMVEC-D) *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использован яд змеи MLO (“Toctris Bioscience”, Великобритания). Первичные эндотелиальные клетки микрососудов кожи взрослого человека (HMVEC-D) получены из Американской коллекции клеточных культур (ATCC, США), их культивирование проводили в

полной базовой среде-131 для эндотелиальных клеток с добавкой стимуляторов роста микрососудов, содержащей 15% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) (все препараты компании “Invitrogen”, США). Во всех экспериментах использовали клетки HMVEC-D ранних пассажей (3–6).

Рекомбинантный белок VEGF человека (hrVEGF), использованный для индукции пролиферации клеток HMVEC-D *in vitro*, и коллаген IV были приобретены у компании “Sigma” (США); фактор роста фибробластов (bFGF), использованный для стимуляции ангиогенеза в САМ-анализе *in vivo*, – у “Immuno Tools” (Германия).

Лизис тканей. Ткани опухолей (50 мкг) лизировали в 2 мл буфера, содержащего 0.5% Triton X-100, 25 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 75 мМ NaCl, 2.5 мМ EDTA, 0.5 мМ PMSF, 0.5 мМ DTT, 5 мМ NaF, смесь ингибиторов протеаз (“Roche”, Швейцария). Для эффективной гомогенизации ткани и высокого выхода белка в буфер для лизиса добавляли стеклянные шарики. Образцы энергично встряхивали с частотой 30 ударов в секунду в течение 3 мин при комнатной температуре. В случае неполной гомогенизации (кусочки ткани все еще были видны в образцах) этап гомогенизации повторяли. Гомогенизированные образцы центрифугировали при $13545 \times g$ в течение 30 мин при комнатной температуре. При необходимости этап центрифугирования повторяли и собирали супернатант.

Определение концентрации и молекулярной массы белка. Процедуры разделения и анализа белков подробно описаны нами ранее [21], далее дано их краткое описание.

Электрофорез в SDS-ПААГ и иммуноблоттинг. Концентрацию белков в лизатах тканей определяли с помощью набора Pierce™ BCA Protein Assay kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Белки разделяли электрофорезом в ПААГ в денатурирующих условиях (SDS-ПААГ). После разделения белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Novex, 0.2 мкм, с использованием прибора Pierce Power Blot Station и кассеты для блоттинга (“Thermo Fisher Scientific”) при напряжении 25 В и силе тока 3 А в течение 13 мин. После электропереноса мембрану промывали деионизированной водой и инкубировали в течение 1.5 ч в блокирующем буфере, содержащем 0.1% казеина (“Roche”) в TBST (0.02 М Трис-НСl, рН 7.5, 0.15 М NaCl, 0.1% Tween 20).

Белки VEGF и каспазы детектировали, используя в качестве первичных моноклональные мышиные антитела против VEGF (sc-7269; “Santa Cruz Biotechnology, Inc.”, США) и каспазы-8 (sc-16696, “Santa Cruz Biotechnology, Inc.”) в разведении 1 : 1000, прокаспазы-9 и (sc-133109; “Santa Cruz Biotechnology, Inc.”) в разведении 1 : 500,

расщепленной каспазы-3 (# 9661S; “Cell Signaling Technology”, США) в разведении 1 : 1000, каспазы-5 (sc-393346; “Santa Cruz Biotechnology, Inc.”) в разведении 1 : 500 в блокирующем буфере. Инкубацию проводили при осторожном перемешивании в течение ночи при 4°C. После пятикратной промывки деионизированной водой и 5-минутной отмывки в TBST мембраны в течение 1 ч инкубировали с конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) бараньими антителами против IgG мыши (NA931, “GE Healthcare”, США), разведенными в соотношении 1 : 8000 в блокирующем буфере. После промывки на мембрану наносили хемилюминесцентный субстрат HRP (“Thermo Fisher Scientific”) и через 5 мин детектировали сигнал с помощью системы ChemiDoc XRS (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, США). Изображения получали с использованием программного обеспечения Quantity One 1-D Analysis v4.6.9 (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”). Обработку и анализ изображений проводили в программе ImageLab 4.0 (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”).

Денситометрический анализ. Изменения содержания целевого белка оценивали по результатам денситометрического анализа сигнала хемилюминесценции, проведенного с помощью программного обеспечения Image Lab 4.0. Измеряли общую интенсивность каждого сигнала иммуноблотинга после выбора соответствующей полосы с помощью функции “Lane and Bands” (“дорожка и полосы”) и корректировки выбранной области с помощью функции “Lane profile” (“профиль дорожки”). Фоновый сигнал вычитали из значения сигнала в образце по методу “катыщегося диска” (размер диска 8 мм). Молекулярную массу белка определяли с помощью функции “MW”. Нормализованную общую интенсивность каждого сигнала рассчитывали путем деления измеренной общей интенсивности сигнала целевого белка на соответствующее значение сигнала для актина.

Мышиная модель саркомы S-180 и введение препаратов. Клетки саркомы S-180 трансплантировали подкожно в правую подмышечную впадину каждой мыши. Когда опухоль выросла до объема 100–300 мм³, мышей случайным образом делили на 2 группы (по 5 мышей в каждой): контрольную и опытную (обработанную ядом змеи MLO). В контрольной группе мышам вводили PBS, в опытной группе каждое животное получало небольшие дозы яда MLO (10 мкг/мышь). Растворы яда готовили в PBS и ежедневно вводили внутрь опухолей (50 мкл) в течение 5 суток; через 24 ч после последнего введения всех животных взвешивали и умерщвляли.

