

УДК 577.352.2:616-097.3:615.3.014.2

А.А. Матюшин¹, О.В. Хугаева¹, М.А. Барышникова², А.О. Райков^{1,2}, А.Ю. Барышников^{1,2}
ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АНТИ-CD5 ИММУНОЛИПОСОМ МИТОКСАНТРОНА IN VITRO

¹Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва²ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва**Контактная информация**

Матюшин Алексей Аркадьевич, к. фарм. н., доцент кафедры общей химии

адрес: 105043 Москва, 4 Парковая ул., д.31/8; тел. +7(906)705-75-52

e-mail: foralan79@mail.ru

Статья поступила 21.10.2014, принята к печати 09.02.2015.

Резюме

Разработана иммунолипосомальная конструкция митоксантрона, направленная против CD5⁺ Т-клеточных лимфопролиферативных заболеваний. Для получения иммунолипосомальной конструкции митоксантрона за основу взяли липосомальную модель, в которой липидное соотношение ФХ : ХОЛ : mPEG₂₀₀₀-DSPE : pNP-PEG₃₀₀₀-lipid составило 11 : 9 : 0,95 : 0,05. Очистку иммунолипосомальной конструкции митоксантрона от «свободного» митоксантрона и не связавшихся моноклональных антител проводили методом гelfiltrации. В среднем на одну липосому приходилось ~16 молекул конъюгированных антител. Иммунолипосомы связывались с 88 % антиген⁺ клеток. В МТТ-тесте показали, что иммунолипосомы, нагруженные митоксантроном, убивают антиген⁺ клетки-мишени.

Ключевые слова: иммунолипосомы, моноклональные антитела, митоксантрон, CD5.

А.А. Matyushin¹, O.V. Khugaeva¹, M.A. Baryshnikova², A.O. Raykov^{1,2}, A.Yu. Baryshnikov^{1,2}

DEVELOPMENT AND STUDY OF MITOXANTRONE ANTI-CD5-IMMUNOLIPOSOME IN VITRO¹First Moscow State Medical University²FSBI "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center", Moscow**Abstract**

Immunoliposomal Mitoxantrone against CD5⁺ T-cell lymphoproliferative diseases was developed. Liposomal model with lipid proportion PhCh : Chol : mPEG₂₀₀₀-DSPE : pNP-PEG₃₀₀₀-lipid 11 : 9 : 0,95 : 0,05 was used for immunoliposome development. We used gel-filtration to remove free Mitoxantrone and unconjugated monoclonal antibody from immunoliposomal construction. One liposome was conjugated with ~16 antibody molecules. Immunoliposomes linked with 80% of antigen⁺ cells. Immunoliposomal Mitoxantrone killed antigen⁺ target cells in MTT-assay.

Key words: immunoliposome, monoclonal antibody, Mitoxantrone, CD5.**Введение**

В последнее десятилетие в онкологических клиниках появился новый класс противоопухолевых препаратов – таргетные препараты [29; 73; 74; 87]. Под понятием «таргетные» подразумеваются препараты, нацеленные на определенную молекулу или рецептор, взаимодействие с которым приводит к гибели клеток. К таким препаратам относятся моноклональные антитела (МКА). Последние похожи на чистейшие химические реагенты, т.к. они специфически связываются только с одной молекулой. Первыми МКА, которые можно назвать таргетными, были МКА АРО-1, анти-Fas, ICO-160, IPO-4 [11; 87; 88; 90–92]. Эти МКА связывались с CD95/Fas рецептором и индуцировали апоптоз. Потом появились таргетные гуманизированные МКА, такие как герцептин, мабтера, авастин и др. [29; 73; 85].

МКА сделали таргетными липосомальные препараты [6]. Если к липосомам присоединить МКА, они доставят загруженный в липосомы препарат непосредственно к молекуле, против которой они направлены [8–10]. Наличие большого разнообразия МКА делает иммунолипосомы уникальным инструментом терапии онкологических заболеваний [6; 17]. В качестве мишеней действия иммунолипосомальных препаратов могут выступать

любые молекулы и рецепторы, локализованные на поверхностной цитоплазматической мембране опухолевой клетки [16; 86]. Предпочтение отдается антигенам, которые при соединении с МКА пинцетируются, доставляя липосомы в цитоплазму клетки [37; 77; 78].

Иммунолипосомы осуществляют направленную доставку препаратов к опухолевой клетке. Однако простые пегилированные липосомы сами по себе способны накапливаться в опухолевой ткани [1; 5; 56; 57; 61]. Это обусловлено феноменом «проницаемости и накопления». Суть его в том, что в неоплазме нарушена васкуляризация, вновь образующиеся кровеносные сосуды в опухолевом узле не успевают за ростом самой опухоли [18; 24; 69; 72; 79]. В эндотелии кровеносных сосудов образуются поры размером до 700 нм. В них проникают липосомы и застревают в опухоли [23]. Они накапливаются в основном в окружающей строме, тогда как иммунолипосомы соединяются непосредственно с опухолевой клеткой. Кроме того, для опухоли характерна васкулогенная мимикрия, при которой кровеносные сосуды образуются из опухолевых клеток [93–96].

Липосомы в клетке попадают в лизосомы, в которых высвобождают противоопухолевое вещество [9; 15; 47]. Хороший терапевтический эффект получается при быстром высвобождении препарата

в опухоли. Существует множество способов повысить выброс препаратов в опухоль. Среди таких новых препаратов наиболее популярны термолипосомы и pH-зависимые липосомы [75; 76].

Преимущество липосомальных препаратов перед другими заключается в том, что они нетоксичны, биodeградируемы и повышают биодоступность [2–4; 12; 22; 33–38; 42; 43; 45; 60]. Липосомы преодолевают лекарственную устойчивость, обусловленную гиперэкспрессией гена МЛУ [84] или отсутствием CD95/Fas–рецептора [13; 14; 19; 20]. Кроме того, в липосомы можно включать водонерастворимые вещества [25; 28; 61]. Этим определяется появление большого количества препаратов для ФДТ [26–28; 34; 49; 50; 62–68; 82; 89]. Липосомальные препараты изменяют фармакокинетику лекарственного вещества и активируют другие механизмы клеточной гибели [21; 39; 44; 54; 55; 81].

