

ПРОЯВЛЕНИЕ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К БЕЛКУ PRAME

Н.А. Лыжко, В.А. Мисюрин, Ю.П. Финашутина, Т.В. Ахлынина, Л.А. Кесаева, В.В. Тихонова,
Н.Н. Касаткина, О.Н. Солопова, М.А. Барышникова, А.В. Мисюрин

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Всеволод Андреевич Мисюрин vsevolod.misyurin@gmail.com

Введение. Белок PRAME является перспективной мишенью для противоопухолевой иммунотерапии, так как не экспрессируется в здоровых тканях, но активен в опухолевых клетках многих гистологических типов. Нами были разработаны мышиные моноклональные антитела (МКАТ) 5D3F2 и 6H8F12, распознающие эпитопы белка PRAME.

Цель исследования — определение эффектов, оказываемых МКАТ 5D3F2 и 6H8F12 на клетки, экспрессирующие ген PRAME на различных уровнях.

Материалы и методы. Использовались линии клеток NOMO-1 и WI-38 с низким уровнем экспрессии PRAME, THP-1 — со средним уровнем экспрессии, K562 и WI-38-PRAME — с высоким уровнем экспрессии PRAME. Проводилось инкубирование данных линий клеток с МКАТ 5D3F2 и 6H8F12. Конечная концентрация МКАТ в культуральной среде составила от 6 до 120 мкг/мл. Проводился подсчет клеток после инкубирования МКАТ после 24, 48 и 72 ч эксперимента. Количество мертвых клеток оценивали при проведении МТТ-теста после 24 ч инкубирования клеток с МКАТ 6H8F12.

Результаты. Скорость роста клеток замедлилась при инкубировании в присутствии МКАТ. Эффект замедления роста клеток увеличивался напрямую с ростом концентрации МКАТ в среде (коэффициент корреляции Пирсона составил 0,67; $p = 0,0219$). Рост клеток линии K562 был значимо меньшим, чем линии THP-1 ($p = 0,0061$), NOMO-1 ($p = 0,0005$) и WI-38 ($p = 0,0002$), в присутствии одинакового количества МКАТ 6H8F12. Скорость роста клеток линии K562 была ниже, чем клеток линии WI-38-PRAME ($p = 0,0027$), несмотря на одинаковый уровень экспрессии гена PRAME. Влияние МКАТ 5D3F2 и 6H8F12 на скорость роста клеток было сопоставимым ($p = 0,3946$). Согласно данным МТТ-теста в линиях K562 и WI-38-PRAME погибало сопоставимое количество клеток после 24 ч инкубирования с МКАТ 5D3F2 и 6H8F12 ($p = 0,8405$). При тех же условиях погибло меньше клеток линии THP-1, чем K562 ($p = 0,6335$). По сравнению с K562 в линиях NOMO-1 и WI-38 погибло существенно меньшее количество клеток ($p = 0,0026$ и $p = 0,0005$ соответственно).

Заключение. Показано, что МКАТ 5D3F2 и 6H8F12 проявляют существенный цитотоксический эффект в отношении клеток, экспрессирующих PRAME. При более высоком уровне экспрессии гена PRAME в клетках цитостатический эффект более сильный.

Ключевые слова: PRAME, моноклональные антитела, гибель клеток

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-53-58

DEVELOPMENT OF CYTOSTATIC EFFECT OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE PROTEINS PRAME

N.A. Lyzhko, V.A. Misyurin, Y.P. Finashutina, T.V. Akhlynina, L.A. Kesaeva, V.V. Tikhonova,
N.N. Kasatkina, O.N. Solopova, M.A. Baryshnikova, A.V. Misyurin

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe sh., Moscow, 115478, Russia

Introduction. PRAME protein is a promising target for cancer immunotherapy. PRAME is not expressed in normal tissues, but active in number of the tumor types. We have developed the mouse monoclonal antibodies 5D3F2 and 6H8F12 against PRAME epitopes.

Aim. To determine the effects provided by the monoclonal antibodies 5D3F2 and 6H8F12 against the cells with different levels of PRAME gene expression.