Все процедуры выполнены в соответствии с “Правилами по уходу за животными” Института физиологии (Institute of Physiology, Армения) и этическими принципами IACUC по обезглавли-

ванию неанестезированных мышей и крыс (<http://www.utsouthwestern.edu/utsw/cda/dept238828/files/469088.html>).

Определение противоопухолевой активности яда MLO *in vivo*. Противоопухолевую активность яда MLO выражали как степень ингибирования (%) роста опухоли и рассчитывали по формуле:

$$[(A - B)/A] \times 100\%, \quad (1)$$

где A и B – средняя масса опухоли в контрольной и опытной группах мышей соответственно.

Анализ хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона (САМ-анализ). САМ-анализ проводили для оценки антиангиогенной активности обтустатина. Оплодотворенные куриные яйца (*Gallus gallus*) инкубировали в горизонтальном положении при 37.8°C в увлажненной атмосфере и обозначали как эмбриональные (Е). На третьи сутки инкубации (Е3) в оболочке делали квадратное окно и удаляли 2–2.5 мл белка, чтобы дать развивающейся САМ отслоиться. Окно заклеивали прозрачной липкой лентой, и яйца возвращали в инкубатор. На 10 сутки инкубации (Е10) в стерильных условиях на поверхность САМ помещали силиконовое кольцо диаметром 3 мм, вводили в него раствор, содержащий в качестве индуктора ангиогенеза bFGF в концентрации 400 нг/яйцо (контрольная группа; N = 13), или тот же раствор с 3.5 мкг/яйцо яда MLO (опытная группа; N = 18). Яйца герметично закрывали и возвращали в инкубатор еще на 72 ч. Проводили три независимых эксперимента. После удаления кольца САМ вырезали из эмбрионов и фотографировали *ex ovo* под стереоскопом Olympus, SZX16 в сочетании с камерой DP71 (“Olympus”, Япония) при 20-кратном увеличении. Число новых сосудов (диаметр < 15 мкм), растущих в радиальном направлении к области кольца, определяли вслепую.

Детекция мертвых клеток с помощью зеленого флуоресцентного красителя IncuCyte Cytotox. Реагент IncuCyte Cytotox green (“Sartorius”, США) использовали в соответствии с инструкциями производителя для количественного определения мертвых клеток после 24-часовой обработки ядом змеи MLO (3.5 мкг/мкл). Эксперименты проводили в трех повторах. Яд змеи MLO разводили в PBS. Пролиферацию клеток HMVEC-D индуцировали обработкой hrVEGF в концентрации 50 нг/мл.

Анализ жизнеспособности клеток и апоптоза. Жизнеспособность клеток и апоптоз определяли количественно с использованием мультиплексного анализа ApoLive-Glo (“Promega”, США) в соответствии с инструкциями производителя после 24-часовой обработки ядом змеи MLO (1 мкг/мкл). Мультиплексный анализ ApoLive-Glo™ используют для выяснения механизма гибели клеток, так как с его помощью можно в одной лунке измерить как количество жизнеспособных клеток (маркер

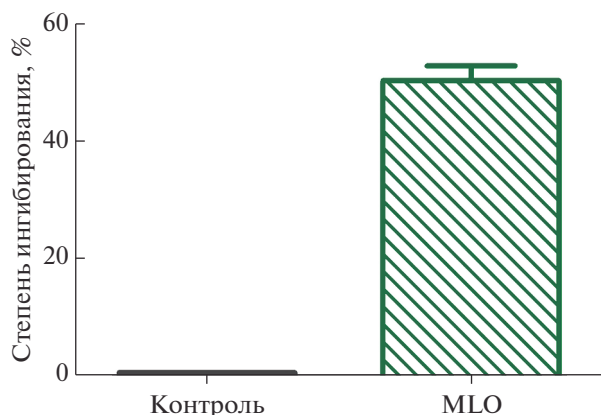


Рис. 1. Яд MLO ингибирует рост саркомы S-180 у мышей. Животным опытной группы каждый день в течение 5 суток вводили внутрь опухоли по 10 мкг яда MLO, растворенного в 50 мкл PBS. Мышам контрольной группы вводили PBS в том же режиме. Через 24 ч после последнего введения животных взвешивали и умерщвляли путем смещения шейных позвонков. Противоопухолевую активность выражали как степень ингибирования (%) и рассчитывали по формуле (1). Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка (SEM) на основании двух независимых экспериментов (непарный *t*-критерий, $p < 0.05$).

цитотоксичности), так и активацию каспаз (маркеры апоптоза).

В первой части анализа измеряют активность протеазного маркера жизнеспособности клеток. Активность протеазы живых клеток ограничена интактными жизнеспособными клетками и измеряется с использованием флуорогенного, проникаемого для клеток пептидного субстрата глицил-фенилаланил-аминофторкумарина (GF-AFC). Субстрат проникает в интактные клетки, где он расщепляется под действием протеазы, генерируя флуоресцентный сигнал, пропорциональный количеству живых клеток. Эта протеаза живых клеток теряет активность при нарушении целостности клеточной мембраны и попадании в окружающую культуральную среду.

