

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ТЕТРАПЕТИДОВ НАЕЕ-СҮ5 И ЕЕАН-СҮ5 С АГРЕГАТАМИ АВ НА КЛЕТКАХ SH-SY5Y

А. В. Иванова<sup>1,2</sup>✉, Н. С. Чмелюк<sup>1,2</sup>, И. А. Кузьмичев<sup>1</sup>, М. И. Шиляева<sup>1</sup>, М. А. Абакумов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биомедицинской инженерии, Университет науки и технологий МИСИС, Москва, Россия

В связи с высокой диагностической значимостью  $\beta$ -амилоидных агрегатов при болезни Альцгеймера особый интерес представляют целевые лиганда, способные к специальному связыванию с патологическими агрегатами Аβ. Целью исследования было провести методом конфокальной микроскопии сравнительную характеристику связывающей способности тетрапептидов НАЕЕ-Сү5 (Ac-His-Ala-Glu-Gly-Gly-Lys(ε-Cy5)-NH2) и ЕЕАН-Сү5 (Ac-Glu-Glu-Ala-His-Gly-Gly-Gly-Lys(ε-Cy5)-NH2) с агрегатами Аβ на клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y. Показано, что тетрапептид НАЕЕ-Сү5 демонстрирует специфическое связывание с образованием характерных цитоплазматических скоплений и четкой колокализации с амилоидными агрегатами, в то время как пептид ЕЕАН-Сү5 с обращенной последовательностью полностью утрачивает способность к связыванию. Количественный анализ подтвердил высокую специфичность связывания НАЕЕ-Сү5 с агрегатами Аβ (коэффициент колокализации Мандерса  $0.58 \pm 0.03$ ). Установлено, что N-концевое положение гистидина является критическим детерминантом специфичности взаимодействия. Результаты работы открывают перспективы применения пептида НАЕЕ в качестве платформы для разработки целевых диагностических систем визуализации амилоидной патологии.

**Ключевые слова:** пептид НАЕЕ, пептид ЕЕАН, агрегаты Аβ, SH-SY5Y, болезнь Альцгеймера

**Финансирование:** работы выполнены в рамках Государственного задания «Создание радиофармацевтического лекарственного препарата для диагностики болезни Альцгеймера с использованием тетрапептида НАЕЕ в качестве векторной молекулы», регистрационный номер ЕГИСУ НИОКР 1024110600012-8-3.2.25;3.2.26;3.2.12.

**Вклад авторов:** А. В. Иванова — обзор литературы, подготовка рукописи; Н. С. Чмелюк — фиксация, подготовка клеточных образцов для съемки на микроскопе, получение и анализ изображений на конфокальном микроскопе; И. А. Кузьмичев — синтез флуоресцентных пептидов Ac-HAEEEGGGK(ε-Cy5)-NH2 и Ac-EEAHGGGGK(ε-Cy5)-NH2; М. И. Шиляева — подготовка образцов клеток; М. А. Абакумов — постановка цели, разработка дизайна исследования, подготовка рукописи; все авторы внесли равнозначный вклад в подготовку публикации, подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE.

✉ **Для корреспонденции:** Анна Валерьевна Иванова  
ул. Островитянова, д. 1, стр.1, г. Москва, 117513, Россия; super.fosforit@yandex.ru

**Статья получена:** 15.10.2025 **Статья принята к печати:** 13.11.2025 **Опубликована онлайн:** 24.11.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.061

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## COMPARATIVE IMAGING OF THE HAEE-CY5 AND EEAH-CY5 TETRAPEPTIDE BINDING TO THE A $\beta$ AGGREGATES ON THE SH-SY5Y CELLS

Ivanova AV<sup>1,2</sup>✉, Chmelyuk NS<sup>1,2</sup>, Kuzmichev IA<sup>1</sup>, Shilyaeva MI<sup>1</sup>, Abakumov MA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Biomedical Engineering, MISIS University of Science and Technology, Moscow, Russia

Due to high diagnostic value of  $\beta$ -amyloid aggregates, the target ligands capable of specific binding to abnormal A $\beta$  aggregates are of special interest. The study aimed to perform comparative characterization of the HAEE-Cy5 (Ac-His-Ala-Glu-Gly-Gly-Lys(ε-Cy5)-NH2) and EEAH-Cy5 (Ac-Glu-Glu-Ala-His-Gly-Gly-Gly-Lys(ε-Cy5)-NH2) tetrapeptide capability of binding to the A $\beta$  aggregates in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line by confocal microscopy. It has been shown that the HAEE-Cy5 tetrapeptide demonstrates specific binding yielding typical cytoplasmic clusters and clear co-localization with the amyloid aggregates, while the EEAH-Cy5 peptide with the inverted sequence totally loses the binding capability. Quantification has confirmed high specificity of the HAEE-Cy5 binding to the A $\beta$  aggregates (Manders' colocalization coefficient  $0.58 \pm 0.03$ ). It has been found that the histidine N-terminal position is a critical determinant of the interaction specificity. The findings offer the prospects of using the HAEE peptide as a platform for the development of targeted diagnostic systems for amyloid disorder imaging.

**Keywords:** HAEE peptide, EEAH peptide, A $\beta$  aggregates, SH-SY5Y, Alzheimer's disease

**Funding:** the work was carried out under the State Assignment "Development of a radiopharmaceutical for the diagnosis of Alzheimer's disease using the HAEE tetrapeptide as a vector molecule", EGISU R&D registration number 1024110600012-8-3.2.25;3.2.26;3.2.12.