Materials and methods. We used different cell lines: NOMO-1 and WI-38 with low levels of expression PRAME; THP-1 with intermediate level of PRAME expression; K562 and WI-38-PRAME with high level of PRAME expression. We incubated these cell lines in the presence of monoclonal antibodies 5D3F2 and 6H8F12. The final concentration of monoclonal antibodies in culture varied from 6 pg/ml to 120 mcg/ml. The live cells were counted at the 24, 48 and 72 hours after incubation. The number of dead cells was evaluated by the MTT-test after 24 hours.

Results. Cell growth rate is significantly decreased during incubation with monoclonal antibodies. This effect is correlated with increase of monoclonal antibody concentrations (Pearson coefficient 0,67; $p = 0,0219$). K562 growth rate was much less compared to the THP-1's rate ($p = 0,0061$), NOMO-1 ($p = 0,0005$) and WI-38 ($p = 0,0002$) in the presence of the same amount of monoclonal antibody 6H8F12. K562 cell growth rate was lower than the WI-38-PRAME's rate ($p = 0,0027$), despite the comparable level of PRAME expres-

sion. Effects of monoclonal antibody 5D3F2 and 6H8F12 were similar ($p = 0,3946$). According to the MTT-test, the comparable number of death cells in K562 and WI-38-PRAME was observed ($p = 0,8405$). Under the same conditions the amount of death cells in THP-1 was smaller than K562 ($p = 0,6335$). To compare with K562, fewer cells died in NOMO-1 and WI-38 ($p = 0,0026$ and $p = 0,0005$, respectively).

Conclusion. It was shown that monoclonal antibody 5D3F2 and 6H8F12 exhibit a significant cytotoxic effect against PRAME-expressing cells. In case of higher levels of PRAME expression the cytotoxic effect was stronger.

Key words: PRAME, monoclonal antibodies, cell death

Введение

Раково-тестикулярный антиген PRAME является перспективной мишенью для иммунотерапии онкологических заболеваний, так как данный белок не экспрессируется в большинстве тканей здорового взрослого человека, но широко распространен в опухолевых клетках [1]. В качестве средства терапии PRAME-позитивных онкологических заболеваний могут быть использованы моноклональные антитела (МКАТ), специфически распознающие PRAME. Важным условием для применения препарата на основе МКАТ является расположение целевого антигена на поверхности клетки [2].

Имеются данные, указывающие на то, что PRAME может находиться на внешней мембране клеток. Так, на поверхности эпителиальных клеток человека были обнаружены белки, называемые OIPs (Opa-interacting proteins), которые ассоциируются с белками Опа гонококков, что позволяет паразиту распространяться. Гены, кодирующие OIPs, выделены и изучены. Согласно результатам секвенирования ген одного из найденных OIPs (OIP4) полностью идентичен гену *PRAME* [3]. Результаты этой работы подтверждаются нашими собственными данными о том, что PRAME локализован на клеточной мембране [4]. Это является доводом в пользу разработки терапевтического МКАТ, распознающего PRAME.

Связывание антитела с поверхностным антигеном, как правило, не оказывает влияния на клетку-мишень. Лизис клеток чаще всего вызван привлечением иммунных клеток или молекул системы комплемента [5]. Однако в некоторых случаях может происходить стимулированная антителом передача сигнала от связанного рецептора [6]. К примеру, МКАТ, распознающие рецептор клеточной гибели Fas, могут вызывать апоптоз, заменяя собой лиганд [7, 8]. Группа С. L. Dobson и соавт. разработала МКАТ, стимулирующие апоптоз благодаря распознаванию рецепторов TRAIL-R1 и TRAIL-R2 [9]. Известен и пример стимуляции роста клеток при помощи антитела. М. Maegawa и соавт. обнаружили, что МКАТ B4G7 при связывании со своей мишенью EGFR стимулирует рост линии немелкоклеточного рака легких PC-14 [10].