Вторая часть анализа построена на технологии Caspase-Glo® Assay и предназначена на измерение активности каспаз — ключевого биомаркера апоптоза. В анализе Caspase-Glo® использован люминогенный субстрат каспазы-3/7 — DEVD-аминолюциферин — в реагенте, оптимизированном для активности каспазы и лизиса клеток. Добавление реагента Caspase-Glo® 3/7 приводит к лизису клеток с последующим расщеплением субстрата каспазой и генерацией люминесцентного сигнала, величина которого пропорциональна каспазной активности.

Эксперименты выполняли в трех повторах, и данные представляли в виде графика как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Яд

MLO разводили в PBS. Пролиферацию клеток HMVEC-D индуцировали обработкой hrVEGF в концентрации 50 нг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Яд змеи MLO подавляет рост саркомы S-180 у мышей, усиливает экспрессию VEGF, но не каспаз-8 и -9

По результатам экспериментов *in vivo* яд MLO подавлял рост саркомы S-180 у мышей на 50% (рис. 1); при этом не наблюдали значительной потери веса у животных этой группы, то есть лечение не вызывало заметного побочного эффекта (данные не представлены).

Известно, что VEGF играет важную роль в ангиогенезе, поэтому мы исследовали влияние яда на экспрессию VEGF у мышей с саркомой S-180. Согласно полученным результатам (рис. 2), обработка опухоли ядом змеи MLO приводила к повышению экспрессии белка VEGF (рис. 2).

Ранее мы сообщали, что яд змеи MLO вызывает некроз клеток саркомы S-180 *in vivo*, но не исследовали детально механизм их гибели [22]. Теперь мы проанализировали влияние яда на экспрессию некоторых каспаз. После обработки опухолей ядом не зарегистрировано никаких изменений в уровнях каспазы-8 и прокаспазы-9, тогда как для каспазы-3 и каспазы-5 выявлена тенденция к усилению экспрессии. Отсутствие изменений в содержании каспаз-8 и -9 свидетельствует о том, что яд MLO не вызывает апоптоза раковых клеток, в то же время его действие не приводит и к некрозу, так как изменяются уровни каспаз-3 и -5 (рис. 2). В течение последнего десятилетия широко обсуждается путь программируемой гибели клеток, называемый некроптозом, особенно при онкологических и воспалительных заболеваниях [23]. Уже известно, что при этих патологиях некроптический способ разрушения клеток может сопровождаться повышением активности эффекторных каспаз. Этот механизм заключается в том, что каспаза-3 запускает неспецифический ответ, так называемый ответ “наблюдателя” (bystander response), модулируя передачу сигнала внутри клеток и/или стимулируя пролиферацию соседних клеток [24–26].

Антиангиогенный эффект яда змеи MLO

Антиангиогенный эффект яда MLO оценивали в САМ-анализе *in vivo*. С целью имитировать патологическое состояние, при котором усиливается ангиогенез, 10-дневные куриные эмбрионы обрабатывали только bFGF или в сочетании с ядом MLO (3.5 мкг/яйцо). Через 72 ч после обработки САМ вырезали из эмбрионов, фотографировали *ex ovo* под стереоскопом и определяли чис-

