



Детоксификация пептид-содержащих биотоксинов

И.В. Лягин^{1,2}, О.В. Маслова¹, О.В. Сенько^{1,2}, Н.А. Степанов^{1,2}, Е.Н. Ефременко^{1,2}✉

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
119991, Российская Федерация, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

✉ e-mail: elena_efremenko@list.ru

Основные моменты

Пептидные биотоксины представляют собой серьезную проблему для здоровья людей и как поражающие агенты из-за широкого разнообразия их структур и источников.

Пептидные биотоксины и прионные белки могут быть эффективно нейтрализованы различными методами, включая обработку протеазами.

Актуальность – биотоксины пептидной природы представляют серьезную угрозу для здоровья людей и как поражающие агенты. Если направлениям, касающимся иммунологических систем защиты от таких токсинов, посвящено большое количество аналитических обзоров, то вопросы ферментативной детоксификации биотоксинов в лучшем случае рассматриваются поверхностно.

Цель работы – провести анализ основных современных направлений разработки средств ферментативной детоксификации биотоксинов пептидной природы.

Источниковая база исследования – преимущественно англоязычная научная литература, доступная через глобальную сеть Интернет, а также собственные опубликованные экспериментальные исследования авторов.

Метод исследования – аналитический.

Результаты. В настоящее время эффективность детоксифицирующих иммунологических препаратов возросла благодаря высокопроизводительным методам скрининга и отбору эффективных клонов – продуцентов моноклональных антител. В статье особое внимание уделено применению для детоксификации пептидных биотоксинов гидролитических ферментов, рассматриваемых в данной работе как альтернатива иммунобиологическим препаратам. Природный аналог детоксифицирующих ферментов – система «токсин–антитоксин» прокариот. Известно не менее четырех типов ингибиторов биотоксинов: блокирующие их каталитическую активность; экранирующие их рецепторы-мишени; ингибирующие токсин путем воздействия на его структуру; аллостерически модулирующие активность биотоксина. Имеются обнадеживающие данные по использованию детоксифицирующих ферментов для нейтрализации прионов в почве и лечения прионных осложнений, вызванных «вакцинацией» нуклеиновыми кислотами.

Вывод. Использование ферментов-протеаз для детоксикации пептидных биотоксинов и прионных белков можно рассматривать как перспективную альтернативу детоксифицирующим иммунобиологическим препаратам.

Ключевые слова: антитело; антитоксин; защитное действие; ингибитор; нейтрализация; пептидный биотоксин; прион

Для цитирования: Лягин И.В., Маслова О.В., Сенько О.В., Степанов Н.А., Ефременко Е.Н. Детоксификация пептид-содержащих биотоксинов. Вестник войск РХБ защиты. 2024;8(3):256–269. EDN:jokpyt.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-3-256-269>

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов: Е.Н. Ефременко является членом редколлегии с 2019 г. Это не повлияло на процесс рецензирования и его результаты.

Финансирование: Работа была выполнена в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № 121041500039-8) и ИБХФ РАН (тема № 122041300210-2).

Поступила 10.08.2024 г. После доработки 19.09.2024 г. Принята к публикации 27.09.2024 г.

Detoxification of Peptide-Containing Biotoxins

Ilya V. Lyagin^{1,2}, Olga V. Maslova¹, Olga V. Senko^{1,2}, Nikolay A. Stepanov^{1,2,✉}
Elena N. Efremenko^{1,2}

¹Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University
Lenin Hills, 1/3, Moscow 119991, Russian Federation

²N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS
Kosygin Str., 4, Moscow 119334, Russian Federation
✉ e-mail: elena_efremenko@list.ru

Highlights

Peptide biotoxins are important problem for human health and as lethal agents due to their wild diversity of chemical structures and biological sources.

Such peptide biotoxins and prion proteins can be effectively neutralized by different methods, including by protease treatment.

Relevance – biological toxins containing peptides possess serious danger for life and well being of humans. There are a lot of reviews summarizing immunologic protective measures against these toxins. As opposed to that an enzymatic detoxification of biotoxins is, at best, considered superficially.

The purpose of the work is analysis of the main up-to-date trends of development of protective remedies against biotoxins of peptide nature.

The source base of the research is mainly English–language scientific literature available via the global Internet network, as well as the authors' own published experimental studies.

The research method is analytical.

Results. Currently the efficiency of detoxifying immunological drugs is surging due to highly productive methods of screening and selection of effective clones producing monoclonal antibodies. Special attention in the review is paid to application of hydrolytic enzymes which are considered in the work as alternative for immunobiological agents during detoxication of peptide biotoxins. The natural analogue of detoxifying enzymes is a system “toxin–antitoxin” of procaryotes. More than four types of inhibitors of biotoxins are know: blocking of their catalytic activity; hindering of their target receptors; inhibiting of toxin by acting on its structure; and allosterically modulating of biotoxin activity. There are encouraging data on application of detoxifying enzymes for neutralization of prions in soils and for treatment of prion complication.

Conclusions. Application of proteases for detoxification of peptide biotoxins and prion peptides could be considered as viable alternative to detoxifying immunobiological agents.

Keywords: antibody; antitoxin; biological toxin; inhibitor; neutralization; protective action; prion

For citation: Lyagin I.V., Maslova O.V., Senko O.V., Stepanov N.A., Efremenko E.N. Detoxification of Peptide-Containing Biotoxins. *Journal of NBC Protection Corps*. 2024;8(3):256–269. EDN:jokpyt.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-3-256-269>

Financial disclosure: The authors have no financial interests in the submitted materials or methods.

Conflict of interest statement: E.N. Efremenko is a member of the Editorial Board of the journal (since 2019). This did not affect the review process or its results.

Funding: The work was realized within state task of Lomonosov Moscow State University (No. 121041500039-8) and Institute of Biochemical Physics of RAS (No. 122041300210-2).

Received August 10, 2024. Revised September 19, 2024. Accepted September 27, 2024

К настоящему времени известно большое количество токсинов из разных биологических источников, включая бактерий, грибов, растений и животных [1]. Биотоксины нашли свое применение в военном деле, как потенциальные поражающие агенты биологического

оружия, в медицине и меньшей степени – в пищевой промышленности, сельском хозяйстве, быту и т.д. По своей химической структуре биотоксины могут быть разделены на множество классов и подклассов [2]. Наиболее изученными и представляющими наи-

большую опасность для человека представляет группы токсинов пептидной природы, как бактериального [3], так и животного происхождения [4] (рисунк 1). Рекомбинантные формы таких токсинов в настоящее время могут быть синтезированы в клетках различных таксонов (бактериях, грибах, отдельных клеточных линиях эукариотов или целых трансгенных организмах) или получены бесклеточным синтезом, локализованы в заданной структуре клетки, тканях или органах, могут иметь целевые модификации (генетические, пост-трансляционные) и др. Исследование наиболее тонких механизмов действия биотоксинов позволяет получать их производные, обладающие неизвестным патогенным потенциалом. Поэтому проблема создания избирательных и эффективных средств защиты, направленных против таких биотоксинов, по-прежнему актуальна. Если направлениям, касающимся иммунологических средств [4] (рисунк 2), систем токсин-антитоксин [5, 6], ингибиторов [7] и нано-препаратов [8], посвящено довольно большое число аналитических обзоров, то вопросы

ферментативной детоксификации биотоксинов в лучшем случае рассматриваются поверхностно и кратко, как бы «на дальнейшую перспективу», или совсем не принимаются в расчет.