**Author contribution:** Ivanova AV — literature review, manuscript writing; Chmelyuk NS — fixation, cell sample preparation for microscopic imaging, image acquisition and analysis using a confocal microscope; Kuzmichev IA — synthesis of Ac-HAEEEGGGK(ε-Cy5)-NH2 and Ac-EEAHGGGGK(ε-Cy5)-NH2 fluorescent peptides; Shilyaeva MI — cell sample preparation; Abakumov MA — goal setting, developing the study design, manuscript writing; all the authors contributed to preparation of the paper equally, they confirmed compliance of their authorship with the international ICMJE criteria.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna V. Ivanova  
Ostrovityanova, 1, str.1, Moscow, 117513, Russia; super.fosforit@yandex.ru

**Received:** 15.10.2025 **Accepted:** 13.11.2025 **Published online:** 24.11.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.061

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Болезнь Альцгеймера (БА) — наиболее распространенная в мире нейродегенеративная патология, которая обычно приводит к гибели нейронов и атрофии головного мозга, сопровождается накоплением патологических отложений: сенильных бляшек, состоящих из агрегированного  $\beta$ -амилоида ( $A\beta$ ) и нейрофибрillaryных клубков, образованных гиперфосфорилированным тау-белком [1, 2]. Несмотря на многолетние исследования, амилоидная гипотеза остается одной из центральных в объяснении патогенеза БА. Накопление олигомерных форм  $A\beta$  и их последующая агрегация в зрелые, стабильные фибриллы считаются ключевым событием, запускающим каскад нейротоксичности и нейровоспаления [3–5], поскольку агрегаты  $A\beta$  являются основным структурным компонентом сенильных бляшек, что делает их приоритетной мишенью для разработки методов диагностики и терапии. Одним из перспективных подходов является поиск соединений, способных ингибировать агрегацию  $A\beta$ . В настоящее время разрабатывают различные классы таких соединений, включая малые молекулы [6, 7], моноклональные антитела (адуканумаб, леканемаб) [8, 9], пептиды [10], природные лиганда [11], многофункциональные гибридные молекулы [12], однако многие из них сталкиваются с проблемами низкой биодоступности, ограниченной эффективности на поздних стадиях БА или серьезными побочными эффектами, такими как ARIA (аномалии визуализации, связанные с амилоидом) в случае антительной терапии [13, 14]. В этом контексте особый интерес представляют короткие пептиды, сочетающие целенаправленное действие с потенциально лучшей проникающей способностью. Таким соединением-кандидатом является тетрапептид НАЕЕ. По некоторым данным [15], НАЕЕ действует как специфический молекулярный инструмент, избирательно связывающийся с металлическим доменом пептида  $A\beta$  (11EVHH14), формируя в присутствии  $Zn^{2+}$  стабильный комплекс. Это взаимодействие, подтвержденное методами поверхностного плазмонного резонанса, ядерного магнитного резонанса и молекулярного моделирования, значительно нарушает  $Zn^{2+}$ -зависимую димеризацию мономеров  $A\beta$ , тем самым препятствуя образованию токсичных олигомеров. Важным подтверждением эффективности НАЕЕ стали эксперименты *in vivo* на гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ): пептид не только подавлял  $Zn^{2+}$ -индуцированное накопление амилоида, но и полностью предотвращал связанные с ним патологические фенотипы, включая паралич и сокращение продолжительности жизни трансгенных нематод [15]. В данных экспериментах не было зафиксировано признаков токсичности пептида, что указывает на его благоприятный профиль безопасности на этой модельной системе. Кроме того, для НАЕЕ было показано еще одно ключевое свойство: фармакокинетические исследования и молекулярное моделирование указывают на его способность преодолевать ГЭБ [15]. Следует отметить, что НАЕЕ представляет собой пептид, происходящий из последовательности  $\alpha$ 4-субъединицы никотинового ацетилхолинового рецептора ( $nAChR\alpha 4$ ) [16]. Таким образом, НАЕЕ обладает свойствами уникального кандидата для терапии БА: он имеет установленный механизм действия, направленный на ключевое звено патогенеза, и демонстрирует эффективность на уровне целого организма. Для дальнейшего подтверждения этого механизма простым и наглядным методом может служить прямое обнаружение связывания НАЕЕ с агрегатами  $A\beta$

в условиях клеточных культур. Для решения этой задачи одним из наиболее популярных и доступных методов является флуоресцентная микроскопия, в частности, с применением иммуноцитохимического анализа.

Таким образом, цель данной работы — провести прямую визуализацию и подтверждение связывания флуоресцентного коньюгата НАЕЕ-Су5 с агрегатами  $A\beta$  на клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y с помощью флуоресцентной микроскопии для оценки его специфичности и перспектив использования пептида НАЕЕ в качестве целевого лиганда для диагностики и терапии БА.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты были выполнены в лаборатории отдела медицинских нанобиотехнологий Научно-исследовательского института трансляционной медицины РНИМУ имени Н. И. Пирогова. Конфокальную микроскопию проводили в лаборатории «Биомедицинские наноматериалы» Института биоинженерии Университета науки и технологий МИСИС.

В эксперименте исследовали соединения: НАЕЕ-Су5 (Ac-His-Ala-Glu-Glu-Gly-Gly-Lys( $\epsilon$ -Су5)-NH<sub>2</sub>), ЕЕАН-Су5 (Ac-Glu-Glu-Ala-His-Gly-Gly-Gly-Lys( $\epsilon$ -Су5)-NH<sub>2</sub>, Су5-NH<sub>2</sub>). Исследуемые пептиды НАЕЕ-Су5 и ЕЕАН-Су5 (чистота > 95% по данным ВЭЖХ) были синтезированы и предоставлены лабораторией отдела медицинских нанобиотехнологий НИИ трансляционной медицины РНИМУ имени Н. И. Пирогова. Пептиды состоят из тетрапептидной «головки» (НАЕЕ или ЕЕАН), соединенной через линкер из четырех остатков глицина (GGGG) с флуоресцентным красителем Су5.

Остаток L-лизина (К) в линкере обеспечивает точку конъюгации для красителя. Структурные формулы исследуемых соединений представлены на рис. 1.

Лиофилизованные пептиды растворяли в стерильной деионизованной воде в концентрации 5–10 мМ и хранили аликвоты растворов при -20 °C не более 3 месяцев. Перед внесением пептидов на клетки растворы разводили в среде для культивирования клеток DMEM/F12, не содержащей эмбриональную телячьую сыворотку (ФБС), до концентрации 5 мкМ.

