

КЛЕТочНАЯ БИотехнология и Тканевая Инженерия

БИологическая Активность Внеклеточных Гистонов и Перспективы Их Исползования в Биотехнологии

О. А. Горюхина,^{1} Г. П. Пинаев²*

¹ Кафедра биохимии Санкт-Петербургского государственного университета,

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; * pushkeen@gmail.com

В настоящем кратком обзоре суммированы данные литературы и собственные данные о действии внеклеточных гистонов на функции различных типов клеток. Рассмотрены перспективы создания транспортных систем на основе гистонов для целенаправленной доставки лекарственных средств, которые самостоятельно не проходят через клеточные мембраны и тканевые барьеры. Исследована возможность использования гистонов, иммобилизованных на микросферах, для модификации поверхностей, предназначенных для культивирования клеток. Показано, что гистоны, иммобилизованные на микросферах и нанесенные на поверхность культуральных сосудов, способствуют адгезии культивируемых клеток разного происхождения, их пролиферации и формированию сети клеточных структур за счет образования межклеточных контактов и одновременного взаимодействия клеток с несколькими микросферами. Рассматривается возможность использования подобных микросфер в качестве компонентов при создании трехмерных пористых матриц, предназначенных для формирования в них тканеподобных клеточных структур *in vitro*.

Ключевые слова: внеклеточные гистоны, конъюгаты лекарственных средств с белками-носителями, микросферы, адгезия, пролиферация культивируемых клеток.

Гистоны - катионные (основные) белки, которые содержатся в ядрах клеток всех тканей животных и растений. Различают пять классов гистонов, которые детально охарактеризованы и изучены (1). Классы гистонов имеют следующие обозначения: гистон H1 (богатый лизином),

гистон H2B (умеренно богатый лизином), гистон H2A (богатый аргинином и лизином), гистон H3 (богатый аргинином), гистон H4 (богатый аргинином и глицином).

В настоящее время, имеется достаточное количество данных, которые позволяют предполагать, что биологическая роль гистонов не ограничена их участием в компактизации ДНК. Гистоны обнаруживаются и во внеклеточном пространстве (2–4). Они выявлены на поверхности лейкоцитов (5), Raji-клеток африканской лимфомы Беркитта (6), цитолитических лимфоцитов (7), моноцитов (8), мышинных В-клеток (9) и на плазматической мембране клеток эндотелия сосудов пупочного канатика (10). Кроме того, показано, что гистон H1, связанный с перлеканом, присутствует во внеклеточном матриксе культур мышечных клеток линии C₂C₁₂ и в регенерирующей скелетной мышце, и принимает участие в стимуляции пролиферативной активности миобластов (3). Наряду с этим, показано, что внеклеточный гистон H1, идентифицированный на поверхности культивируемых макрофагов, действует как тироглобулин-связывающий белок, который опосредует его эндоцитоз (2).

Предполагают, что гистоны высвобождаются при апоптозе и распаде клеток в очагах воспаления и экспонируются на поверхности различных типов клеток. Так обнаружено, что коровые гистоны (H2A, H2B, H3 и H4) при апоптозе части активированных Т-клеток линии NBV-ALL высвобождаются во внеклеточное пространство и связываются с клеточной поверхностью морфологически неизмененных Т-клеток (11). Кроме того, показано, что коровые гистоны высвобождаются из лимфоцитов периферической крови человека на ранних стадиях апоптоза и стимулируют синтез иммуноглобулинов нормальных лимфоцитов (12).

Имеется большее количество данных, которые показывают, что экзогенные гистоны при их добавлении к различным типам клеток оказывают выраженные эффекты. Так например, экзогенные гистоны при добавлении к клеткам лимфомы в культурах el-4 и S-49 усиливают клеточное деление (13), оказывают выраженный пролиферативный эффект на миобласты в культуре линии клеток C₂C₁₂ (3), индуцируют дифференцировку мышинных миелоидных лейкемических клеток (M1) в макрофагоподобные и гранулоцитоподобные клетки (14). Кроме того, экзогенные гистоны оказывают стимулирующий эффект на дифференцировку и созревание культивируемых антиген-представляющих дендритных клеток из костного мозга самцов крыс, синтезирующих главный комплекс гистосовместимости - гаплотип RTJ (15), а также стимулируют фагоцитоз (16-18).

