

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АЦИПЕНСИНА 1 В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Умнякова Е.С.¹, Кудрявцев И.В.^{1,4}, Грудинина Н.А.¹, Баландин С.В.²,
Болосов И.А.², Пантелеев П.В.², Филатенкова Т.А.¹, Орлов Д.С.^{1,3},
Цветкова Е.В.^{1,3}, Овчинникова Т.В.², Кокряков В.Н.^{1,3}, Шамова О.В.^{1,3}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академ. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Поиск новых соединений, обеспечивающих доставку лекарственных препаратов в инфицированные или опухолевые клетки, является актуальной задачей биомедицинских исследований. К числу таких соединений относятся проникающие в клетки пептиды (Cell-Penetrating Peptides), которые легко транслоцируются через мембраны эукариотических клеток и могут служить переносчиками разнообразных терапевтических агентов в клетки. Целью данной работы явилось изучение способности антимикробного пептида системы врожденного иммунитета — аципенсина 1 — проникать в опухолевые клетки человека *in vitro*. Аципенсин 1 — катионный пептид, выделенный нами ранее из лейкоцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*. В рамках данного исследования впервые установлено, что аципенсин 1 может проникать в эукариотические клетки без их повреждения. Разработана процедура получения рекомбинантного препарата аципенсина 1, проведена конъюгация пептида с флуоресцентным маркером BODIPY FL. С использованием конфокальной микроскопии показано, что меченый аципенсин 1 быстро транслоцируется в клетки эритромиелоидного лейкоза человека линии К-562 и детектируется во внутриклеточном пространстве уже через 5 мин после добавления его в культуру клеток. С помощью проточной цитометрии изучена кинетика проникновения меченых пептидов (в нетоксических микромолярных концентрациях) в клетки К-562, получены данные о быстрой интернализации меченого пептида в исследуемые клетки, подтверждающие результаты микроскопического анализа: несущий флуоресцентную метку пептид выявлялся в клетках К-562 через 2–3 секунды после внесения препарата инкубационную среду, максимум флуоресценции достигался на сроке около 45 секунд, с дальнейшим выходом «на плато» на сроках свыше 100 секунд после стимуляции клеток исследуемым соединением. Установленные факты подтверждают концепцию о том, что антимикробные пептиды врожденного иммунитета обладают свойствами проникающих в клетки пептидов, а также позволяют рассматривать исследуемый антимикробный пептид аципенсин 1 как перспективное соединение, на основе которого могут быть разработаны новые лекарствен-

Адрес для переписки:

Умнякова Екатерина Сергеевна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, г. Санкт-Петербург,
ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (981) 971-49-75.
E-mail: umka-biolog@mail.ru

Address for correspondence:

Umnyakova Ekaterina S.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Akad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (981) 971-49-75.
E-mail: umka-biolog@mail.ru

Образец цитирования:

Е.С. Умнякова, И.В. Кудрявцев, Н.А. Грудинина,
С.В. Баландин, И.А. Болосов, П.В. Пантелеев,
Т.А. Филатенкова, Д.С. Орлов, Е.В. Цветкова,
Т.В. Овчинникова, В.Н. Кокряков, О.В. Шамова
«Интернализация антимикробного пептида аципенсина 1
в опухолевые клетки человека» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 575–582.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-575-582
© Умнякова Е.С. и соавт., 2016

For citation:

E.S. Umnyakova, I.V. Kudryavtsev, N.A. Grudinina,
S.V. Balandin, I.A. Bolosov, P.V. Panteleev, T.A. Filatenkova,
D.S. Orlov, E.V. Tsvetkova, T.V. Ovchinnikova,
V.N. Kokryakov, O.V. Shamova "Internalization of
antimicrobial peptide acipensin 1 into human tumor cells",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2016, Vol. 18, no. 6, pp. 575–582.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-575-582
DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-6-575-582

ные препараты с повышенной способностью проникать в клетки-мишени, участвующие в патологических процессах и, следовательно, с более высокой эффективностью терапевтического действия.

