

**ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИОЦИНОВ НА ФУНКЦИИ КЛЕТОК
ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА *IN VIVO* И *IN VITRO***

Гейн С. В.^{1,2},
Полюдова Т. В.¹,
Ибатуллин М. В.^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов - филиал ФГБУН
Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения
Российской академии наук, Пермь, Россия.

² Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия.

**INFLUENCE OF BACTERIOCINS ON THE FUNCTIONS OF INNATE
IMMUNE CELLS *IN VIVO* AND *IN VITRO***

Gein S. V. ^{a, b},
Polyudova T. V. ^a,
Ibatullin M. V. ^{a, b}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganism, Perm Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation.

^b Perm State University, Perm, Russian Federation.

Резюме

Цель исследования - изучить влияние варнерина и хоминина — лантибиотиков, выделенных из сред роста *Staphylococcus warneri* и *Staphylococcus hominis* соответственно, а также низина и синтетической полиаминокислоты поли-L-аргинина на функциональную активность клеток врожденного иммунитета *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы. В работе исследованы лантибиотики варнерин (APD ID: AP02801), полученный из среды роста бактерий *Staphylococcus warneri* DSM 16081, хоминин, выделенный из сред роста *Staphylococcus hominis* ГИСК-284 и низин из *Lactococcus lactis* (Sigma, США), а также поликатионный синтетический пептид с антибактериальными свойствами – поли-L-агнинин гирдохлорид с мол. массой 5000-15000 Да (Sigma, США).

В исследованиях *in vivo* объектом служили клетки перитонеальной полости белых лабораторных мышей породы Swiss, массой 20-22 г. Исследуемые пептиды вводили мышам внутрибрюшинно, через 1 ч мышей выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом. В качестве объекта исследований *in vitro* использовались лейкоциты периферической крови здоровых доноров-добровольцев. Поглотительную активность клеток перитонеальной полости оценивали методом проточной цитометрии, продукцию активных форм кислорода оценивали с помощью реакции люминолзависимой хемилюминесценции.

Результаты. Установлено, что варнерин и хоминин достоверно модулировали продукцию АФК *in vivo*. Оба пептида усиливали генерацию АФК перитонеальными макрофагами во всем диапазоне исследуемых доз, низин демонстрировал более слабое стимулирующее действие, увеличивая продукцию АФК только в дозе 0,1 мг/кг. Варнерин *in vivo* оказывал статистически значимый угнетающий эффект на поглотительную активность перитонеальных клеток, в то время как хоминин и низин во всем диапазоне исследуемых доз на процент фагоцитоза не влияли. *In vitro* варнерин как в спонтанных, так и в стимулированных пробах в высоких концентрациях угнетал, а в низких - стимулировал образование активных форм кислорода. Хоминин, напротив, усиливал микробицидный потенциал в нестимулированных культурах, но снижал зиозаниндуцированную продукцию АФК, оба пептида *in vitro* снижали поглотительную активность моноцитов и нейтрофилов. Низин и поли-L-аргинин на фагоцитарную активность и микробицидный потенциал влияния не оказывали.

Выводы. полученные данные подтверждают гипотезу о том, что антимикробные пептиды сдерживают рост конкурентной микрофлоры и оказывают модулирующее действие на врожденный иммунитет.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, лантибиотики, макрофаги, нейтрофилы, фагоцитоз, низин, поли-L-аргинин.

Abstract

Aim. The aim of this study was to investigate the effect of warnerin and hominin, lantibiotics isolated from the growth media of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus hominis*, respectively, as well as nisin and the synthetic polyamino acid poly-L-arginine, on the functional activity of innate immune cells *in vivo* and *in vitro*.

Materials and methods. The work investigated the lantibiotics warnerin (APD ID: AP02801), obtained from the growth medium of *Staphylococcus warneri* DSM 16081 bacteria, hominin, isolated from the growth media of *Staphylococcus hominis* GISK-284 and nisin from *Lactococcus lactis* (Sigma, USA), as well as a polycationic synthetic peptide with antibacterial properties - poly-L-arginine hydrochloride with a molecular weight of 5000-15000 Da (Sigma, USA).

In vivo studies were performed using peritoneal cells of white laboratory Swiss mice weighing 20-22 g. Leukocytes from the peripheral blood of healthy volunteer donors were used as an object of *in vitro* studies. The absorption activity of peritoneal cavity cells was assessed flow cytometry, and the production of reactive oxygen species was assessed using luminol-dependent chemiluminescence.

