

УДК 616-006.81:57.085.23:615.2/.3.015.46:577.126:577.218

Д.А. Афанасьева, М.А. Барышникова, Т.Н. Заботина, А.А. Борунова, О.С. Бузова, Е.Ю. Рыбалкина,
А.А. Николина, М.В. Оборотова, Н.В. Грищенко, З.Г. Кадагидзе, А.Ю. Барышников

ХАРАКТЕРИСТИКА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва

Контактная информация

Афанасьева Дарья Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

адрес: 115478 Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(499)324-10-65

e-mail: danila459@mail.ru

Статья поступила 26.10.2015, принята к печати 27.11.2015.

Резюме

МЛУ является основным препятствием эффективности химиотерапии. В опухолевых клетках МЛУ может развиваться в ответ на действие даже одного цитостатического агента. Целью настоящей работы была характеристика МЛУ в клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека, полученных в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Экспрессию гликопротеина pgp170 определяли в реакции иммунофлуоресценции, мРНК генов МЛУ определяли методом ОТ-ПЦР, выброс родамина 123 оценивали на проточном цитофлуориметре, цитотоксическую активность определяли в МТТ-тесте.

Определение чувствительности клеток к цитотоксическому действию аранозы показало, что клетки меланомы человека *mel Kor* чувствительны к действию препарата, а клетки *mel Ibr* и *mel MtpX* – устойчивы. В реакции иммунофлуоресценции было обнаружено, что от 35 до 50 % клеток линии *mel Ibr* экспрессировали pgp170. Клетки *mel Kor* и *mel MtpX* не экспрессировали Р-гликопротеин. В ПЦР определяли мРНК генов, ответственных за множественную лекарственную устойчивость – *MDR1*, *BCRP*, *MRP1* и *LRP (MVP)*. Во всех образцах линий клеток мРНК генов *BCRP* и *MRP1* экспрессируются слабо, а экспрессию мРНК гена *LRP (MVP)* не удалось увидеть. мРНК гена *YB1* экспрессируется хорошо, что характерно для опухолевых клеток, мРНК этого гена обнаружили в клетках *mel MtpX* и субклонах линии *mel Ibr*. Клетки линии *mel Kor* не содержат мРНК гена *MDR1*. Исследование выброса родамина 123 (Rh123) из клеток показало, что контрольные клетки *mel Kor* накапливали Rh123 и не выбрасывали его. Клетки линии *mel Ibr* накапливали Rh123 и половину выбрасывали. Клетки линии *mel MtpX* накапливали мало родамина 123 и почти весь выбрасывали.

Таким образом, исследование показало, что чувствительные к аранозе клетки линии *mel Kor* не экспрессируют pgp170, не содержат мРНК генов МЛУ и не выбрасывают Rh123. Резистентные к цитотоксическому действию аранозы клетки *mel Ibr* экспрессируют pgp170, содержат мРНК гена *MDR1*, выбрасывают Rh123. Однако устойчивые к аранозе клетки линии *mel MtpX* не экспрессируют pgp170, но содержат мРНК гена *MDR1* и активно выбрасывают Rh123.

Ключевые слова: клеточные линии меланомы человека, множественная лекарственная устойчивость, липосомы, гликопротеин pgp 170, ген *MDR1*.

D.A. Afanasieva, M.A. Baryshnikova, T.N. Zabolina, A.A. Borunova, O.S. Burova, E.Yu. Rybalkina,
A.A. Nikolina, M.V. Oborotova, N.V. Grischenko, Z.G. Kadagidze, A.Yu. Baryshnikov

CHARACTERISTICS OF MULTIDRUG RESISTANCE IN HUMAN SKIN MELANOMA CELL LINES

FSBI “N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center”, Moscow

Abstract

MDR is the main obstacle to chemotherapy efficiency. MDR can grow in cancer cells even if only the one cytostatic agent will act. The aim of the nowadays work is to characterize MDR in metastatic human skin melanoma cell lines prepared in “N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center”.

pgp170 expression was detected by immunofluorescence methods. mRNA of MDR gene was identified by Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) method. Rhodamine 123 (Rh123) emission has been evaluated by flow cytometry, cytotoxic activity was estimated by MTT-tests.