Ключевые слова: проникающие в клетки пептиды, антимикробные пептиды, аципенсин 1

INTERNALIZATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE ACIPENSIN 1 INTO HUMAN TUMOR CELLS

Umnyakova E.S.^a, Kudryavtsev I.V.^{a,d}, Grudinina N.A.^a,
Balandin S.V.^b, Bolosov I.A.^b, Panteleev P.V.^b, Filatenkova T.A.^a,
Orlov D.S.^a, Tsvetkova E.V.^a, Ovchinnikova T.V.^b, Kokryakov V.N.^{a,c},
Shamova O.V.^{a,c}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^c St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

^d The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Search for new compounds providing delivery of drugs into infected or neoplastic cells, is an important direction of biomedical research. Cell-penetrating peptides are among those compounds, due to their ability to translocate through membranes of eukaryotic cells, serving as potential carriers of various therapeutic agents to the target cells. The aim of present work was to investigate the ability of acipensin 1, an antimicrobial peptide of innate immune system, for *in vitro* penetration into human tumor cells. Acipensin 1 is a cationic peptide that we have previously isolated from leukocytes of the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*. Capability of acipensin 1 to enter the human erytroleukemia K-562 cells has been investigated for the first time. A biotechnological procedure for producing a recombinant acipensin 1 peptide has been developed. The obtained peptide was conjugated with a fluorescent probe BODIPY FL. By means of confocal microscopy, we have shown that the tagged acipensin 1 rapidly enters into K-562 cells and can be detected in the intracellular space within 5 min after its addition to the cell culture. Using flow cytometry technique, penetration kinetics of the labeled peptide into K-562 cells (at nontoxic micromolar concentrations) has been studied. We have observed a rapid internalization of the peptide to the target cells, thus confirming the results of microscopic analysis, i.e. the labeled acipensin was detectable in K-562 cells as soon as within 2-3 seconds after its addition to the incubation medium. The maximum of fluorescence was reached within a period of approx. 45 seconds, with further “plateau” at the terms of >100 seconds following cell stimulation with the test compound. These data support the concept, that the antimicrobial peptides of innate immunity system possess the features of cell-penetrating peptides, and allow us to consider the studied sturgeon peptide a promising template for development of new drugs with increased ability to enter the cells implicated into pathological processes, and, therefore, higher therapeutic efficiency.

Keywords: cell-penetrating peptides, antimicrobial peptides, acipensin 1

Работа поддержана грантом ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (соглашение № 14.604.21.0104). Уникальный идентификатор RFMEFI60414X0104.

Поиск путей доставки лекарственных соединений в клетки входит в число актуальных задач медицинской иммунологии, связанных с лечением инфекционных заболеваний, в частности вызываемых микроорганизмами, имеющими внутриклеточную локализацию, а также

с терапией опухолевых заболеваний. Одним из подходов для решения данной задачи является использование соединений, способствующих переносу лекарственных препаратов через мембраны клеток-мишеней. К числу таких соединений принадлежат проникающие в клетки пептиды (Cell Penetrating Peptides – CPP). CPP имеют различные происхождение и структуру. Для большинства CPP характерен высокий положительный заряд молекулы, а также наличие значительного количества гидрофобных аминокислотных остатков. Многие CPP являются

фрагментами белков вирусов, растений, животных. Примерами подобных пептидов являются: ТАТ, представляющий собой фрагмент капсидного белка вируса иммунодефицита человека, пептид VP22 — фрагмент белка вируса простого герпеса, пенетратин или рАНТР — фрагмент белка, участвующего в регуляции процессов развития дрозиды, и другие пептиды [2, 6]. На основе природных структур разработаны и синтезированы химерные молекулы, обладающие способностью транслоцироваться через мембрану клеток млекопитающих, а также переносить в клетки разнообразные лекарственные препараты, имеющие внутриклеточные мишени: siRNA, антисмысловые олигонуклеотиды, плазмиды, наночастицы различной природы, липосомы, разнообразные противоопухолевые или противомикробные лекарственные агенты [3, 4, 9]. Однако известно, что многие СРР обладают и побочными эффектами, в частности могут нарушать функционирование мембранных белков нормальных клеток организма, вызывать аллергические реакции [6, 8] и т.д. Некоторые пептиды подвергаются быстрой деградации в биологических жидкостях [6]. Поэтому поиск новых эффективных СРР с оптимальными для практического применения свойствами в настоящее время является актуальной задачей биомедицинских исследований,