Наряду с этим, в многочисленных исследованиях показано, что гистоны подавляют размножение некоторых опухолевых клеток. Анализ данных литературы по влиянию гистонов

на опухолевые клетки показал, что их эффект зависит как от типа гистоновых фракций, так и от вида ткани, из которой получены гистоны. Хотя механизм действия гистонов на опухолевые клетки изучен недостаточно, многие исследователи связывают цитотоксический эффект гистонов с их способностью воздействовать на поверхность мембран. Так показано, что цитотоксический эффект гистона H1 на лейкемические клетки опосредован через определенные рецепторы, экспонированные на поверхности мембран только у опухолевых клеток (19). Была исследована, также, цитотоксичность гистонов H2A и H2B в отношении клеток шести линий, полученных из В-лимфоцитов больных злокачественной лимфомой. При этом было показано, что гистоны H2A и H2B не только задерживают рост злокачественных клеток лимфомы, но и полностью убивают их. Наряду с этим, гистоны H2A и H2B в незначительной степени задерживают рост нормальных лимфоцитов (20).

Экзогенные гистоны уже давно известны как антибактериальные и противовирусные агенты (21-23), а также как факторы, повышающие неспецифическую резистентность организма благодаря способности опсонизировать бактерии и стимулировать фагоцитарную и бактерицидную активность макрофагов (17). При этом гистоны характеризуются низкой токсичностью и не обладают анафилактической активностью. К настоящему времени установлены LD_{50} (средняя летальная доза) и переносимые дозы различных классов гистонов при однократном и многократном введении животным различными путями. Они оказались весьма значительными. Так, например, суммарные переносимые дозы при ежедневном внутрибрюшинном введении в течение месяца белым мышам для разных классов гистонов составляют от 360 до 1500 мг/кг, причем наименее токсичными оказались аргининбогатые гистоны (21).

Известно, что гистоны благодаря низкому содержанию ароматических аминокислот, низкому молекулярному весу, высокому положительному заряду и высокой чувствительности к протеолитическим ферментам являются слабыми антигенами. В наших исследованиях было проведено изучение иммуногенных свойств препаратов суммарного гистона тимуса теленка, предназначенного для многократного внутривенного введения животным в терапевтической дозе (7 мг на 1 кг массы животного). Анализ сывороток животных, иммунизированных суммарным гистоном по специальной схеме с применением полного адъюванта Фрейнда, показало отсутствие выраженного гуморального иммунного ответа в отношении продукции антител как к гистону H1, так и к коровым гистонам (титры сывороток при использовании в качестве антигена гистона H1 колебались в пределах 1:64-1:256, а титры этих сывороток в

отношении коровых гистонов были значительно ниже и составляли 1:20) (24). Следовательно за счет высокой устойчивости к ним животных длительное (в течение 1 мес) ежедневное введение гистонов в дозе 0,1 LD₅₀ может быть широко использовано в опытах *in vivo* как практически безвредное. Совокупность благоприятных свойств гистонов делает понятным интерес к гистонам как возможным фармакологическим агентам.

Особый интерес вызывает способность гистонов быстро проходить через клеточные мембраны посредством эндоцитоза, а также повышать проницаемость мембран для других веществ, в том числе и для полимерных соединений (25, 26). В этих исследованиях было показано, что относительная скорость поступления гистонов в опухолевые клетки линии саркомы-180 зависит от содержания в их составе аргинина. Так при культивировании клеток в присутствии различных классов гистонов в среде Игла, не содержащей сыворотку, в течение 1 ч при комнатной температуре поглощение клетками аргининбогатого гистона составляло 1.0 мкг, суммарного гистона - 0.8 мкг, а лизинбогатого гистона - 0.15 мкг на 1 мг общего белка клеток. Это указывает на то, что эффект проникновения гистонов через клеточные мембраны зависит от содержания в их молекулах основных аминокислот – лизина и аргинина.