Согласно данным литературы гибель клеток или же их пролиферация напрямую зависит от типа рецептора,

активированного антителом. Если это рецептор внешнего сигнала апоптоза, можно ожидать гибели клетки. Если это рецептор, предназначенный для распознавания лигандов, стимулирующих рост клеток, при связывании его с антителом будет передаваться сигнал, стимулирующий рост.

Нигде в литературе прямо не сказано, что PRAME является мембранным рецептором. Было установлено, что данный белок может функционировать как цитоплазматический рецептор, предназначенный для распознавания внутриклеточных паразитов, заразивших клетку [11]. Показано, что в ядре белок PRAME активно связывается с NFY-распознаваемыми промоторами и энхансерами и принимает участие в активации транскрипции генов, ответственных за метаболизм и пролиферацию [12]. Известно, что PRAME инактивирует экспрессию гена *TRAIL*, повышая жизнеспособность опухолевой клетки [13]. Представленные данные объясняют, почему гиперэкспрессия *PRAME* при различных онкологических заболеваниях в основном является неблагоприятным фактором. При этом гиперэкспрессия *PRAME* при остром промиелоцитарном лейкозе связана с меньшим риском развития рецидива [14]. Установлено, что в присутствии PRAME инактивируется белок S1004A, за счет чего в клетке повышается уровень экспрессии *TP53*. Стимуляция экспрессии *PRAME* в лейкозных клетках линии KG-1 приводила к их гибели в процессе апоптоза [15]. Понижение уровня экспрессии *PRAME* в клетках рака легких линий PC9 и A549 приводило к ускорению пролиферации. Экспрессия проапоптотических генов при этом падала [16].

Если принимать во внимание локализацию белка PRAME на клеточной мембране и его способность влиять на различные процессы в клетке, последствия связывания PRAME – антитело для опухолевой клетки могут быть различными.

Проводилось изучение влияния мышинового МКАТ 5D3F2 к белку PRAME на пролиферацию клеток мышиной меланомы B16F10, которая была трансфицирована плазмидой со вставкой гена *PRAME* [4]. В результате проведенных экспериментов скорость роста трансфицированной линии B16F10 замедлилась, и более значительный эффект мы обнаружили в присутствии мышинового МКАТ 5D3F2.

Данный эффект, возможно, объясняется тем, что моноклональное антитело 5D3F2 к белку PRAME усилило способность содержащихся в сыворотке белков системы комплемента перфорировать клеточную мембрану, ранее опсонизированную другими мышинными антителами, появившимися в сыворотке в результате успешной иммунизации. Потенциальная возможность прямого цитостатического действия, вызванного МКАТ 5D3F2 без привлечения белков системы комплемента, еще не проверялась.

В связи с этим нами были проведены эксперименты по определению возможных последствий применения моноклональных анти-PRAME-антител при отсутствии белков системы комплемента против экспрессирующих PRAME опухолевых клеток.

Ранее мы определили, что в клетках линии NOMO-1 уровень экспрессии составляет 0,713 %, линии THP-1—44,3 %, линии K652—541 % и линии WI-38—0,0013 % [17]. При помощи вектора pCER4 в клетки WI-38 был введен ген *PRAME*, благодаря чему в полученной линии WI-38-PRAME экспрессировался на уровне 542 % [4]. Опираясь на эти данные, можно классифицировать линии клеток по уровню экспрессии гена *PRAME* как высокоэкспрессирующие (K652 и WI-38-PRAME), среднеэкспрессирующую (THP-1) и низкоэкспрессирующие (NOMO-1 и WI-38). Мы предполагали, что при инкубировании клеток с МКАТ, связывающим белок PRAME, наиболее чувствительными к этому будут клетки высокоэкспрессирующих линий, а наименее чувствительными — клетки низкоэкспрессирующих линий. Это могло быть верным как для линий, в которых ген *PRAME* активен исходно, так и для линии WI-38-PRAME, которая экспрессирует PRAME искусственно. Чувствительность может выражаться в виде изменения скорости роста клеток или повышения доли погибших клеток относительно контрольных.

