

Глутоксим как ингибитор фенотипа множественной лекарственной резистентности, ассоциированной с экспрессией Pgp

Т. А. БОГУШ, Е. А. ДУДКО, Е. А. БОГУШ, В. Ю. КИРСАНОВ, В. Г. АНТОНОВ

Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Glutoxime, as an Inhibitor of Multiple Drug Resistance Phenotype Associated with Pgp Expression

T. A. BOGUSH, E. A. DUDKO, E. A. BOGUSH, V. YU. KIRSANOV, V. G. ANTONOV

N. N. Blokhin Russian Scientific Centre of Cancer, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Исследовано взаимодействие Глутоксима с маркером множественной лекарственной резистентности Р-гликопротеином (Pgp), а также влияние Глутоксима на внутриклеточное накопление доксорубина. Показано, что воздействие Глутоксима на опухолевые клетки, экспрессирующие Pgp, приводит к снижению интенсивности специфической флуоресценции клеток, обусловленной связыванием моноклональных антител с транспортным белком. Это свидетельствует о конкуренции Глутоксима с моноклональными антителами за связывание с Pgp и указывает на взаимодействие модификатора с этим транспортным белком. Эффект продемонстрирован на двух культурах опухолевых клеток человека разного гистогенеза — клетках Т-клеточного лейкоза линии Jurkat и немелкоклеточного рака лёгкого линии A549. Показано также ингибирование функциональной активности Pgp при воздействии Глутоксима, причиной которого, по мнению авторов, является прямая конкуренция модификатора с противоопухолевым препаратом за связывание с местами посадки на Pgp. Считают, что препарат Глутоксим может рассматриваться как ингибитор множественной лекарственной резистентности, ассоциированной с функцией Pgp.

Ключевые слова: Pgp, экспрессия и функциональная активность, Глутоксим.

Interaction of Glutoxime with P-glycoprotein (Pgp), a multiple drug resistance marker, as well as the Glutoxime impact on doxorubicin intracellular accumulation were investigated. It was shown that the Glutoxime effect on the Pgp expressing tumor cells resulted in a decrease of the cell specific fluorescence intensity, conditioned by binding of the monoclonal antibodies to the transport protein. That was evident of Glutoxime competition with the monoclonal antibodies for binding to Pgp and indicative of the modulator interaction with the transport protein. The effect was proved with the use of two cultures of human tumor cells of different histogenesis, i. e. the cells of Jurkat T-cellular leukemia and nonsmall cell lung cancer A549. Inhibition of the Pgp functional activity by Glutoxime was also demonstrated. The authors suggested that it could be caused by direct competition of the modulator with the antitumor agent for binding to the precipitation sites on Pgp. Glutoxime could be considered as an inhibitor of multiple drug resistance associated with the Pgp function.

Key words: Pgp, expression, functional activity, Glutoxime.

Наряду с высокой токсичностью большинства противоопухолевых препаратов, врождённая и индуцированная устойчивость к лекарственной терапии является важнейшим ограничением в достижении оптимальной эффективности лечения. Одним из универсальных механизмов развития устойчивости, который затрагивает не только большинство классических цитостатиков, но и современные таргетные препараты, является так называемая множественная лекарственная резистентность, обусловленная активацией выброса противоопухолевых препаратов из клеток. Про-

цесс этот осуществляется транспортными белками семейства АВС-транспортёров [1]. При этом поиск лекарственных средств, подавляющих функционирование этих белков и таким образом ингибирующих механизм множественной лекарственной резистентности, является, наряду с созданием новых противоопухолевых препаратов, одним из интенсивно развивающихся направлений противоопухолевой химиотерапии.