Наряду с этим было обнаружено, что при культивировании опухолевых клеток в среде Игла, содержащей 1% сыворотку телят, в течение 2 ч при комнатной температуре, поглощение клетками добавленного [¹³¹I] альбумина увеличивается в 15 и 12 раз в присутствии аргининбогатого гистона или суммарного гистона в концентрации 30 мкг на 1 мл среды соответственно. Однако, в присутствии лизинбогатого гистона при той же концентрации белка поглощение клетками альбумина увеличивается только в 1.5 раза. Таким образом, наблюдается корреляция между поглощением клетками различных классов гистонов и их способностью стимулировать поглощение клетками альбумина. Было показано также, что при экспозиции гистонов с клетками в концентрации 30 мкг на 1 мл культуральной среды не наблюдается повреждения клеточных мембран. Более того, при субкультивировании клеток после экспозиции с гистонами их скорость роста не отличалась от скорости роста клеток в контроле. Однако, при экспозиции клеток с гистонами в концентрации более 100 мкг на 1 мл культуральной среды наблюдаются такие аномальные клеточные реакции, как их открепление от поверхности стекла, образование агрегатов клеток и повреждение клеточных мембран.

Следует отметить, что повреждающее действие высоких концентраций гистона на клетки зависит от типа клеток, которые подвергаются их обработке. Так известно, что повреждающие

концентрации лизинбогатого гистона для нормальных эукариотических клеток лежат в пределах 200-250 мкг, для опухолевых клеток – 150-200 мкг, а для бактериальных клеток менее 80 мкг на 1 мл инкубационной среды (22).

Приведенные данные позволяют считать, что при низких концентрациях гистоны могут быть использованы в качестве транспортных систем для доставки в ткани и органы ряда лекарственных средств, самостоятельно не проникающих через клеточные мембраны и тканевые барьеры. Это достигается путем ковалентного связывания транспортируемого лиганда к белку, который в норме претерпевает рецепторно-опосредованный трансцитоз через клеточные мембраны.

В наших исследованиях было показано, что экзогенный гистон проходит через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в паренхиму мозга крыс после введения его в сонную артерию анестезированных животных в опытах *in vivo* (27). Также были получены растворимые конъюгаты гистонов с лекарственными веществами (28). Было установлено, что экзогенные гистоны проходят через эндотелий капилляров мозга, т.е. через ГЭБ, и способствуют прохождению ковалентно связанных с ними веществ, не проходящих в норме через ГЭБ (29-31).

Другим важным свойством гистонов является их способность оказывать положительное действие на адгезию, пролиферацию и клональный рост клеток в культуре. Было обнаружено, что успешному размножению одиночных клеток способствует покрытие поверхности положительно заряженными белками, в частности гистонами (32). Кроме того, показано, что гистоны содержат гепарин-связывающие домены, способные взаимодействовать с протеогликанами клетки, которые могут контактировать с поверхностными рецепторами и индуцировать внутриклеточные сигналы, сопровождающиеся реорганизацией цитоскелета (33, 34).

Как правило, культивирование клеток производят в специальных культуральных сосудах, изготовленных из полистирола, поверхность которого обрабатывают различными способами, чтобы создать на ней положительный заряд. Так как общий поверхностный заряд клеток отрицательный, такая обработка поверхности культуральных сосудов способствует прикреплению к ней культивируемых клеток.

При культивировании в монослое прикрепившиеся клетки начинают синтезировать и секретировать в среду белки внеклеточного матрикса, которые позволяют им распластываться на субстрате и осуществлять разнообразные физиологические функции:

пролиферацию, миграцию, образование межклеточных контактов и многие другие. Не все клетки легко прикрепляются к поверхности культуральных сосудов, и в этих случаях поверхность предварительно покрывают такими мажорными белками внеклеточного матрикса, как коллаген, фибронектин или ламинин. Взаимодействие клеток с этими белками осуществляется с помощью поверхностных адгезионных рецепторов – интегринов (35).

Наряду с этим для увеличения адгезионной способности некоторых типов клеток требуется нанесение на поверхность пластика положительно заряженных белков или пептидов. Для этих целей используют поли-L-лизин или синтетические пептиды, содержащие в своем составе остатки основных аминокислот, которые предварительно ковалентно связывают с гиалуроновой кислотой, нанесенной на поверхность субстрата (32, 36-38). В этом плане использование гистонов для покрытия поверхности субстрата может оказаться перспективным, поскольку в отличие от пептидов в молекуле гистонов имеются различные домены для связывания с клеточной поверхностью.

В настоящее время интенсивно развиваются клеточные технологии, направленные на лечение травм и тяжелых заболеваний человека с помощью стволовых и других клеток. Для этих целей используются нормальные клетки, выделенные из организма. Эти клетки до пересадки в поврежденное место переводят в культуру, размножают и даже проводят направленную дифференцировку. Недостатком терапии с помощью клеток, культивируемых на поверхности субстрата, является предварительный перевод клеток из их исходного трехмерного существования в тканях живого организма в культуру, где они растут на плоских поверхностях. При этом они теряют естественное микроокружение, изменяют свою форму и функциональные способности, что сказывается на эффективности их дальнейшего участия в процессах регенерации при имплантации в поврежденные ткани.