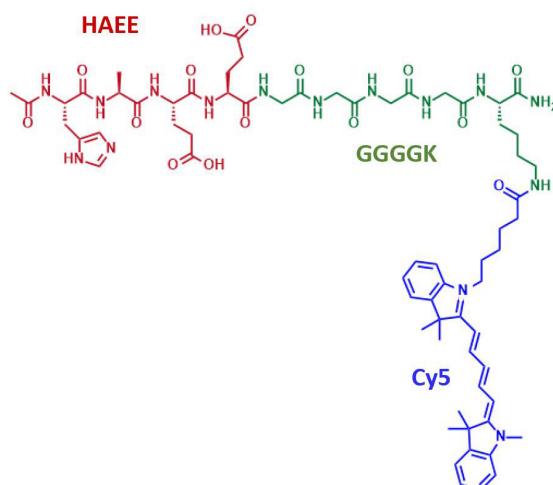
## Культивирование клеток линии SH-SY5Y

Клеточную линию нейробластомы человека SH-SY5Y (ATCC, США) выращивали во флаконах для культивирования в среде, состоящей из DMEM/F12 (ServiceBio, Китай) с добавлением 10%-й ФБС («Cytiva (GE Healthcare Life Sciences HyClone)», США), смеси антибиотиков (пенициллин — 100 мкг/мл, стрептомицин — 100 мкг/мл) (ServiceBio, Китай) и L-глутамина (100мМ) (ServiceBio, Китай), при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

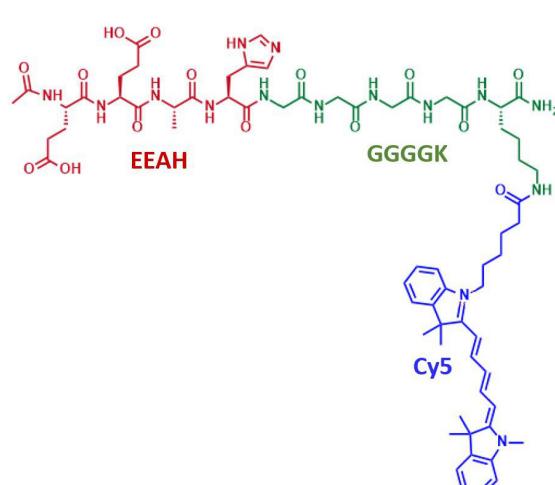
## Препараты бета-амилоида

Лиофилизованный  $A\beta$  (Amyloid  $\beta$ -Protein (1–42) (E-PP-0428), Elabscience, Китай) растворяли в 1% NH<sub>4</sub>OH до концентрации 1 мг/мл на ультразвуковой бане без нагрева в течение 10 мин. Далее раствор аликвотировали по 10 мкЛ и хранили при -80 °C. Перед нанесением на клетки раствор вновь подвергали обработке ультразвуком в течение 30 мин при 37 °C в конечной концентрации (20 мкг/мл).

1



2



**Рис. 1.** Структурные формулы исследуемых конъюгированных пептидов

#### Иммунофлуоресцентный анализ

Для исследования локализации соединений SH-SY5Y высаживали в лунки 24-луночного планшета по  $200 \times 10^3$  клеток на лунку. Через 24 ч клетки были обработаны препаратами Аβ (20 мкг/мл) в среде, не содержащей ФБС, и инкубировались 4 ч. После этого клетки дважды отмывали раствором Хэнкса и добавляли исследуемые соединения (HAEE-Су5, ЕЕАН-Су5, NH<sub>2</sub>-Су5) в концентрации 5 мкМ и инкубировали 2 ч. Затем клетки подвергали фиксации в течение 15 мин в 4%-м параформальдегиде при +4 °C. Пермеабилизацию проводили в блокирующем буфере 0,2%-го Твин-20, 0,2%-м Тритон X-100 и 2%-й козьей сыворотке в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее проводили инкубацию в течение 60 мин с первичными антителами (антитела мыши IgG1 против человеческого белка бета-амилоида, abl, clone 6E10 BioLegend) в разведении 1:100 000 (0,01 мкг/мл) в буфере (0,2% Твин-20, 0,2% Тритон X-100, 0,2% козья сыворотка, ФБС). После этого клетки трижды отмывали раствором 0,2%-го Твин-20, 0,2%-го Тритона X-100 по 5 мин. Далее клетки инкубировали со вторичными атителами (abII, Антитела козы против IgG(H+L), конъюгированные с alexa 488, E-AB-1056, Elabscience, Китай). Инкубация со вторичными антителами также составляла 60 мин, после клетки трижды промывали раствором 0,2%-го Твин-20, 0,2%-го Тритона X-100 по 5 мин и окрашивали ядерным красителем DAPI.

#### Конфокальная микроскопия

Визуализацию клеток проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Токио, Япония), оснащенного лазерной сканирующей системой (ThorLabs, Ньютон, Нью-Джерси, США) и объективом Apo 60×/0.5-1.25 с масляной иммерсией. Сканирование проводили с помощью программного обеспечения ThorImageLS (версия 2.4) (Thorlabs, Ньютон, Нью-Джерси, США); для обработки изображений использовали программное обеспечение Fiji 2.9.0.

#### Статистический анализ

Колокализацию изображений в каналах alexa488 и Су5 рассчитывали, используя программное обеспечение Fiji и