Материалы и методы

Культуры клеток инкубировали при 37 °C в CO₂-инкубаторе на среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ глутамин, 10 мМ HEPES, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 40 мкг/мл гентамицина сульфата. Клетки WI-38, B16F10 и mel Kог пересевали при достижении конфлюэнтного монослоя с помощью 0,02 % раствора Версена и 0,25 % раствора трипсина.

В опытные линии добавляли МКАТ 5D3F2 и 6H8F12, разведенные в буферном растворе PBS до достижения их конечной концентрации в культуральной среде соответственно 6, 12, 24 и 120 мкг/мл. В качестве контрольных МКАТ использовали ритуксимаб (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) в концентрации 12 и 120 мкг/мл. Культивирование проводилось в течение 72 ч. По истечении 24, 48 и 72 ч проводили оценку скорости роста клеток путем

сравнения абсолютного количества клеток в опытном и контрольном образце. МТТ-тест проводили по прошествии 24 ч от начала эксперимента.

Статистический анализ данных. Каждый эксперимент проводили 3 раза. Для оценки взаимосвязи концентрации МКАТ 5D3F2 и 6H8F12, распознающих белок PRAME, а также контрольного МКАТ и наблюдаемого цитостатического эффекта вычисляли коэффициент корреляции Пирсона. Для сравнения относительной скорости роста клеток различных линий между собой и доли погибших клеток в различных линиях использовался ранговый дисперсионный анализ Краскела—Уоллеса. Данный непараметрический критерий был выбран исходя из того, что для анализируемых данных не была доказана нормальность распределения значений. Вычисления проводили в программе Statistica 10. Различия считали достоверными при рассчитанном значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Добавление моноклональных антител 5D3F2 и 6H8F12 в выбранных концентрациях в культуральную среду приводило к замедлению скорости роста клеток как в первые, так и в последующие сутки. Рассмотрим это на примере линии K562, инкубированной при разных концентрациях МКАТ 6H8F12 (рис. 1). Эффект замедления роста клеток увеличивался напрямую с ростом концентрации МКАТ в среде (коэффициент корреляции Пирсона составил 0,67; $p = 0,0219$), особенно в первые сутки инкубирования ($p < 0,0001$).

Скорость роста клеток K562 снижается одинаково вне зависимости от типа МКАТ. Наблюдается несколько больший эффект от действия антитела 6H8F12 по сравнению с 5D3F2, но без статистически значимой разницы ($p = 0,3946$) (рис. 2).

По сравнению с K562 рост клеток других линий подавлялся статистически значимо меньше (рис. 3). Клетки линии THP-1 росли относительно быстрее, чем линии K562 ($p = 0,0061$). Скорость роста клеток линии WI-38-PRAME также снижалась в присутствии МКАТ, но меньше по сравнению с эффектом, наблюдаемым на линии K562 ($p = 0,0027$). МКАТ 6H8F12 также заметно подавляло рост клеток линии NOMO-1 по сравнению с контролем ($p = 0,0284$), но существенно меньше по сравнению с линией K562 ($p = 0,0005$). Рост клеток линии WI-38 в присутствии МКАТ 6H8F12 замедлялся статистически незначимо ($p = 0,2817$) относительно роста WI-38 в среде без добавления МКАТ и статистически значимо — относительно клеток линии K562, инкубированной с МКАТ ($p = 0,0002$).

Согласно данным МТТ-теста при инкубировании с МКАТ 6H8F12 в наибольшей степени были подвержены гибели клетки линий K562 и WI-38-PRAME.