Results. It was found that warnerin and hominin reliably modulated ROS production *in vivo*. Both peptides enhanced ROS generation by peritoneal macrophages in the entire range of doses studied, nisin demonstrated a weaker stimulating effect, increasing ROS production only at a dose of 0.1 mg/kg. Warnerin *in vivo* had a statistically significant inhibitory effect on the absorptive activity of peritoneal cells, while hominin and nisin did not affect the percentage of phagocytosis in the entire range of doses studied. *In vitro*, warnerin in both spontaneous and stimulated tests at high concentrations inhibited, and at low concentrations stimulated, the formation of active oxygen forms. Hominin, on the contrary, enhanced the microbicidal potential in unstimulated cultures, but decreased zyozone-induced ROS production; both peptides decreased the scavenging activity of monocytes and neutrophils *in vitro*. Nisin and poly-L-arginine had no effect on phagocytic activity and microbicidal potential.

Conclusion. The obtained data confirm the hypothesis that antimicrobial peptides inhibit the growth of competitive microflora and have a modulating effect on innate immunity.

Keywords: antimicrobial peptides, lantibiotics, macrophages, neutrophils, phagocytosis, nisin, poly-L-arginine.

1 Введение

Кожа человека — это орган, являющийся не только физическим барьером, защищающим от агрессивных факторов внешней среды, но и уникальной экологической нишей для разнообразных микроорганизмов. Комменсальные бактерии, обитающие на поверхности кожи, играют важную роль в поддержании барьерной функции и иммунного гомеостаза. Основу кожного микробиома составляют преимущественно грамположительные бактерии, включая представителей родов *Staphylococcus*, *Corynebacterium* и *Cutibacterium*. Их взаимоотношения между собой и с организмом хозяина связаны с выработкой низкомолекулярных антимикробных соединений, среди которых ключевую роль играют бактериоцины [10]. Особое внимание в последние годы уделяется лантибиотикам — полициклическим пептидным бактериоцинам, содержащим уникальные аминокислотные остатки, такие как лантионин и β -метиллантионин. Именно эти пептиды наиболее часто синтезируются коагулазонегативными стафилококками [4, 6]. Антибактериальная активность лантибиотиков-стафилококцинов распространяется на различных представителей патогенных бактерий, включая *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes* [12]. Благодаря антибактериальному действию, бактериоцины вовлекаются в формирование микробного баланса кожи, предотвращая гиперколонизацию патогенными штаммами и способствуя доминированию комменсальных видов [11]. Бактерии, продуцирующие лантибиотики и другие антимикробные пептиды, обладают не только конкурентными преимуществами в микробиоте кожи, но и способны модулировать врожденный иммунитет хозяина. Установлено, что бактериоцины стафилококков могут влиять на активацию ряда клеточных популяций, регулируя продукцию провоспалительных цитокинов и антимикробных белков [5, 14]. В то же время, характер взаимодействия лантибиотиков с клетками иммунной системы находится в самом начале исследований. Изучение механизмов взаимодействия бактериоцинов с клетками врожденного иммунитета и их способности модулировать функциональную активность макрофагов и гранулоцитов, открывает новые возможности для создания иммуномодулирующих и противомикробных средств, которые могут использоваться в терапии инфекционных и воспалительных заболеваний.

Цель работы — исследование влияния стафилококковых бактериоцинов класса лантибиотиков на функциональную активность клеток врожденного иммунитета *in vivo* и *in vitro*.

2 Материалы и методы

В работе исследованы лантибиотики варнерин (APD ID:AP02801), полученный из среды роста бактерий *Staphylococcus warneri* DSM 16081 [2], хоминин, выделенный из сред роста *Staphylococcus hominis* ГИСК-284 [1] и низин из *Lactococcus lactis* (Sigma, США), а также поликатионный синтетический пептид с антибактериальными свойствами — поли-L-агринин гирдохлорид с мол. массой 5000-15000 Да (Sigma, США).

В исследованиях *in vivo* объектом служили перитонеальные макрофаги белых лабораторных мышей породы Swiss, массой 20-22 г. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Мышам внутрибрюшинно вводили исследуемые пептиды в дозах 10, 1, и 0,1 мг/кг (контрольной группе вводили 0,9% раствор NaCl), через 1 ч мышей выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом и выделяли лейкоциты перитонеальной полости путем промывания брюшной полости раствором Хенкса с 20 ЕД/мл гепарина. После выделения полученную суспензию центрифугировали при 400g в течение 10 мин. Для оценки поглотительной активности концентрацию клеток доводили до $2 \cdot 10^6$, затем 100 мкл FITC-меченных бактерий *Staphylococcus cohnii* (10^9 кл/мл) смешивали со 100 мкл клеток перитонеального смыва ($1 \cdot 10^6$), инкубировали в течение 30 мин при 37°C и промывали 2 раза центрифугированием в буфере DPBS/ЭДТА 0,02% при 4°C. Регистрацию производили на проточном цитофлуориметре Sino Cyte Flow Cytometer (Китай).