The cells sensitivity to Aranoza cytostatic effects has showed that *mel Kor* cells were sensitive to Aranoza acting, but *mel Ibr* and *mel Mtp X* were not. *Mel Ibr* cells had expressed pgp170 from 35 to 50 per cent, it was detected by

immunofluorescence reaction. Mel Kor and mel Mtp-X cells were not expressed P-glycoprotein. mRNA of genes responsible for multi-drug resistance – *MDR1*, *BCRP*, *MRP1* and *LRP (MVP)* – were detected by PCR. mRNA of *BCRP* and *MRP1* genes has low expression, barely visible stripes after 33 cycles in all cell lines samples. *LRP (MVP)* genes expression of mRNA, unfortunately, never managed to see. *YBI* gene mRNA expression is well, it is typically for cancer cells. mRNA of gene was found in mel MtpX and mel Ibr subclones cell lines. Mel Kor cells didn't contain mRNA of *MDR1* gene. The study of the Rh123 emission from cells showed that mel Kor control cells had accumulated Rh123 and didn't throw it out. Mel Ibr cell line accumulated Rh123 and threw out the half part of it. Mel MtpX cell line had accumulated the less part of Rh123 and almost all were thrown out.

Thus, the study shows that mel Kor cell line that are sensitive to Aranoza doesn't express pgp170, not contain mRNA of multi-drug resistance genes and does not throw Rh123. Mel Ibr cells resistant to the Aranoza cytotoxic action express pgp170, contain mRNA of *MDR1* gene and throw out Rh123. However, mel MtpX cell line resistant to Aranoza does not express pgp170, but contains mRNA of *MDR1* gene and actively throws out Rh123.

Key words: the human melanoma cell lines, multi-drug resistance, liposomes.

Введение

МЛУ является основным препятствием эффективности химиотерапии [2; 5–8; 19; 23–25]. В опухолевых клетках в ответ на действие даже одного цитостатического агента может развиваться МЛУ к большому количеству других препаратов, еще не воздействовавших на опухоль, различающихся по структуре и механизмам действия [13; 20]. Для изучения лекарственной чувствительности клеток к противоопухолевым препаратам используются перевиваемые клеточные линии [9; 11; 12; 21; 22]. В рамках программы разработки противоопухолевых вакцин была создана панель перевиваемых клеточных линий меланомы кожи человека [1; 14–17]. Эти клеточные линии были использованы при изучении цитотоксического действия противоопухолевых препаратов [9; 18]. При этом было обнаружено, что некоторые клеточные линии устойчивы к цитотоксическому действию, определенному в МТТ-тесте, и индукции апоптоза [10]. Изучение механизма лекарственной устойчивости показало, что клетки линий *mel Mtp-X* и *mel Z* не экспрессируют рецептор внешнего апоптоза CD95/Fas, и это было причиной отсутствия индукции апоптоза [3; 4]. Однако клетки линии *mel Ibr* экспрессировали CD95/Fas рецептор, но не гибли под воздействием препаратов [3; 4; 10]. Предполагали, что в этих клетках имеется гиперэкспрессия одного из генов МЛУ.

Целью настоящей работы стала характеристика МЛУ в клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека, полученных в «РОНЦ им. Н.Н. Блохина».

Материалы и методы

Клеточные линии

Исследования проводили на 3 клеточных линиях диссеминированной меланомы кожи человека: *mel Kor*, *mel Mtp-X* и *mel Ibr*. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ТЭС, 10 мМ HEPES (Sigma, США), 2мМ L-глутамин (Sigma, США), 40 нг/мл гентамицин (ICN, США), пируват натрия (ПанЭко, Россия), 0,1 %-ный раствор аминокислот и 0,1 %-ный раствор витаминов (ПанЭко, Россия) при +37 °C в атмосфере

5 %-ного CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

Определение экспрессии гликопротеида pgp170

Экспрессию pgp170 определяли в прямой реакции иммунофлуоресценции с помощью МКА Mouse Anti-Human P-glycoprotein, меченных фикоэритрином (Dako, Дания). Реакцию учитывали на проточном цитометре FACSCantoII (Becton Dickinson, США).