Глутоксим — это синтетический аналог окисленного глутатиона (дисульфид глутатиона), который вместе с восстановленной формой образуют в клетке одну из основных редокс систем, осуществляющих регуляцию многих клеточных функций [2, 3]. Глутоксим обладает иммуномодулирующей активностью и применяется в ком-

© Коллектив авторов, 2010

Адрес для корреспонденции: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24. РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН

плексной терапии различных инфекционных заболеваний, псориаза и при других хронических процессах [4, 5]. Интересны описанные в литературе данные о способности Глутоксима изменять активность рецепторных и цитоплазматических тирозинкиназ в макрофагах, что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации ионов кальция [6, 7]. И наконец, существует опыт применения Глутоксима в качестве сопутствующего средства при лучевой терапии местно-распространённого рака шейки матки [8]. Отмечено, что процент полной и частичной клинической ремиссии по окончании лучевой терапии при применении Глутоксима был выше, чем в контрольной группе.

В настоящей работе Глутоксим изучен как модификатор лекарственной устойчивости. Исследовано взаимодействие Глутоксима с одним из прогностически значимых маркеров множественной лекарственной резистентности — Р-гликопротеином (Pgp), а также влияние Глутоксима на внутриклеточное накопление доксорубина.

Материал и методы

Работа проведена на опухолевых клетках человека, культивируемых *in vitro*.

Суспензионную культуру клеток Т-лимфоblastного лейкоза человека линии Jurkat выращивали в среде RPMI-1640, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки. Суспензию клеток центрифугировали в течение 10 мин при 1,5 тыс. об/мин и осадок ресуспендировали в фосфатном буферном растворе pH 7,4. Количество клеток в полученной суспензии подсчитывали в камере Горяева и, в случае необходимости, центрифугировали и ресуспендировали в соответствующем объёме фосфатного буферного раствора pH 7,4 до достижения конечной концентрации клеток 1 млн/мл. Клетки фиксировали формальдегидом до конечной концентрации 4%.

Монослойную культуру клеток немелкоклеточного рака лёгкого человека линии A549 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки. После удаления среды монослой дважды промывали раствором Версена, затем заливали этим же раствором, добавляя такое количество, чтобы покрыть все клетки, и инкубировали при 37°C 10 мин. После пипетирования в фосфатном буферном растворе pH 7,4 суспензию клеток центрифугировали в течение 10 мин при 1,5 тыс. об/мин и осадок ресуспендировали в фосфатном буферном растворе pH 7,4. Количество клеток в полученной суспензии подсчитывали в камере Горяева и, в случае необходимости, центрифугировали и ресуспендировали в соответствующем объёме фосфатного буферного раствора pH 7,4 до достижения конечной концентрации клеток 1 млн/мл. Клетки фиксировали формальдегидом до конечной концентрации 4%.

При проведении иммунофлуоресцентного анализа непосредственно перед экспериментом готовили необходимые разведения коммерческих антител, используя раствор фосфатного буфера pH 7,4. В пластиковые пробирки для проточного цитофлуориметра к 100 мкл суспензии исследуемых клеток добавляли соответствующие разведения антител и инкубировали на холоду при 4°C в течение 30 мин. После окончания инкубации клетки дважды отмывали в 2 мл раствора фосфатного буфера pH 7,4 при центрифугировании при 1,5 тыс. об/мин в течение 10 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 300 мкл фосфатного буферного раствора pH 7,4.

В работе использованы мышиные моноклональные антитела (фирма BD Pharmingen), меченные флуоресцентным

красителем FITC, клон 17F9. Данные антитела характеризуются специфичностью к внешнему эпитопу трансмембранного белка Pgp человека. В исследовании использованы семь концентраций антител, выраженные в объёмных единицах неразведённого коммерческого раствора: 40; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5 мкл на 100 мкл клеточной суспензии. За максимальную принята концентрация антител 40 мкл/100 мкл суспензии, так как при дальнейшем увеличении количества антител происходило лишь незначительное изменение интенсивности флуоресценции. В качестве изотипического контроля использованы мышиные моноклональные антитела IgG2b, к, меченные FITC (BD Pharmingen) в эквивалентных специфическим антителам концентрациях.