Липосомальные препараты уже используются в клинике, однако иммунолипосомальные препараты находятся на стадии доклинического изучения [30–33; 40; 41; 46; 48; 58; 70]. Главным препятствием для разработки иммунолипосомальных препаратов является отсутствие экспериментальной модели [71]. Все мишени действия МКА являются гликопротеидами человеческой природы, и они не реагируют с мышиными аналогами этих антигенов. Использование ксенографтов человеческих опухолей на голых бестимусных мышах ограничено в связи с тем, что многие антигены утрачиваются на клеточной поверхности при росте опухоли у таких животных. Это является примером одного из способов ухода опухоли от иммунологического надзора [7]. Учитывая изложенное, многие разработки иммунолипосом заканчиваются экспериментами *in vitro* [10; 31; 59; 80].

Новым направлением использования липосом и иммунолипосом является их применение для создания противоопухолевых вакцин [4; 51–53]. Захват липосом дендритными клетками или доставка к иммунокомпетентным клеткам позволяют усилить иммунный ответ на опухолевые антигены [83].

Целью настоящей работы стало создание иммунолипосом, нагруженных митоксантроном, которые специфически связываются с клетками, экспрессирующими Т-клеточный антиген CD5.

Материалы и методы

Метод получения иммунолипосом

В работе использовали МКА ICO-80, созданные в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Для приготовления липосом использовали метод обращения фаз. Точные навески яичного фосфатидилхолина, холестерина, DSPE-PEG₂₀₀₀ и pNp-PEG₃₀₀₀-lipid растворяли в 7 мл хлороформа. Смесь переносили в круглодонную колбу и упаривали органический растворитель на ротаторном испарителе под вакуумом при температуре не выше 37±2 °С до образования липидной пленки. Пленку сушили под вакуумом в течение 40–50 мин. Далее ее гидратировали 1,5 мл 125 мМ раствора сульфата аммония при постоянном перемешивании до полного исчезновения пленки со стенок колбы. Для получения малых однослойных липосом использовали экструзионный метод, который основывается на последовательном продавливании дисперсии липосом через мембранные фильтры «Nuclepore» с пор 400; 200 и 100 нм с применением ручного мини-экструдера. Присоединение антител к липосомам и включение препарата осуществляли по принципу

активной загрузки с помощью ионного градиента сульфата аммония, pH 5,5 [81]. Для этого 0,4 мл полученных пустых липосом помещали во флакон вместимостью 10 мл и добавляли МКА ICO-80, исходя из мольного соотношения белок/pNp-PEG₃₀₀₀-lipid 1 : 40. Смесь перемешивали и добавляли 2,6 мл буфера, содержащего 10 мМ HEPES и 145 мМ NaCl (pH 8,2–8,4) и 3 мл раствора митоксантрона (концентрация 2 мг/мл). Конечный объем дисперсии составил 6 мл. Далее доводили pH в дисперсии 3 М раствором NaOH до значения 8,5–8,6 и инкубировали в течение 12 ч при +4 °С и постоянном перемешивании. Весовое соотношение препарат : липиды составило 0,12 : 1.

Измерение диаметра везикул

Анализ среднего диаметра полученных везикул и оценку их распределения по размерам проводили с использованием метода корреляционной спектроскопии светорассеяния с помощью прибора Nicomp 380 Submicron Particle Sizer.

Получение чистой фракции иммунолипосом

Очистку дисперсии от не включившегося в везикулы препарата и не присоединившихся МКА проводили методом гелевой фильтрации. На хроматографическую колонку C10/20, заполненную сефадексом G-50 и предварительно уравновешенную 0,15М р-ром хлорида натрия в течение 1 ч (при скорости 0,3–0,4 мл/мин), наносили 1 мл иммунолипосомальной дисперсии с митоксантроном. В качестве элюента использовали 0,15М раствор хлорида натрия, скорость элюции составляла 0,5 мл/мин и регулировалась перистальтическим насосом Liposomat. Процесс очистки контролировали с помощью детектора UVIS-920 с длиной волны 215 нм и рекордера REC 111, фиксировавшего разделение в виде пиков.

Количественное определение инкапсулированного митоксантрона

Для определения митоксантрона в липосомальной или иммунолипосомальной дисперсиях применяли стандартную спектрофотометрическую методику количественного определения вещества с использованием РСО митоксантрона при длине волны 242±2 нм. Исследование влияния вспомогательных веществ на спектральные характеристики митоксантрона показало, что присутствие фосфатидилхолина, холестерина, PEG₂₀₀₀DSPE, pNp-PEG₃₀₀₀-lipid и криопротекторов (сахарозы, глюкозы) не изменяет положения характеристического максимума. Измерение оптической плотности спиртовых растворов проводили относительно 95% этилового спирта в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм.

Содержание митоксантрона (X, мг) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D \times a \times C}{D_0 \times C_0}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность раствора образца;
D₀ – оптическая плотность РСО митоксантрона;
C – величина разбавления образца;
C₀ – величина разбавления РСО митоксантрона,
a – навеска РСО митоксантрона, мг.

Эффективность включения митоксантрона в липосомы (В, %) рассчитывали по формуле:

$$B = \frac{D_1 \times C_1 \times V_1}{D \times C \times V} \times 100\%, \text{ где}$$

D_1 – оптическая плотность раствора фракции с очищенным липосомальным митоксантроном;
 D – оптическая плотность раствора исходной липосомальной дисперсии;
 C_1 – величина разбавления фракции с очищенным липосомальным митоксантроном;
 C – величина разбавления исходной липосомальной дисперсии;
 V_1 – объем фракции с очищенным липосомальным митоксантроном, мл;
 V – объем исходной липосомальной дисперсии, нанесенной на колонку, мл. Митоксантрон, холестерин и фосфатидилхолин в составе липосомального препарата определяли хроматографически.

Непрямая РИФ

Специфическое связывание иммунолипосом с клетками определяли в непрямой реакции повышенной иммунофлуоресценции.

Для проведения реакции 5×10^4 дважды отмытых в PBS клеток инкубировали с 20 мкл меченых МКА, иммунолипосомальным митоксантроном, а также пустыми иммунолипосомами, в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего клетки отмывали PBS центрифугированием в течение 7 мин при 1200 об/мин.