Определение мРНК генов МЛУ

Определяли мРНК генов, ответственных за МЛУ – *MDR1*, *BCRP*, *MRP1* и *LRP (MVP)*, в ОТ-ПЦР. Для выделения тотальной РНК клетки (1–2×10⁶) снимали с культурального флакона раствором трипсина с ЭДТА, и осаждали центрифугированием. Затем клетки лизировали 1 мл тризола (Tri reagent, «MRC», США). Образцы инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Далее все процедуры выделения РНК проводили в соответствии с протоколом производителя Tri reagent. РНК разводили деионизованной водой до конечной концентрации 1 мкг/мкл и хранили при температуре –20 °C. Качество выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в 1 %-ном агарозном геле. Образцы с ясно видимыми полосами 18S и 28S РНК были использованы для дальнейшего анализа. Фотографировали гель при помощи аналоговой видеокамеры с использованием программы Gel Imager.

Реакцию ОТ проводили с использованием случайных гексануклеотидных праймеров. Реакционная смесь для реакции обратной транскрипции: буфер для обратной транскрипции, смесь дезокси-нуклеотид-трифосфатов (дНТФ) 2,5 мМ каждого, праймеры (Random Hexamer «Thermo Scientific», США) 0,2 мкг на пробу, ингибитор РНКаз (Ribolock RNase «Thermo Scientific», США) 20 ед. на пробу, обратная транскриптаза (RevertAid Reverse «Thermo Scientific», США) – 100 ед., тотальная РНК – 2 мкг.

Далее пробирки с реакционной смесью помещали в программируемый термостат и инкубировали 50 мин при +42 °C. Для выравнивания ко-

личества кДНК в разных образцах амплифицировали ген домашнего хозяйства *GAPDH*.

Для амплификации кДНК использовали специфические праймеры, приведенные в табл. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия).

Условия амплификации: +94 °С 30 с., затем 25 – 40 циклов +94 °С 10 с., +60 °С 10 с., +72 °С 10 с., затем +72 °С 1 мин. Конечная концентрация фермента для полимеризации (TagDNA Polymerase «Thermo Scientific», США) – 1 ед. на пробу. Число циклов подбирали таким образом, чтобы оказаться в экспоненциальной фазе образования продуктов реакции. Продукты амплификации, предварительно помеченные бромистым этидием, в количестве 20 мкл разделяли в 2 %-ном агарозном геле. Фотографировали гель при помощи видеосистемы «DNA Analyzer» (США).

Выброс родамина 123

Функцию Р-гликопротеина определяли по выбросу из клеток родамина 123 (Rh123). Для этого клетки снимали с культуральных флаконов раствором Версена, отмывали, затем к 5×10^5 клеток в объеме 50 мкл добавляли по 1 мл бессывороточной среды RPMI-1640 и по 3 мкл Rh123.

Клетки инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего двукратно отмывали раствором PBS. Клетки делили на две части и помещали в новые пробирки в 50 мкл раствора PBS. В контрольную пробирку добавляли 1 мл полной среды роста, а в опытную – 2 мкл раствора винкристина и 1 мл полной среды роста и инкубировали их в течение 30 мин при +37 °С.

После двукратной отмывки PBS клетки ресуспендировали в 300 мкл PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (Becton Dickinson, США).

MTT-тест

В MTT-тесте изучали цитотоксическое действие на клеточные линии противоопухолевого препарата из группы нитрозоалкилмочевины аранозы в лекарственной форме «Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» (Научно-производственный филиал «Наукпрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва).