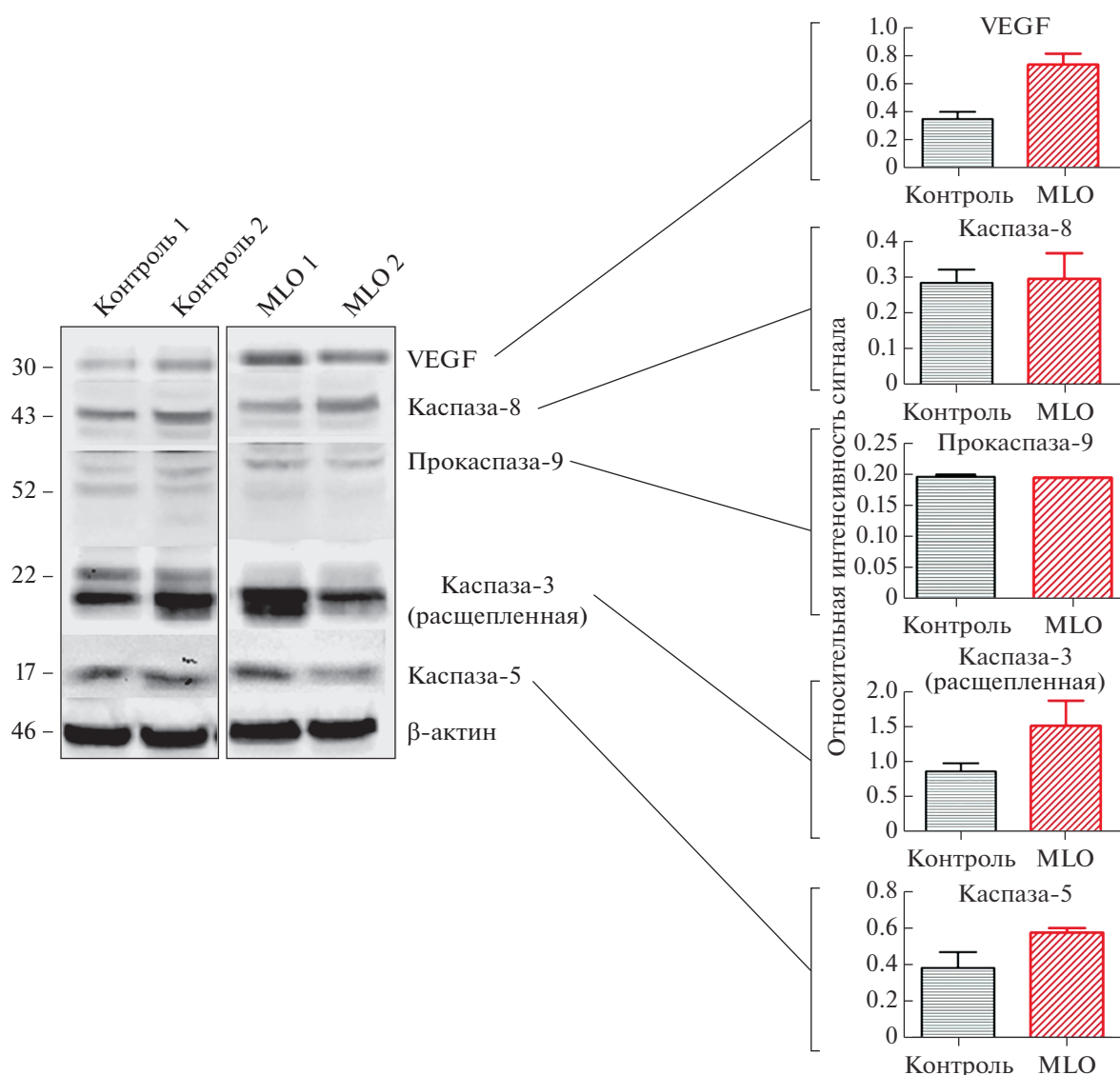


Рис. 2. Влияние яда MLO на экспрессию белков VEGF, каспазы-8, прокаспазы-9, каспазы-3 и каспазы-5 в опухолях саркомы S-180 у мышей. Белки экстрагировали из опухолей, изолированных от мышей, и использовали для вестерн-блот-анализа. Представлены результаты двух независимых экспериментов (обозначены цифрами 1 и 2), проведенных с антителами против VEGF, каспазы-8, прокаспазы-9, каспазы-3 и каспазы-5. β -actin использовали в качестве контроля загрузки. Денситометрический анализ выполнен с помощью программного обеспечения ImageLab 4.0 ("Bio-Rad"). Результаты представлены как среднее \pm SEM на основании двух независимых экспериментов, проведенных в трех повторах (непарный *t*-критерий, $p < 0.05$).

ло вновь образовавшихся сосудов (диаметр менее 15 мкм) (рис. 3). По сравнению с куриными эмбрионами, обработанными только bFGF, в САМ эмбрионов, содержащих яд MLO, появилось значительно меньше сосудов (рис. 3а).

Влияние яда MLO на жизнеспособность и апоптоз клеток HMVEC-D in vitro

При изучении влияния яда MLO на жизнеспособность клеток HMVEC-D *in vitro* использован реагент IncuCyte® Cytotox green. Краситель спе-

цифично связывается с ДНК мертвых клеток из-за потери целостности их мембран. Клетки HMVEC-D выращивали в присутствии hrVEGF на планшетах, покрытых коллагеном IV. Клетки обрабатывали ядом MLO в течение 24 ч и анализировали поля изображения с помощью IncuCyte. Согласно полученным результатам (рис. 4), обработка ядом змеи MLO приводит к гибели практически всей популяции клеток.

С целью дополнительной проверки полученных результатов мы использовали мультиплексный анализ ApoLive-Glo. Этот эксперимент поз-