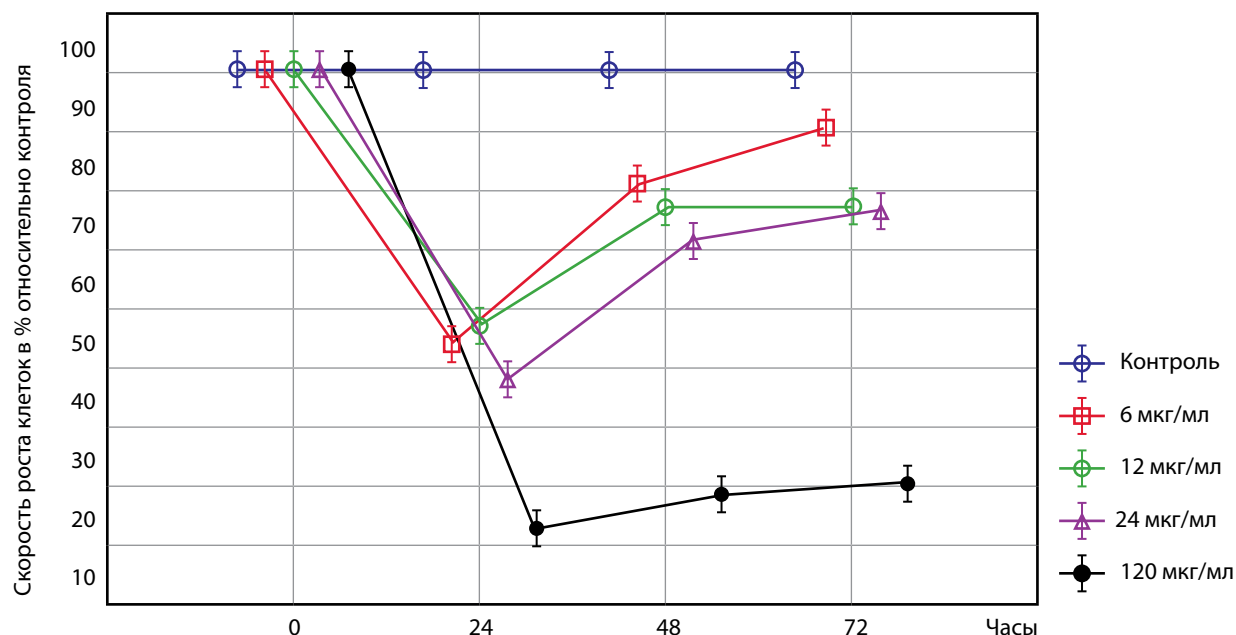


Рис. 1. Динамика роста линии клеток K562 в зависимости от концентрации моноклонального антитела 6H8F12 в культуральной среде

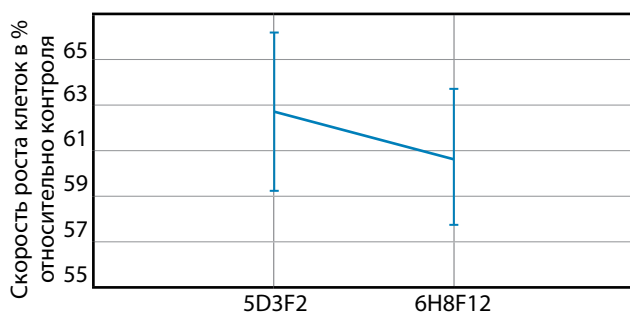


Рис. 2. Сравнение скорости роста клеток линии K562 при инкубировании в присутствии разных моноклональных антител

В обеих линиях при одинаковой концентрации МКАТ 5D3F2 и 6H8F12 погибало сопоставимое количество клеток ($p = 0,8405$) с тенденцией к меньшему выживанию клеток линии K562. В линии THP-1 наблюдалось меньшее число погибших клеток, чем в K562, но без статистически значимой разницы ($p = 0,6335$). Часть клеток линии NOMO-1 также погибла, но количество мертвых клеток было статистически значимо меньше, чем в линии K562 ($p = 0,0026$). При инкубировании с МКАТ 6H8F12 практически не изменилось соотношение количества мертвых и живых клеток в линии WI-38 ($p = 0,8452$). Количество погибших клеток в линии WI-38 было статистически значимо меньше, чем в линии K562 ($p = 0,0005$) (рис. 4).

Клетки линии WI-38-PRAME замедлили скорость роста относительно контроля. Среди них была большая доля погибших по сравнению с клетками линии WI-38 ($p = 0,001$ и $p = 0,004$ соответственно).

Как мы и предполагали, моноклональные анти-PRAME-антитела оказали влияние на клетки,

экспрессирующие PRAME. Это выразилось в замедлении скорости роста клеток, причем в прямой зависимости от уровня экспрессии гена.