В связи с этим, в последнее время интенсивно развивается новое направление, получившее название тканевой инженерии, суть которого состоит в культивировании клеток в трехмерном пространстве, образуемом специально разработанными пористыми полимерными матрицами с целью получения тканеподобных структур для их дальнейшей трансплантации в организм человека (34). Большинство из разработанных к настоящему времени полимеров имеют гидрофобную поверхность, которую необходимо модифицировать для лучшего взаимодействия с ней клеток. Для этой цели пытаются использовать компоненты внеклеточного матрикса или другие адгезивные молекулы (39-42). Однако модификация поверхности должна способствовать не только прикреплению к ней клеток, но также

стимуляции их размножения и образованию межклеточных контактов. Приведенные выше данные позволяют предположить, что экзогенные гистоны в качестве агента, модифицирующего поверхность создаваемой матрицы, могут оказывать положительное влияние на создание тканеподобных клеточных структур.

На характер прикрепления клеток к субстрату и их поведение оказывает влияние не только химический состав субстрата, но и топография его поверхности, от которой будет зависеть организация и физиологическая активность формирующихся клеточных структур (43-45). В настоящее время разработаны специальные технологии для конструирования поверхности субстрата с определенной микроконфигурацией. Для получения таких поверхностей используют технику фотолитографии с целью создания желаемой топографии поверхности, содержащей адгезивные и неадгезивные области для клеток (46, 47). Такие поверхности используются, например, при сокультивировании клеток для целей тканевой инженерии (37).

Известно исследование (48), в котором авторы оценивали судьбу эндотелиальных клеток (выживание, пролиферацию и апоптоз) на субстратах, содержащих адгезивные островки, покрытые фибронектином на неадгезивной поверхности. Для создания таких субстратов, содержащих адгезивные островки, расположенные на определенных расстояниях друг от друга и имеющие различные размеры, используют метод микроконтактного принтинга (отпечатка). В этом исследовании было показано, что когда адгезивные островки, покрытые фибронектином, отстоят друг от друга на дистанциях, достаточных для того, чтобы клетка взаимодействовала только с одним адгезивным островком, выживание клеток коррелирует с площадью поверхности данного островка. Однако иная картина наблюдается, когда адгезивные островки, покрытые фибронектином, имеют диаметр от 3 до 5 мкм и расположены друг от друга на расстоянии 10 мкм. В этом случае клетка взаимодействует со многими адгезивными островками и занимает большую площадь поверхности субстрата. Показано, что на такой поверхности субстрата скорость пролиферации и выживание клеток коррелируют с доступностью, количеством и распределением адгезивных островков, при этом клетки за счет формирующихся псевдоподий имеют возможность взаимодействовать между собой.

В качестве модели, позволяющей выявить реакцию клеток на модифицированную поверхность субстрата и его пространственную организацию, могут служить микросферы, покрытые гистонами и расположенные на поверхности культурального сосуда. В наших исследованиях для модификации поверхности субстрата и его пространственной организации были использованы микросферы с иммобилизованными на их поверхности гистонами с целью

выявления возможности их применения для топографической модификации поверхностей, предназначенных для трехмерного культивирования клеток (49). При этом микросферы должны были иметь оптимальные размеры и располагаться на субстрате на таком удалении друг от друга, чтобы клетки были способны одновременно взаимодействовать с несколькими микросферами, рассредоточенными в пространстве. Для этого получали микросферы диаметром не более 1,0 мкм из кристаллизованного декстрана. Такой диаметр микросфер соответствует размеру фокального контакта, образующегося при прикреплении клетки к субстрату (50). Кроме того, при нанесении на поверхность культурального сосуда микросферы располагались на нем на расстоянии друг от друга, не превышающем площади распластанной клетки, что способствовало одновременному взаимодействию каждой отдельной клетки с несколькими микросферами.