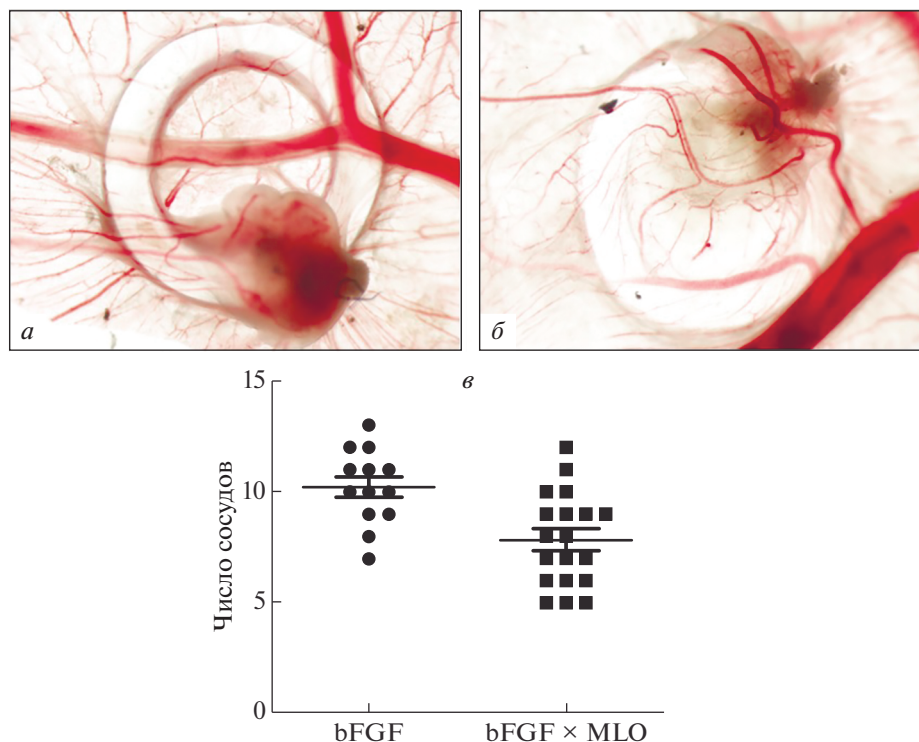


Рис. 3. САМ-анализ *in vivo* антиангиогенного действия яда змеи MLO. На 10 сутки инкубации на поверхность САМ помещали силиконовое кольцо диаметром 3 мм и добавляли в него растворы: *a* – bFGF (400 нг/яйцо; $N = 13$); *б* – bFGF (400 нг/яйцо) и яд змеи MLO (3.5 мкг/мкл; $N = 18$). Представлены характерные изображения состояния мембраны в каждом эксперименте после 72 ч обработки. *в* – Число новых сосудов (диаметр < 15 мкм), растущих в радиальном направлении к области кольца, подсчитано вслепую в трех независимых экспериментах. Результаты представлены как среднее \pm SEM (непарный *t*-критерий, $p < 0.05$).

воляет, в первую очередь, определить активность протеазного маркера жизнеспособности клеток, которая характерна только для интактных жизнеспособных клеток. Небольшой пептид GF-AFC используется в качестве субстрата для определения протеазной активности живых клеток, генерируя флуоресцентный сигнал, пропорциональный количеству живых клеток. Обнаружено, что низкие концентрации сырого яда MLO сильно снижают жизнеспособность клеток (рис. 5а). Активность биомаркера апоптоза каспазы-3/7 не увеличивалась в клетках HMVEC-D, обработанных ядом MLO (рис. 5б), что подтверждает данные о неапоптотическом пути их гибели. Следует сказать, что уровень апоптоза был даже несколько выше (хотя и незначительно) в контрольных клетках, чем в обработанных ядом, что, вероятно, связано с их более высокой скоростью пролиферации и конкуренцией за питательные вещества.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение последних пяти лет в проведенных нами экспериментах установлено, что один из компонентов змеиного яда MLO – обтустатин – ингибирует рост саркомы S-180 у мышей, не вызы-

вая при этом потери веса животных, что, по-видимому, можно расценивать как отсутствие побочного действия препарата [21, 22]. Теперь мы исследовали потенциальное терапевтическое действие неочищенного змеиного яда MLO на модели саркомы S-180 у мышей.

Впервые исследованы функции и механизмы действия яда MLO при ангиогенезе саркомы. В экспериментах *in vivo* показано, что яд змеи MLO подавляет рост опухоли на 50%. Используя ту же модель саркомы S-180 у мышей, мы проанализировали экспрессию белка VEGF – одного из наиболее специфичных и важных регуляторов сигнального каскада ангиогенеза [8–12] – до и после обработки ядом MLO. Показано, что экспрессия VEGF усиливается в клетках опухоли, обработанных змеиным ядом. Этот феномен можно объяснить способностью яда MLO ингибировать ангиогенез, что может вызывать гипоксию в опухолевой ткани. В условиях гипоксии активируется индуцируемый гипоксией фактор-1 α (HIF-1 α), усиливая HIF-1 α -зависимую транскрипционную активацию гена *VEGFA* [27–30]. Эту гипотезу еще предстоит проверить, проанализировав экспрессию HIF-1 α в контрольной и обработанной ядом MLO группах мышей.