Высокоэкспрессирующая линия K562 росла значительно медленнее, чем среднеэкспрессирующая THP-1, а линия THP-1, в свою очередь, — медленнее, чем низкоэкспрессирующие линии NOMO-1 и WI-38. Скорость роста клеток линии WI-38-PRAME, в которой экспрессия гена *PRAME* осуществлялась искусственно, снизилась меньше, чем линии THP-1. Скорость роста клеток линий WI-38-PRAME и K562 при одинаковой концентрации МКАТ оказалась несопоставимой, несмотря на то что уровень экспрессии гена *PRAME* в их клетках был одинаковым.

Цитостатический эффект наблюдался при полном отсутствии мышиных сывороточных белков, из чего следует, что антитела, связавшись с антигеном, не могли активировать комплементопосредованный лизис клеток [4]. Причиной снижения скорости роста и гибели части клеток могут быть изменение конформации мембранного белка PRAME после связывания с антителом и возможная передача сигнала в клетку. Этот сигнал может быть подобен сигналу, инициированному Toll-подобными рецепторами, которые имеют сходную с PRAME структуру [11]. Для доказательства прохождения такого сигнала и выяснения последствий этого необходимо провести дополнительные исследования с выборочным ингибированием различных адапторов пути, таких как MyD88 или TRIF [18].

Хотя на данном этапе исследований механизм замедления роста культуры и гибели клеток не был раскрыт, мы доказали факт цитостатического действия

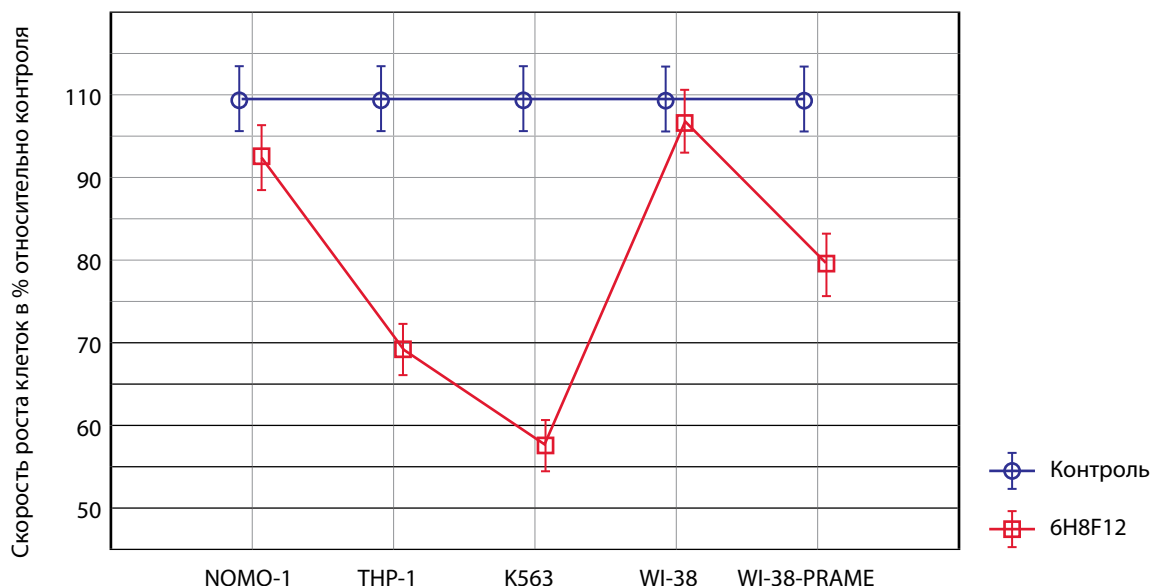


Рис. 3. Сравнение скорости роста клеток различных линий после 24 ч инкубирования в присутствии моноклонального антитела 6H8F12. Начальная концентрация моноклонального антитела составила 120 мкг/мл