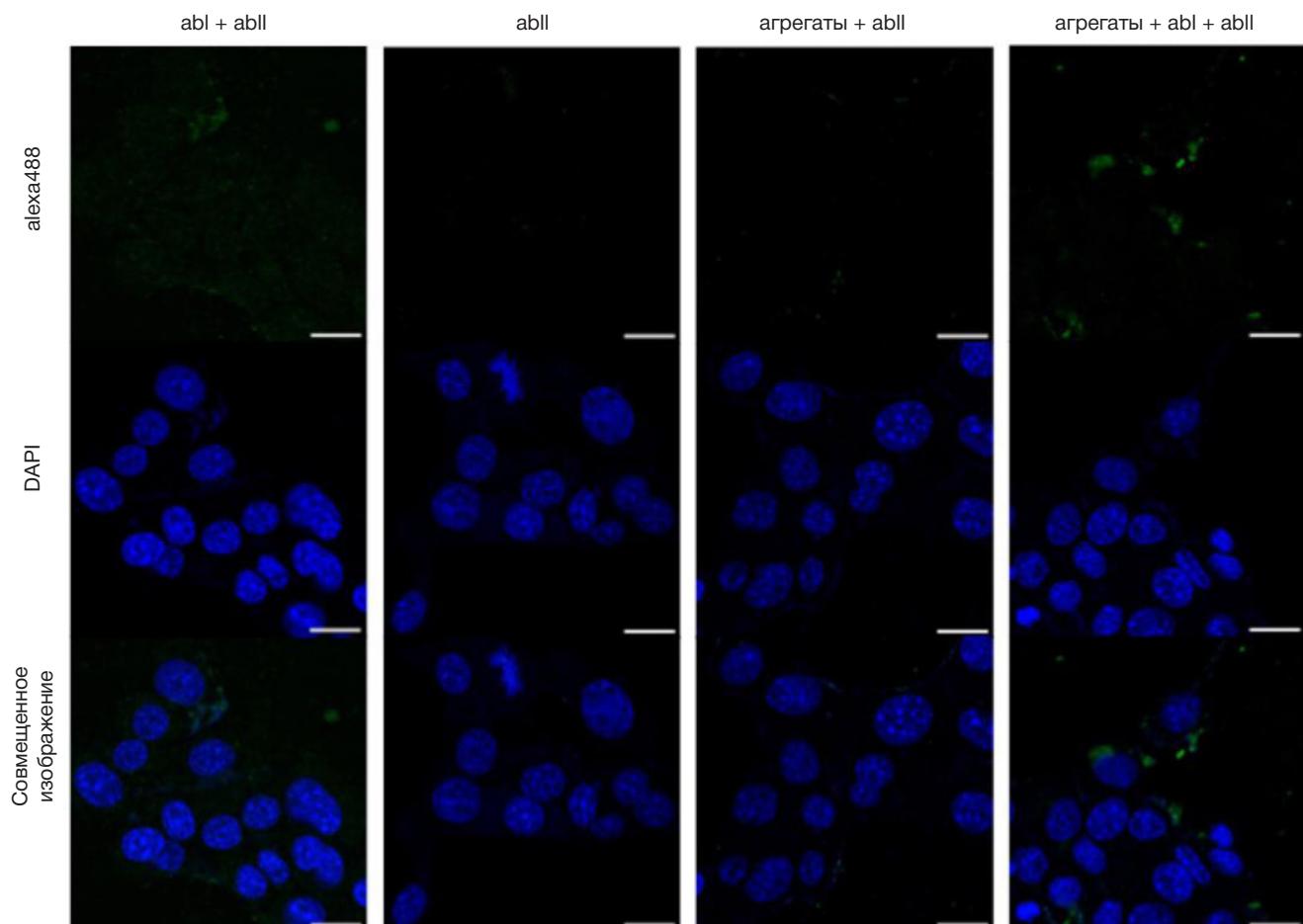
коэффициент Мандерса; для анализа использовали  $n = 6$  изображений.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для подтверждения специфичности иммунофлуоресцентного окрашивания на клетках линии SH-SY5Y был проведен ряд контрольных экспериментов (рис. 2). При использовании только вторичных антител, конъюгированных флуоресцентной меткой alexa 488 (abII), значимый флуоресцентный сигнал не детектировался. Аналогично инкубация клеток с Аβ в отсутствие первичных антител (abl) не приводила к появлению специфического окрашивания. Обработка клеток только abl или abII без Аβ не вызывала значимого флуоресцентного сигнала. Интенсивное флуоресцентное окрашивание наблюдалось исключительно при одновременном присутствии Аβ, abl и abII и соответствовало ожидаемой локализации целевых антигенов. Полученные результаты подтверждают, что специфическое окрашивание требует наличия всех компонентов системы и доказывают специфичность использованных антител.

Далее была исследована локализация НАЕЕ-Су5 и ЕЕАН-Су5 на клетках. В ходе контрольного эксперимента с использованием свободного красителя Су5-NH<sub>2</sub> выявлена его неспецифическая интернализация, проявляющаяся в виде диффузного сигнала на мембране и в цитоплазме клеток. Частичную локализацию столь гидрофобного соединения в цитоплазме можно объяснить пермеабилизацией клеток при проведении анализа. Напротив, для соединений ЕЕАН-Су5 и НАЕЕ-Су5 наблюдали интенсивный и структурно организованный сигнал, качественно отличающийся от контроля: он характеризовался выраженным мембранным связанным компонентом и формированием дискретных скоплений в цитоплазме (рис. 3). Это свидетельствует о специфическом взаимодействии исследуемых соединений с клеточными структурами, которое не сводится к неспецифическому накоплению красителя.

В связи с обнаруженной специфической локализацией ЕЕАН-Су5 и НАЕЕ-Су5 была непосредственно проверена их способность к связыванию с агрегатами Аβ. Анализ конфокальных микрофотографий продемонстрировал четкую и интенсивную колокализацию сигнала НАЕЕ-Су5 (красный) с сигналом от отложений Аβ (alex488, зеленый),