Цель обзора – провести анализ основных современных направлений разработки средств ферментативной детоксификации биотоксинов пептидной природы.

Источниковая база исследования – преимущественно англоязычная научная литература, доступная через глобальную сеть Интернет, а также собственные опубликованные экспериментальные исследования авторов.

Метод исследования – аналитический.

В работе рассмотрены классические средства защиты от биотоксинов пептидной природы, основанные на иммунном ответе организма человека и ингибировании. Кроме того, обсуждаются системы «токсин-антитоксин» и альтернативные подходы к инактивации действия биотоксинов путем их ферментативной модификации. В заключении сформулированы выводы о перспективных направ-

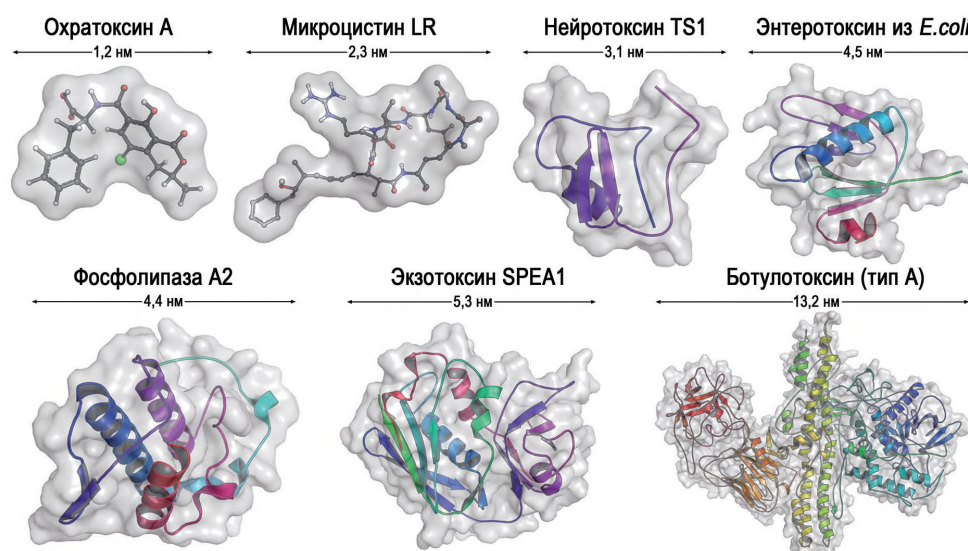


Рисунок 1 – Строение отдельных токсинов биологического происхождения (рисунок подготовлен авторами). Средний размер молекул (по наибольшей диагонали) увеличивается в ряду от охратоксина А до ботулинического нейротоксина. Структура микроцистина LR из *Microcystis aeruginosa* (1LCM), нейротоксина TS1 из *Tityus serrulatus* (1B7D), термостабильного энтеротоксина из *Escherichia coli* (1B44), фосфолипазы A2 из *Daboia russelli pulchella* (1FV0), пирогенного экзотоксина SPEA1 из *Streptococcus pyogenes* (1B1Z) и ботулинического нейротоксина типа А из *Clostridium botulinum* (3BTA) приведена согласно рентгеноструктурным данным, депонированным в базе данных Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org>)

Figure 1 – Structures of some toxins of biological origins (the illustration was prepared by authors). The average size of molecules (by their largest diagonal) is increased in a row ochratoxin A – botulinum toxin. The structure of microcystin-LR from *Microcystis aeruginosa* (1LCM), neurotoxin TS1 from *Tityus serrulatus* (1B7D), thermostable enterotoxin from *Escherichia coli* (1B44), phospholipase A2 from *Daboia russelli pulchella* (1FV0), pyrogenic exotoxin SPEA1 from *Streptococcus pyogenes* (1B1Z) and botulinum toxin type A from *Clostridium botulinum* (3BTA) is presented according to XRD data deposited in Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org>)

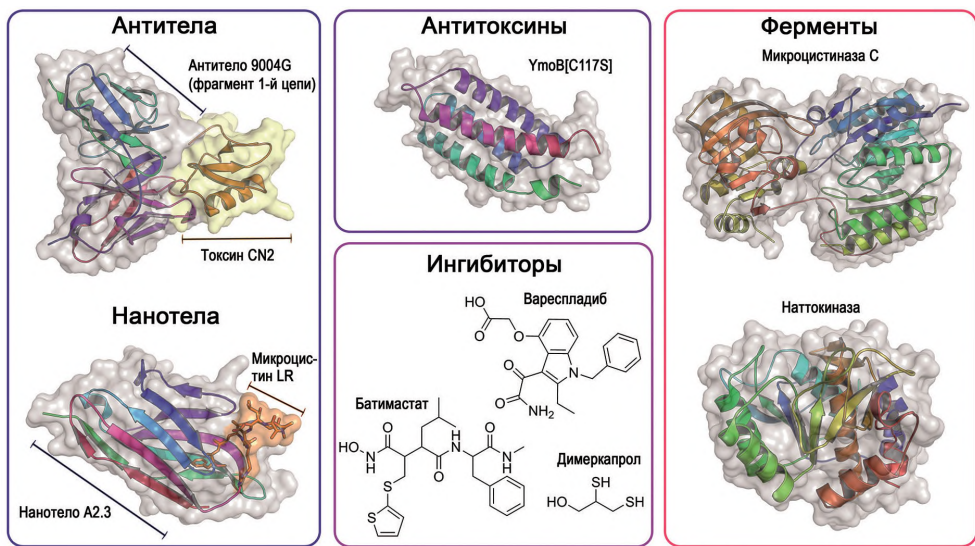


Рисунок 2 – Примеры основных групп защитных средств, рассматриваемых в данном обзоре (рисунок подготовлен авторами). Комплексы фрагмента одной из цепей антитела 9004G человека с токсином CN2 (2YBR), а также нанотела A2.3 верблюда с микроцистином LR (8FIF) взяты из базы данных PDB. Отдельно представлены YmoB[C117S] системы токсин-антитоксин в *Yersinia enterocolitica* (2MN2), а также микроцистиназа C из *Sphingomonas* sp. (7YLQ) и наттокиназа из *Bacillus subtilis* var. natto (4DWW)

Figure 2 – Examples of main types of protective agents considered in the study (the illustration was prepared by authors). Complex of single chain human antibody fragment 9004G with CN2 toxin (2YBR) and complex of A2.3 camel nanobody with microcystin-LR have been obtained from PDB. Other molecules, i.e., YmoB[C117S] of the toxin-antitoxin system from *Yersinia enterocolitica* (2MN2), as well as microcystinase C from *Sphingomonas* sp. (7YLQ) and nattokinase from *Bacillus subtilis* var. natto (4DWW), are shown in separate

лениях дальнейшего развития биозащитных средств от пептидных биотоксинов и прогнозируемых прорывных инновациях в данной области науки и практики.