Целью данной работы явилось изучение способности недавно открытого нами антимикробного пептида системы врожденного иммунитета — аципенсина 1 — проникать в эукариотические клетки. Аципенсин 1 (Ac1) — пептид, выделенный из лейкоцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*, является производным гистона H2A, имеет молекулярную массу 5336 kDa, включает 51 аминокислотный остаток, в том числе 13 положительно заряженных остатков аргинина и лизина (при отсутствии отрицательно заряженных), а также 10 остатков гидрофобных аминокислот (валина, лейцина, тирозина, фенилаланина) [7]. Подобные признаки характерны для многих СРР, что позволило предположить, что аципенсин обладает и сходными функциональными свойствами. В пользу этого предположения свидетельствовали и данные по наличию свойств СРР у ряда антимикробных пептидов врожденного иммунитета позвоночных, в частности буфорина [10]. В задачи нашей работы входило получение рекомбинантного Ac1, конъюгация его с флуорофором и исследование его

способности интернализироваться в клетки человека в культуре.

Получение рекомбинантного препарата аципенсина 1

Экспрессирующую плазмиду pET-His8-TrxL-Ac1p1 получали путем лигирования BglII/XhoI-фрагмента плазмиды pET-31b(+) (Novagen) со вставкой, кодирующей T7lac промотор, участок связывания рибосомы и гибридный белок His8-TrxL-Ac1. Последний состоял из восьми остатков гистидина, последовательности тиоредоксина (белка-носителя) и участка, соответствующего целевому пептиду Ac1. Искусственный ген получали химическим синтезом набора олигонуклеотидных фрагментов с последующей сборкой и амплификацией промежуточных и конечного продуктов при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Матрицей для амплификации последовательности тиоредоксина служила плаزمида pET-32a(+) (Novagen). Методом направленного мутагенеза при помощи ПЦР на стадии сборки была осуществлена замена кодона, кодирующего Met37 (ATG) в составе тиоредоксина, на лейциновый кодон (CTG).

Экспрессию гена гибридного белка проводили в клетках *E. coli* BL21 (DE3), трансформированных плазмидой pET-His8-TrxL-Ac1. Трансформанты выращивали в жидкой питательной среде LB с добавлением 20 мМ глюкозы и 100 мкМ ампициллина до плотности культуры $OD_{600} \sim 0,7$, после чего индуцировали экспрессию добавлением 0,2 мМ изопропилтио-D-галактопиранозидом (IPTG) и продолжали инкубацию при температуре 30 °C в течение 4 ч. Далее клеточную массу осаждали центрифугированием и проводили ресуспендирование и ультразвуковой лизис клеток в фосфатном буфере (pH 7,8), содержащем 6 М гидрохлорид гуанидина. Гибридный белок очищали на колонке с Ni-сефарозой (Amersham) в системе буферов, содержащих 6 М гидрохлорид гуанидина, обессоливали с помощью диализа и подвергали лиофилизации. Навеску гибридного белка растворяли в трифторуксусной кислоте и расщепляли бромцианом в течение 12 ч. Реакцию останавливали добавлением избытка воды и упариванием на вакуумной центрифуге. Белок-носитель удаляли путем повторной металлохелатной хроматографии. В качестве финальной стадии очистки использовали метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) на колонке ReproSil-Pur C18-AQ (Германия) в линейном градиенте ацетонитри-

ла от 5 до 80% в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты. Гомогенность полученных образцов и содержание в них целевых пептидов подтверждали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и масс-спектрометрии МАЛДИ.