Оценку продукции активных форм кислорода (АФК) производили методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ), в лунки 96-луночного планшета вносили 10^5 клеток в 100 мкл раствора Хенкса. Индуктором и маркером реакции служили опсонизированный зимозан (150 мкг/мл) и люминол (10^{-5} М) соответственно. Результат регистрировался на многофункциональном спектрофотометре TECAN (Австрия) в течение часа с интервалом в 5 мин.

В качестве объекта исследований *in vitro* использовались лейкоциты периферической крови здоровых доноров-добровольцев, которые получали из плазмы путем отстаивания гепаринизированной крови в термостате в течение 2 часов при 37°C. После чего плазму снимали, центрифугировали при 400g в течение 20 мин и суспендировали в полной питательной среде (ППС), которую готовили на основе среды 199 с добавлением 10 mM HEPES («Sigma»), 2 mM L-глутамина («Sigma»), 100 мкг/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Варнерин, хоминин, низин и поли-L-аргинин использовали в концентрациях 3, 0,3, 0,03 мкг/мл. Поглотительную активность клеток и детекцию выработки АФК производили методами, описанными выше для *in vivo*. Популяции моноцитов и гранулоцитов определяли путем оценки фронтального и бокового светорассеивания, в каждом гейте оценивали 50000 клеток.

Статистическая обработка результатов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа для парных данных и LSD-критерия для межгруппового сравнения для *in vitro* и однофакторного дисперсионного анализа для непарных данных и LSD-критерия для межгруппового сравнения для *in vivo*.

3 Результаты

Установлено, что *in vivo* лантибиотики варнерин и хоминин усиливали выработку кислородных радикалов клетками перитонеальной полости в спонтанных и стимулированных пробах во всем исследуемом диапазоне концентраций. В сравнении с ними низин проявил значительно меньшую активность - не влиял на спонтанную и усиливал стимулированную ЛЗХЛ только в одной дозе – 0,1 мг/кг. При исследовании влияния пептидов на фагоцитарную активность *in vivo* было установлено, что хоминин и низин во всем диапазоне исследуемых доз на процент фагоцитоза не влияли, в то время как варнерин оказывал статистически значимый угнетающий эффект в дозах 1 и 0,1 мг/кг.

В экспериментах *in vitro* нами было обнаружено, что варнерин и хоминин обладали выраженным модулирующим эффектом по отношению к продукции активных форм кислорода (АФК). Варнерин в высокой концентрации угнетал спонтанную и стимулированную продукцию АФК, а в более низких, напротив, стимулировал. Хоминин спонтанную продукцию АФК во всем диапазоне исследуемых концентраций усиливал, а стимулированную, напротив, угнетал в концентрации 3 мкг/мл. В отличие от варнерина и хоминина, два других бактерицидных пептида - низин и поли-L-аргинин на продукцию АФК лейкоцитами периферической крови влияния не оказывали. Поглотительную способность как моноцитов, так и нейтрофилов *in vitro* варнерин и хоминин ингибировали, в то время как низин и поли-L-аргинин на фагоцитарную активность выше указанных клеточных популяций не влияли.

4 Обсуждение

Таким образом, бактериальные пептиды, выделенные из сред роста стафилококков, обладают выраженным иммуномодулирующим действием как *in vitro*, так и *in vivo*. Показано, что катионные антимикробные пептиды могут активировать клетки врожденного иммунитета благодаря взаимодействию с мембранными рецепторами и влиянию на клеточный метаболизм [9]. В системе *in vivo* все исследуемые нами пептиды стимулировали продукцию активных форм кислорода, особенно выражено данный эффект проявлялся у пептидов, выделенных из сред культивирования коагулазонегативных стафилококков – варнерина и хоминина. Лантибиотик низин, получаемый из сред роста молочнокислых бактерий *L. lactis* обладал менее выраженным эффектом на микробицидный потенциал. На поглотительную активность клеток перитонеального смыва *in vivo* значимое действие оказывал только варнерин, которое выражалось в снижении фагоцитарной активности.