Классические средства защиты, основанные на клеточном и антительном иммунном ответе

Исторически противоядия и иммунные сыворотки были (и остаются) единственным вариантом противодействия пептидным биотоксинам, поразившим человека или животных. Они представляли собой «коктейли» различных белков, включая иммуноглобулины (рисунок 2), которые могут обладать специфичностью действия к одному или нескольким компонентам, входящим в состав яда, которым иммунизировали организмы продуцентов антител [9].

Достаточно крупные токсины пептидной природы обладают несколькими антигенными детерминантами (эпитопами), к которым могут формироваться специфичные антитела, что может несколько улучшать их распознавание и связывание *in vitro*. С целью увеличения иммунного ответа организма-продуцента антител, проводилась и про-

водится модификация антигена [10, 11] или его части [12].

Со временем стало понятно, что более эффективным (как на этапе получения защитного препарата, так и на этапе его применения) представляется ограничение спектра нейтрализуемых компонентов (т.е. моновалентность) и выбор максимально специфичных вариантов (т.е. моноклональность). В настоящее время разработаны и активно используются высокопроизводительные методы скрининга и отбора самых эффективных клонов продуцентов моноклональных антител [13, 14].

Дальнейшее развитие такие препараты получили при их гибридизации с одноцепочечными антителами (так называемыми нанотелами), обладающими такими важными, с прикладной точки зрения, характеристиками, как большая стабильность и меньшая цитотоксичность. В отдельных экспериментальных работах защитные свойства у таких химерных препаратов в реакциях нейтрализации пептидных биотоксинов, в частности, ботулинического нейротоксина удалось увеличить тысячекратно в сравнении с исходными специфическими антителами [15].

Система «токсин–антитоксин»

Такие внутриклеточные системы, как «токсин–антитоксин»¹ уже реализованы природой в одноклеточных организмах-прокариотах и представляются прекрасной иллюстрацией возможных путей нейтрализации других биотоксинов [5, 6]. Исследовано и введено в оборот несколько классификаций подобных систем. В сущности, главными компонентами во всех них являются собственно токсин и его антипод – антитоксин (рисунок 2). Находясь во взаимодействии, они компенсируют действия друг друга, обеспечивая существование клетке. Если по какой-либо причине антитоксин отсоединяется, деградирует, инактивируется и т.д., тогда токсин начинает свое разрушительное действие, обычно приводя клетку к гибели.

Ограничившись только токсинами пептидной природы, можно отметить системы на основе гуанилилтрансферазы TglT (токсин) и протеинкиназы TakA (антитоксин) из клеток *Mycobacterium tuberculosis* [16]; рибонуклеазы HerT (токсин) и аденилилтрансферазы MntA (антитоксин) из *Shewanella oneidensis* [17]; литического пептида GhoT (токсин) и рибонуклеазы GhoS (антитоксин) из *Escherichia coli* [18]; токсина Hha, модулирующего экспрессию гемолизина, и цистеин-оксидазы TomB (антитоксин) из *Escherichia coli* [19]; токсина DarT, АДФ-рибозилирующего тимидины одноцепочечной ДНК, и АДФ-рибозилазы DarG (антитоксин) из *Mycobacterium tuberculosis* [20].

Принимая во внимание приведенные исследования, можно сделать вывод о том, что варианты противодействия токсичному эффекту не ограничиваются лишь связыванием биотоксина специфическими антителами, а используется обширный арсенал его возможной каталитической (ферментативной) модификации.

Ферментативные ингибиторы действия биотоксинов

Известны не менее четырех типов таких ингибиторов (рисунок 2):

- блокирующие каталитическую активность биотоксинов. Например, среди них

можно упомянуть вареспладиб (рисунок 2), селективно связывающийся с фосфолипазой A2; батимастат, являющийся негидролизуемым аналогом субстратов для протеаз; димеркапрол, проявляющий металл-хелатирующие свойства и тем самым инактивирующий металл-зависимые ферменты; и т.д. Комбинирование в одном средстве компонентов, направленных на разные мишени, может дать синергетический эффект как по универсальности препарата к токсинам разного состава, так и их нейтрализуемой;

- экранирующие от биотоксинов их рецепторы-мишени, мешая их связыванию. Например, блокирование пуринергических рецепторов (P2) дифенилениодонием защищает эритроциты от β -гемолизина из *Staphylococcus aureus* [22];

- ингибирующие токсин путем воздействия на его структуру. Например, действие каррагинанов на морфологию липополисахаридов и образование интерполимерных комплексов снижает воспалительную реакцию организма [23];

- связывающиеся с биотоксинами и аллостерически действующие на их активность. Например, нитрофенилпсорален (3-(4-nitrophenyl)-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one), образуя стабильный комплекс с ботулиническим нейротоксином типа А, эффективно его ингибировал смешанным образом [24].

Не зависимо от того, по одному ли механизму действует вещество-эффектор или сразу по нескольким, его действие будет приводить к ингибированию токсичности биотоксина.

Если раньше первоначальный поиск ингибиторов биотоксинов был по большей части эмпирическим процессом, то в настоящее время активное внедрение компьютерных методов симуляции межмолекулярных взаимодействий значительно облегчает предварительный скрининг и отбор эффективных ингибиторов. Кроме того, особенно результативным является использование природоподобных подходов, например, методов эволюционной биологии [25, 26].

В качестве ингибиторов чаще всего рассматриваются низкомолекулярные соеди-

¹ Когда говорят о системе «токсин–антитоксин» (англ. toxin-antitoxin system), то речь не идет о классических бактериальных токсинах типа ботулинического или столбнячного [3]. Это набор двух и более тесно связанных генов, которые в совокупности кодируют и белок-«яд», и соответствующее ему «противоядие». Когда такая система локализована на плазмиде (автономном генетическом элементе), то в результате деления исходной клетки, содержащей плазмиду, дочерняя клетка выживет только в том случае, если унаследует плазмиду. Если дочерняя клетка лишена плазмиды, то нестабильный антитоксин, унаследованный с цитоплазмой матери, разрушается, а стабильный токсичный белок убивает клетку; это явление получило название «постсегрегационное убийство» (англ. post-segregational killing). См. Toxin-antitoxin system. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Toxin-antitoxin_system (дата обращения: 06.07.2024).

нения, связывание которых является равновесным процессом. То есть, возможно произвольное высвобождение биотоксина из инактивирующего комплекса со всеми негативными последствиями. Например, молекулы ботулинического нейротоксина могут находиться в клетках приблизительно недели или месяцы, превосходя по продолжительности удержания их низкомолекулярные ингибиторы. Для предотвращения такого результата предпринимаются попытки дополнительной стабилизации инактивирующего комплекса за счет специальных модификаций ингибитора, например, путем введения химически активного остатка, образующего связь с цистеином биотоксина, в структуру металл-хелатирующей гидроксамовой кислоты [27]. Тем самым, кратно улучшается константа и продолжительность связывания биотоксина и ингибитора.