Затем клетки инкубировали в течение 30 мин при $+4^\circ\text{C}$ с 10 мкл F(ab)₂фрагментов кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши (рабочее разведение 1 : 200), меченных FITC.

После чего клетки дважды отмывали PBS и ресуспендировали в PBS, содержащем 1%-ный формалин и 0,1%-ный азид натрия. Результаты реакции анализировали на проточном цитофлуориметре FACScan.

Оценка

цитотоксической активности

ЛФ митоксантрона МТТ-тестом

Для оценки способности иммунолипосом, загруженных митоксантроном, избирательно доставлять лекарственный препарат к клеткам-мишеням, исследуемые образцы инкубировали с клетками в течение 1 часа при $+4^\circ\text{C}$.

После этого клетки отмывали и оставляли в CO₂-инкубаторе при $+37^\circ\text{C}$ и 5% CO₂.

Контролем служили интактные клетки, которые инкубировали в тех же условиях. Общее время инкубации составило 24; 48 и 72 ч. За 6 ч до окончания инкубации в каждую лунку вносили раствор МТТ (концентрация 5 мг/мл).

По окончании инкубации планшеты центрифугировали при угловой скорости 1500 об/мин 10 мин, надосадочную жидкость удаляли.

Осадок растворяли в 150 мкл ДМСО и помещали планшеты на 5–7 минут в термостат при температуре $+37^\circ\text{C}$.

Далее, планшеты встряхивали на шейкере, после чего интенсивность окрашивания измеряли на спектрофотометре «Titertek Multiscan MCC/340» при $\lambda=530$ нм.

Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток. Процент живых клеток вычисляли по формуле:

$$N_0 = \frac{[N_1 - n] \times 100\%}{N_2}, \text{ где}$$

N_0 – процент живых клеток;

N_1 – средняя оптическая плотность лунок, содержащих клетки и препарат;

N_2 – средняя оптическая плотность контрольных лунок, содержащих только клетки;

n – оптическая плотность лунок, содержащих только митоксантрон.

Для каждого препарата строили график зависимости «доза – эффект» и определяли ИК₅₀.

Статистический анализ проводили с использованием программ «BIOSTAT» (Version 3.2), Microsoft Excel, Statisticav.5.0. Различия считали статистически достоверными при $p \leq 0,02$ и $p \leq 0,05$, использовали t-критерий Стьюдента, односторонний и двусторонний точный критерий Фишера.

Результаты и обсуждение

Получение

иммунолипосомальной конструкции митоксантрона

ИЛМ получали согласно методу обращения фаз, описанному ранее [48]. Для получения иммунолипосомальной конструкции митоксантрона за основу взяли липосомальную модель, в которой липидное соотношение ФХ : ХОЛ : mPEG₂₀₀₀-DSPE : pNP-PEG₃₀₀₀-lipid составило 11 : 9 : 0,95 : 0,05. Липидный состав иммунолипосом представлен в табл. 1.

Очистку ИЛМ от «свободного» митоксантрона и не связавшихся МКА ICO-80 проводили методом гель-фильтрации. Контроль разделения фракций осуществляли с помощью проточного спектрофотометра UVis-920. На выходе регистрировали четкое разделение на три пика, соответствующие чистой фракции ИЛМ (I), не связавшимся МКА (II) и буфера HEPES с NaCl (III; рис. 1). Сошедшие фракции собирали в стерильные флаконы и подвергали спектрофотометрическому анализу.

Условия хроматографии: колонка: С 10/20 (Amersham Biosciences); элюент: 0,15M NaCl; скорость элюции 0,5 мл/мин; детектор: UVis-920 при 215 нм (Amersham Biosciences); температура колонки – комнатная. Скорость движения бумаги в рекордере – 2 мм/мин.

Спектрофотометрическое

определение содержания митоксантрона в иммунолипосомальной конструкции

Первоначально определяли максимумы поглощения спиртовых растворов субстанции СМ и препарата в исследуемых образцах с целью выбора рабочей длины волны. В случае ИЛМ исследовали также влияние МКА на спектрофотометрическое определение препарата в везикулах. В качестве растворителя использовали 95 %-ный этиловый спирт. Оптическую плотность спиртовых растворов СМ, ICO-80-ИЛМ, ЛМ измеряли в диапазоне длин волн от 200 нм до 700 нм в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм (относительно 95 %-ного этилового спирта). Полученный спектр поглощения спиртового раствора СМ, представлен на рис. 2.

На полученной спектрограмме наблюдается четыре максимума при 242 нм, 280 нм, 620 нм и 673 нм. Спектры поглощения спиртовых растворов ЛМ и ИЛМ по положению максимумов и форме кривой были идентичны спектру спиртового раствора СМ (рис. 3 и 4).

Таблица 1

Липидный состав анти-CD5 иммунолипосомального митоксантрона

Состав	Молярное соотношение	Молекулярный вес, г/моль	Концентрация, мг/мл	% мол.
Фосфатидилхолин	11	760,09	57	52,38
Холестерин	9	386,70	23,7	42,86
mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	0,95	2805,05	18,2	4,52
pNP-PEG ₃₀₀₀ -lipid	0,05	3400	1,1	0,24
			Σ =16,65	

Таблица 2

Влияние липосомальной формы, иммунолипосомальной конструкции и субстанции митоксантрона на жизнеспособность клеток линии Jurkat

ЛФ	Концентрация митоксантрона, мг/мл					
	0,1	0,025	0,006	0,00156	0,00039	0,000097
	Количество живых клеток, %					
СМ	20±3	22±1	22±3	23±2	34±5	51±4
ЛМ	48±2*,***	49±4*,***	53±4*	79±5*	86±8*	98±3*
ICO-80-ИЛМ	35±2**,***	36±1**,***	50±7**	73±8**	86±14**	87±12**

*p≤0,02 по отношению к СМ; **p≤0,02 для ИЛМ по отношению к СМ; ***p≤0,02 для ЛМ по отношению к ИЛМ

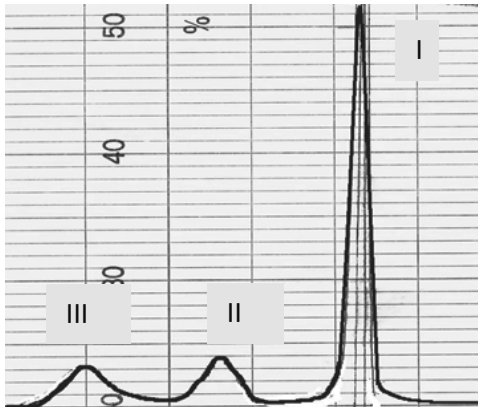


Рис. 1. Хроматограмма очистки ICO-80-ИЛМ от не связанных МКА и препарата:
I – фракция очищенных ИЛМ; II – МКА ICO-80;
III – буфер HEPES с NaCl.