Конъюгация аципенсина 1 с флуоресцентным зондом BODIPY FL (SE)

К 500 мг Ас-1 добавляли 500 мкг флуорофора BODIPY FL SE (N-гидроксисукцинимидный эфир 4,4-дифтор-5,7-диметил-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен-3-пропионовой кислоты (возбужд. 503 нм, испуск. 512 нм) фирмы Invitrogen, США) в 0,15 М натрий-карбонатном буфере, рН = 8,3. Конъюгацию проводили в течение 24 ч при +25 °С на роторной мешалке при низкой скорости вращения (35 об/мин). Реакцию останавливали, добавляя трифторуксусную кислоту до конечной концентрации 0,1%. Далее производили очистку меченого продукта (Ас1-BOBIPY) от несвязавшегося пептида и других нежелательных продуктов реакции с помощью ОФ ВЭЖХ на колонке Vydac-C18 (США) в линейном градиенте ацетонитрила от 10 до 60% в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты. Белковый состав полученных фракций анализировали с помощью аналитического электрофореза в полиакриламидном геле. Концентрацию пептидов, конъюгированных с BODIPY FL, определяли спектрофотометрически согласно рекомендациям производителя флуорофора.

Клеточные культуры

В работе использовали клетки эритромиелоидного лейкоза человека линии К-562, поставляемые фирмой Биолот (Россия). Клетки культивировали в среде RPMI 1640, дополненной глутамином, гентамицином и 10% эмбриональной телячьей сывороткой (Биолот, Россия), при 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

Методы исследования проникновения аципенсина 1 через мембраны опухолевых клеток

Конфокальная микроскопия

Связывание и интернализацию меченого аципенсина 1 (Ас1-BODIPY) в клетки-мишени (K562) выявляли при помощи инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа «LSM 510 Meta» (Zeiss, Германия), с иммерсионным объективом PlanApoChromat 63/1.4 Oil. Клеточные суспензии переносили в пластиковые пробирки по 80 000 клеток на про-

бу в объеме 50 мкл. Затем к этим суспензиям добавляли Ас1-BODIPY до конечной концентрации 25 мкМ. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 5, 15 или 40 минут, затем клетки осаждали центрифугированием, отмывали от избытка несвязавшегося пептида и препараты (без фиксации) немедленно использовали для микроскопического анализа распределения меченого пептида в клетках-мишенях.

Для возбуждения флуоресценции BODIPY FL использовали лазер с длиной волны 488 нм, для детекции — фильтр более 505 нм. В проходящем свете изображения получали с использованием метода дифференциально-интерференционного контраста (DIC). Изображения сохраняли в базе данных LSM с последующим конвертированием в JPEG-формат.

Проточная цитометрия

Интернализацию меченого пептида в клетки-мишени (клетки линии K562) количественно оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии по увеличению величины сигнала зелёной флуоресценции (BODIPY FL, Ex/Em 503/512) на проточных цитофлуориметрах Navios™ и CytoFlex™ (Beckman Coulter, США). Суспензии клеток К-562 переносили в пластиковые пробирки по 200 000 клеток на пробирку в объеме 100 мкл. Затем к клеточным суспензиям добавляли несущий флуоресцентную метку Ас1 до конечной концентрации 25 мкМ. Пробирки помещали в термостат и инкубировали в течение 0, 15, 30, 60 минут при 37 °С, после чего клетки осаждали центрифугированием (300 g 7 минут), отмывали от избытка несвязавшегося пептида (учитывая время, потраченное на центрифугирование и подготовку пробы, наименьшую длительность инкубации при анализе данных принимали за 5 мин). К осадку клеток добавляли по 300 мкл фосфатно-солевого буфера и за 3 мин до исследования вносили раствор трипанового синего до конечной концентрации 40 мкг/мл. Трипановый синий служил в качестве «гасителя» флуоресценции BODIPY FL [12], который, не проникая внутрь живых клеток, элиминировал сигнал от конъюгатов пептида и BODIPY, находящихся на поверхности клеток-мишеней. Далее проводили цитофлуориметрический анализ на приборе Navios™ (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов анализировали не менее 20 000