Альтернативным путем представляется химическая модификация самого биотоксина в составе такого комплекса и/или его связывание с образованием прочной ковалентной связи. Не принимая во внимание биокаталитические методы такой модификации, о которых пойдет речь ниже, наиболее приближенным к ней вариантом можно считать средства защиты, создаваемые на основе наноматериалов [28]. Как минимум, некоторые из этих нанолекарств предполагают прочное связывание биотоксинов наночастицами. Однако здесь требуются дальнейшие исследования. В частности, различные синтетические полимеры, широко применяемые на практике для изготовления различных изделий (тканей, в том числе применяемых для производства индивидуальных средств защиты, а также технологических поверхностей, деталей оборудования, инструментов и т.д.), которые могут деградировать при эксплуатации и присутствовать далее в окружающей человека среде в виде микро- и наночастиц, способны сорбировать различные соединения, включая биотоксины [29, 30]. Это не только не отменяет последующее беспрепятственное высвобождение подобных токсичных соединений при деградации самих полимерных частиц [31, 32], но и может происходить без деградации полимеров при изменении условий их пребывания (изменения влажности, pH среды, температурных условий, появления поверхностно-активных веществ в составе, например, моющих или антибактериальных дезинфицирующих средств и т.д.).

Ферментативная детоксификация

Использование отдельных ферментов в качестве нейтрализаторов токсичного действия биотоксинов представляется логичным следствием и развитием упомянутых ранее систем «токсин–антитоксин». И действительно: рассматриваемые токсины имеют пептидную природу, а, следовательно, статистически могут быть субстратом одной или даже нескольких протеаз. Таких протеолитических ферментов к настоящему времени уже изучено огромное количество (рисунки 2), и это лишь «верхушка айсберга» – в реальности их может быть многократно больше.

Необходимо отметить, что сейчас существуют многочисленные общедоступные базы данных, например, MEROPS и др.², позволяющие подобрать индивидуальный фермент, исходя из аминокислотной последовательности пептидного субстрата (токсина), и наоборот.

Таким образом, уже на этапе планирования экспериментов представляется возможным предварительный отбор потенциально более специфично действующих вариантов протеаз *in silico* перед их непосредственным тестированием *in vitro*. Конечно, может оказаться на практике, что подобранные ферменты проявляют широкую субстратную специфичность *in vivo* и действуют, в том числе, и на нецелевые мишени в защищаемом организме. Именно поэтому, в любом случае, отбор и исследование ферментов для детоксификации пептидных биотоксинов требует обязательных исследований их безопасности и/или выявления формируемого ими или с их участием возможных токсических эффектов причем еще на уровне проведения экспериментов *in vitro*.

Возвращаясь к обсуждению средств широкого спектра действия, надо отметить, что хорошо известный многие годы трипсин давно и активно используется для предобработки (трипсинолиза) различных полипептидов перед их анализом методом хроматографии с масс-спектрометрическим определением получаемых пептидов. В частности, многие (если не все) пептидные биотоксины могут быть определены таким образом, в частности, фосфолипаза A2 [33], ботулинический нейротоксин [34, 35], рицин [36] и многие другие [37]. Здесь опять нужно упомянуть, что чрезмерно широкий субстратный спектр действия трипсина (как одного из представителей подобных протеаз) – это не всегда благо, так как увеличивается вероятность

² MEROPS. URL: <https://www.ebi.ac.uk/merops/>; PeptideCutter. URL: https://web.expasy.org/peptide_cutter/; Degradome. URL: <https://degradome.uniovi.es/dindex.html>.

побочного действия. Кроме того, очень часто ферменты с широким субстратным профилем активности могут проигрывать «узкоспецифичным» ферментам по своей удельной активности в реакциях с отдельными субстратами.

Следует подчеркнуть, что по аналогии с трипсином такой же гидролиз могут катализировать и другие ферменты. Так, например, мелитин (цитолитический компонент пчелиного яда) может быть гидролизован не только трипсином из бычьей поджелудочной железы [38], но и человеческим плазмином или дуоденазой (протеаза из бычьей двенадцатиперстной кишки) [39], а также неуставленной протеазой из *Escherichia coli* [40]. В целом, сайты гидролиза токсина естественно отличаются для разных ферментов, хотя некоторые из них могут частично и совпадать. В этом случае требуется проведение их сравнительного анализа в аналогичных условиях, часто приближенных к физиологическим. В этой связи можно отметить, что именно трипсин оказался наиболее активным по сравнению с другими указанными выше исследованными ферментами.

Алкалаза из *Bacillus licheniformis* способна катализировать гидролиз мелитина почти между любыми двумя его аминокислотными остатками, давая набор олигопептидов [41]. Однако степень конверсии токсина этим ферментом (менее 20 % за 2 ч) низкая. Потребуется значительно ее увеличить перед тем, как рассматривать такую протеазу в качестве защитного средства от мелитина. Кроме того, гидролизированный токсин, а также его отдельные фракции имели такую же токсичность в отношении клеточной линии фибробластов из легких человека, что и исходный мелитин [41].

Последовательная обработка мелитина бромелаином (растительная протеаза) и упомянутой выше алкалазой привела к образованию более длинноцепочечных пептидов [42]. Тем не менее, токсин, гидролизированный таким образом, уже не проявлял цитотоксичности, в частности, в отношении клеточной линии эпителиальных клеток из грудных желез человека. Вероятно, отличия в токсичности мелитина, гидролизованного алкалазой без или с бромелаином, могут частично объясняться различиями в процедурах их пост-обработки в проведенных исследованиях. В частности, возможна контаминация исходным токсином продукта реакции [41].

Отдельного обсуждения требуют эндогенные протеазы человека. Известно, что в ответ на отравление неизвестным токсином

в тканях человека, как и других млекопитающих, одними из первых реагируют тучные клетки [43]. Причем предварительная сенсibilизация только усиливает такую реакцию. Активированные тучные клетки секретируют «коктейль» первичных и вторичных мессенджеров, а самое главное – набор протеолитических ферментов. Среди них следует отметить химазу (аналог химотрипсина), триптазу (аналог трипсина), карбоксипептидазу А3 и катепсин G. Все они имеют многочисленные основные и вспомогательные каталитические функции [44] и, конечно же, обладают разной субстратной специфичностью действия. Ключевым моментом является то, что они способны напрямую нейтрализовать биотоксины, в частности, триптаза (но не химаза или карбоксипептидаза А3) гидролизует оксидазу L-аминокислот, входящую в состав различных ядов [45]. Химаза и карбоксипептидаза А3 осуществляют нейтрализацию эндотелина и сарафотоксина 6В [44].

Классические методы скрининга микроорганизмов-продуцентов по-прежнему действенны, хотя и требуют огромных временных затрат и определенной целеустремленности у исследователей. В качестве примера можно упомянуть микроцистиназы, гидролизующие микроцистины – циклические пептиды, продуцируемые фотосинтетическими микроорганизмами, и аналогичные им по структуре токсичные пептиды [46]. Хотя бактерии *Sphingopyxis* sp., продуцирующие микроцистиназу, на самом деле последовательно используют несколько протеаз [47], чтобы, соответственно, линеаризовать исходный циклический пептид, а затем уже его разрезать на аминокислоты. Тем не менее, отмеченная выше работа [46] послужила своеобразным спусковым крючком и запустила серию подобных публикаций по исследованию аналогичных ферментов [48]. Более того, микроцистиназа MlrA была иммобилизована на оксиде графена, активированного карбодиимидом, сукцинимидом и цистеином [49].

Проведенная оценка токсичности такого бионанопрепарата показала его умеренную токсичность по отношению к лимфоцитам рыбок данио-рерио, но при этом данный иммобилизованный фермент полностью нейтрализовал токсичность нодуларина в исследованной концентрации. При этом надо принять во внимание тот факт, что подобные иммобилизованные формы ферментов, способных катализировать гидролиз биотоксинов, скорее могут быть предназначены не

для введения в организм человека, а использоваться в составе средств биозащиты (материалах, костюмах, покрытиях, фильтрующих картриджах и т.п.).