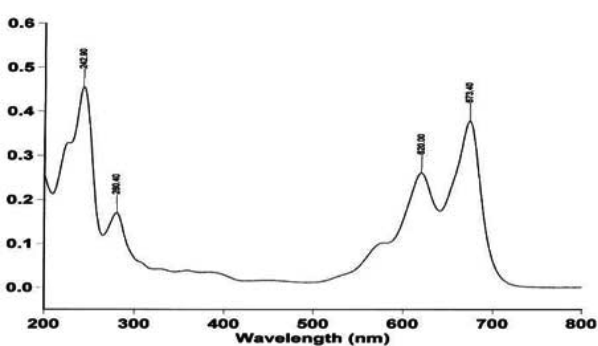


Рис. 2.Спектрограмма спиртового раствора СМ.

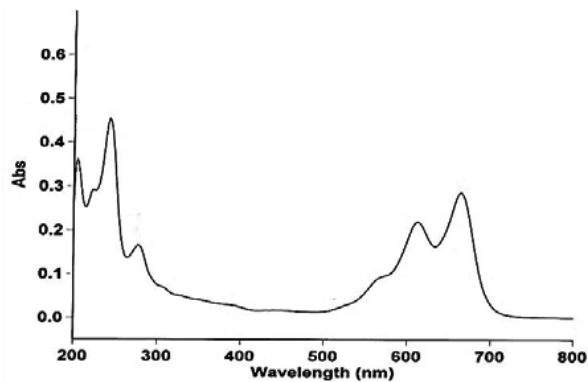


Рис. 3.Спектрограмма спиртового раствора ЛМ.

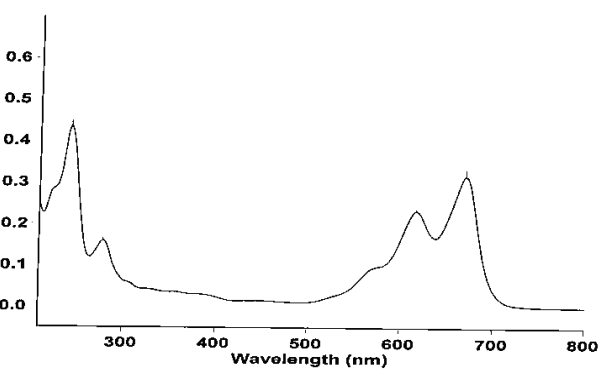


Рис. 4.Спектрограмма спиртового раствора ICO-80-ИЛМ.

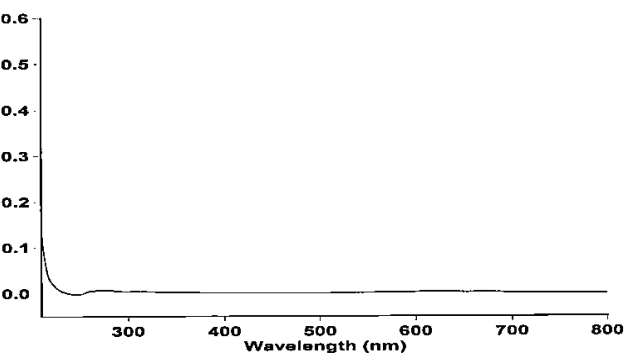


Рис. 5. Спектрограмма спиртового раствора пустых липосом.

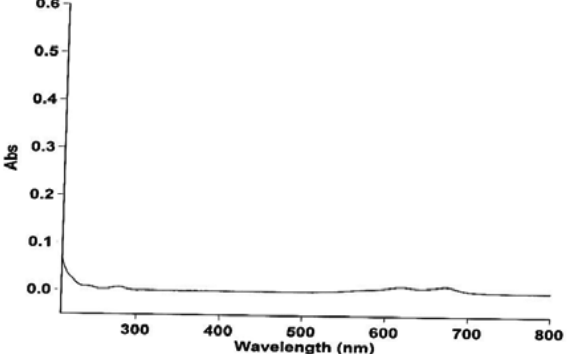


Рис. 6. Спектрограмма спиртового раствора ICO-80.