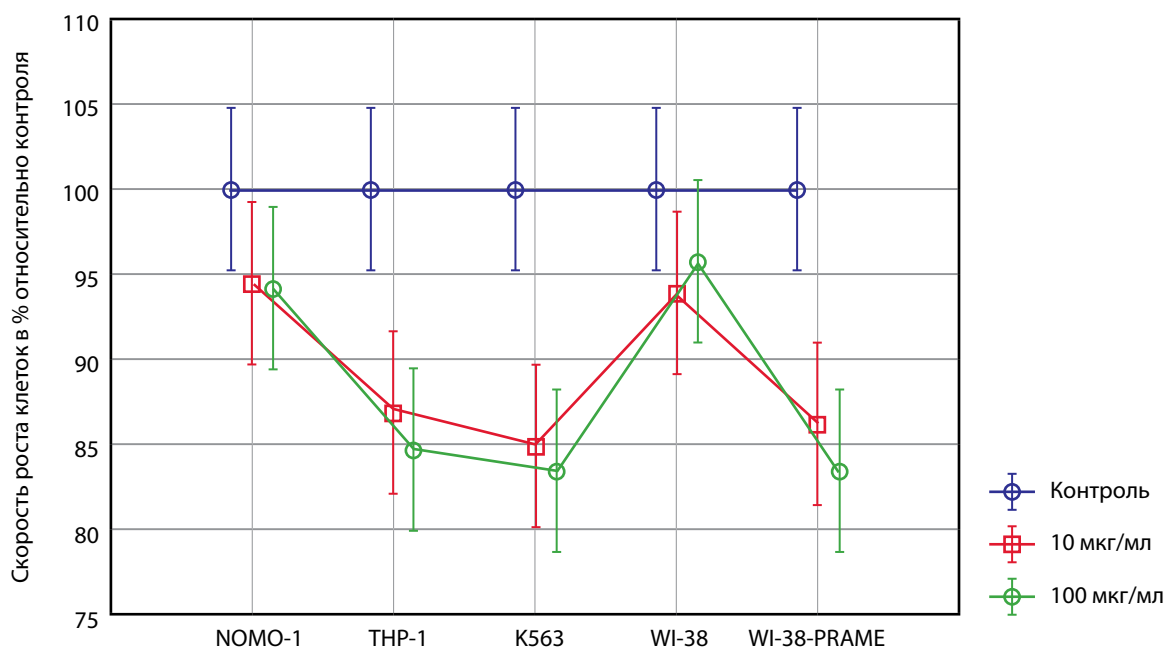


Рис. 4. Сравнение количества погибших клеток различных линий после 24 ч инкубирования в присутствии моноклонального антитела 6H8F12. Начальная концентрация моноклонального антитела составила 100 мкг/мл

моноклональных анти-PRAME-антител, независимо от присутствия молекул системы комплемента или цитотоксических клеток. Чем выше уровень экспрессии гена *PRAME* в опухолевых клетках, тем выше их чувствительность к мышинным моноклональным анти-PRAME-антителам 5D3F2 и 6H8F12. Цитостатический эффект и гибель клеток происходят даже в условиях, когда экспрессия гена *PRAME* вызвана искусственно введением этого гена при трансфекции клеток. Низкоэкспрессирующие опухолевые клетки

линии NOMO-1 и неопухолевые клетки линии WI-38 оказались почти не подвержены действию этих моноклональных антител.

Заключение

Клетки с низким уровнем экспрессии гена *PRAME*, такие как неопухолевые клетки линии WI-38, подвержены цитотоксическому действию MKAT 5D3F2 и 6H8F12 в меньшей степени, чем опухолевые клетки линий THP-1 и K562 с более высоким уровнем экспрессии

гена *PRAME*. Терапевтическое антитело, разработанное на основе мышинных МКАТ 5D3F2 и 6H8F12, при сохранении специфичности к белку *PRAME* может обладать не только комплементзависимой и клеточно-опосредованной цитотоксичностью, но также уничтожать опухолевые клетки напрямую, без привлечения активных компонентов иммунной системы больного.