Эндшпиль: прионные белки

В ряду биологических токсинов пептидной природы особое место занимают прионные белки (prion proteins), как частный случай амилоидных образований. Хотя до сих пор нет консенсуса (или доминирующей научной теории) даже на счет того, какой именно компонент ответственен за передачу инфекции, формирование амилоидных агрегатов с одновременным проявлением токсического эффекта (например, в виде дегенеративных процессов в нервной системе) уже давно не подвергается сомнению. Ограничиваясь рассмотрением лишь амилоидных агрегатов, сформированных прионными белками, можно заметить, что они отличаются от остальных биотоксинов пептидной природы только увеличенной плотностью упаковки. Как следствие – они резистентны к действию протеаз [50].

Чтобы как-то преодолеть резистентность амилоидных агрегатов к действию протеолитических ферментов и ускорить процесс их гидролиза, предпринимаются попытки подобрать условия гидролитической реакции.

Для уничтожения прионных белков, связанных с почвой и вызывающих хроническую изнуряющую болезнь у оленей (chronic wasting disease, CWD) и болезнь скрепи у овец (sheep scrapie), использовался коммерчески доступный фермент прионизим М (сериновая протеаза из *Bacillus subtilis*). Прионовая активность CWD исчезала при обработке ферментом почвы в течение 7 суток при температуре 22 °C и pH 7,4 (для всех типов почв; среднее извлечение CWD из почв составляло 51 %) [51]. Однако концентрация гиперпатогенной линии трансмиссивной энцефалопатии хомячков (HY TME) в суглинистой почве снижалась лишь на 74 % в аналогичных условиях (среднее извлечение 27 %). Исчерпывающее разложение детектируемого HY TME (>97 %) в суглинистой почве было возможно лишь при температуре 50 °C и высоком pH (12,5) [51].

Кератинолаза из *B. licheniformis*, помимо определенной термической предобработки, для нейтрализации прионов необходимо еще и присутствие детергентов [52]. В некоторых случаях, как, например, для субтилизина 309 из *Bacillus clausii* и его мутантной формы 309-*v*, только строго определенные условия (55 °C, pH 7,9) позволяют в ходе ферментативного гидролиза снизить остаточную кон-

центрацию приона до такого уровня, чтобы погибала только половина лабораторных животных, а не все [53]. Такой подход не приближает создание терапевтических или защитных средств, которые можно было бы применять в физиологически релевантных условиях. Однако такие подходы могут быть предприняты для детоксификации технических поверхностей, например, инструментов.

Ряд других ферментов, например, наттокиназа (субтилизин из *Bacillus subtilis* var. *natto*), протеиназа К и субтилизин Карлсберга проявляют активность в отношении амилоидных белков при более физиологичных условиях [54]. Самое важное, что та же наттокиназа не проявляет явных токсических свойств и на животных, и на людях [55]. Более того, она же снижает проявление нейротоксических эффектов прионных белков на определенных животных моделях [56], что дает основания на осторожную надежду на введение в практику данного препарата. К тому же наттокиназа имеет и другие потенциальные области медицинского применения, например, в комплексном лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы, что может дополнительно ускорить ее практическое внедрение [57].

В настоящее время в программе лечения пост-ковидных синдромов, проявляющихся в виде проблем в функционировании сердечно-сосудистой системы человека и приобретенных в результате «вакцинации» нуклеиновыми кислотами, или перенесенного вирусного заболевания, предлагается использовать оральное применение наттокиназы в комбинации с бромелаином (растительной протеазой) и куркумином [58] для детоксификации так называемого спайкового белка коронавируса, обладающего прионными свойствами и длительно циркулирующего в кровеносном русле [59].

Здесь нужно отметить, что имеется некоторая вероятность того, что агрегаты прионных белков сами являются ответом клеток организма на некие токсигенные процессы, протекающие вне рассматриваемых причин, связанных с воздействием именно биотоксинов [60]. Поэтому, как обычно, требуется осторожное, вдумчивое обращение даже с самыми, казалось бы, надежно установленными фактами.

Хотя текущий обзор ограничивался лишь биотоксинами пептидной природы, его выводы и методологию можно экстраполировать и на токсины другого химического строения. И действительно, сапонины, имеющие в своем составе остатки углеводов, инактивируются путем гидролиза томатыназой (глю-

каназа из *Botrytis cinerea*) [61]; β -глюкозидаза нейтрализует афлатоксин и зеараленон [62] и т.д. То есть, все рассмотренные в данном обзоре ключевые направления детоксификации биотоксинов могут с некоторыми вариациями исследоваться для применения в отношении неограниченного круга других биотоксинов. Это представляется весьма актуальным, так как постоянно открываются новые биотоксины, или неожиданно обнаруживается токсический потенциал у давно известных объектов исследования, как, например, в случае амилоидных структур, формируемых лизоцимом [63].

Заключение

Таким образом, широчайшее многообразие биологических токсинов пептидной природы (рисунок 1) обосновало необходимость и вынудило создать гораздо больший арсенал средств защиты от них (рисунок 2). Помимо традиционных иммунологических препаратов, а также различных соединений-ингибиторов и наноматериалов, могут успешно применяться разнообразные ферментативные нейтрализаторы токсического действия. Естественно, гидролитические ферменты, как наиболее доступные, хорошо изученные и предсказуемые в своем действии нейтрализаторы, занимают доминирующее положение. Однако имеется еще шесть других классов ферментов, которые почти никак не представлены в настоящее время среди исследуемых вариантов ферментных защитных средств, что гарантирует значи-

тельный потенциал для дальнейших исследований. Конечно же, будущие исследования уже немислимы без активного использования компьютерного моделирования. И их роль будет только возрастать, а предиктивные модели значительно улучшатся, что откроет новые горизонты создания каталитически активных и других средств защиты от биотоксинов.

Наконец, нельзя не отметить, что сейчас разные направления разработки действенных средств защиты работают параллельно, по разным мишеням (даже в одном и том же токсичном объекте) и практически никак не соприкасаются. Очевидно, что это упущение нужно устранять, и лучше всего – задействовав уже готовые решения, используемые производителями биотоксинов в них. Например, ботулинический нейротоксин, столбнячный токсин и другие имеют свою систему наведения, нацеливающую каждого из них на определенный рецептор на поверхности или внутри клетки. Аналогичным образом можно было бы использовать иммуноглобулины как нацеливающую боеголовку фьюжн-препарата, вторую часть которого может представлять протеолитический фермент, инактивирующий целевой биотоксин. Похожие препараты уже долгое время разрабатываются или даже уже используются в качестве противораковых средств целевого иммунохимического действия. Точно так же можно попытаться скомбинировать и другие отдельные компоненты, рассмотренные в данном обзоре.