Клетки сажали в 96-луночные плоскодонные планшеты по 7×10^3 клеток в 180 мкл среды роста на лунку. Через 24 ч в лунки с клетками добавляли по 20 мкл аранозы в концентрациях 56 мкг/мл; 112 мкг/мл; 225 мкг/мл; 450 мкг/мл и 900 мкг/мл. В контрольные лунки добавляли по 20 мкл полной ростовой среды.

Клетки инкубировали с препаратом в течение 24 ч при +37 °С и 5 % CO₂. После инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора MTT (1 мг/мл, Sigma, Chemical Co, США) и оставляли еще на 4 ч при +37 °С при 5 % CO₂. По окончании инкубации планшеты центрифугировали, отбирали супернатант и вносили в лунки по 150 мкл ДМСО

(ПанЭко, Россия) для растворения кристаллов формазана, после чего планшеты встряхивали на шейкере для равномерного распределения окрашивания.

Оптическую плотность раствора формазана определяли на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций «АИФР – 01 Униплан» (ЗАО, «Пикон», Россия) при длине волны 530 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток. Цитотоксичность (Ц) оценивали в % по формуле:

$$Ц = \left(\frac{1 - O_o}{O_k} \right) \times 100\%, \text{ где}$$

O_к – оптическая плотность в контрольных лунках,

O_о – оптическая плотность в опытных лунках.

Эффективность препарата оценивали по ИК50 – концентрации, при которой происходит ингибирование роста 50% клеток.

Результаты

Определение чувствительности клеток *mel Kor* к цитотоксическому действию аранозы показало, что ИК₅₀ для них равнялась 0,45 мг/мл. Для клеток линий *mel Ibr* и *mel MtpX* ИК₅₀ после 24 ч инкубации с аранозой не была достигнута. Таким образом, клетки *mel Kor* чувствительны к действию аранозы, а клетки *mel Ibr* и *mel MtpX* устойчивы (рис. 1).

В реакции иммунофлуоресценции было показано, что от 35 до 50 % клеток линии *mel Ibr* экспрессировали pgp170 (рис. 2). Клетки *mel Kor* и *mel MtpX* не экспрессировали Р-гликопротеин.

В ПЦР определяли мРНК генов, ответственных за множественную лекарственную устойчивость – *MDR1*, *BCRP*, *MRP1* и *LRP (MVP)*. Образцы лизатов опухолевых клеток были уравнианы по гену *GAPDH*. Все остальные гены были оценены в сравнении с ним.

Во всех образцах линий клеток мРНК генов *BCRP* и *MRP1* экспрессируются слабо, а экспрессию мРНК гена *LRP (MVP)* вообще не удалось увидеть. Однако мРНК гена *YB1* экспрессируется хорошо, что характерно для большинства опухолевых клеток.

Наиболее интересные результаты получены при определении мРНК гена *MDR1*. мРНК этого гена обнаружили в клетках *mel MtpX* и субклонах линии *mel Ibr*. Клетки линий *mel Kor* и *mel Mtp* не содержат мРНК гена *MDR1* (рис. 3).

Исследование выброса родамина из клеток показало, что контрольные клетки *mel Kor* накапливали Rh123 и не выбрасывали его.

Клетки линии *mel Ibr* накапливали Rh123 и половину выбрасывали. Клетки линии *mel MtpX* накапливали мало Rh123 и почти весь его выбрасывали (рис. 4). На рисунке показаны средние каналы флуоресценции (mean).

Таблица

Специфические праймеры, использованные для амплификации кДНК

Название гена	Последовательность	Длина фрагмента
<i>GAPDH</i>	Прямой: CCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAAC TTT Обратный: GGCCATGAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTA	513 пн
<i>LRP</i>	Прямой: CCCCATACCACTATATCCATGTG Обратный: TCGAAAAGCCACTGATCTCCTG	405 пн
<i>BCRP</i>	Прямой: TGCCCAGGACTCAATGCAACAG Обратный: ACAATTTTCAGGTAGGCAATTGTG	172 пн
<i>MDR1</i>	Прямой: CCCATCATTTGCAATAGCAGG Обратный: GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA	167 пн
<i>MRP1</i>	Прямой: ATCAAGACCGCTGTCAATTGG Обратный: GAGCAAGGATGACTTGCAGG	180 пн
<i>YB-1</i>	Прямой: ACAAGAAGGTCATCGCAACGAAG Обратный: GGTGGAATACTGTGGTCGACG	476 пн