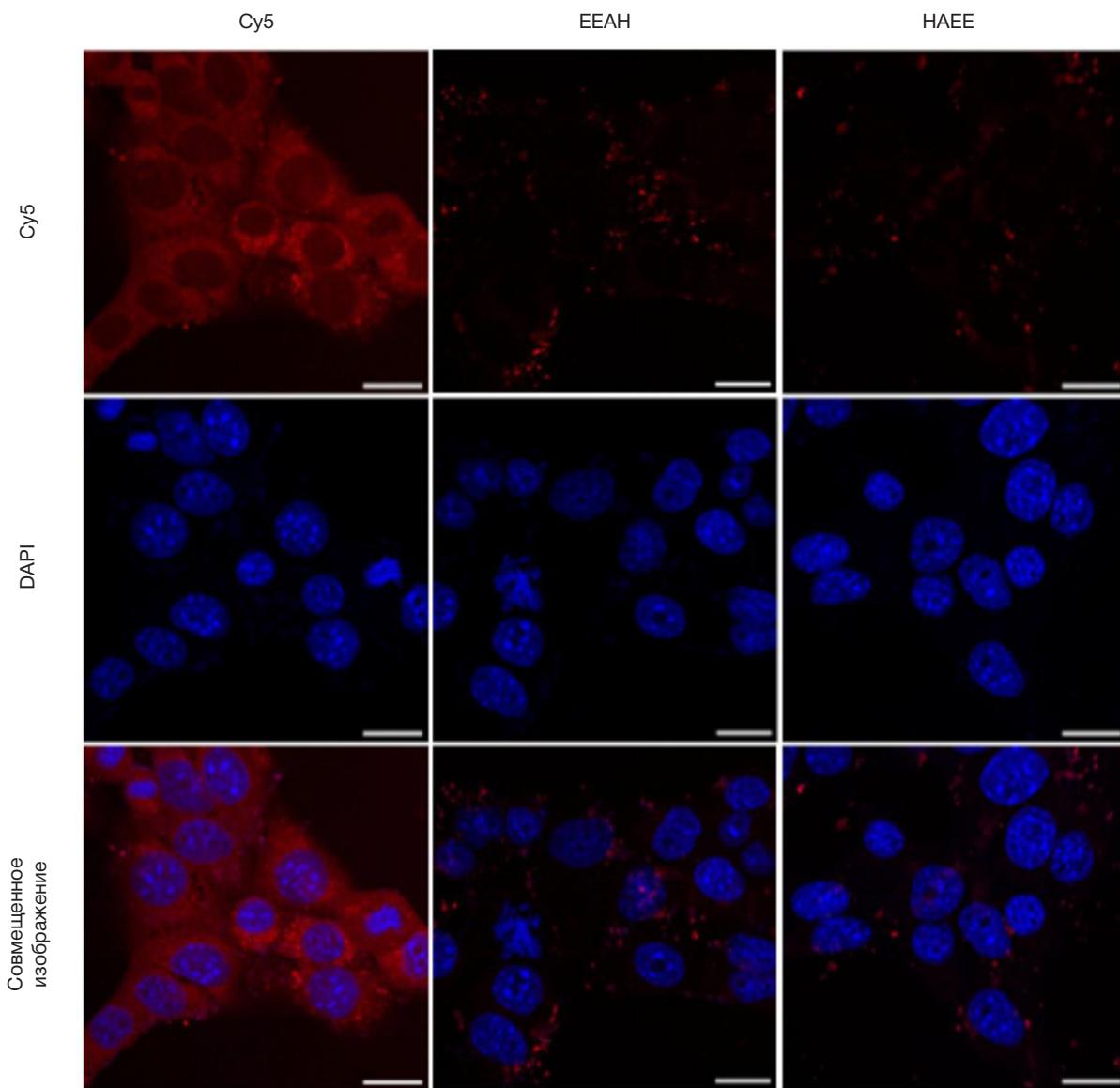


**Рис. 2.** Контроль специфичности иммунофлуоресцентного окрашивания в клетках линии SH-SY5Y. Совмещение каналов демонстрирует локализацию целевых антигенов, меченных alexa 488 (зеленый) на агрегатах Аβ. Ядра клеток визуализированы с помощью DAPI (синий). Масштабный отрезок 20 мкм

визуализируемую в виде обширных желтых областей на совмещенном изображении (рис. 4), что однозначно указывает на высокоаффинное связывание тетрапептида НАЕЕ-Суб с амилоидными агрегатами. В отличие от НАЕЕ-Суб, для пептида ЕЕАН-Суб не было зафиксировано значимого сигнала в канале Суб, что свидетельствует о его неспособности к специальному взаимодействию с изучаемой мишенью. Исходный краситель Суб хоть и проявлял некоторую возможность связывания с амилоидными отложениями, в большей степени был локализован неспецифически, что также подтверждает высокое сродство НАЕЕ-Суб к белковым агрегатам Аβ. Для дополнительного подтверждения колокализации каналов был расчитан коэффициент Мандерса между каналами изображений агрегатов Аβ и исследуемыми соединениями для полученных изображений: наиболее высоким значение коэффициента оказалось для соединения НАЕЕ-Суб и агрегатов Аβ ( $0.58 \pm 0.03$ ), в то время как между каналами Аβ и Суб и каналами Аβ и ЕЕАН-Суб значения составляли  $0.22 \pm 0.05$  и  $0.19 \pm 0.02$  соответственно, что говорит об отсутствии колокализации Суб и ЕЕАН-Суб и гораздо более высокой степени связывания НАЕЕ-Суб с Аβ. Крайне невысокий сигнал флуоресценции от ЕЕАН-Суб может быть связан с его низкой способностью удерживаться на агрегатах Аβ и на других компартментах клетки. В то же время сигнал от Суб является значительным и усиливается в областях агрегатов Аβ, однако значительная часть флуоресценции распределена в области мембраны и цитоплазмы, что говорит о низкой специфичности связывания Суб с Аβ.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование позволило выявить фундаментальные различия в способности НАЕЕ-Суб и ЕЕАН-Суб к связыванию с агрегатами Аβ на клеточной линии SH-SY5Y, что, по-видимому, обусловлено их структурными особенностями. Несмотря на идентичный аминокислотный состав, обращенная последовательность ЕЕАН-Суб привела к полной потере функциональной активности, в то время как НАЕЕ-Суб продемонстрировал высокую специфичность к исследуемой мишени. Полученные данные позволяют предположить, что N-концевое положение гистидина в последовательности НАЕЕ-Суб является критическим для формирования специфических взаимодействий с Аβ. Наши данные однозначно демонстрируют, что перенос гистидина (His, H) с первой на четвертую позицию в тетрапептидной «головке» лиганда приводит к резкому снижению способности к связыванию с Аβ. Известно, что N-концевой домен пептида Аβ содержит основные центры для связывания, а именно остатки His6, His13, His14, которые являются хорошими σ-донорами и участвуют в координации с металлами [17], а также ароматические остатки Phe4 и Tyr10, ответственные за π-π взаимодействия [17, 18]. Можно предположить, что гистидин в составе НАЕЕ участвует в аналогичных взаимодействиях с этими сайтами. В случае неактивного пептида ЕЕАН присутствие двух отрицательно заряженных остатков глутаминовой кислоты (Glu, E) в N-концевой позиции, а также присутствие флуоресцентного красителя Суб на ε-конце лизина (Lys, K) могут вызывать