При использовании такого подхода был проведен сравнительный анализ взаимодействия клеток постоянной линии почки эмбриона человека, 293, трансформированной Ad5 вирусом, и спонтанно трансформированных эмбриональных фибробластов мыши линии BALB/3T3 клон A31, с гистонами разных типов, иммобилизованными на микросферах. Было показано, что все исследованные классы гистонов обладали адгезивной способностью, но их комплексы в виде суммарного гистона и коровых гистонов оказывали наилучшее действие на распластывание и морфологию клеток и способствовали их более интенсивной пролиферации. При этом клетки, посеянные на субстраты, содержащие перекрестно сшитые конъюгаты гистоновых комплексов, иммобилизованные на микросферах, в большей степени способствовали формированию сети клеточных структур за счет образования межклеточных контактов и одновременного взаимодействия клеток с несколькими микросферами. Такие субстраты аналогичны матрицам, более широко известным в литературе как скаффолды, которые используют для культивирования клеток с целью образования сложной композиции клеток для формирования тканеподобных клеточных структур, предназначенных для клеточной терапии (51, 52).

Представленные данные можно рассматривать как первые шаги, свидетельствующие о перспективности попыток практического использования гистонов:

- во-первых, в качестве транспортных средств, обеспечивающих доступ ковалентно связанных с ними лигандов к месту действия. Транспортные системы на основе гистонов могут быть потенциальным средством для транспорта традиционных лекарственных средств, самостоятельно не проходящих через клеточные мембраны и тканевые барьеры, а также

сайт-специфической доставки к мишени (органу или ткани), потенцирования и пролонгирования действия, резистентности к деградации и др.;

- во-вторых, для клеточной терапии, проводимой с помощью клеток, культивируемых в трехмерном пространстве. Положительные результаты проведенных исследований по использованию микросфер, покрытых гистонами, с целью выявления возможности культивирования клеток на модифицированной поверхности субстрата по существу показали, что микросферы, покрытые гистонами, могут быть использованы в дальнейшем в качестве компонентов при создании трехмерных пористых матриц, предназначенных для формирования в них тканеподобных клеточных структур *in vitro*. Такие матрицы могут быть использованы для имплантации клеток в поврежденные области для дальнейшего их участия в процессах регенерации ткани.

Список литературы

1. **Isenberg I.** Histones. *Ann. Rev. Biochem.* 1979, 48:159-191.
2. **Brix K., Summa W., Lottspeich F., Herzog V.** Extracellularly occurring histone H1 mediates the binding of thyroglobulin to the cell surface of mouse macrophages. *J. Clin. Invest.* 1998, 102: 283-293.
3. **Henriquez J. P., Casar J.C., Fuentealba L., Carey D.J., Brandan E.** Extracellular matrix histone H1 binds to perlecan, is present in regenerating skeletal muscle and stimulates myoblast proliferation. *J. Cell Sci.* 2002, 115: 2041-2051.
4. **Jeffery C.J.** Moonlighting proteins: complications and implications for proteomics. *DDT: Targets.* 2004, 3: 71-78.
5. **Rekvig O. P., Muller S., Briand J.P., Skogen B., Van Regenmortel M.H.** Human antinuclear autoantibodies crossreacting with the plasma membrane and the N-terminal region of histone H2B. *Immunol. Invest.* 1987, 16: 535-547.
6. **Kubota T., Kanai Y., Miyasaka N.** Interpretation of the cross-reactivity of anti-DNA antibodies with cell surface proteins: the role of cell surface histones. *Immunol. Lett.* 1990, 23:187-193.
7. **Ojcius D. M., Muller S., Hasselkus-Light C.S., Young J.D., Jiang S.** Plasma membrane-associated proteins with the ability to partially inhibit perforin-mediated lysis. *Immunol. Lett.* 1991, 28:101-108.
8. **Emlen W., Holers V.M., Arend W.P., Kotzin B.** Regulation of nuclear antigen expression on the cell surface of human monocytes. *J. Immunol.* 1992, 148: 3042-3048.
9. **Mecheri S., Dannecker G., Dennig D., Poncet P., Hoffmann M.K.** Anti-histone autoantibodies react specifically with the B cell surface. *Mol. Immunol.* 1993, 30: 549-557.
10. **Horneland M., Rekvig O.P., Jørgensen L., Hannestad K.** Cultured human endothelial cells display an antigen that is recognized by certain human anti-chromatin autoantibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 1983, 54: 373-377.
11. **Watson K., Edwards R.J., Shaunak S., Parmelee D.C., Sarraf C., Gooderham N.J., Davies D.S.** Extra-nuclear location of histones in activated human peripheral blood lymphocytes and cultured T-cells. *Biochem. Pharmacol.* 1995, 50: 299-309.