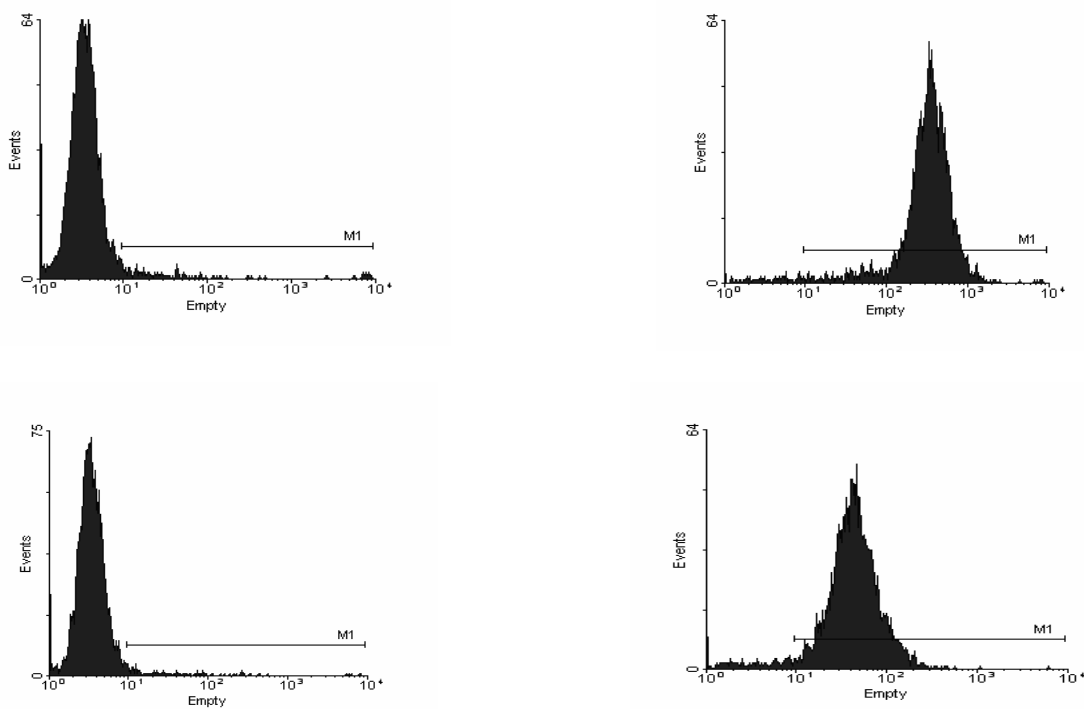


Рис. 7. Анализ специфического связывания ICO-80-ИЛМ с клетками линии Jurkat методом проточной цитофлуориметрии:
А – неокрашенные клетки;
Б – клетки, инкубированные с МКА ICO-80;
В – клетки, инкубированные с ИЛМ;
Г – клетки, инкубированные с ИМЛ и F(ab)₂, меченными FITC.

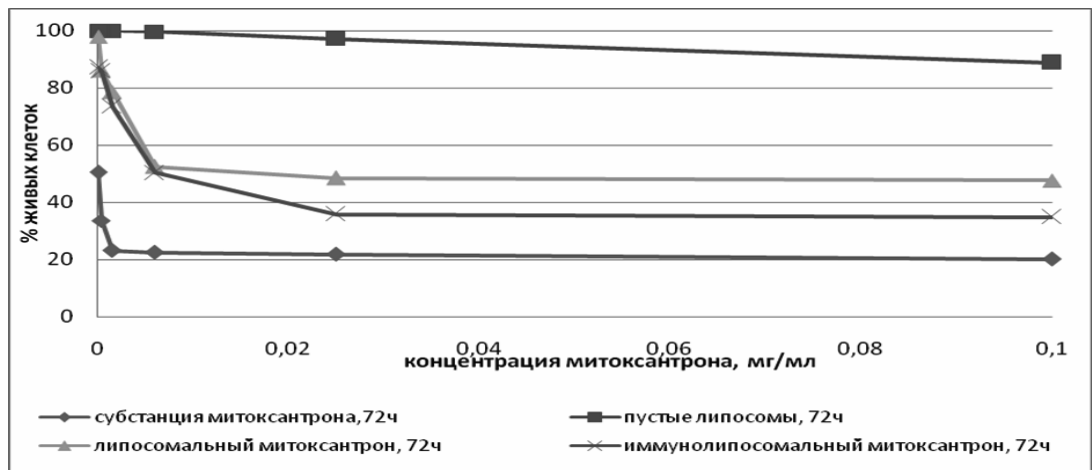


Рис. 8. Цитотоксический эффект различных лекарственных форм митоксантрона в отношении клеток Jurkat.

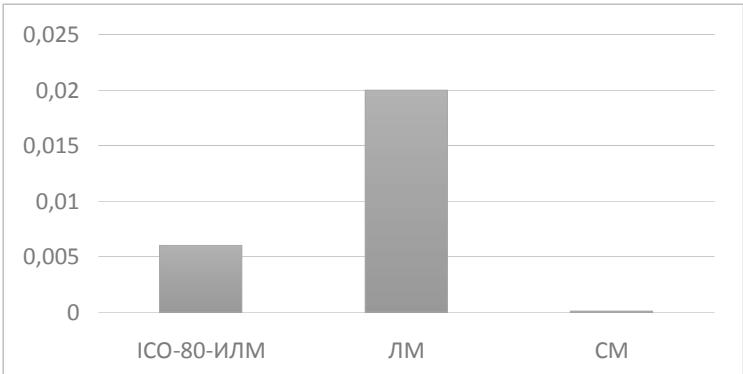


Рис. 9. Сравнение значений ИК₅₀ субстанции митоксантрона, липосомального и иммунолипосомального митоксантрона на клеточной линии Jurkat

В качестве аналитической выбрали длину волны, на которой пик митоксантрона был наиболее выраженным и узким.

Такой пик отмечали при длине волны 242 нм. Для исследования потенциального влияния МКА ICO-80, используемых в качестве векторов, и компонентов липосом на спектральные характеристики митоксантрона, прописывали максимумы поглощения спиртовых растворов ICO-80, а также пустых липосом в диапазоне длин волн от 200 нм до 700 нм.

Пустые липосомы получали из фосфатидилхолина, холестерина, mPEG₂₀₀₀-DSPE и pNP-PEG₃₀₀₀-lipid в молярном соотношении 11 : 9 : 0,95 : 0,05. Затем их разбавляли в 20 раз буфером из 10мМ HEPES и 145мМ NaCl (pH 8,4).

Оптическую плотность спиртовых растворов МКА и липосом измеряли в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм относительно спирта.

Полученные спектрограммы представлены на рис. 5 и 6. Степень включения митоксантрона в иммунолипосомы составила 95±5 %.

Определение количества МКА ICO-80, связанных с поверхностью липосом

Среднее количество белка во всей очищенной фракции пустых ICO-80-ИЛМ составило 0,107 мг. Из литературных данных известно, что одну липосому ø100 нм составляют 100 000 молекул липидов [48; 70], то на липосому ø 150 нм приходится 150 000 молекул липидов.

Если учесть, что средняя молекулярная масса липидов составляет 760 Да, а молекулярная масса иммуноглобулинов IgG₃ – 170 000 Да, то, зная соотношение фосфолипидов и белка в полученном препарате, можно вычислить, сколько молекул антител приходилось на одну липосому:

$$N = \frac{m \times N_A}{M}, \text{ где}$$

N – число молекул,

m – масса вещества, взятого согласно методике приготовления ИЛМ,

M – молекулярная масса вещества.

Таким образом, в среднем на одну ICO-80-ИЛМ приходилось ~ 16 молекул конъюгированных антител.