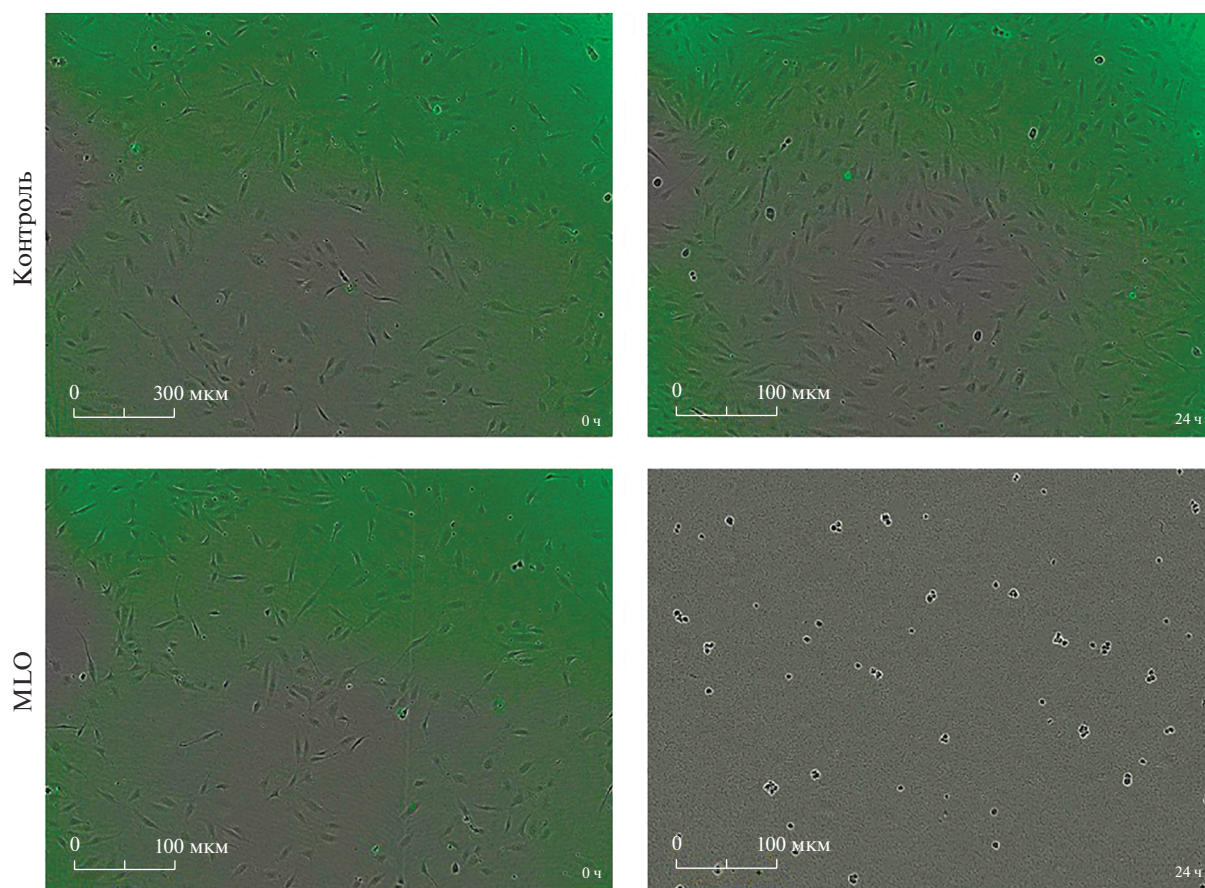


Рис. 4. Анализ гибели клеток HMVEC-D, вызванной ядом змеи MLO, с помощью IncuCyte ZOOM®. Клетки HMVEC-D выращивали на планшетах, покрытых коллагеном IV (50 мкг/мл), в присутствии hrVEGF (50 нг/мл). IncuCyte® Cytotox green (0.25 мкМ) добавляли после 24-часовой обработки ядом MLO (3.5 мкг/мл). Характерные изображения полей получали с помощью IncuCyte ZOOM®. Масштаб 300 мкм.

На основании накопленных к настоящему времени данных можно сделать вывод, что несколько выделенных или рекомбинантных токсинов змеиного яда оказывают противораковое действие на доклинических моделях злокачественных опухолей *in vitro* и *in vivo*, вызывая гибель клеток по пути апоптоза, внутриклеточно активируемого митохондриями, или по пути некроза [31–33]. В ранее проведенных нами экспериментах на мышиной модели саркомы S-180 *in vivo* показано, что при лечении животных обустатином не происходит апоптотической гибели раковых клеток [21]. Такой вывод был сделан на основании анализа экспрессии каспазы-8 как индикатора внеклеточной активации пути апоптоза (ранее описана как маркер опосредованной интегринами смерти [34]), а также прокаспазы-9, каспазы-3 и каспазы-5.

Теперь нами исследовано влияние змеиного яда MLO на клетки саркомы S-180. Никаких признаков апоптоза раковых клеток мы не зарегистрировали, но получили некоторые “намекы” на некроптоз, а не на некроз. Хорошо известно, что для некоторых типов злокачественных опухолей

характерны многочисленные мутации в каспазах, что нарушает функциональную активность этих ферментов и приводит к подавлению апоптоза в опухолевых тканях; причем эти данные в основном касаются каспазы-8 [35]. Что касается каспазы-3, то она известна как очень мощный эффектор апоптоза, причем как по внутриклеточному, так и внеклеточному пути. У каспазы-3 обнаружены и другие, неапоптотические, функции в физиологических процессах, не вызывающих гибели клеток, – это развитие центральной нервной системы и дифференцировка [36]. Более того, недавно показано, что каспаза-3 стимулирует репопуляцию опухолей при онкотерапии [37] и инициирует дестабилизацию генома и онкогенез.

В этом исследовании мы оценили антиангиогенный потенциал сырого змеиного яда MLO с помощью САМ-анализа *in vivo*. bFGF использовали для стимуляции роста сосудов, имитируя патологический сценарий, наблюдаемый в солидных опухолях. Мы рассмотрели 3 параметра для количественной оценки сосудов: диаметр сосуда, организацию сосудов и направление относитель-