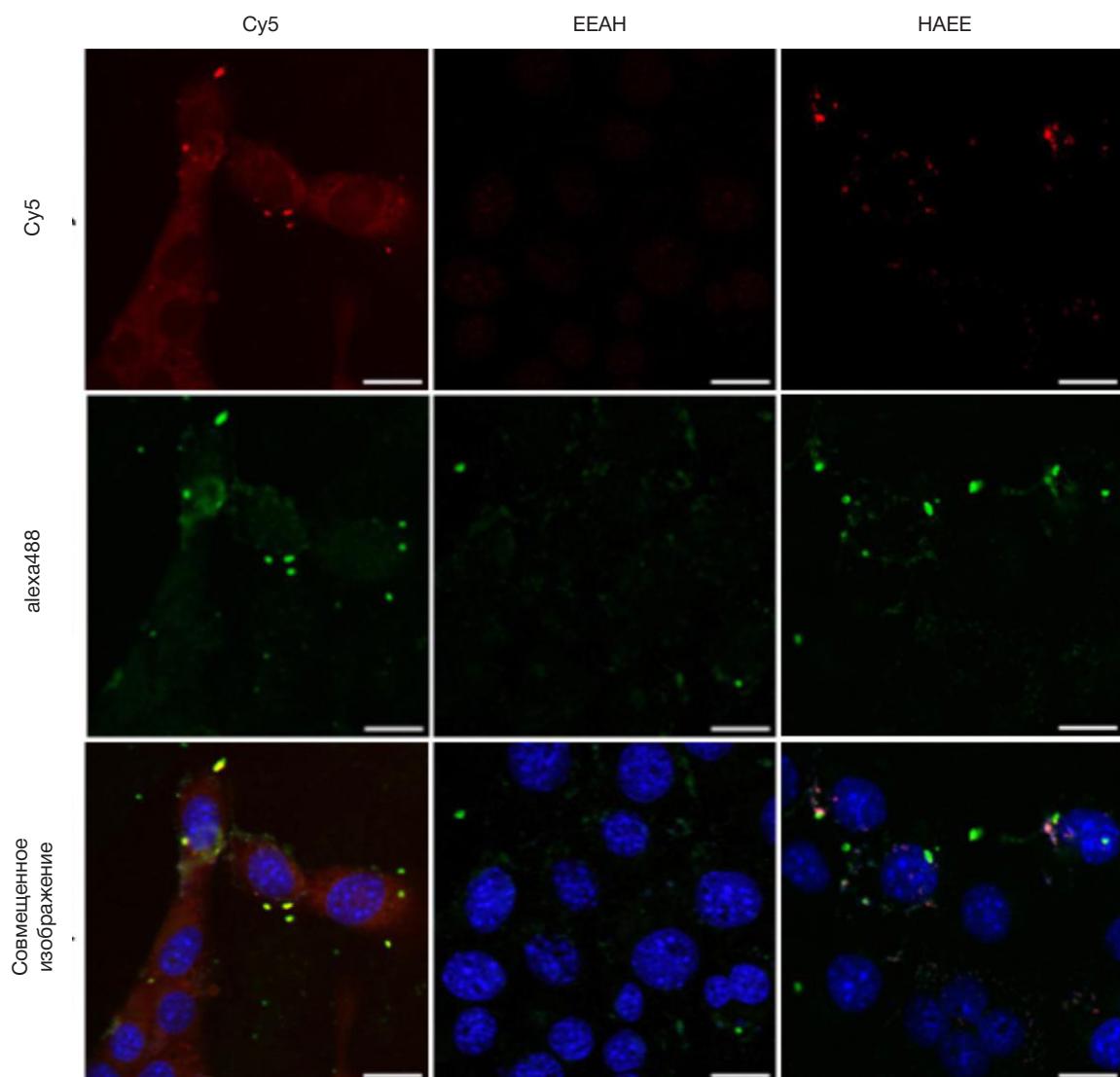
**Рис. 3.** Локализация соединений EEAH-Су5 и HAEE-Су5 в клетках линии SH-SY5Y. Сигнал от соединений, меченных Су5 (красный). Ядра клеток визуализированы с помощью DAPI (синий). Масштабный отрезок 20 мкм

сворачивание пептидной цепи или создавать стерические препятствия, нарушающие пространственную ориентацию и доступность ключевого остатка гистидина. В такой конфигурации гистидин может быть стерически недоступен для взаимодействия с сайтами связывания на А $\beta$ .

Количественным подтверждением высокой специфичности связывания HAEE-Су5 с амилоидными агрегатами служит расчет коэффициента колокализации Мандерса. Значение коэффициента  $0.58 \pm 0.03$  для пары HAEE-Су5 / А $\beta$  существенно превышает значения для контрольных соединений (Су5-NH<sub>2</sub> / А $\beta$  и EEAH-Су5 / А $\beta$ ), которые были близки к нулю. Этот количественный анализ убедительно свидетельствует, что интенсивный сигнал колокализации не является случайным и подтверждает высокое средство пептида HAEE именно к целевым А $\beta$ -агрегатам, что полностью согласуется с визуальными наблюдениями и демонстрирует критическую важность правильной последовательности аминокислот для эффективного взаимодействия.

Отсутствие флуоресцентного сигнала от EEAH-Су5 при четкой детекции связывания HAEE-Су5 с внеклеточными агрегатами А $\beta$  указывает на его неспособность к

специфическому взаимодействию с мишенью. Это различие, обусловленное неоптимальной первичной структурой контрольного пептида, может быть следствием нескольких факторов: нарушения связывания с А $\beta$ , повышенной чувствительности к протеолитической деградации, ухудшенной клеточной проницаемости или ускоренного выведения из клетки. Таким образом, в отличие от HAEE-Су5, пептид EEAH-Су5 не выполняет целевую функцию, что подтверждает критическую важность конкретной аминокислотной последовательности для эффективного связывания. Стоит отметить, что в отсутствие А $\beta$  оба пептида демонстрировали схожую внутриклеточную локализацию, что указывает на их стабильность и способность к проникновению в клетку. Однако интенсивный и структурно организованный сигнал от пептида HAEE-Су5, проявляющийся в виде дискретных цитоплазматических скоплений, указывает на его способность к проникновению в клетку и взаимодействию с внутриклеточными структурами. При этом, согласно литературным данным [19], наблюдаемая колокализация с А $\beta$  (рис. 4) происходит во внеклеточном пространстве, что и подтверждает специфичность связывания. Важно