Оценка специфического связывания иммунолипосом с клетками-мишенями

При создании анти-CD5-ИМЛ использовали МКА ICO-80 против Т-клеточного антигена CD5 [6]. Эти МКА специфически реагировали с CD5-положительными клеточными линиями, Т-лимфоцитами периферической крови здоровых доноров и Т-клеточными лейкозами и лимфомами.

Для оценки способности иммунолипосом избирательно связываться с клетками-мишенями была использована Т-клеточная линия *Jurkat*. Оценка специфического связывания проводили с помощью непрямой РИФ.

В популяции клеток линии *Jurkat* выявлено 98 % CD5⁺ клеток-мишеней (рис. 7). При инкубации с липосомальной формой митоксантрона специфическое связывание не отмечали.

После инкубации клеток с иммунолипосомальной конструкцией митоксантрона регистрировали связывание с 88 % клеток (рис. 7).

Оценка

цитотоксической активности иммунолипосомальной конструкции митоксантрона in vitro

Оценку цитотоксического действия полученных иммунолипосом проводили в МТТ-тесте. В исследовании использовали очищенную ИЛМ, ЛМ, СМ, а также пустые иммунолипосомы.

Разведения пустых иммунолипосом готовили исходя из концентрации липидов в ИЛМ.

Перед проведением теста все образцы подвергали стерилизующей фильтрации через мембранные фильтры с низкой сорбцией белка.

Каждый препарат исследовали в 6 концентрациях, каждое разведение ставили в триплете. В контрольные лунки с клетками добавляли по 20 мкл чистой среды RPMI-1640.

По результатам теста строили кривые выживаемости клеток и определяли концентрацию, при которой происходит гибель 50 % клеток (ИК₅₀).

В таблицу 2 представлена зависимость количества живых клеток от концентрации митоксантрона в культуре клеток *Jurkat* после 72-часового инкубирования.

Субстанция митоксантрона и обе липосомальные лекарственные формы оказывали дозозависимый эффект.

Однако липосомальные препараты убивали меньшее количество клеток по сравнению с субстанцией.

На рис. 8 представлены результаты 72 часов инкубации ICO-80-ИЛМ, ЛМ, СМ и пустых липосом с клетками линии *Jurkat*.

Нижняя кривая, которая соответствовала группе клеток, инкубированных с субстанцией митоксантрона, показала самый низкий процент выживших клеток.

Верхняя кривая соответствует пустым липосомам, которые в исследованном диапазоне концентраций не проявляют цитотоксический эффект. ICO-80-ИЛМ проявила более высокий цитотоксический эффект, чем ЛМ, в концентрациях 0,025мг/мл и 0,1мг/мл он составил 36 и 35 %, а для ЛМ – 49 и 48 % соответственно.

Средняя величина ИК₅₀ в группе клеток, инкубированных с ICO-80-ИЛМ, составила 0,006±0,002 мг/мл, с ЛМ – 0,02±0,004 мг/мл и с СМ – 9×10⁻⁵±0,2×10⁻⁵ мг/мл (рис. 9).

Были выявлены достоверные различия значений ИК₅₀ в группах ICO-80-ИЛМ, ЛМ и СМ (p<0,05).

Таким образом, иммунолипосомы более эффективны по сравнению с липосомальным митоксантроном.

Заключение

Разработана иммунолипосомальная конструкция митоксантрона, направленная против CD5⁺ Т-клеточных лимфопрлиферативных заболеваний. Соотношение липидов в данной конструкции составило ФХ : ХОЛ : mPEG₂₀₀₀-DSPE : pNP-PEG₃₀₀₀-lipid составило 11 : 9 : 0,95 : 0,05.

На одну липосому в среднем приходилось 16 молекул антител ICO-80.

Иммунолипосомы связывались с антиген-положительными клетками, и в МТТ тесте было показано, что иммунолипосомальный митоксантрон обладал большей цитотоксичностью по сравнению с липосомальной формой.

Литература

1. Алексеева А.С., Апкаева М.Р., Щегловитова О.Н. и др. Специфическое связывание и накопление в эндотелиальных клетках цитотоксических липосом с лигандом селективных сиалил-Льюис-Х // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, №1. – С. 58.
2. Альбассит Б., Зангиева М.Т., Барышникова М.А. и др. Липосомальный противоопухолевый препарат ОР-2011 из класса нитрозомочевины для лечения меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 59.
3. Альбассит Б., Барышникова М.А., Игнатъева Е.В. и др. Разработка липосомальной лекарственной формы нового соединения из класса нитрозоалкилмочевины // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, №2. – С. 5.
4. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Соколова З.А., Косоруков В.С. Разработка липосомальной конструкции, содержащей лизат опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 5.
5. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Федоров В.Е. и др. Синтез и изучение цитотоксической активности аналогов гипоталамического гормона соматостатина // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 47–53.
6. Барышников А.Ю. Моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека // Гематология и трансфузиология. – 1990. – № 8. – С. 4.
7. Барышников А.Ю. Взаимодействие опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 127–30.
8. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. – 2012. – № 3. – С. 23–30.
9. Барышников А.Ю., Барышникова М.А. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И.Менделеева 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 60–7.
10. Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. Иммунолипосомы – новое средство доставки лекарственных препаратов // Современная онкология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 4.
11. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз) // Российский онкологический журнал. – 1996. – № 1. – С. 58.
12. Барышникова М.А., Альбассит Б., Сапрыкина Н.С. и др. Противоопухолевая активность нового соединения из класса нитрозомочевин // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 8.
13. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Бузова О.С. и др. Роль CD95/Fas рецептора в индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 3–8.
14. 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.
15. Барышникова М.А., Зангиева М., Барышников А.Ю. Взаимодействие липидных капсул с клеткой // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 11–5.
16. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: факторы роста, ангиогенеза и апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 25–30.
17. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. Молекулы клеточной адгезии // Успехи современной биологии. – 1994. – Т. 114, № 6. – С. 741.
18. Григорьева И.Н., Харатешвили Т.К., Барышников А.Ю. Васкулогенная мимикрия: альтернативный механизм кровоснабжения опухоли? // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 25–30.
19. 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.
20. 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.
21. Гулякин И.Д., Санарова Е.В., Ланцова А.В. и др. Разработка наноструктурированной модели лекарственной формы производного индолкарбазола – ЛХС-1208 // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 78.
22. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Санарова Е.В. и др. Применение фармацевтической технологии для повышения биодоступности лекарственных веществ // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 101–8.
23. Гуревич Д.Г., Меерович И.Г., Меерович Г.А. и др. Влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления тиосенса в опухоли // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 45–9.
24. Дедов И.И., Шестакова М.В., Кочемасова Т.В. и др. Дисфункция эндотелия в развитии сосудистых осложнений сахарного диабета (проблемная статья) // Российский физиологический журнал. им. И.М. Сеченова. – 2001. – Т. 87, № 8. – С. 1073–84.
25. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. и др. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 21–7.
26. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Орлова О.Л. и др. Липосомальная лекарственная форма борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.