одиноким клеткам. Чтобы отличить отдельные клетки от агрегатов и в последующем дискриминировать агрегаты из анализа, использовали следующие сочетания сигналов по прямому (величина, пропорциональная размеру клеток) и боковому (величина, характеризующая структуру клеток) светорассеянию: интенсивность пикового против интенсивности интегрального сигналов по FS или SS, а также время полета против интенсивности интегрального сигналов FS или SS. Для анализа интернализации Ac1-BODIPY в клетки К-562 в режиме реального времени проводили измерения на проточном цитофлуориметре CytoFlex™ (Beckman Coulter, США). Внесение Ac1-BODIPY (до конечной концентрации 25 мкМ) в суспензию клеток осуществляли на 40 секунды после начала анализа образца на приборе. Статистическую обработку данных проводили в программе Excel. Результаты представлены как среднее и ошибки среднего показателей интенсивности флуоресценции по данным 3-х измерений.

Результаты и обсуждение

С использованием конфокальной микроскопии показано, что несущий флуоресцентную метку аципенсин (Ac1-BODIPY) быстро проникает через мембраны клеток-мишеней. Пептид детектировался внутри клеток К-562 уже после 5 мин инкубации (рис. 1А).

Через 15 и 40 мин меченый Ac1 продолжал накапливаться в клетках (рис. 1 Б, В). При использовании пептида в исследуемой концентрации существенных признаков повреждения клеток не наблюдалось.

Таким образом, установлено, что аципенсин 1, конъюгированный с флуорофором BODIPY FL, проникает в клетки и выявляется во внутриклеточном пространстве уже через 5 мин. Пептид детектируется преимущественно в цитоплазме клеток. Сходные результаты, свидетельствующие о быстром проникновении пептида, конъюгированного с флуорофором, получены с помощью проточной цитофлуориметрии.

Использование проточной цитофлуориметрии позволило количественно оценить эффективность интернализации пептидов в исследуемые клетки. Изучена кинетика проникновения меченых пептидов (в нетоксических микромолярных концентрациях) в клетки К-562. Анализ полу-