Оценка влияния Глутоксима на внутриклеточное накопление модельного противоопухолевого препарата доксорубина проведена на клетках Т-лимфоblastного лейкоза человека линии Jurkat. Клетки инкубировали в течение 5 мин с доксорубином (Pharmacia & Upjohn, Италия) в диапазоне конечных концентраций 5×10^{-7} – 5×10^{-8} М. Реакцию останавливали добавлением раствора формальдегида до конечной концентрации 4%.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson), укомплектованном аргонным лазером с длиной волны испускания 488 нм. Для измерения флуоресценции красителя FITC применяли фильтр FL1-H. Для измерения внутриклеточной флуоресценции доксорубина применяли фильтр FL2-H. В обоих случаях измерение проводили при значении порога по прямому светорассеянию FSC — 50, число анализируемых событий — от 5 до 10 тыс. [9, 10].

Во всех экспериментах анализ данных гистограмм распределения клеток по интенсивности флуоресценции проводили с помощью программы WinMDI, оценивая уровень средней флуоресценции клеток в исследованной популяции.

Влияние Глутоксима (Фарма-ВАМ, Москва) на взаимодействие с клетками моноклональных антител к Pgp и на внутриклеточное накопление доксорубина оценивали при концентрации препарата 100 мкг/мл и времени инкубации с клетками 20 мин.

Результаты и обсуждение

Перед началом основного этапа исследований в культурах клеток человека линий Jurkat и A549 охарактеризована экспрессия маркера множественной лекарственной резистентности Pgp при окрашивании клеток специфическими антителами к внеклеточному эпитопу Pgp в диапазоне концентраций антител от 0,5 до 40 мкл на 100 мкл суспензии. Результаты одного из трёх независимых экспериментов представлены на рис. 1.

Видно, что в клетках Jurkat при количестве антител 0,5; 1,0 и 2,5 мкл выявляется лишь незначительное окрашивание суспензии по сравнению с изотипическим контролем, что выражается в увеличении интенсивности флуоресценции в 1,1; 1,2 и 1,4 раза (рис. 1, а). При дальнейшем повышении количества антител, вплоть до 10 мкл, выявляется прямая линейная зависимость окрашивания суспензии от концентрации антител. В этой области превышение интенсивности флуоресценции составило 1,8 и 2,8 для количества антител 5 и 10 мкл соответственно. Дальнейшее увеличение количества антител до 40 мкл приводит к выходу на плато превышения интенсивности спе-

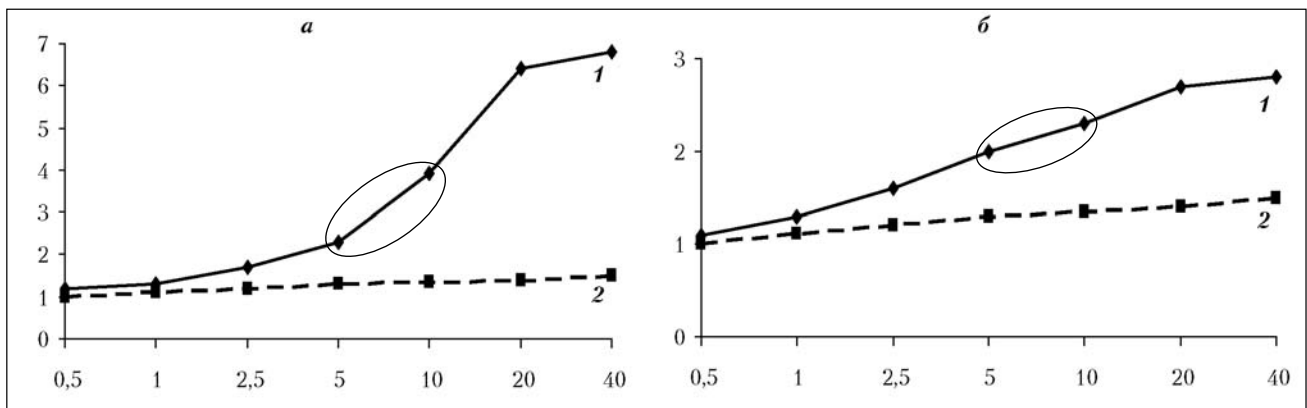


Рис. 1. Характеристика экспрессии Pgp в клетках культур Т-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat и немелкоклеточного рака лёгкого человека линии A549.