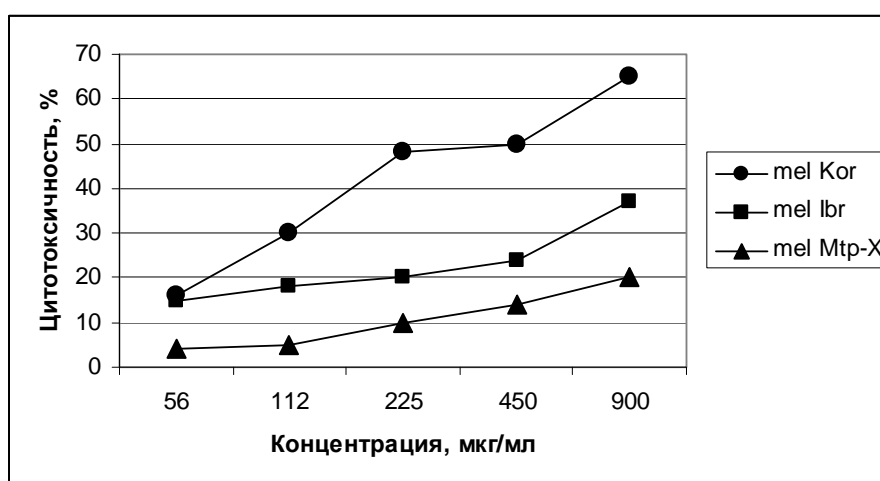


Рис.1. Цитотоксический эффект действия аранозы на клеточные линии меланомы.