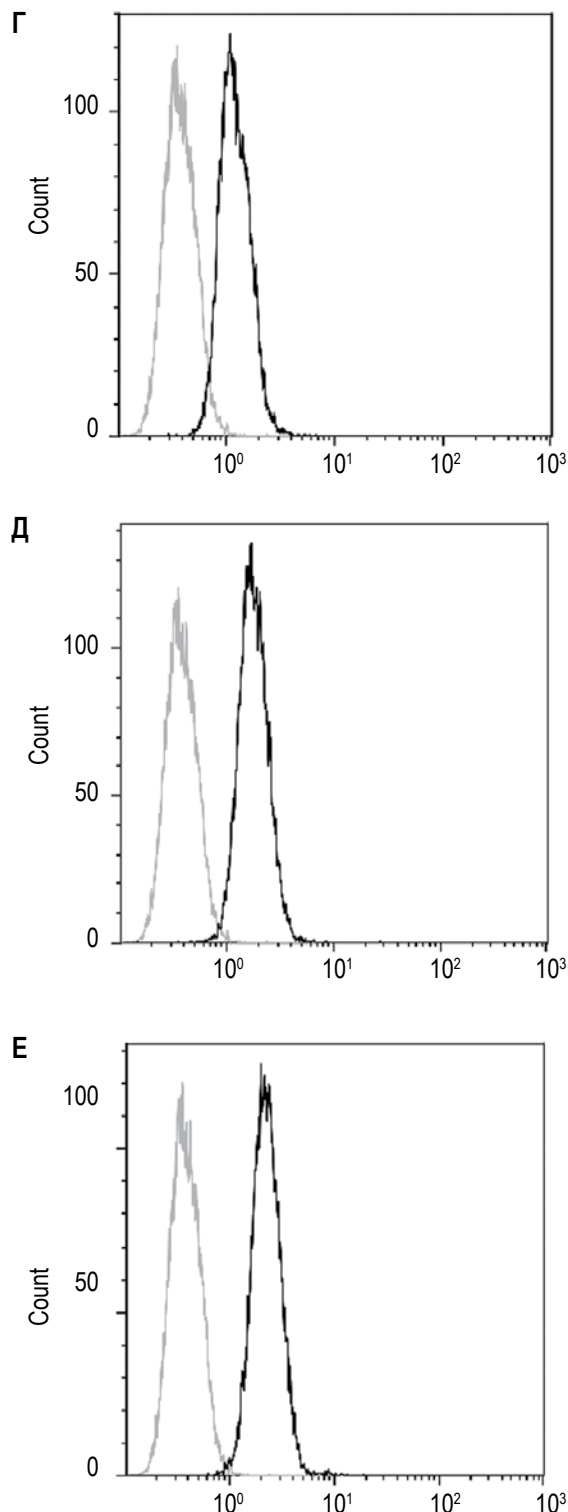


Рисунок 1. Гистограммы, полученные при проведении проточной цитометрии образцов Ac1-BODIPY на приборе Navios™ после инкубации пептида с клетками в течение 5 мин (Г), 15 мин (Д), 40 мин (Е): по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции меченого пептида, по оси ординат – количество клеток, обладающих определенной интенсивностью флуоресценции

Примечание. Рисунки А, Б, В см. на 3-й стр. обложки.

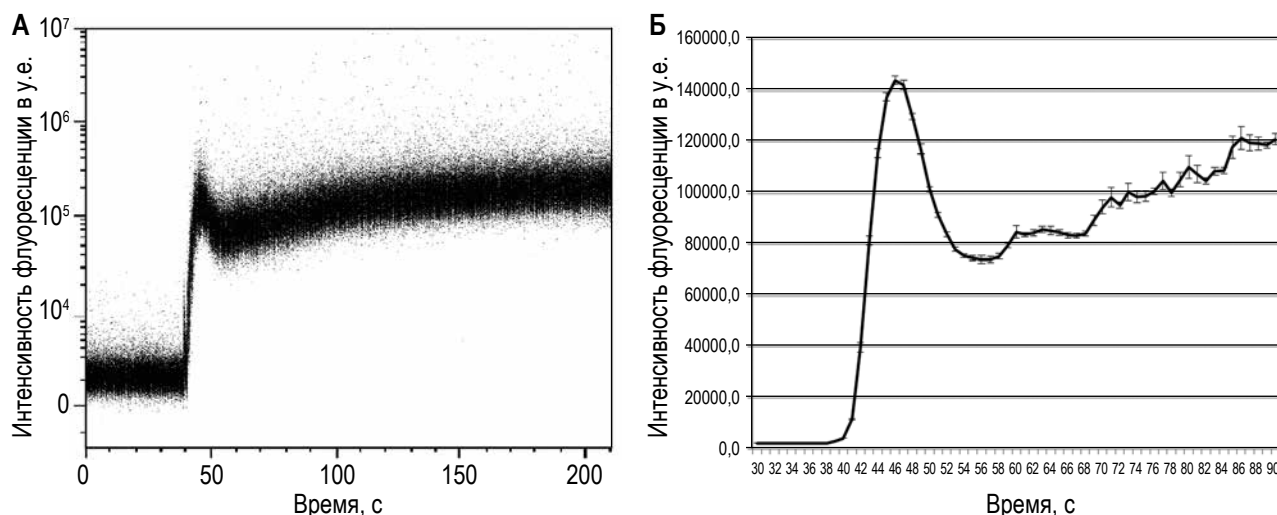


Рисунок 2. Анализ динамики включения Ac1-BODIPY в клетки линии K-562 по результатам проточной цитофлуориметрии на приборе CytoFlex™

Примечание. Гистограмма А – кинетика проникновения Ac1-BODIPY (25 мкМ) в клетки. По оси абсцисс – время, с (внесение Ac1-BODIPY осуществляли на 40 секунде после начала анализа образца), по оси ординат – интенсивность флуоресценции Ac1-BODIPY, проникшего через плазматическую мембрану клеток линии K-562, условные единицы (MFI).