а – клетки Т-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat; *б* – клетки немелкоклеточного рака лёгкого человека линии A549. По оси абсцисс – концентрация антител в мкл, по оси ординат – относительные показатели флуоресценции. За единицу принята флуоресценция клеток после инкубации с минимальной концентрацией изотипических антител – 0,5 мкл. 1 – относительная флуоресценция клеток после инкубации с изотипическими антителами; 2 – относительная флуоресценция клеток после инкубации со специфическими антителами к Pgp. Выделенная область обозначает линейную зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации специфических антител к Pgp. Рис. *а* – превышение интенсивности флуоресценции составило 1,1; 1,2; 1,4; 1,8; 2,8; 4,5 и 4,6 для количеств антител 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 соответственно. Рис. *б* – Превышение интенсивности флуоресценции составило 1,1; 1,2; 1,3; 1,5; 1,7; 1,9 и 2,0 для количеств антител 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 соответственно.

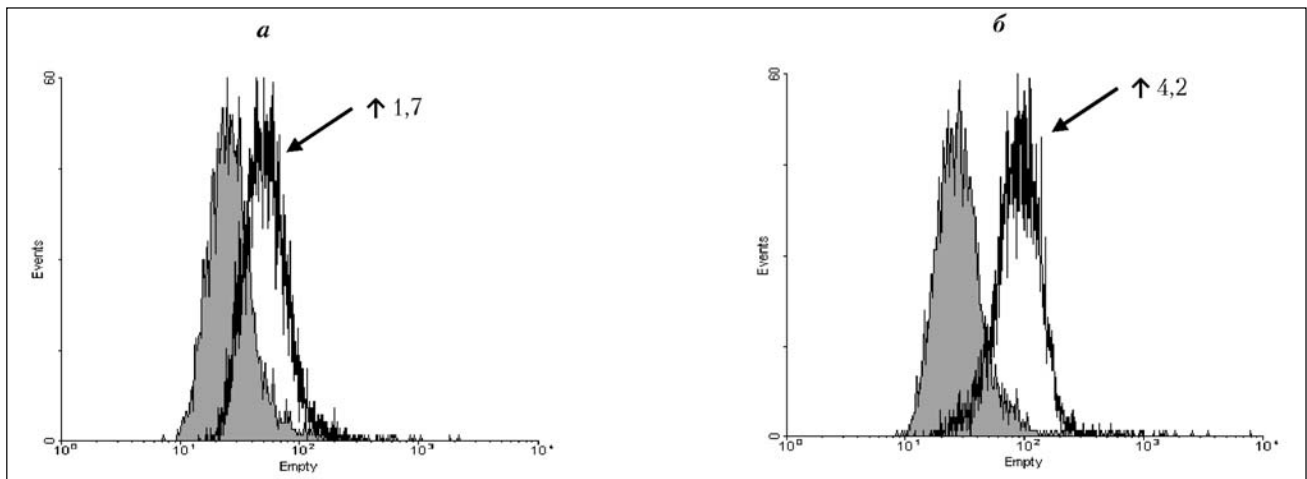


Рис. 2. Пример гистограмм распределения клеток Т-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat по интенсивности флуоресценции в области линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации специфических антител к Pgp.

По оси абсцисс – средняя интенсивность флуоресценции (усл. ед.); по оси ординат – количество клеток. *а* – при количестве специфических и изотипических антител – 2,5 мкл; *б* – при количестве специфических и изотипических антител – 5,0 мкл. Закрашенные гистограммы – интенсивность флуоресценции после добавления изотипических антител, незакрашенные – после добавления специфических антител к Pgp. Стрелками отмечено увеличение интенсивности флуоресценции при окрашивании специфическими антителами к Pgp.

цифической флуоресценции клеток линии Jurkat над изотипическим контролем – в 4,5 и 4,6 раз для количеств антител 20 и 40 мкл соответственно.

Аналогичные данные получены и для клеток линии A549, в которых также выявляется Pgp, но, судя по превышению интенсивности специфической флуоресценции клеток над изотипическим контролем, уровень экспрессии белка ниже, чем в клетках Т-лимфобластного лейкоза. На рис. 1, *б* видно, что превышение интенсивности специфической

флуоресценции над изотипическим контролем составило 1,1; 1,2; 1,3; 1,5; 1,7; 1,9 и 2,0 для количеств антител 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 соответственно. Плато также достигнуто при количестве специфических антител выше 20 мкл.