**Рис. 4.** Визуализация связывания HAAE-Сy5 и EEAH-Сy5 с агрегатами А $\beta$  в клетках линии SH-SY5Y. Сигнал от тетрапептидов, меченные Сy5 (красный). Антитела на А $\beta$ , меченные alexa 488 (зеленый). Желтый цвет на совмещенном изображении указывает на колокализацию пептидов с агрегатами А $\beta$ . Ядра клеток визуализированы с помощью DAPI (синий). Масштабный отрезок 20 мкм

отметить, что наблюдаемое распределение HAAE-Сy5 качественно отличалось от диффузного сигнала свободного красителя Сy5-NH<sub>2</sub>, что исключает объяснение простым накоплением красителя и подчеркивает роль пептидной последовательности в направленном связывании.

Полученные результаты имеют важное практическое значение. Выявленная специфичность HAAE-Сy5 к агрегатам А $\beta$  позволяет рассматривать его в качестве перспективного лиганда для создания диагностических средств. В частности, его можно использовать как основу для разработки: МРТ-контрастных препаратов для прижизненной визуализации амилоидных бляшек, флуоресцентных зондов для интраоперационной детекции амилоидных отложений, тераностических платформ для направленной доставки лекарственных средств. В отличие от HAAE-Сy5, пептид EEAH-Сy5 демонстрирует полное отсутствие связывающей активности, и это наглядно показывает, что биологическая функция определяется не только аминокислотным составом, но и строго определенным порядком аминокислот. Для дальнейшего развития данного направления исследований требуется:

1) детальное изучение молекулярных взаимодействий HAAE с А $\beta$ -методами молекулярного докинга и спектроскопии; 2) оценка способности HAAE ингибировать агрегацию А $\beta$  *in vitro*; 3) исследование *in vivo* распределения и биодоступности HAAE на трансгенных моделях БА. Таким образом, результаты работы не только идентифицировали высокоспецифичный лиганд для А $\beta$ , но и продемонстрировали, что минимальные изменения в структуре пептида могут кардинально влиять на его функциональные свойства, что имеет фундаментальное значение для дизайна пептидных препаратов.

## ВЫВОДЫ

В ходе исследования была успешно валидирована методика детекции агрегатов А $\beta$  и визуализировано специфическое связывание тетрапептида HAAE, конъюгированного с Сy5, с амилоидными агрегатами на клеточной линии SH-SY5Y, что было количественно подтверждено высоким коэффициентом колокализации Мандерса ( $0.58 \pm 0.03$ ). Критическая важность аминокислотной последовательности для этого взаимодействия была установлена на основании того, что пептид EEAH-Сy5 с инвертированной последовательностью продемонстрировал полное отсутствие связывающей активности. Таким образом, установлено, что именно

N-концевое положение гистидина является критическим для формирования специфических взаимодействий с агрегатами А $\beta$ . Полученные результаты подтверждают перспективность применения НАЕЕ в качестве целевого лиганда для разработки диагностических и терапевтических средств

против БА, а также подчеркивают важность стереохимических факторов при конструировании пептидных препаратов. Для дальнейшего развития направления требуются исследования молекулярных механизмов взаимодействия и изучение *in vivo* распределения пептида.

## Литература

- Kolobova EA, Petrushanko IY, Mitkevich VA, Makarov AA, Grigorova IL. Novel method for detection of A $\beta$  and Iso-D7-A $\beta$  N-terminus-specific B cells and Iso-D7-A $\beta$ -specific antibodies. *Biol Methods Protoc.* 2025; 10 (1).
- Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2021; 7 (1): 33.
- Harris JR, Marles-Wright J, editors. *Macromolecular Protein Complexes II: Structure and Function.* Subcell Biochem. 2019; 93.
- Walsh DM, Selkoe DJ. Amyloid  $\beta$ -protein and beyond: the path forward in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol.* 2020; 61: 116–24.
- Katzmarski N, Ziegler-Waldkirch S, Scheffler N, Witt C, Abou-Ajram C, Nuscher B, et al. A $\beta$  oligomers trigger and accelerate A $\beta$  seeding. *Brain Pathol.* 2020; 30 (1): 36–45.
- Wilcock GK, Gauthier S, Frisoni GB, Jia J, Hardlund JH, Moebius HJ, et al. Potential of low dose leuco-methylthioninium bis(hydromethanesulphonate) monotherapy for treatment of mild Alzheimer's disease: cohort analysis as modified primary outcome in a phase III clinical trial. *J Alzheimers Dis.* 2018; 61 (1): 435–57.
- Paul A, Viswanathan GKK, Huber A, Arad E, Engel H, Jelinek R, et al. Inhibition of tau amyloid formation and disruption of its preformed fibrils by naphthoquinone-dopamine hybrid. *FEBS J.* 2021; 288 (13): 4267–90.
- Fedele E. Anti-amyloid therapies for Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (19): 14499.
- Kepp KP, Robakis NK, Høilund-Carlsen PF, Sensi SL, Vissel B. The amyloid cascade hypothesis: an updated critical review. *Brain.* 2023; 146 (9): 3969–90.
- Tucker M, Liao GY, Park JY, Rosenfeld M, Wezeman J, Mangalindan R, et al. Behavioral and neuropathological features of Alzheimer's disease are attenuated in 5xFAD mice treated with intranasal GHK peptide. *bioRxiv.* 2023; 20: 2023.11.20.567908.
- Kryscio RJ, Abner EL, Caban-Holt A, Lovell M, Goodman P, Darke AK, et al. Association of antioxidant supplement use and dementia in the Prevention of Alzheimer's Disease by Vitamin E and Selenium Trial (PREADViSE). *JAMA Neurol.* 2017; 74 (5): 567–73.
- Ramesh M, Govindaraju T. Multipronged diagnostic and therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Chem Sci.* 2022; 13 (46): 13657–89.
- Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2014; 370 (4): 322–33.
- Ivanova AV, Kutuzova AD, Kuzmichev IA, Abakumov MA. Alzheimer's disease: from molecular mechanisms to promising therapeutic strategies. *Int J Mol Sci.* 2025; 26 (19): 9444.
- Mitkevich VA, Barykin EP, Eremina S, Pani B, Katkova-Zhukotskaya O, Polshakov VI, et al. Zn-dependent  $\beta$ -amyloid aggregation and its reversal by the tetrapeptide HAEЕ. *Aging Dis.* 2023; 14 (2): 309–14.
- Barykin EP, Garifulina AI, Tolstova AP, Anashkina AA, Adzhubei AA, Mezentsev YV, et al. Tetrapeptide Ac-HAEЕ-NH2 protects  $\alpha$  $\beta$ 2 nAChR from inhibition by A $\beta$ . *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (24): 1–18.
- Silva DES, Cali MP, Pazin WM, Carlos-Lima E, Salles Trevisan MT, Venâncio T, et al. Luminescent Ru(II) phenanthroline complexes as a probe for real-time imaging of A $\beta$  self-aggregation and therapeutic applications in Alzheimer's disease. *J Med Chem.* 2016; 59 (19): 9215–27.
- Yao S, Cherny RA, Bush AI, Masters CL, Barnham KJ. Characterizing bathocuproine self-association and subsequent binding to Alzheimer's disease amyloid  $\beta$ -peptide by NMR. *J Pept Sci.* 2004; 10 (4): 210–7.
- Petrushanko IY, Mitkevich VA, Anashkina AA, Adzhubei AA, Burnysheva KM, Lakunina VA, et al. Direct interaction of beta-amyloid with Na $^+$ , K-ATPase as a putative regulator of the enzyme function. *Sci Rep.* 2016; 6: 27738.