12. **Bell D.A., Morrison B.** The spontaneous apoptotic cell death of normal human lymphocytes in vitro: the release of, and immunoproliferative response to, nucleosomes in vitro. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1991, 60:13-26.
13. **Kundahl E., Richman R., Flickinger R.A.** The effect of added H1 histone and polylysine on DNA synthesis and cell division of cultured mammalian cells. *J. Cell Physiol.* 1981, 108: 291-298.
14. **Okabe-Kado J., Honma Y., Hayashi M., Hozumi M.** Effects of histone fractions on induction of differentiation of cultured mouse myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* 1981, 41:1997-2002.
15. **Hsu L.W., Chen C.L., Nakano T., Lai C.Y., Chiang K.C., Lin Y.C., Kao Y.H., Chen S.H., Goto T., Sung W.C., Yang C.H., Cheng Y.F., Jawan B., Chiu K.W., Goto S.** The role of a nuclear proteins, histone H1, on signalling pathways for the maturation of dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2008, 152: 576-584.
16. **Ginsburg I.** Cationic polyelectrolytes: a new look at their possible roles as opsonins, as stimulators of respiratory burst in leukocytes, in bacteriolysis, and as modulators of immune-complex diseases (a review hypothesis). *Inflammation.* 1987, 11: 489-515.
17. **Тишкина Т. Е., Горюхина О. А.** Влияние ограниченного протеолиза гистонов на их фагоцитозстимулирующую активность. *Вестн. Ленингр. ун-та.* 1983, 3:122-124.
18. **Taylor M. B., Brown I. N.** Histone preopsonisation increases the respiratory burst response of phagocytes to *Pneumocystis carinii* FEMS Microbiol. Lett. 1991, 69: 79-82.
19. **Class R., Lindman S., Fassbender C., Leinenbach H.P., Rawer S., Emrich J.G., Brady L.W., Zeppezauer M.** Histone H1 suppresses tumor growth of leukemia cells in vitro, ex vivo and in an animal model suggesting extracellular functions of histones. *Am. J. Clin. Oncol.* 1996, 19: 522-531.
20. **Zeppezauer M., Reichhart R.** Use of pure histones H1 and H2A:H2B dimmers in therapeutic methods. 1993. US Patent 5, 182, 257 (<http://patft.uspto.gov>).
21. **Ашмарин И.П., Ждан-Пушкина С.М., Кокряков В.И., Самедов А.Ш., Антонова С.Н.** Антибактериальные и антивирусные функции основных белков клетки и перспективы практического их использования. *Известия Академии Наук СССР.* 1972, 4: 502-508.
22. **Class R., Zeppezauer M.** Antimicrobial histone H1 compositions, kits, and methods of use thereof. 2005. US Patent 6, 884, 423 (<http://patft.uspto.gov>).
23. **Kawasaki H., Iwamuro S.** Potential roles of histones in host defence as antimicrobial agents. *Infect. Disord. Drug. Targets.* 2008, 8: 195-205.
24. **Горюхина О.А., Леонтьева Г.Ф., Кашкин А.П.** Некоторые антигенные свойства препарата тотального гистона тимуса теленка. *Журн. микробиол.* 1978, 11: 91-96.
25. **Ryser H. J., Hancock R.** Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture. *Science.* 1965, 150: 501-503.
26. **Ryser H. J.** Uptake of protein by mammalian cells: an underdeveloped area. *Science.* 1968, 159: 390-396.
27. **Горюхина О.А., Илюк Р.Д., Мищенко И.В.** Сравнительное исследование поступления экзогенного гистона в паренхиму головного мозга крыс. *Бюлл.экспер.биол.мед.* 2000, 130, 7: 63-66.
28. **Матюшичев В.Б., Горюхина О.А., Немцова Н.Н.** Получение и некоторые свойства ковалентных конъюгатов суммарного гистона с канамицином. *Вопр. мед. химии* 1995, 41, .2: 8-11.
29. **Горюхина О. А.** Способ получения растворимых ковалентных конъюгатов. Патент на изобретение № 2127606. РФ. *Бюл.изобр.* 1999, 8: 323.