Ограничения исследования / Limitations of the study

Данный аналитический обзор имеет ряд ограничений, а именно: 1) в качестве источников рассмотрены лишь англоязычные статьи или переводные варианты (например, русскоязычных статей); 2) рассматриваемые работы опубликованы в открытых источниках, индексируемых Google, Scopus, Web of Science, eLibrary; 3) не было введено критерия на исключение работ из рассмотрения ввиду недостоверности, невозможности воспроизвести, необъективности и т.д. представленных в них данных. / This analytical review has several limitations, namely: (1) only English language articles and those translated to English (e.g., Russian language studies) were considered; (2) the considered works were published in open sources indexed by Google, Scopus, Web of Science, eLibrary; (3) the criterion on exclusion of articles from consideration (due to data uncertainty, irreproducibility, preconception, etc.).

Список источников/References

1. Clark GC, Casewell NR, Elliott CT, Harvey AL, Jamieson AG, Strong PN, et al. Friends or foes? Emerging impacts of biological toxins. *Trends Biochem Sci.* 2019;44(4):365–79.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.12.004>
2. Efremenko E, Aslanli A, Lyagin I. Advanced situation with recombinant toxins: Diversity, production and application purposes. *Int J Mo. Sci.* 2023;24(5):4630.
<https://doi.org/10.3390/ijms24054630>
3. Супотницкий МВ. Биологические свойства бактериальных токсинов. *Вестник войск РХБ защиты.* 2024;8(1):34–64. EDN:jtrfxo
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-1-34-64>

- Supotnitskiy MV. The Biological properties of bacterial toxins. *Journal of NBC Protection Corps*. 2024;8(1):34–64. EDN:jtrfxo
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-1-34-64>
4. Osipov A, Utkin Y. What are the neurotoxins in hemotoxic snake venoms? *Int J Mol Sci*. 2023;24(3):2919.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032919>
5. Page R, Peti W. Toxin–antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat Chem Biol*. 2016;12(4):208–14.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.2044>
6. Andryukov BG, Somova LM, Timchenko NF, Bynina MP, Lyapun IN. Toxin–antitoxin systems and their role in maintaining the pathogenic potential of causative agents of Saprinoses. *Infect Disord Drug Targets*. 2020;20(5):570–84.
<https://doi.org/10.2174/1871526519666190715150444>
7. Gutiérrez JM, Albulescu LO, Clare RH, Casewell NR, Abd El-Aziz TM, Escalante T, et al. The search for natural and synthetic inhibitors that would complement antivenoms as therapeutics for snakebite envenoming. *Toxins*. 2021;13(7):451.
<https://doi.org/10.3390/toxins13070451>
8. Wang X, Xia Z, Wang H, Wang D, Sun T, Hossain E, et al. Cell-membrane-coated nanoparticles for the fight against pathogenic bacteria, toxins, and inflammatory cytokines associated with sepsis. *Theranostics*. 2023;13(10):3224–44.
<https://doi.org/10.7150/thno.81520>
9. Romero-Giraldo LE, Pulido S, Berrío MA, Flórez MF, Rey-Suárez P, Nuñez V, et al. Heterologous expression and immunogenic potential of the most abundant phospholipase a2 from coral snake *Micrurus dumerilii* to develop antivenoms. *Toxins*. 2022;14(12):825.
<https://doi.org/10.3390/toxins14120825>
10. Ryabchevskaya EM, Granovskiy DL, Evtushenko EA, Ivanov PA, Kondakova OA, Nikitin NA, et al. Designing stable *Bacillus anthracis* antigens with a view to recombinant anthrax vaccine development. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):806.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040806>
11. Granovskiy DL, Ryabchevskaya EM, Evtushenko EA, Kondakova OA, Arkhipenko MV, Kravchenko TB, et al. New formulation of a recombinant anthrax vaccine stabilised with structurally modified plant viruses. *Front Microbiol*. 2022;13:1003969.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1003969>
12. Karpov DS, Goncharenko AV, Usachev EV, Vasina DV, Divisenko EV, Chalenko YM, et al. A Strategy for the Rapid Development of a Safe *Vibrio cholerae* Candidate Vaccine Strain. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11657.
<https://doi.org/10.3390/ijms222111657>
13. Rudenko N, Nagel A, Zamyatina A, Karatovskaya A, Salyamov V, Andreeva-Kovalevskaya Z, et al. A monoclonal antibody against the C-terminal domain of *Bacillus cereus* hemolysin II inhibits HlyII cytolytic activity. *Toxins*. 2020;12(12):806.
<https://doi.org/10.3390/toxins12120806>
14. Abramov VM, Kosarev IV, Motin VL, Khlebnikov VS, Vasilenko RN, Sakulin VK, et al. Binding of LcrV protein from *Yersinia pestis* to human T-cells induces apoptosis, which is completely blocked by specific antibodies. *Int J Biol Macromol*. 2019;122:1062–70.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.054>
15. Godakova SA, Noskov AN, Vinogradova ID, Ugriumova GA, Solovyev AI, Esmagambetov IB, et al. Camelid VHHs Fused to Human Fc Fragments Provide Long Term Protection Against Botulinum Neurotoxin A in Mice. *Toxins*. 2019;11(8):464.
<https://doi.org/10.3390/toxins11080464>
16. Yu X, Gao X, Zhu K, Yin H, Mao X, Wojdyla JA, et al. Characterization of a toxin–antitoxin system in *Mycobacterium tuberculosis* suggests neutralization by phosphorylation as the antitoxicity mechanism. *Commun Biol*. 2020;3(1):216.
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-0941-1>
17. Yao J, Zhen X, Tang K, Liu T, Xu X, Chen Z, et al. Novel polyadenylation-dependent neutralization mechanism of the HEPN/MNT toxin/antitoxin system. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(19):11054–67.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa855>
18. Wang X, Lord DM, Cheng HY, Osbourne DO, Hong SH, Sanchez-Torres V, et al. A new type V toxin–antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat Chem Biol*. 2012;8(10):855–61.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1062>