## References

- Kolobova EA, Petrushanko IY, Mitkevich VA, Makarov AA, Grigorova IL. Novel method for detection of A $\beta$  and Iso-D7-A $\beta$  N-terminus-specific B cells and Iso-D7-A $\beta$ -specific antibodies. *Biol Methods Protoc.* 2025; 10 (1).
- Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2021; 7 (1): 33.
- Harris JR, Marles-Wright J, editors. *Macromolecular Protein Complexes II: Structure and Function.* Subcell Biochem. 2019; 93.
- Walsh DM, Selkoe DJ. Amyloid  $\beta$ -protein and beyond: the path forward in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol.* 2020; 61: 116–24.
- Katzmarski N, Ziegler-Waldkirch S, Scheffler N, Witt C, Abou-Ajram C, Nuscher B, et al. A $\beta$  oligomers trigger and accelerate A $\beta$  seeding. *Brain Pathol.* 2020; 30 (1): 36–45.
- Wilcock GK, Gauthier S, Frisoni GB, Jia J, Hardlund JH, Moebius HJ, et al. Potential of low dose leuco-methylthioninium bis(hydromethanesulphonate) monotherapy for treatment of mild Alzheimer's disease: cohort analysis as modified primary outcome in a phase III clinical trial. *J Alzheimers Dis.* 2018; 61 (1): 435–57.
- Paul A, Viswanathan GKK, Huber A, Arad E, Engel H, Jelinek R, et al. Inhibition of tau amyloid formation and disruption of its preformed fibrils by naphthoquinone-dopamine hybrid. *FEBS J.* 2021; 288 (13): 4267–90.
- Fedele E. Anti-amyloid therapies for Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (19): 14499.
- Kepp KP, Robakis NK, Høilund-Carlsen PF, Sensi SL, Vissel B. The amyloid cascade hypothesis: an updated critical review. *Brain.* 2023; 146 (9): 3969–90.
- Tucker M, Liao GY, Park JY, Rosenfeld M, Wezeman J, Mangalindan R, et al. Behavioral and neuropathological features of Alzheimer's disease are attenuated in 5xFAD mice treated with intranasal GHK peptide. *bioRxiv.* 2023; 20: 2023.11.20.567908.
- Kryscio RJ, Abner EL, Caban-Holt A, Lovell M, Goodman P, Darke AK, et al. Association of antioxidant supplement use and dementia in the Prevention of Alzheimer's Disease by Vitamin E and Selenium Trial (PREADViSE). *JAMA Neurol.* 2017; 74 (5): 567–73.
- Ramesh M, Govindaraju T. Multipronged diagnostic and therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Chem Sci.* 2022; 13 (46): 13657–89.
- Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2014; 370 (4): 322–33.
- Ivanova AV, Kutuzova AD, Kuzmichev IA, Abakumov MA. Alzheimer's disease: from molecular mechanisms to promising therapeutic strategies. *Int J Mol Sci.* 2025; 26 (19): 9444.
- Mitkevich VA, Barykin EP, Eremina S, Pani B, Katkova-Zhukotskaya O,

- Polshakov VI, et al. Zn-dependent  $\beta$ -amyloid aggregation and its reversal by the tetrapeptide HAEE. *Aging Dis.* 2023; 14 (2): 309–14.
16. Barykin EP, Garifulina AI, Tolstova AP, Anashkina AA, Adzhubei AA, Mezentsev YV, et al. Tetrapeptide Ac-HAEE-NH<sub>2</sub> protects  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 nAChR from inhibition by A $\beta$ . *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (24): 1–18.
17. Silva DES, Cali MP, Pazin WM, Carlos-Lima E, Salles Trevisan MT, Venâncio T, et al. Luminescent Ru(II) phenanthroline complexes as a probe for real-time imaging of A $\beta$  self-aggregation and therapeutic applications in Alzheimer's disease. *J Med Chem.* 2016; 59 (19): 9215–27.
18. Yao S, Cherny RA, Bush AI, Masters CL, Barnham KJ. Characterizing bathocuproine self-association and subsequent binding to Alzheimer's disease amyloid  $\beta$ -peptide by NMR. *J Pept Sci.* 2004; 10 (4): 210–7.
19. Petrushanko IY, Mitkevich VA, Anashkina AA, Adzhubei AA, Burnysheva KM, Lakunina VA, et al. Direct interaction of beta-amyloid with Na, K-ATPase as a putative regulator of the enzyme function. *Sci Rep.* 2016; 6: 27738.