30. **Мищенко В. А., Горюхина О. А.** Структура, проницаемость гематоэнцефалического барьера и перспективы доставки через него лекарственных средств. Журн. невропатол. и психиатр. 1996, 96, 4: 116-120.
31. **Горюхина О. А.** Перспективы применения катионных белков для транспорта лекарственных средств в ткань мозга. (Нервная система. Выпуск 37). СПб. гос. у-та. 2004: 168-175.
32. **McKeehan W. L., Ham R. G.** Stimulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers. *J. Cell Biol.* 1976, 71: 727-734.
33. **Cardin A. D., Weintraub H. J.** Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis.* 1989, 9: 21-32.
34. **Minuth W. W., Strehl R., Schumacher K.** In: *Tissue engineering: essentials for daily laboratory work.* Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. 2005. 314 p.
35. **Olsen B. R.** Matrix molecules and their ligands. In: *Principles of tissue engineering* San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo Acad. Press. 2000: 57-72.
36. **Swiderek M. S., Mannuzza F.J., Ilsley S.R., Myles A.** Preparation of a cell culture substrate coated with poly-D-lysine. 1999. US Patent 5, 932, 473 (<http://patft.uspto.gov>).
37. **Khademhosseini A., Suh K.Y., Yang J.M., Eng G., Yeh J., Levenberg S., Langer R.** Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and poly-L-lysine for patterned cell co-cultures. *Biomaterials.* 2004, 25: 3583-3592.
38. **Guarino R. D., Chaney B.N., Liebmann-Vinson A., Heidarani M.A.** Peptides for enhanced cell attachment and growth. 2007. US Patent 7, 157, 275 (<http://patft.uspto.gov>).
39. **Hubbell J. A.** Matrix effects. In: *Principles of tissue engineering.* San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Acad. Press. 2000: 237-250.
40. **Saltzman W.M.** Cell interaction with polymers. In: *Principles of tissue engineering* . San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Acad. Press. 2000: 221-236.
41. **Katsuen S., Ohshima K., Kawamura S., Yamamoto R., Nishino T.** Coating composition for culturing animal cells and method for culturing of the cells in serum-free condition. 1997. US Patent 5, 643, 561 (<http://patft.uspto.gov>).
42. **Clapper D. L., Hu W. S.** Cell culture support containing a cell adhesion factor and a positively- charged molecule. 1996. US Patent 5, 512, 474 (<http://patft.uspto.gov>).
43. **Ikada Y.** In: *Tissue engineering: fundamentals and applications. Interface science and technology,* 8. Japan Acad. Press. 2006. 469 p.
44. **Vitte J., Benoliel A.M., Pierres A., Bongrand P.** Is there a predictable relationship between surface physical-chemical properties and cell behaviour at the interface? *Eur. Cell Mater.* 2004, 7: 52-63.
45. **Pierres A., Benoliel A.M., Bongrand P.** Cell fitting to adhesive surfaces: A prerequisite to firm attachment and subsequent events. *Eur. Cell Mater.* 2002, 3: 31-45.
46. **Suh K. Y., Seong J., Khademhosseini A., Laibinis P. E., Langer R.** A simple soft lithographic route to fabrication of poly(ethylene glycol) microstructures for protein and cell patterning. *Biomaterials.* 2004, 25: 557-563.
47. **Nakanishi J., Takarada T., Yamaguchi K., Maeda M.** Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences. *Anal. Sci.* 2008, 24: 67-72.
48. **Chen C. S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G.M., Ingber D.E.** Geometric control of cell life and death. *Science.* 1997, 276:1425-1428.
49. **Горюхина О. А., Мартюшин С. В., Блинова М. И., Полянская Г. Г., Черепанова О. А., Пинаев Г. П.** Культивирование клеток на микросферах, покрытых гистонами. *Цитология.* 2010, 52, 1: 12-23.

50. **Peterson L., Burrige K.** Focal adhesions and focal complexes. In: Cell adhesion. Oxford University Press. 2001: 288-299.
51. **Vunjak-Novakovic G.** The fundamentals of tissue engineering: scaffolds and bioreactor. Tissue engineering of cartilage and bone.(Novartis Foundation Symposium 249). Wiley. Chichester. London. 2003: 34-51.
52. **Jaklenec A., Wan E., Murray M.E., Mathiowitz E.** Novel scaffolds fabricated from protein-loaded microspheres for tissue engineering. Biomaterials. 2008, 29:185-192.