Благодарность

Благодарим руководителя лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России д-ра биол. наук Н.И. Дризе и ведущего научного сотрудника канд. биол. наук Н.И. Оловникову за помощь в получении моноклональных антител.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Мисюрин В.А. Аутосомные раково-тестикулярные гены. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(3):77–82.
2. Голубцова Н.В., Степанова Е.В., Бармашов А.Е. и др. Определение специфических противоопухолевых антител у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии. Российский биотерапевтический журнал 2014;11(3):25–8.
3. Williams J. M., Chen G. C., Zhu L., Rest R. F. Using the yeast two-hybrid system to identify human epithelial cell proteins that bind gonococcal Opa proteins: intracellular gonococci bind pyruvate kinase via their Opa proteins and require host pyruvate for growth. Mol Microbiol 199;27(1):171–86. PMID: 9466265.
4. Лыжко Н.А., Ахлынина Т.В., Мисюрин А.В. и др. Повышение уровня экспрессии гена *PRAME* в опухолевых клетках сопровождается локализацией белка в клеточном ядре. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(4):19–30.
5. Stevenson G. T. Three major uncertainties in the antibody therapy of cancer. Haematologica 2014;99(10):1538–1546. DOI: 10.3324/haematol.2013.084640.
6. Bradbury A. R. M., Sidhu S., Dubel S. et al. Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies. Nature Biotechnology 2011;29:245–54. DOI: 10.1038/nbt.1791.
7. Trauth B. C., Klas C., Peters A. M. et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science 1989;245(4915):301–5. PMID: 2787530.
8. Yonehara S., Ishii A., Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. J Exp Med 1989;169(5):1747–56. PMID: 2469768.
9. Dobson C. L., Main S., Newton P. et al. Human monomeric antibody fragments to TRAIL-R1 and TRAIL-R2 that display potent in vitro agonism. MAbs 2009;1:552–62. PMID: 20068388.
10. Maegawa M., Takeuchi K., Funakoshi E. et al. Growth stimulation of non-small cell lung cancer cell lines by antibody against epidermal growth factor receptor promoting formation of ErbB2/ErbB3 heterodimers. Mol Cancer Res 2007;5(4):393–401. DOI: 10.1158/1541–7786.MCR-06–0303. PMID: 17426253.
11. Wadelin F. R., Fulton J., Collins H. M. et al. PRAME is a golgi-targeted protein that associates with the Elongin BC complex and is upregulated by interferon-gamma and bacterial PAMPs. PLoS One 2013;8(2):e58052. PMID: 23460923.
12. Costessi A., Mahrour N., Tjchou E. The tumour antigen PRAME is a subunit of a Cul2 ubiquitin ligase and associates with active NFY promoters. EMBO J 2011;30(18):3786–98. DOI: 10.1038/emboj.2011.262. PMID: 21822215.
13. De Carvalho D. D., Mello B. P., Pereira W. O., Amarante-Mendes G. P. PRAME/EZH2-mediated regulation of TRAIL: a new target for cancer therapy. Curr Mol Med 2013;13(2):296–304. PMID: 23228130.
14. Мисюрин В.А., Лукина А.Е., Мисюрин А.В. и др. Особенности соотношения уровней экспрессии генов *PRAME* и *PML/RARα* в дебюте острого промиелоцитарного лейкоза. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):9–16.
15. Xu Y., Rong L.-J., Meng S.-L. et al. PRAME promotes in vitro leukemia cells death by regulating S100A4/p53 signaling. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2016;20:1057–63. PMID: 27049257.
16. Huang Q., Li L., Lin Z. et al. Identification of Preferentially Expressed Antigen of Melanoma as a Potential Tumor Suppressor in Lung Adenocarcinoma. Med Sci Monit 2016;22:1837–42. PMID: 27241212.
17. Ахлынина Т.В., Мисюрин А.В., Лыжко Н.А. и др. Наличие иммуногенного антигена в опухолевой клетке способствует антипролиферативному действию дендритных клеток. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(4):23–30.
18. Kawasaki T., Taro K. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. Front Immunol 2014;5(461). DOI: 10.3389/fimmu.2014.00461.