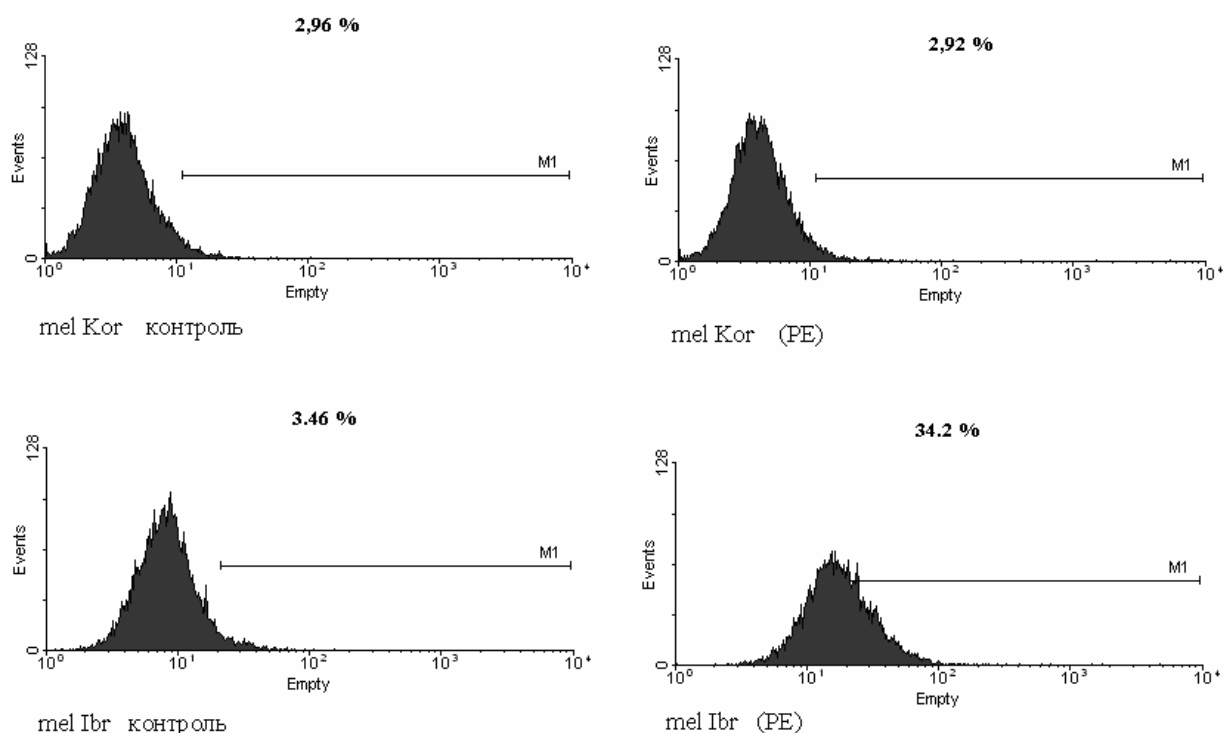


Рис. 2. Гистограммы клеток, окрашенных моноклональными антителами к pgp170, меченными фикоэритрином.

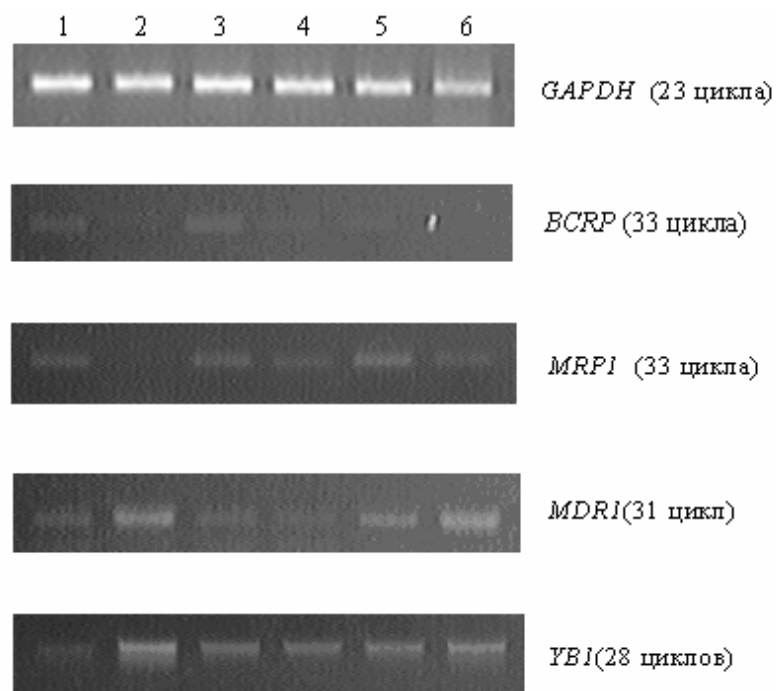


Рис. 3. Экспрессия генов, ответственных за лекарственную устойчивость в различных клетках меланомы человека: 1 – *mel Kor*; 2 – *mel Mtp* клон X; 3 – *mel Mtp*; 4 – *mel Ibr* клон 1; 5 – *mel Ibr* клон 2; 6 – *mel Ibr* клон 3.