В системе *in vitro* выраженное угнетающее действие на поглотительную активность макрофагов и гранулоцитов было зарегистрировано как у варнерина, так и у хоминина, в то же время направленность действия этих пептидов на микробицидный потенциал зависела от концентрации пептида и присутствия активирующего сигнала. Такая полифункциональность является одной из особенностей пептидов данной группы, так, например, продуцируемый бактериями *Streptococcus salivarius* лантибиотик

сальвариоцин разнонаправлено регулирует фагоцитоз, продукцию кислородных радикалов и провоспалительных цитокинов [3, 8]. Известно также о продукции бактериями *Staphylococcus epidermidis* фенолорастворимых модулинов, регулирующих функции иммунных клеток кожи [5, 13]. Угнетение фагоцитоза является свидетельством особой функции антимикробных пептидов, защищающей стафилококков-продуцентов от клеток врожденного иммунитета и способствующей повышению выживаемости микробных популяций в организме хозяина.

В тоже время, у низина и поли-L-аргинина, которые обладая выраженной противомикробной активностью, модулирующих эффектов в отношении клеток врожденного иммунитета *in vitro* выявить не удалось. Это может быть связано с тем, что низин – продукт синтеза молочнокислых бактерий, проявляет преимущественно прямую антимикробную активность, и модулировать функции клеток иммунной системы может только в определенных условиях [7, 15].

5 Выводы

1. Антимикробные пептиды способны одновременно подавлять рост конкурентной микрофлоры и модулировать врожденный иммунитет.
2. Обнаруженные различия в действиях отдельных пептидов *in vitro* и *in vivo* позволяют предположить, что иммуномодулирующее действие пептидов может опосредоваться различными молекулярными механизмами и клеточными мишенями.

Исследования проведены в рамках государственного задания «ИЭГМ УрО РАН», номер государственной регистрации темы № 124020500027-7.

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Гейн Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, директор ФГБУ Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГАОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет;

адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13;

телефон: 8(902)831-77-05;

e-mail: gein@iegm.ru

Gein Sergey V., MD, director of Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms - Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; professor of department of microbiology and immunology Perm State National Research University;

address: 614081 Perm, Goleva 13;

telephone: 8(902)831-77-05;

e-mail: gein@iegm.ru

Блок 2. Информация об авторах

Полюдова Татьяна Вячеславовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник, заведующая лабораторией биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук;

адрес: 614000, г. Пермь, ул. Голева, 13;

телефон: 8(902)831-70-78;

e-mail: poludova76@mail.ru

Polyudova Tatyana V., PhD, Researcher, head of the Laboratory of Biochemistry of Microbial Development, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms - Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences;

address: 614000 Perm, Goleva 13;

telephone: 8(902)831-70-78;

e-mail: poludova76@mail.ru

Ибатуллин Матвей Викторович, магистрант кафедры микробиологии и иммунологии ПГНИУ; лаборант лаборатории молекулярной иммунологии; инженер лаборатории биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук - филиал Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра
Уральского отделения Российской академии наук;

адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13;

телефон: 8(950)449-63-00;

e-mail: manovvi@yandex.ru

Ibatullin Matvey V., master's student at the Department of Microbiology and Immunology, Perm State University; Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Immunology; Engineer, Laboratory of Biochemistry of Microbial Development, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms - Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences;

address: 614081 Perm, Goleva 13;

telephone: 9(950)449-63-00;

e-mail: manovvi@yandex.ru

Блок 3. Метаданные статьи

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИОЦИНОВ НА ФУНКЦИИ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО
ИММУНИТЕТА *IN VIVO* И *IN VITRO*

INFLUENCE OF BACTERIOCINS ON THE FUNCTIONS OF INNATE
IMMUNE CELLS *IN VIVO* AND *IN VITRO*

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИОЦИНОВ НА ФУНКЦИИ

INFLUENCE OF BACTERIOCINS ON THE FUNCTIONS

Ключевые слова: антимикробные пептиды, лантибиотики, макрофаги, нейтрофилы, фагоцитоз, низин, поли-L-аргинин.

Keywords: antimicrobial peptides, lantibiotics, macrophages, neutrophils, phagocytosis, nizin, poly-L-arginine.

Иммунологические чтения в Челябинске 2025.

Количество страниц текста – 4,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 0.