Гистограмма Б – результаты статистической обработки данных проточной цитометрии, полученных на интервале 30-90 секунд после начала эксперимента (внесение Ac1-BODIPY осуществляли на 40 секунде после начала анализа образца), результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего для каждой из точек, n = 3.

ченных результатов проводили с применением программного обеспечения Kaluza™ (Beckman Coulter, США). Результаты измерений представлены на рисунке 1 (Г-Е) в виде гистограмм распределения клеток по интенсивности флуоресценции. Приведены типичные гистограммы, полученные при анализе проб, содержащих клеточные суспензии, инкубировавшиеся с пептидом в течение различных временных интервалов – в соответствии со сроками инкубации при микроскопических исследованиях (рис. 1А-В, см. 3-ю стр. обложки).

Таким образом, полученные данные подтверждают, что аципенсин 1, несущий флуоресцентную метку, быстро проникает в клетки K-562 и детектируется в них уже через 5 мин после его внесения в культуру клеток. Для более детального анализа эффективности проникновения аципенсина 1 через плазматическую мембрану клеток была проведена серия динамических экспериментов, результаты одного из которых приведены на рисунке 2. Полученные данные указывают на то, что исследованный пептид, конъюгированный с флуорофором, детектируется в составе клеток уже через 2-3 секунды после внесения препарата в среду для культивирования клеток. Максимум флуоресценции достигается на сроке 46 секунд, после чего имеет место некоторое

снижение флуоресценции клеток с дальнейшим выходом «на плато» на сроках свыше 100 секунд после стимуляции клеток исследуемой конструкцией.

Результаты исследования находятся в соответствии с описанными в литературе, хотя и немногочисленными данными по аналогичным свойствам других антимикробных пептидов врожденного иммунитета позвоночных: буфорина 2 – пептида из кожи жабы, представляющего собой, как и аципенсин, производное гистона H2A [5]; кателицидина человека LL-37, фрагментов бактенецина Vac7 быка [11], бактенецина ChVac5 козы, протегрина 1 свиньи [1] и др., для которых подтверждена способность проникать в эукариотические клетки. Подобная активность впервые показана нами для пептида из лейкоцитов осетра. Одним из преимуществ исследуемого соединения по сравнению с вышеперечисленными пептидами является то, что в работе применялся рекомбинантный препарат пептида, полученный в результате разработанной авторами биотехнологической процедуры, позволяющей получать данное соединение в больших количествах, что является немаловажным в свете перспективы практического применения этого вещества. Следующим этапом проводимой работы будет создание

конъюгатов АсI с различными антимикробными или противоопухолевыми соединениями и изучение способности АсI содействовать переносу этих соединений в инфицированные или опухолевые клетки.

Заключение

Впервые установлено свойство антимикробного пептида лейкоцитов русского осетра — аципенсина I — транслоцироваться в эукариотические клетки. Полученные данные подтверждают

концепцию о том, что антимикробные пептиды врожденного иммунитета обладают свойствами проникающих в клетки пептидов (CPP), а также позволяют рассматривать исследуемый пептид осетра как перспективное соединение, на основе которого могут быть разработаны новые лекарственные препараты с повышенной способностью проникать в клетки-мишени, участвующие в патологических процессах и, следовательно, с более высокой эффективностью терапевтического действия.