Изучение влияния Глутоксима на связывание с клетками специфических антител проведено в области линейной зависимости превышения интенсивности специфической флуоресценции над изотипическим контролем от концентрации ан-

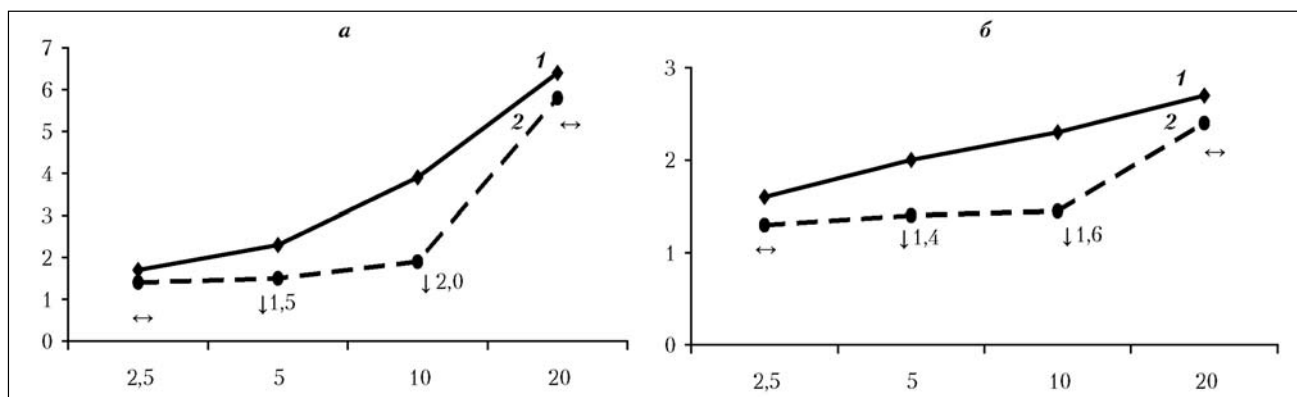


Рис. 3. Влияние Глутоксима на связывание специфических антител с Pgp в клетках линий Jurkat и A549 в области линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации специфических антител к Pgp.

По оси абсцисс — концентрация антител в мкл; по оси ординат — количество клеток (%), специфически окрашенных антителами к Pgp. 1 — относительная флуоресценция клеток после инкубации со специфическими антителами к Pgp. 2 — относительная флуоресценция клеток после преинкубации с Глутоксимом и последующей инкубации со специфическими антителами к Pgp. Цифры и стрелки указывают изменение показателя при воздействии Глутоксима в сравнении с аналогичным показателем без воздействия Глутоксима.

тител (очерчены линией на рис. 1, а и б). Такой подход повышает достоверность получаемых результатов и практически исключает ложноположительный ответ, который может быть получен при «попадании» в область нелинейной зависимости или отсутствия таковой при насыщающей концентрации антител. На рис. 2 представлены примеры реальных гистограмм распределения клеток по интенсивности специфической флуоресценции в сравнении с изотипическим контролем, демонстрирующие окрашивание клеток линии Jurkat при количестве специфических антител к Pgp 5 и 10 мкл.

Данные, представленные на рис. 3, а, демонстрируют влияние Глутоксима на специфическое флуоресцентное окрашивание клеток линии Jurkat при разных концентрациях моноклональных антител к Pgp. Видно, что после инкубации клеток с модификатором средняя флуоресценция клеток в суспензии не изменяется при количестве специфических антител 2,5 мкл, то есть при отсутствии специфического окрашивания клеток. По существу, это свидетельствует об отсутствии влияния Глутоксима на неспецифическое взаимодействие с клетками флуоресцирующих антител, что согласуется с результатами, полученными нами в прямых экспериментах при оценке влияния вещества на взаимодействие с клетками линии Jurkat изотипических антител (данные не представлены). Также не выявлено никаких изменений в специфическом окрашивании клеток после преинкубации с Глутоксимом при использовании моноклональных антител к Pgp в количестве 20 мкл, которое находится в области плато, то есть отсутствия зависимости флуоресценции клеток от количества антител.