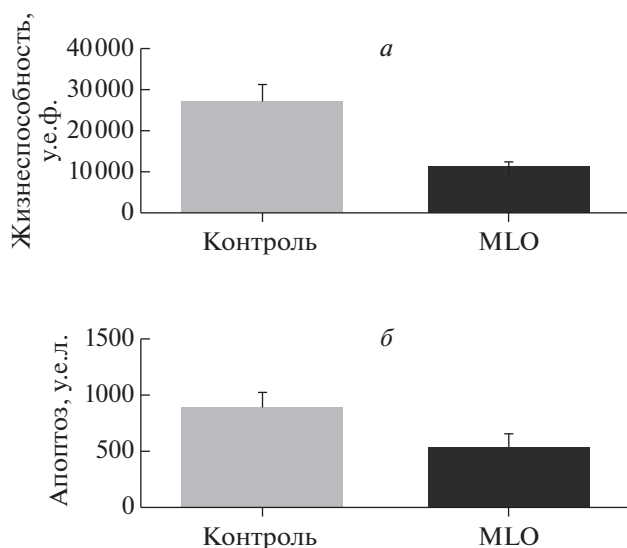


Рис. 5. Мультиплексный анализ ApoLive-Glo на жизнеспособность клеток HMVEC-D (а) и апоптоз (б). Клетки HMVEC-D, стимулированные к пролиферации в присутствии 50 нг/мл hVEGF, обрабатывали ядом MLO (1 мкг/мл) в течение 24 ч. Обозначения: у.е.ф. – условные единицы флуоресценции; у.е.л. – условные единицы люминесценции. Результаты представлены как среднее ± SEM по результатам трех повторов (непарный *t*-критерий, *p* < 0.05).

но сайта инокуляции. Ранее нами обнаружено [21], что 90 мкМ обтустатин ингибирует ангиогенез, индуцированный bFGF, на 17%. Несмотря на то, что неочищенный яд MLO содержит в 300000 раз меньшую концентрацию обтустатина (концентрация обтустатина в неочищенном яде MLO составляла 0.3 нМ), он подавляет ангиогенез более эффективно (~22%).

Результаты экспериментов *in vivo* подтвердили данные *in vitro*. Обнаружено, что яд змеи MLO убивает клетки HMVEC-D и ингибирует ангиогенез гораздо эффективнее чистого обтустатина (в пересчете на его концентрацию), причем гибель эндотелиальных клеток не связана с апоптозом.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что неочищенный яд змеи MLO или его компоненты следует рассматривать как новые потенциально эффективные средства для лечения сарком.

Работа выполнена при финансовой поддержке базирующегося в Нью-Йорке Армянского национального фонда науки и образования (the Armenian National Science and Education Fund (ANSEF) based in New York; грант # NS-biochem-2218) и Государственного комитета по науке Министерства образования, науки, культуры и спорта Республики Армения (State Committee of Science from Ministry of Education, Science, Culture and Sport of the Republic of Armenia; грант # 19YR-1F012).

При выполнении работы соблюдены все международные, национальные и/или институциональные инструкции по уходу и использованию животных.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- (2002) World Health Organisation classification of tumours. Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone. Eds Fletcher C.D.M., Uni K.K., Mertens F. Lyon: IARC Press, 427 p.
- Cormier J. N., Pollock R.E. (2004) Soft tissue sarcomas. *CA Cancer J. Clin.* **54**, 94–109.
- Dean B.J.F., Whitwell D. (2009) Epidemiology of bone and soft-tissue sarcomas. *Orthop. Trauma.* **23**, 223–230.
- Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **285**, 1182–1186.
- Carmeliet P., Jain R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* **407**, 249–257.
- Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., McLean J.W., Thurston G., Roberge S., Jain R.K., McDonald D.M. (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* **156**, 1363–1380.
- Senger D.R., Perruzzi C.A., Streit M., Kotliansky V.E., De Fougères A.R., Detmar M. (2002) The $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **160**, 195–204.
- Ferrara N. (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 795–803.
- Folkman J. (2003) Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr. Mol. Med.* **3**, 643–651.
- Naldini A., Carraro F. (2005) Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* **4**, 3–8.
- Lijnen H. R. (2008) Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc. Res.* **78**, 286–293.
- Carmeliet P., Jain R.K. (2011) Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 417–427.
- Benassi M.S., Gamberi G., Magagnoli G., Molendini L., Ragazzini P., Merli M., Chiesa F., Balladelli A., Manfredini M., Bertoni F. (2001) Metalloproteinase expression and prognosis in soft tissue sarcomas. *Ann. Oncol.* **12**, 75–80.
- Hedlund E.M., Hosaka K., Zhong Z., Cao R., Cao Y. (2009) Malignant cell-derived PlGF promotes normalization and remodeling of the tumor vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 17505–17510.
- Marcinkiewicz C., Rosenthal L.A., Mosser D.M., Kunicki T.J., Niewiarowicz C. (1996) Immunological characterization of eristatatin and echistatin binding sites on $\alpha 1\text{Ib}\beta 3$ and $\alpha \text{v}\beta 3$ integrins. *Biochem. J.* **317**, 817–825.
- Marcinkiewicz C., Weinreb P.H., Calvete J.J., Kiesel D.G., Mousa S.A., Tuszyński G.P., Lobb R.R. (2003) Obt-