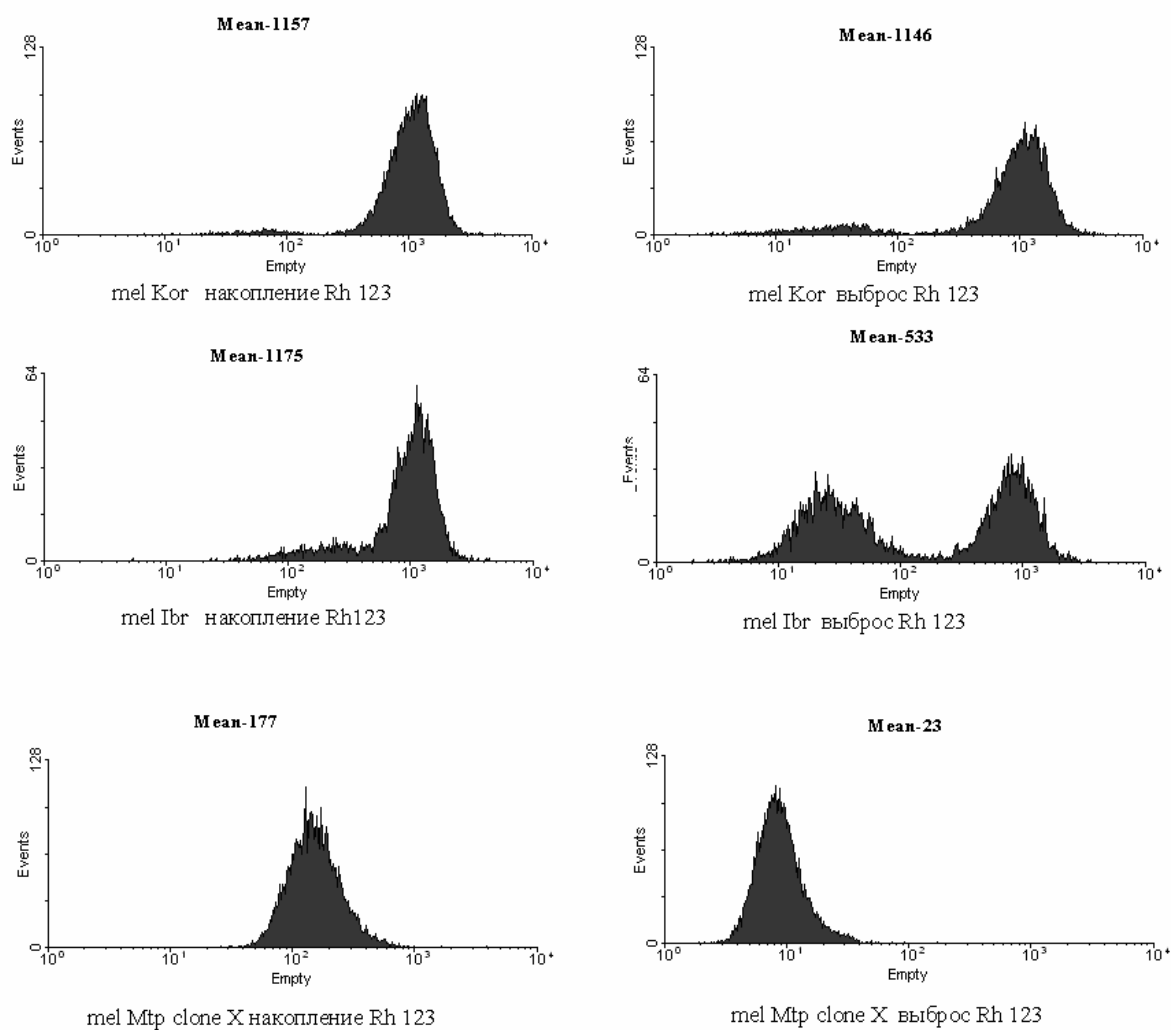


Рис. 4. Накопление и выброс родамина 123 (mean – средний канал флуоресценции).

Заключение

Таким образом, исследование показало, что чувствительные к аранозе клетки линии *mel Kor* не экспрессируют *pgr170*, не содержат мРНК генов множественной лекарственной устойчивости и не выбрасывают родамин 123. Резистентные к цитотоксическому действию аранозы клетки *mel Ibr* экспрессируют *pgr170*, содержат мРНК гена *MDR1* и выбрасывают родамин 123. Однако устойчивые к

аранозе клетки линии *mel MtpX* не экспрессируют *pgr170*, но содержат мРНК гена *MDR1* и активно выбрасывают родамин 123. Вероятно, на этих клетках экспрессирован другой эпиген *pgr170*, который не выявился МКА, которые мы применяли для детекции. Охарактеризованные клеточные линии могут быть использованы для изучения преодоления МЛУ.