В то же время в области линейной зависимости интенсивности флуоресценции от количества

антител при воздействии Глутоксима отмечено снижение интенсивности флуоресценции клеток. Превышение средней интенсивности флуоресценции клеток по сравнению с изотипическим контролем после инкубации с Глутоксимом при количестве специфических антител 5 мкл снизилось в 1,5 раза — с 2,3 до 1,5 раз, а при количестве антител 10 мкл — в 2,0 раза: с 3,9 до 1,9 раз (рис. 3, а).

Аналогичные результаты получены и в экспериментах с клетками немелкоклеточного рака лёгкого линии A549 (рис. 3, б). Уменьшение интенсивности специфической флуоресценции клеток при воздействии Глутоксима происходит только в области линейной зависимости интенсивности флуоресценции клеток от концентрации специфических антител к Pgp. При количестве моноклональных антител 5 мкл превышение средней интенсивности флуоресценции клеток по сравнению с изотипическим контролем после инкубации с Глутоксимом снизилось в 1,4 раза: с 2,0 до 1,4 раз, а при количестве антител 10 мкл — в 1,6 раза: с 2,3 до 1,4 раз. При количестве антител 2,5 и 20 мкл, так же как и в клетках линии Jurkat, после воздействия Глутоксима не удалось выявить значимых различий в превышении средней интенсивности флуоресценции клеток по сравнению с изотипическим контролем.

На рис. 4 представлены примеры реальных гистограмм распределения клеток по интенсивности специфической флуоресценции по сравнению с изотипическим контролем, демонстрирующие влияние Глутоксима на связывание моноклональных антител с Pgp в клетках линии Jurkat в области линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации специфических антител к Pgp. Отчетливо видно смещение гистограмм специфически флуоресцирующих клеток

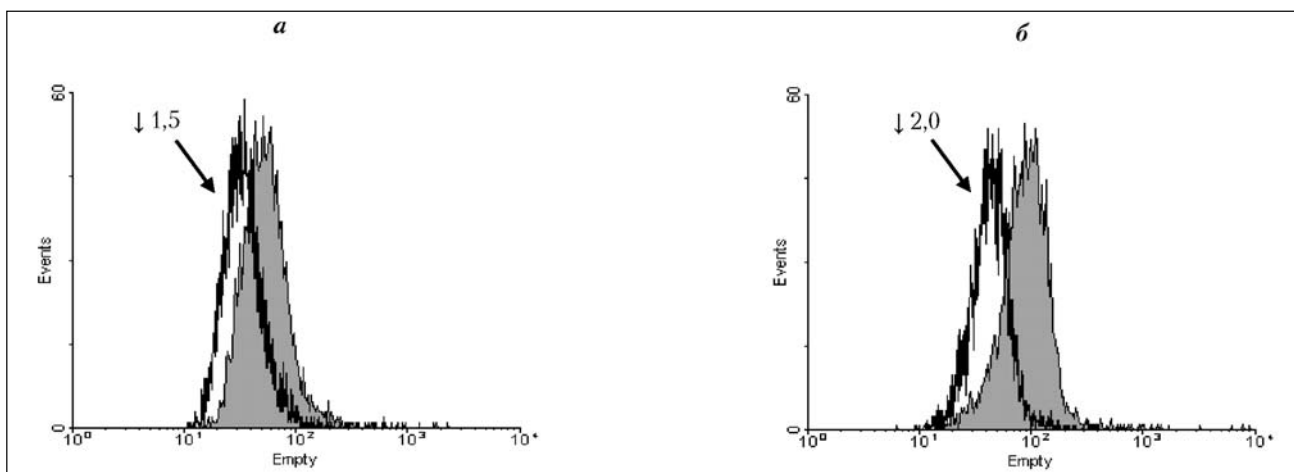


Рис. 4. Пример гистограмм, демонстрирующих влияние Глутоксима на связывание моноклональных антител с Pgp в клетках линии Jurkat в области линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации специфических антител к Pgp.