- statin: a potent selective inhibitor of alpha1beta1 integrin *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Cancer Res.* **9**, 2020–2023.
17. Marcinkewicz C. (2005) Functional characteristic of snake venom disintegrins: potential therapeutic implication. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 815–827.
 18. Calvete J.J., Mureno-Murciano M.P., Theakston D.G., Kisiel D.G., Marcinkewicz C. (2003) Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochem. J.* **372**, 725–734.
 19. Sanz L., Ayyazyan N., Calvete J.J. (2008) Snake venomics of the Armenian mountain vipers *Macrovipera lebetina obtusa* and *Vipera raddei*. *J. Proteomics.* **71**, 198–209.
 20. Brown M.C., Staniszewska I., Del Valle L., Tuszynski G.P., Marcinkewicz C. (2008) Angiostatic activity of obtustatin as alpha1beta1 integrin inhibitor in experimental melanoma growth. *Int. J. Cancer.* **123**, 2195–2203.
 21. Ghazaryan N., Movsisyan N., Macedo J., Vaz S., Ayyazyan N., Pardo L., Logarinho E. (2019) The anti-tumor efficacy of monomeric disintegrin obtustatin in S-180 sarcoma mouse model. *Invest. New Drugs.* **37**, 1044–1051.
 22. Ghazaryan N.A., Ghulikyan L., Kishmiryan A., Kirakosyan G., Nazaryan O., Ghevondyan T., Zakaryan N., Ayyazyan N.M. (2015) Anti-tumor effect investigation of obtustatin and crude *Macrovipera lebetina obtusa* venom in S-180 sarcoma bearing mice. *Eur. J. Pharmacol.* **11**, 340–345.
 23. Najafov A., Chen H., Yuan J. (2017) Necroptosis and cancer. *Trends Cancer.* **3**, 294–301.
 24. Huang Q., Li F., Liu X., Li W., Shi W., Liu F.F., O'Sullivan B., He Z., Peng Y., Tan A.C. (2011) Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat. Med.* **17**, 860–866.
 25. Liu X., He Y., Li F., Huang Q., Kato T.A., Hall R.P., Li C.Y. (2015) Caspase-3 promotes genetic instability and carcinogenesis. *Mol. Cell.* **58**, 284–296.
 26. Mirzayans R., Andrais B., Kumar P., Murray D. (2016) The growing complexity of cancer cell response to DNA-damaging agents: caspase 3 mediates cell death or survival? *Int. J. Mol. Sci.* **17**(5), 708.
 27. Wang G.L., Semenza G.L. (1993) Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **268**, 21513–21518.
 28. Pugh C.W., Ratcliffe P.J. (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* **9**, 677–684.
 29. Hirota K., Semenza G.L. (2006) Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **59**, 15–26.
 30. Liang H., Xiao J., Zhou Z., Wu J., Ge F., Li Z., Zhang H., Sun J., Li F., Liu R., Chen C. (2018) Hypoxia induces miR-153 through the IRE1 α -XBP1 pathway to fine tune the HIF1 α /VEGFA axis in breast cancer angiogenesis. *Oncogene.* **37**, 1961–1975.
 31. Aranda-Souza M., Rossato F., Costa R., Figueira T., Castilho R., Guarneri M., Nunes E., Coelho L., Correia M., Vercesi A.A. (2014) Lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. *Toxicon.* **2**, 97–103.
 32. Ebrahim, K., Shirazi F., Mirakabadi A., Vatanpour H. (2015) Cobra venom cytotoxins; apoptotic or necrotic agents? *Toxicon.* **108**, 134–140.
 33. Prinholato da Silva C., Costa T.R., Paiva R.M.A., Cintra A.C.O., Menaldo D.L., Antunes L.M.G., Sampaio S.V. (2015) Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu* snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **21**, 44.
 34. Stupack D.G., Cheresch D.A. (2002) Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* **115**, 3729–3738.
 35. McIlwain D., Berger Th., Mak T. (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a008656.
 36. D'Amelio M., Cavallucci V., Cecconi F. (2010) Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.* **17**, 1104–1114.
 37. Porter A., Jaenicke R. (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 99–104.

***Macrovipera lebetina obtusa* SNAKE VENOM AS A MODULATOR OF ANTITUMOR EFFECT IN S-180 SARCOMA MOUSE MODEL**

N. Ghazaryan^{1, 2, *}, N. Movsisyan^{2, 3}, J. C. Macedo⁴, S. Vaz⁴, N. Ayyazyan¹, L. Pardo², and E. Logarinho⁴

¹Laboratory of Toxinology and Molecular Systematics, Institute of Physiology, Yerevan, 0028 Armenia

²Oncophysiology Group, Max Planck Institute for Experimental Medicine, Göttingen, 37075 Germany

³Göttingen Graduate School for Neurosciences, Biophysics, and Molecular Biosciences, Göttingen, 37075 Germany

⁴Aging and Aneuploidy Laboratory, Instituto de Biologia Molecular e Celular, Instituto de Investigação e Inovação em Saúde – i3S, Universidade do Porto, Porto, 4200-135 Portugal

*e-mail: naringhazaryan@gmail.com

Macrovipera lebetina obtusa (MLO) is a venomous snake endemic to Middle East. Here we describe the therapeutic potential of the MLO snake venom. In S-180 sarcoma-bearing mouse model, we showed that the

MLO snake venom inhibits tumour growth by 50%. In human dermal microvascular endothelial cells (HMVEC-D), treatment with the MLO snake venom lead to an increase of expression levels of the vascular endothelial growth factor (VEGF), while the level of the expression of caspase 8 did not change. In HMVEC-D cells MLO snake venom induces necroptosis, rather than apoptosis. In the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay, exposure to MLO snake venom inhibited FGF2-induced angiogenesis by 22%. Taken together, these results indicate that the MLO snake venom has a potent cytotoxic activity. Regulated necroptic cell death pathway, which is engaged by MLO snake venom, may become a promising novel target for antitumor therapies.

Keywords: snake venom, sarcoma, angiogenesis, necroptosis