19. Marimon O, Teixeira JM, Cordeiro TN, Soo VW, Wood TL, Mayzel M, et al. An oxygen-sensitive toxin-antitoxin system. *Nat Commun.* 2016;7:13634.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13634>
20. Jankevicius G, Ariza A, Ahel M, Ahel I. The toxin-antitoxin system DarTG catalyzes reversible ADP-ribosylation of DNA. *Mol Cell.* 2016;64(6):1109–16.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.014>
21. Albulescu L-O, Xie C, Ainsworth S, Alsolaiss J, Crittenden E, Dawson CA, et al. A therapeutic combination of two small molecule toxin inhibitors provides broad preclinical efficacy against viper snakebite. *Nat Commun.* 2020;11(1):6094.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19981-6>
22. Guo Z, Yue N, Chen M, Li J, Lv R, Wang J, et al. Purinergic Receptor Antagonists Inhibit Hemolysis Induced by *Clostridium perfringens* Alpha Toxin. *Pathogens.* 2024;13(6):454.
<https://doi.org/10.3390/pathogens13060454>
23. Yermak IM, Volod'ko AV, Khasina EI, Davydova VN, Chusovitin EA, Goroshko DL, et al. Inhibitory Effects of Carrageenans on Endotoxin-Induced Inflammation. *Mar Drugs.* 2020;18(5):248.
<https://doi.org/10.3390/md18050248>
24. Patel KB, Kononova O, Cai S, Barsegov V, Parmar VS, Kumar R, et al. Botulinum neurotoxin inhibitor binding dynamics and kinetics relevant for drug design. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2021;1865(9):129933.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129933>
25. Yang Z, Wang C, Liu J, Xiao L, Guo L, Xie J. *In Silico-Ex Vitro* Iteration Strategy for Affinity Maturation of Anti-Ricin Peptides and the SPR Biosensing Application. *Toxins.* 2023;15(8):490.
<https://doi.org/10.3390/toxins15080490>
26. Aziz UBA, Saoud A, Bermudez M, Mieth M, Atef A, Rudolf T, et al. Targeted small molecule inhibitors blocking the cytolytic effects of pneumolysin and homologous toxins. *Nat Commun.* 2024;15(1):3537.
<https://doi.org/10.1038/s41467-024-47741-3>
27. Lin L, Olson ME, Sugane T, Turner LD, Tararina MA, Nielsen AL, et al. Catch and Anchor Approach To Combat Both Toxicity and Longevity of Botulinum Toxin A. *J Med Chem.* 2020;63(19):11100–20.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01006>
28. Desai N, Pande S, Salave S, Singh TRR, Vora LK. Antitoxin nanoparticles: design considerations, functional mechanisms, and applications in toxin neutralization. *Drug Discov Today.* 2024;29(8):104060.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.104060>
29. Ефременко ЕН, Лягин ИВ, Маслова ОВ, Сенько ОВ, Степанов НА, Асланлы АГ. Каталитическое разложение микропластиков. *Успехи химии.* 2023;92(2):RCR5069.
<https://doi.org/10.57634/RCR5069>
- Ефременко EN, Lyagin IV, Maslova OV, Senko OV, Stepanov NA, Aslanli AG. Catalytic degradation of microplastics. *Russ Chem Rev.* 2023;92(2):RCR5069.
<https://doi.org/10.57634/RCR5069>
30. Маслова ОВ, Сенько ОВ, Степанов НА, Лягин ИВ, Ефременко ЕН. Биокатализ в деградации синтетических полимеров. *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия.* 2024;65(2):161–8.
<https://doi.org/10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-2-161-168>
- Maslova OV, Senko OV, Stepanov NA, Lyagin IV, Efremenko EN. Biocatalysis in the Degradation of Synthetic Polymers. *Moscow Univ Chem Bull.* 2024;79(2):140–5.
<https://doi.org/10.3103/S0027131424700019>
31. Wang D, Pan Q, Yang J, Gong S, Liu X, Fu Y. Effects of Mixtures of Engineered Nanoparticles and Cocontaminants on Anaerobic Digestion. *Environ. Sci Technol.* 2024;58(6):2598–2614.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.3c09239>
32. Wei L, Li J, Wang Z, Wu J, Wang S, Cai Z, et al. Evaluating effects of tetrabromobisphenol A and microplastics on anaerobic granular sludge: Physicochemical properties, microbial metabolism, and underlying mechanisms. *J Environ Manage.* 2024;359:121077.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121077>
33. Samel M, Vija H, Kurvet I, Künnis-Beres K, Trummal K, Subbi J, et al. Interactions of PLA2-s from *Vipera lebetina*, *Vipera berus berus* and *Naja naja oxiana* venom with platelets, bacterial and cancer cells. *Toxins.* 2013;5(2):203–23.
<https://doi.org/10.3390/toxins5020203>
34. Barr JR, Moura H, Boyer AE, Woolfitt AR, Kalb SR, Pavlopoulos A, et al. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(10):1578–83.
<https://doi.org/10.3201/eid1110.041279>

35. Kalb SR, Baudys J, Wang D, Barr JR. Recommended mass spectrometry-based strategies to identify botulinum neurotoxin-containing samples. *Toxins*. 2015;7(5):1765–78.
<https://doi.org/10.3390/toxins7051765>
36. Dupré M, Gilquin B, Fenaile F, Feraudet-Tarisse C, Dano J, Ferro M, et al. Multiplex quantification of protein toxins in human biofluids and food matrices using immunoextraction and high-resolution targeted mass spectrometry. *Anal Chem*. 2015;87(16):8473–80.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01900>
37. Alam SI, Kumar B, Kamboj DV. Multiplex detection of protein toxins using MALDI-TOF-TOF tandem mass spectrometry: application in unambiguous toxin detection from bioaerosol. *Anal Chem*. 2012;84(23):10500–07.
<https://doi.org/10.1021/ac3028678>
38. Mirgorodskaya OA, Kazanina GA, Mirgorodskaya EP, Vorotyntseva TI, Zamolodchikova TS, Alexandrov SL. A Comparative study of the specificity of melittin hydrolysis by duodenase, trypsin and plasmin. *Prot Pept Lett*. 1996;3(5):315–20.
39. Sokolova EA, Mirgorodskaya OA, Roepstorff P, Savelyeva NV, Zamolodchikova TS. Comparative study of the action of bovine duodenal proteinases (duodenases) on polypeptide substrates. *Biochemistry (Mosc)*. 2001;66(1):62–7.
<https://doi.org/10.1023/a:1002833729744>
40. Mirgorodskaya O, Kazanina G, Mirgorodskaya E, Matveyev V, Thiede B, Khaitlina S. Proteolytic cleavage of melittin with the actin-digesting protease. *Prot Pept Lett*. 1996;3(2):81–8.
41. El-Didamony SE, Kalaba MH, Sharaf MH, El-Fakharany EM, Osman A, Sitohy M, et al. Melittin alcalase-hydrolysate: a novel chemically characterized multifunctional bioagent; antibacterial, anti-biofilm and anticancer. *Front Microbiol*. 2024;15:e1419917.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1419917>
42. Lee H-S, Kim YS, Lee K-S, Seo H-S, Lee C-Y, Kim KK. Detoxification of Bee Venom Increases Its Anti-inflammatory Activity and Decreases Its Cytotoxicity and Allergenic Activity. *Appl Biochem Biotechnol*. 2021;193(12):4068–82.
<https://doi.org/10.1007/s12010-021-03653-2>
43. Galli SJ, Metz M, Starkl P, Marichal T, Tsai M. Mast cells and IgE in defense against lethality of venoms: Possible “benefit” of allergy. *Allergo J Int*. 2020;29(2):46–62.
<https://doi.org/10.1007/s40629-020-00118-6>
44. Hellman L, Akula S, Fu Z, Wernersson S. Mast Cell and Basophil Granule Proteases - In Vivo Targets and Function. *Front Immunol*. 2022;13:918305
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.918305>
45. Anderson E, Stavenhagen K, Kolarich D, Sommerhoff CP, Maurer M, Metz M. Human Mast Cell Tryptase Is a Potential Treatment for Snakebite Envenoming Across Multiple Snake Species. *Front Immunol*. 2018;9:1532.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01532>
46. Xu Q, Ma H, Zhang H, Fan J, Yin C, Liu X, et al. Purification and activity of the first recombinant enzyme for biodegrading hepatotoxin by *Sphingopyxis* sp. USTB-05. *Algal Res*. 2020;47:101863.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101863>
47. Zou Q, Teng J, Wang K, Huang Y, Hu Q, Chen S, et al. Purification and mechanism of microcystinase MlrC for catalyzing linearized cyanobacterial hepatotoxins using *Sphingopyxis* sp. USTB-05. *Toxins*. 2022;14(9):602.
<https://doi.org/10.3390/toxins14090602>
48. Teng J, Song M, Xu Q, Zou Q, Zhang H, Yin C, et al. Purification and activity of the second recombinant enzyme for biodegrading linearized microcystins by *Sphingopyxis* sp. USTB-05. *Toxins*. 2023;15(8):494.
<https://doi.org/10.3390/toxins15080494>
49. Wu X, Wu H, Gu X, Zhang R, Sheng Q, Ye J. Effect of the immobilized microcystin-LR-degrading enzyme MlrA on nodularin degradation and its immunotoxicity study. *Environ Pollut*. 2020;258:113653.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113653>
50. Johnson CJ, Bennett JP, Biro SM, Duque-Velasquez JC, Rodriguez CM, Bessen RA, et al. Degradation of the disease-associated prion protein by a serine protease from lichens. *PLoS One*. 2011;6(5):19836.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019836>
51. Saunders SE, Bartz JC, Vercauteren KC, Bartelt-Hunt SL. Enzymatic digestion of chronic wasting disease prions bound to soil. *Environ Sci Technol*. 2010;44(11):4129–35.
<https://doi.org/10.1021/es903520d>
52. Langeveld JPM, Wang J-J, Van de Wiel DFM, Shih GC, Garssen GJ, Bossers A, et al. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. *J Infect Dis*. 2003;188(11):1782–9.
<https://doi.org/10.1086/379664>
53. Pilon JL, Nash PB, Arver T, Hoglund D, VerCauteren KC. Feasibility of infectious prion digestion using mild conditions and commercial subtilisin. *J Virol Methods*. 2009;161(1):168–72.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.04.040>