По оси абсцисс — средняя интенсивность флуоресценции (усл. ед.); по оси ординат — количество клеток. а — при количестве специфических антител — 5 мкл; б — при количестве специфических антител — 10 мкл. Закрашенные гистограммы — интенсивность флуоресценции после добавления специфических антител, незакрашенные — после преинкубации с Глутоксимом. Стрелками отмечено уменьшение интенсивности флуоресценции после воздействия Глутоксима.

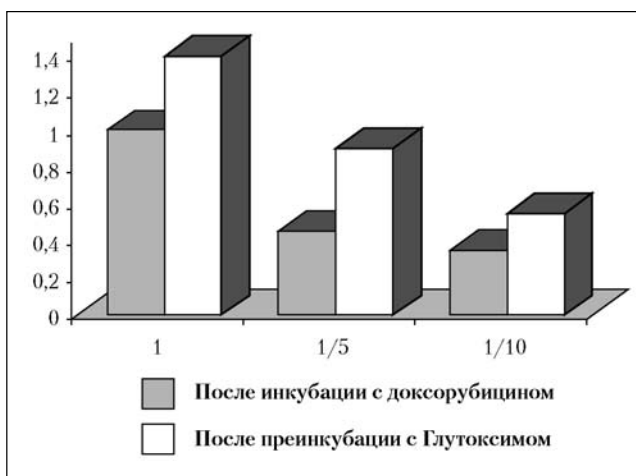


Рис. 5. Влияние Глутоксима на внутриклеточное накопление доксорубина в клетках Т-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat.

По оси абсцисс — концентрация доксорубина (за единицу принята концентрация 5×10^{-7} М); по оси ординат — внутриклеточная флуоресценция доксорубина относительно показателя при максимальной концентрации антрациклина 5×10^{-7} М. Цифры указывают изменение показателя при воздействии Глутоксима в сравнении с аналогичным показателем без воздействия Глутоксима; ↑ — увеличение внутриклеточной флуоресценции доксорубина при воздействии Глутоксима.

по сравнению с изотипическим контролем влево, что отражает уменьшение интенсивности специфической флуоресценции клеток в 1,5 и 2,0 раза при количестве моноклональных антител к Pgp 5,0 и 10,0 мкл (рис. 4, а и б соответственно).

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что воздействие Глутоксима

приводит к уменьшению взаимодействия с клетками моноклональных антител к Pgp, что является прямым указанием на способность препарата связываться с этим транспортным белком. Взаимодействие такого рода дает возможность предположить изменение функциональной активности белка и, таким образом, ингибирование механизма множественной лекарственной резистентности, ассоциированного с экспрессией Pgp.

Для проверки этого предположения, в клетках линии Jurkat изучено влияние Глутоксима на внутриклеточное накопление модельного препарата и флуоресцентного зонда доксорубина, применённого в трёх концентрациях: максимальной — 5×10^{-7} М, а также в 5 и 10 раз меньше (далее обозначаются как 1, 1/5 и 1/10 соответственно). Результаты одного из трёх независимых экспериментов представлены на рис. 5.

Показано выраженное увеличение внутриклеточного накопления доксорубина после преинкубации клеток с Глутоксимом. Это зарегистрировано как увеличение внутриклеточной флуоресценции доксорубина при всех исследованных концентрациях доксорубина: при концентрациях антрациклина 1, 1/5 и 1/10 — в 1,4 раза, 2,0 и 1,6 раза соответственно. При этом уровень внутриклеточного накопления доксорубина в концентрации 5×10^{-8} М при воздействии Глутоксима соответствовал показателю при концентрации в 2 раза выше — 10^{-7} М. Аналогичный эффект отмечен и при большей концентрации доксорубина: при воздействии Глутоксима внутриклеточное накопление доксорубина в концентрации 10^{-7} М соответствовало таковому при концентрации в 5 раз выше — 5×10^{-7} М. Иными

словами, при воздействии Глутоксима сохранялась линейная зависимость накопления доксорубина в клетках линии Jurkat от концентрации антрациклина, но внутриклеточный уровень препарата был от 1,5 до 2,0 раз выше.