27. Дмитриева М.В., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Качественный анализ липосомальной лекарственной формы борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 81.
28. Дрожжина В.В., Осипчук Ю.С. Сравнительный анализ противоопухолевой активности фотосенсибилизаторов боронового хлорина и «борхлорина липосомального лиофилизата» после фотодинамической терапии саркома М-1 крыс // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 45–50.
29. Зейналова К.Р., Вишневецкая Я.В., Ганьшина И.П. Трансгузумаб в комбинации с доцетакселом и карбоплатином в неoadъювантной терапии местнораспространенного рака молочной железы (клинико-морфологическое исследование) // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 103–6.
30. Зангиева М.Т., Барышникова М.А., Игнатъева Е.В. и др. Разработка состава пространственно стабилизированных иммунолипосом, направленных против Her-2 рецептора // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 85.
31. Зангиева М.Т., Игнатъева Е.В., Косоруков В.С. Оценка эффективности включения доксорубина в иммунолипосомы, направленные против Her-2 рецептора // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 31.
32. Зангиева М.Т., Игнатъева Е.В., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Разработка оптимального состава пространственно стабилизированных липосом, нагруженных доксорубицином // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 18.
33. Зангиева М.Т., Матюшин А.А., Соколова Д.В. и др. Разработка и исследование иммунолипосомальных конструкций in vitro // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 19–28.
34. Истомин Ю.К., Артемьева Т.П., Александров Е.Н., Церковский Д.А. Сонодинамическая и сонофотодинамическая терапия злокачественных опухолей с использованием фотосенсибилизаторов // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 119–28.
35. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. Разработка наноструктурированной лекарственной формы аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
36. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Афанасьева Д. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
37. Кортова М.А., Палкина Т.Н., Толчева Е.В. и др. Подходы к созданию иммунолипосом на примере доксорубина // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 1. – С. 6.
38. Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю., Ермакова Н.П. и др. Доклиническое изучение общетоксического действия лиофилизированной липосомальной формы тиосенса (ЛЛЛФТ) // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 43.
39. Котова Е.А., Смирнова З.С., Краснюк И.И. и др. Противоопухолевое действие липосомальной формы цифелина на лейкоз Р-388 // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 46.
40. Краснополянский Ю.М., Балабаньян В.Ю., Шаболов Д.Л., Швец В.И. Липосомальные лекарственные препараты в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 48.
41. Краснополянский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И., Шахмаев А.Е. Липосомальные препараты для вспомогательной терапии в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 3. – С. 29.
42. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Дмитриева М.В., Оборотова Н.А. Изучение «острой» токсичности липосомальной лекарственной формы борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 51–6.
43. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Изучение «хронической» токсичности лиофилизированной липосомальной лекарственной формы тиосенса на крысах // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 30.
44. Ланцова А.В., Барышникова М.А., Санарова Е.В. и др. Изучение в системе in vitro наноструктурированной лекарственной формы лизомустина // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 31.
45. Ланцова А.В., Сапрыкина Н.С., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Противоопухолевая активность наноструктурированной формы лизомустина на мышах с солидной опухолью меланомы В-16 // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 52.
46. Левачева И.С., Барышникова М.А. Направленная доставка противоопухолевых препаратов липосомами // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 32.
47. Матюшин А.А., Барышникова М.А., Барышников А.Ю., Караулов А.В. Липосомы: организм, опухоль, клетка // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2013. – Т. 17, № 6. – С. 3–10.
48. Матюшин А.А., Хугева О.В., Барышникова М.А. и др. Получение и изучение анти-CD20 иммунолипосомального митоксантрона in vitro // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 15–24.
49. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 3–8.
50. Меерович И.Г. Мицеллярный фотосенсибилизатор на основе 4,5-октаakis(децилио)-3,6-октахлорофталлоцианина цинка Октосенс // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 41–44.
51. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Клименко О.В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–6.
52. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Багирова Н.С. и др. Стерилизация многослойных протеолипосом // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 9–12.

53. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Бурова О.С. и др. Сравнение экспрессии hsp70 на клеточных линиях меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 43–8.
54. Моисеева Е.В., Кузнецова Н.Р., Аронов Д.А. и др. Противоопухолевое действие липосом с липофильным пролекарством комбретастина А4 на модели острого Т-клеточного лейкоза мышей // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 3–10.
55. Моисеева Е.В., Кузнецова Н.Р., Ситников Н.С. и др. Противоопухолевый эффект наноразмерных липосом с липофильным пролекарством комбретастина А4 на мышинной модели острого Т-лейкоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 36.
56. Оборотова Н.А. Направленная доставка противоопухолевых препаратов // Антибиотики и химиотерапия. – 1991. – Т. 36, № 10. – С. 47.
57. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 30.
58. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.
59. Оборотова Н.А. Основные проблемы создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для внутривенного введения // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – № 2. – С. 27–31.
60. Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов // Российский химический журнал. – 2012. – № 3-4. – С. 33–40.
61. Оборотова Н.А., Смирнова З.С., Полозкова А.П., Барышников А.Ю. Фармацевтические аспекты разработки липосомальных лекарственных форм для внутривенного введения гидрофобных цитостатиков // Вестник РАМН. – 2002. – № 1. – С. 42–5.
62. Осипчук Ю.С., Дрожжина В.С. Фотодинамическая терапия саркомы М-1 крыс с использованием нового фотосенсибилизатора борхлорин липосомальный лиофилизат // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 47–50.
63. Санарова Е.В., Оборотова Н.А., Смирнова З.С. и др. Применение липосомальных систем доставки для создания нового эффективного противоопухолевого фотосенсибилизатора // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 72.
64. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Дмитриева М.В. и др. Фотодинамическая терапия – способ повышения селективности и эффективности лечения опухолей // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 109–18.
65. Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Макарова О.А. и др. Доклиническое изучение липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 40–45.
66. Смирнова З.С., Меерович И.Г., Лукьянец Е.А. и др. Фенилтиозамещенные фталоцианины – новые фотосенсибилизаторы ближнего инфракрасного диапазона // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 54–60.
67. Смирнова З.С., Оборотова Н.А., Макарова О.А. и др. Эффективность и фармакокинетика липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора «Фотосенс» на основе сульфатфалоцианина // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39, № 7. – С. 3–7.
68. Смирнова З.С., Санарова Е.В., Борисова Л.М. и др. Противоопухолевая активность фотодинамической терапии с липосомальной лекарственной формой тиосенса на перевиваемых опухолях мышей // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, №4. – С. 56–60.
69. Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Абрамов М.В. и др. Ингибиторы ангиогенеза растительного происхождения: перспективы использования в клинической онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 3–10.
70. Соколова Д.В., Тазина Е.В., Кортава М.А. и др. Анти-MUC-1 иммунолипосомальная конструкция доксорубина для направленной доставки в опухоль // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 99–103.
71. Соколова Д.В., Трещалина Е.М., Андропова Н.В. и др. Модели для доклинического изучения in vivo противоопухолевой активности таргетных препаратов против антигена MUC-1 // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 55–60.
72. Степанова Е.В., Абрамов М.Е., Личиницер М.Р. Перспективы использования ингибиторов NFκB в клинической практике // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 27–30.
73. Степанова Е.В., Барышников А.Ю., Личиницер М.Р. Оценка ангиогенеза опухолей человека // Успехи современной биологии. – Т. 120, № 6. – С. 599.
74. Степанова Е.В., Зейналова К.Р. Механизм резистентности к транстузумабу // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 3–8.
75. Тазина Е.В., Оборотова Н.А. Селективная доставка препаратов в опухоль с помощью термочувствительных липосом и локальной гипертермии // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 4–12.
76. Тазина Е.В., Мещерякова В.В., Игнатьева Е.В. и др. Биофармацевтические исследования термочувствительной липосомальной лекарственной формы доксорубина // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 40–7.
77. Толчева Е.В., Оборотова Н.А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 54–61.
78. Толчева Е.В., Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. и др. Анти-CD5-иммунолипосомы как транспортная система для направленной доставки лекарственных препаратов к CD5+клеткам // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 4. – С. 38–43.
79. Франциянц Е.М., Комарова Е.Ф., Верескунова М.И. Состояние некоторых маркеров ангиогенеза и пролиферации в ткани опухолей репродуктивной системы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 58.

80. Хугаева О.В., Кортава М.А., Зангиева М.Т. и др. Химико-фармацевтические исследования липосомальной формы митоксантрона // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 41–6.
81. Хугаева О.В., Яворская Н.П., Голубева И.С. и др. Сравнительное изучение противоопухолевой активности различных лекарственных форм митоксантрона // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 51–4.
82. Чан Тхи Хай Иен, Поздеев В.И., Меерович Г.А. и др. Липосомальная лекарственная форма фотодитазина // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 2. – С. 105–7.
83. Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А.А. и др. Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 3. – С. 55–61.
84. Шоуа И.Б., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Действие липосомального доксорубина на клетки линии, экспрессирующие активный pgp170 // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 20–3.
85. Якушева Т.А., Когония Л.М., Федотов А.И. и др. Авастин в лечении метастатического колоректального рака // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 35–9.
86. Baryshnikov A.Yu., Baryshnikova M.A. Immunoliposomes and their targets // Russian J. General Chemistry. – 2013. – 83(12). – P. 2565–70.
87. Baryshnikov A.Yu., Polosukhina E.R., Tupitsin N.N. et al. CD95 (Fas/APO-1) antigen is a new prognostic marker of blast cells of acute lymphoblastic leukaemia patients / Book Editor(s): Kaspers, GJL; Pieters, R; Veerman, AJP. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma III Book Series: Advances in Experimental Medicine and Biology. 1999. – Vol.: 457. – P. 251–8.
88. Baryshnikov A.Yu., Polosukhina E.R., Zabolina T.N. et al. FAS(APO-1/CD95) antigen: new activation marker for evaluation of the immune status // Russian Immunological J. – 1997. – 2(2). – P. 115.
89. Derkacheva V.M., Meerovich G.A., Meerovich I.G. et al. Heterooxyaluminium tetra-3-phenyl thiophthalocyanin is a new effective photosensitizer for photodynamic therapy and fluorescent diagnosis // Bulletin Experimental Biology and Medicine. – 2005. – 139(4). – P. 422–30.
90. Polosukhina E.R., Zabolina T.N., Shishkin Yu.V. et al. Studing of Fas(APO-1/CD95) antigen expression by flow cytometry with monoclonal antibodies IPO-4 // Experimental Oncology. – 1997. – 19(3). – P. 206–11.
91. Polosukhina E.R., Baryshnikov A.Yu., Shishkin Yu.V. et al. Expression of antigen CD95(Fas/APO-1) mediating apoptosis in hemoblastosis using monoclonal antibodies ICO-160 // Hematology and transfusiology. – 2000. – 45(4). – P. 3–6.
92. 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. – 2000. 23(1). – P. 46–50.
93. Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V. et al. The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry // Melanoma Research. – 2007. – 17(1). – P. 1–8.
94. Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V. et al. Melanoma vasculogenic mimicry is strongly related to reactive oxygen species level // Melanoma Research. – 2007. – 17(6). – P. 370–9.
95. Vartanian A.A., Stepanova E.V., Gutorov S.V. et al. Prognostic significance of periodic acid-schiff-positive patterns in clear cell renal carcinoma // The Canadian Journal of Urology. – 2009. – 16(4). – P. 4726–32.
96. Vartanian A.A., Stepanova E.V., Grigorjeva I. et al. VEGFR1 and PKCa signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VGFR2 kinasa-idependent manner // Melanoma Research. – 2011. – 21(2). – P. 91–8.