54. Hsu RL, Lee KT, Wang JH, Lee LY, Chen RP. Amyloid-degrading ability of nattokinase from *Bacillus subtilis natto*. *J Agric Food Chem*. 2009;57(2):503–8.
<https://doi.org/10.1021/jf803072r>
55. Lampe BJ, English JC. Toxicological assessment of nattokinase derived from *Bacillus subtilis* var. *natto*. *Food Chem Toxicol*. 2016;88:87–99.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.025>
56. Naik S, Katariya R, Shelke S, Patravale V, Umekar M, Kotagale N, et al. Nattokinase prevents β -amyloid peptide (A β 1–42) induced neuropsychiatric complications, neuroinflammation and BDNF signalling disruption in mice. *Eur J Pharmacol*. 2023;952:175821.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175821>
57. Chen H, McGowan EM, Ren N, Lal S, Nassif N, Shad-Kaneez F, et al. Nattokinase: A Promising Alternative in Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases. *Biomark. Insights*. 2018;13:1177271918785130.
<https://doi.org/10.1177/1177271918785130>
58. Hulscher N, Procter BC, Wynn C, McCullough PA. Clinical Approach to Post-acute Sequelae After COVID19 Infection and Vaccination. *Cureus*. 2023;15(11):e49204.
<https://doi.org/10.7759/cureus.49204>
59. Parry PI, Lefringhausen A, Turni C, Neil CJ, Cosford R, Hudson NJ, Gillespie J. ‘Spikeopathy’: COVID-19 Spike Protein Is Pathogenic, from Both Virus and Vaccine mRNA. *Biomedicines*. 2023;11:2287.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11082287>
60. Jack K, Jackson GS, Bieschke J. Essential components of synthetic infectious prion formation *de novo*. *Biomolecules*. 2022;12(11):1694.
<https://doi.org/10.3390/biom12111694>
61. You Y, Suraj HM, Matz L, Valderrama ALH, Ruigrok P, Shi-Kunne X, et al. *Botrytis cinerea* combines four molecular strategies to tolerate membrane-permeating plant compounds and to increase virulence. *Nat Commun*. 2024;15(1):6448.
<https://doi.org/10.1038/s41467-024-50748-5>
62. Efremenko E, Lyagin I, Stepanov N, Senko O, Maslova O, Aslanli A, et al. Luminescent Bacteria as Bioindicators in Screening and Selection of Enzymes Detoxifying Various Mycotoxins. *Sensors*. 2024;24(3):763.
<https://doi.org/10.3390/s24030763>
63. Roy S, Srinivasan VR, Arunagiri S, Mishra N, Bhatia A, Shejale KP, et al. Molecular insights into the phase transition of lysozyme into amyloid nanostructures: Implications of therapeutic strategies in diverse pathological conditions. *Adv Colloid Interface Sci*. 2024;331:103205.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2024.103205>

Вклад авторов / Authors contributions

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: концептуализация – **Е.Н. Ефременко**; анализ литературы – **И.В. Лягин, О.В. Маслова, О.В. Сенько, Н.А. Степанов, Е.Н. Ефременко**; написание оригинального текста – **И.В. Лягин, Е.Н. Ефременко**; подготовка рисунков – **И.В. Лягин**; рецензирование и редактирование текста – **Е.Н. Ефременко**. Все авторы внесли существенный вклад в подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию рукописи. / All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Conceptualization – **E.N. Efremenko**; literature analysis – **I.V. Lyagin, O.V. Maslova, O.V. Senko, N.A. Stepanov, E.N. Efremenko**; writing of the original text – **I.V. Lyagin, E.N. Efremenko**; preparation of drawings – **I.V. Lyagin**; reviewing and editing of the text – **E.N. Efremenko**. All the authors made a significant contribution to the preparation of the article, read and approved the final version of the manuscript.

Сведения о рецензировании / Peer review information

Статья прошла двустороннее анонимное «слепое» рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе / The article has been doubleblind peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Об авторах / Authors

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Российская Федерация, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4.

Лягин Илья Владимирович. Старший научный сотрудник, канд. хим. наук, член коллектива, выполняющего исследование.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3970-4334>

Маслова Ольга Васильевна. Старший научный сотрудник, канд. хим. наук, член коллектива, выполняющего исследование.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6358-1231>

Сенько Ольга Витальевна. Научный сотрудник, канд. хим. наук, член коллектива, выполняющего исследование.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7831-6222>

Степанов Николай Алексеевич. Научный сотрудник, канд. тех. наук, член коллектива, выполняющего исследование.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0821-8226>

Ефременко Елена Николаевна. Зав. лабораторией, докт. биол. наук, профессор, руководитель коллектива, выполняющего исследование.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6992-854X>

Контактная информация для всех авторов: elena_efremenko@list.ru
Контактное лицо: Ефременко Елена Николаевна; elena_efremenko@list.ru

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry. Lenin Hills 1-3, Moscow 119991, Russian Federation.

Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Kosygina str., 4, Moscow 119334, Russian Federation.

Ilya V. Lyagin. Senior Researcher, Cand Sci (Chem). Grant team member.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3970-4334>

Olga V. Maslova. Senior Researcher, Cand Sci (Chem). Grant team member.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6358-1231>

Olga V. Senko. Researcher, Cand Sci (Chem). Grant team member.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7831-6222>

Nikolay A. Stepanov. Researcher, Cand. Sci. (Techn.). Grant team member.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0821-8226>

Elena N. Efremenko. Laboratory Chief. Dr Sci. (Biol.). Professor. Grant team member.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6992-854X>

Contact information for all authors: elena_efremenko@list.ru
Contact person: Elena N. Efremenko; elena_efremenko@list.ru