Выявленное при воздействии Глутоксима увеличение внутриклеточного накопления доксорубина свидетельствует об ингибировании функциональной активности транспортного белка Pgp, об ингибировании выброса противоопухолевого препарата из клеток, то есть об ингибировании механизма множественной лекарственной резистентности, ассоциированной с экспрессией Pgp. Причиной этого, как показали представленные выше результаты иммунофлуоресцентной оценки влияния Глутоксима на взаимодействие моноклональных антител с Pgp, является прямое взаимодействие Глутоксима с этим транспортным белком — маркером множественной резистентности.

Выводы

Препарат Глутоксим нарушает взаимодействие специфических антител с прогностически значимым маркером множественной лекарственной резистентности — Pgp. Воздействие Глутоксима на опухолевые клетки, экспрессирующие Pgp, приводит к снижению интенсивности спе-

цифической флуоресценции клеток, обусловленной связыванием моноклональных антител с транспортным белком. Это свидетельствует о конкуренции Глутоксима с моноклональными антителами за связывание с Pgp и указывает на взаимодействие модификатора с этим транспортным белком. Эффект продемонстрирован на двух культурах опухолевых клеток человека разного гистогенеза — клетках Т-клеточного лейкоза линии Jurkat и немелкоклеточного рака лёгкого линии A549.

В основе выявленного ингибирующего воздействия Глутоксима на функциональную активность Pgp лежит, по-видимому, прямая конкуренция модификатора с противоопухолевым препаратом за связывание с местами посадки на Pgp. При этом неспецифические эффекты Глутоксима и опосредованная регуляция функционирования Pgp представляются маловероятными, так как влияния на взаимодействие с клетками изотипических или специфических антител при отсутствии экспрессии в клетках Pgp не выявлено.

Оценивая перспективы клинического применения Глутоксима, считаем, что препарат может рассматриваться как ингибитор множественной лекарственной резистентности, ассоциированной с функцией Pgp.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bogush T., Robert J.* Multidrug resistance reversal in solid tumors. ABC transporters and multidrug resistance. WILEY, 2009; 349—362.
2. *Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M. R.* Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1057—1064.
3. *Jordan P. A., Gibbins J. M.* Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function. *Antioxidants & Redox Signalling* 2006; 8: 4: 312—324.
4. *Соколова Г. Б., Сеницин М. В., Кожемякин Л. А. и др.* Глутоксим в комплексной терапии туберкулеза. *Антибиотики и химиотер* 2002; 47: 2: 20—23.
5. *Новиков А. И., Кононов А. В., Охлопков В. А. и др.* Эффективность Глутоксима в комплексной терапии больных каплевидной формой псориаза. *Росс журн кож вен бол* 2003; 1: 38—41.
6. *Курилова Л. С., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. и др.* Влияние окисленного глутатиона и его фармакологического аналога препарата Глутоксим на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. *Цитология* 2008; 50: 5: 452—460.
7. *Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Курилова Л. С. и др.* Возможное участие ионов кальция в регуляторном действии окисленного глутатиона на макрофаги. *Доклады Академии наук* 2007; 412: 5: 1—4.
8. *Манихас Г. М., Филатова Е. И., Былинская Е. Н. и др.* Применение препарата Глутоксима при сочетанной лучевой терапии местнораспространённого рака шейки матки. *Росс онкол журн* 2008; 1: 23—28.
9. *Богущ Т. А., Дудко Е. А., Богущ Е. А. и др.* Характеристика взаимодействия специфических антител с Pgp в клетках Т-лимфобластного лейкоза линии Jurkat. *Антибиотики и химиотер* 2009; 54: 1—2: 3—9.
10. *Богущ Т. А., Равчеева А. Б., Конухова А. В. и др.* Новый подход к оценке функциональной активности ABC-транспортёров, контролирующих внутриклеточное распределение противоопухолевых препаратов, методом проточной цитофлюориметрии. *Доклады Академии наук* 2005; 405: 5: 682—685.