Литература

1. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. – 2004. – № 2. – С. 59-63.
2. Барышников А.Ю., Степанова Е.В. Молекулярные биомаркеры в диагностике лекарственной резистентности // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2009. – № 1. – С. 23.
3. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Бурова О.С. и др. Роль CD95/Fas рецептора в индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 3–8.
4. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Полозкова А.П. Влияние лекарственных форм аранозы на индукцию апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 64.
5. Блохин Д.Ю., Соколовская А.А., Власенкова Н.К. и др. Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток, резистентных к апоптозу // Вестник РАМН. – 2007. – № 10. – С. 41–6.
6. Богущ Т.А., Смирнова Г.Б., Богущ Е.А., Барышников А.Ю. Маркеры множественной лекарственной резистентности солидных опухолей человека: методические, фундаментальные и клинические аспекты // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 82–92.
7. Богущ Т.А., Гришанина А.Н., Богущ Е.А. и др. Влияние ABC-транспортеров на противоопухолевую терапию рака толстой кишки // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2006. – Т. 16, № 2. – С. 55–62.
8. Богущ Т.А., Дудко Е.А., Богущ Е.А., Барышников А.Ю. Характеристика взаимодействия специфических антител с PGP в клетках Т-лимфоblastного лейкоза линии JURKAT // Антибиотики и химиотерапия. – 2009. – Т. 54, № 1–2. – С. 3–9.
9. Грищенко Н.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевины // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 49–54.
10. Грищенко Н.В., Барышникова М.А., Полозкова А.П. и др. Липосомальные противоопухолевые препараты не используют CD95-зависимый сигнальный путь апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
11. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Афанасьева Д.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
12. Ланцова А.В., Барышникова М.А., Санарова Е.В. Изучение в системе *in vitro* наноструктурированной лекарственной формы лизомустина // Российский онкологический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 31.
13. Литвяков Н.В. Градиентный феномен экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии: связь с прогрессированием заболевания // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – Т. 58, № 4. – С. 5.
14. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник РАМН. 2005. – № 7. – С. 37–40.
15. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестируемых антигенов в клетках меланомы человека // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – Т. 37, № 1. – С. 29–39.
16. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Клименко О.В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 61–6.
17. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Бурова О.С. и др. Сравнение уровня экспрессии HSP70 на клеточных линиях меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 43–8.
18. Славина Е.Г., Бигвава Х.А., Заботина Т.Н. и др. Модификация фактором некроза опухоли (ФНО-альфа) цитотоксического и апоптотического действия противоопухолевых лекарств в клетках меланомы человека // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 37–44.
19. Шоуа И.Б., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Действие липосомального доксорубина на клетки линии, экспрессирующие активный *pgr170* // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 20–3.
20. Szakass G., Paterson J.K., Ludwig J.A. et al. Targetting multidrug resistance in cancer // Nan Rev Drug Discov. – 2006. – № 5. – P. 219–34.
21. Sokolovskaya A.A., Zabolina T.N., Blokhin D.Yu. et al. Comparative analysis of apoptosis induced by various anticancer drugs in Jurkat cells // Experimental Oncology. – 2001. – 1(23). – P. 46–50.
22. Sokolovskaya A.A., Zabolina T.N., Blokhin D.Yu. et al. CD95-deficient cells of Jurkat/A4 subline are resistant to drug-induced apoptosis // Experimental Oncology. – 2001. – 3(23). – P. 175–81.
23. Stavrovskaya A.A., Sedyakhina N.P., Stromskaya T. et al. Prognostic value of P-glycoprotein and correlation with CD34 antigen // British J. Hematology. – 1998. – 5–6(28). – P. 469–82.
24. Turkina A.G., Baryshnikov A.Yu., Sedyakhina N.P. et al. Studies of P-glycoprotein in chronic myelogenousleukaemia patients: Expression, activity and correlations with CD34 antigen // British J. Hematology. – 1996. – 92. – P. 88–96.
25. Turkina A.G., Zabolina T.N., Kusnetsov S.V. et al. Studies of some mechanisms of drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML) // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 1999. – 457. – P. 477–88.