31.03.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации, выходные данные	ФИО, название публикации на английском	Полный интернет адрес
1	Патент РФ. 2014. № 2528055	Patent of the Russian Federation. 2014. No. 2528055	http://www.findpatent.ru/patent/252/2528055.html
2	Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Лихацкая Г.Н., Коробов В.П. Оптимизация условий получения и моделирование 3D-структуры нового антибактериального пептида семейства лантибиотиков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53 № 1. – С. 47-54.	Polyudova T.V., Lyamkina Lum., Likhatskaya G.N., Korobov V.P. Optimization of the conditions for obtaining and modeling the 3D structure of a new antibacterial peptide of the lantibiotic family // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2017. – Vol. 53 No. 1. – pp. 47-54.	https://doi.org/10.7868/S0555109917010147
3	Barbour A., Smith L., Oveisi M., Williams M., Huang R. C., Marks C., Fine N., Sun C., Younesi F., Zargarani S., Orugunty R., Horvath T. D., Haidacher S. J., Haag A. M., Sabharwal, A., Hinz, B., & Glogauer, M. Discovery of phosphorylated lantibiotics with proimmune activity that regulate the oral		https://doi.org/10.1073/pnas.2219392120

	microbiome. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> , 2023, Vol. 120(22), e2219392120.		
4	Carson D. A., Barkema H. W., Naushad S., & De Buck, J. Bacteriocins of Non-aureus Staphylococci Isolated from Bovine Milk. <i>Applied and environmental microbiology</i> , 2017, Vol. 83(17), e01015-17.		https://doi.org/10.1128/AEM.01015-17
5	Cogen A. L., Yamasaki K., Muto J., Sanchez K. M., Crotty Alexander L., Tanios J., Lai Y., Kim J. E., Nizet V., Gallo R. L. Staphylococcus epidermidis antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulins-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A Streptococcus. <i>PloS one</i> , 2010, Vol. 5(1), e8557.		https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008557
6	Fernández-Fernández R., Elsherbini A. M. A., Lozano C., Martínez A., de Toro M., Zarazaga M., Peschel A., Krismer B., Torres C. Genomic Analysis of Bacteriocin-Producing Staphylococci: High Prevalence of Lanthipeptides and the Micrococцин P1 Biosynthetic Gene Clusters. <i>Probiotics and antimicrobial</i>		https://doi.org/10.1007/s12602-023-10119-w

	<i>proteins</i> , 2025, Vol. 17(1), pp. 159–174.		
8	Li J., Jin J., Li S., Zhong Y., Jin Y., Zhang X., Xia B., Zhu Y., Guo R., Sun X., Guo J., Hu F., Xiao W., Huang F., Ye H., Li R., Zhou Y., Xiang X., Yao H., Yan Q., Su L., Wu L., Luo T., Liu Y., Guo X., Qin J., Qi H., He J., Wang J., Li Z. Tonsillar Microbiome-Derived Lantibiotics Induce Structural Changes of IL-6 and IL-21 Receptors and Modulate Host Immunity. <i>Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)</i> , 2022, Vol. 9(30), e2202706.		https://doi.org/10.1002/advances.202202706

10	Nakatsuji T., Chen T. H., Narala S., Chun K. A., Two A. M., Yun T., Shafiq F., Kotol P. F., Bouslimani A., Melnik A. V., Latif H., Kim J. N., Lockhart A., Artis K., David G., Taylor P., Streib J., Dorrestein P. C., Grier A., Gill S. R., Zengler K., Hata T.R. Leung D. Y. M., Gallo R. L. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against <i>Staphylococcus aureus</i> and are deficient in atopic dermatitis. <i>Science translational medicine</i> , 2017, Vol. 9(378), eaah4680.		https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4680

13	Sanford J. A., & Gallo R. L. Functions of the skin microbiota in health and disease. <i>Seminars in immunology</i> , 2013, Vol. 25(5), pp. 370–377.		https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.09.005
14	Tomic-Canic M., Burgess J. L., O'Neill K. E., Strbo N., Pastar I. Skin Microbiota and its Interplay with Wound Healing. <i>American journal of clinical dermatology</i> , 2020, Vol. 21(Suppl 1), pp. 36–43.		https://doi.org/10.1007/s40257-020-00536-w
15	Zhang Z. J., Cole C., Lin H., Wu C., Haro F., McSpadden E., van der Donk W. A., Pamer E. G. Exposure and resistance to lantibiotics impact microbiota composition and function. <i>bioRxiv : the preprint server for biology</i> , 2023.12.30.573728.		https://doi.org/10.1101/2023.12.30.573728