Список литературы / References

1. Шамова О.В., Сакута Г.А., Орлов Д.С., Зенин В.В., Штейн Г.И., Колодкин Н.И., Афонина И.Н., Кокряков В.Н. Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре // Цитология, 2007. Т. 49, № 12. С. 1000-1010. [Shamova O.V., Sakuta G.A., Orlov D.S., Zenin V.V., Shtein G.I., Kolodkin N.I., Afonina I.V., Kokriakov V.N. Effects of antimicrobial peptides of neutrophils on tumor and normal cells in culture. *Tsitologiya = Cytology*, 2007, Vol. 49, no. 12, pp. 1000-1010. (In Russ.)]
2. Chugh A., Eudes F., Shim Y.S. Cell-penetrating peptides: nanocarrier for macromolecule delivery in living cells. *IUBMB Life*, 2010, Vol. 62, no. 3, pp. 183-193.
3. Dinca A., Chien W.M., Chin M.T. Intracellular Delivery of proteins with cell-penetrating peptides for therapeutic uses in human disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 2, p. 263.
4. Johnson R.M., Harrison S.D., Maclean D. Therapeutic applications of cell-penetrating peptides. *Methods in Molecular Biology*, 2011, Vol. 683, pp. 535-551.
5. Park C., Yi K., Matsuzaki K., Kim M., Kim S. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, Vol. 97, pp. 8245-8250.
6. Reissmann S. Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides. *J. Pept. Sci.*, 2014, Vol. 20, no. 10, pp. 760-784.
7. Shamova O.V., Orlov D.S., Balandin S.V., Shramova E.I., Tsvetkova E.V., Panteleev P.V., Leonova Yu.F., Tagaev A.A., Kokryakov V.N. Ovchinnikova Acipensins – novel antimicrobial peptides from leukocytes of the Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*. *Acta Naturae*, 2014, Vol. 6, no. 4, pp. 99-109.
8. Soomets U., Lindgren M., Gallet X., Hällbrink M., Elmquist A., Balaspiri L., Zorko M., Pooga M., Brasseur R., Langel U. Deletion analogues of transportan. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, Vol. 1467, no. 1, pp. 165-176.
9. Sparr C., Purkayastha N., Kolesinska B., Gengenbacher M., Amulic B., Matuschewski K., Seebach D., Kamena F. Improved efficacy of fosmidomycin against *Plasmodium* and *Mycobacterium* species by combination with the cell-penetrating peptide octaarginine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, Vol. 57, no. 10, pp. 4689-4698.
10. Splith K., Neundorff I. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. *Eur. Biophys. J.*, 2011, Vol. 40, pp. 387-397.
11. Tomasinsig L., Skerlavaj B., Papo N., Giabbai B., Shai Y., Zanetti M. Mechanistic and functional studies of the interaction of a proline-rich antimicrobial peptide with mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 2006, Vol. 281, pp. 383-391.
12. van Amersfoort E.S., van Strijp J.A. Evaluation of a flow cytometric fluorescence-quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes. *Cytometry*, 1994, Vol. 17, no. 4, pp. 294-301.

Авторы:

Умнякова Е.С. — аспирант, научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Umnyakova E.S., PhD Student, Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Грудинина Н.А. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Баландин С.В. — к.х.н., научный сотрудник Учебно-научного центра ФГБНУ «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Болосов И.А. — младший научный сотрудник Учебно-научного центра ФГБНУ «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Пантелеев П.В. — к.х.н., младший научный сотрудник Учебно-научного центра ФГБНУ «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Филатенкова Т.А. — аспирант, младший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Орлов Д.С. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Цветкова Е.В. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Овчинникова Т.В. — д.х.н., доцент, заведующая отделом «Учебно-научный центр» ФГБНУ «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Кокряков В.Н. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; профессор, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Шамова О.В. — д.б.н., доцент, заведующая отделом общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; профессор, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Grudinina N.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Balandin S.V., PhD (Chemistry), Research Associate, Research Educational Centre, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Bolosov I.A., Junior Research Associate, Research Educational Centre, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Panteleev P.V., PhD (Chemistry), Junior Research Associate, Research Educational Centre, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Filatenkova T.A., PhD Student, Junior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Orlov D.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Tsvetkova E.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Ovchinnikova T.V., PhD, MD (Chemistry), Associate Professor, Head, Research Educational Centre, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Kokryakov V.N., PhD, MD (Biology), Professor, Head of Laboratory, Department of General Pathology and Pathological Physiology; Professor, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Shamova O.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of General Pathology and Pathological Physiology; St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 03.09.2016

Отправлена на доработку 06.09.2016

Принята к печати 08.09.2016

Received 03.09.2016

Revision received 06.09.2016

Accepted 08.09.2016