

УДК 571.27

# Тирозинфосфатаза CD45 – регулятор иммунитета и потенциальный эффектор CAR T-терапии

Д. В. Волков, В. М. Степанова, Ю. П. Рубцов, А. В. Степанов, А. Г. Габиров\*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

\*E-mail: gabibov@gmail.com

Поступила в редакцию 10.08.2023

Принята к печати 12.09.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.25438

**РЕФЕРАТ** Общий лейкоцитарный антиген CD45 – рецепторная тирозинфосфатаза и один из самых представленных антигенов на поверхности клеток крови – ключевой участник ранних этапов передачи сигналов от рецепторов большинства типов иммунных клеток. Нарушения экспрессии гена и дисбаланс изоформ CD45 часто являются причиной иммунодефицитных, аутоиммунных и онкологических заболеваний. Несмотря на долгую историю изучения структуры и функций CD45, молекулярные механизмы участия CD45 в передаче сигнала T-клеточного рецептора и химерных антигенных рецепторов изучены не полностью. Понимание структурных особенностей CD45, а также роли фосфатазы в регуляции активации клеток иммунной системы крайне важно для изучения молекулярного патогенеза онкологических заболеваний и вклада CD45 в функционирование лимфоцитов и T-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами.

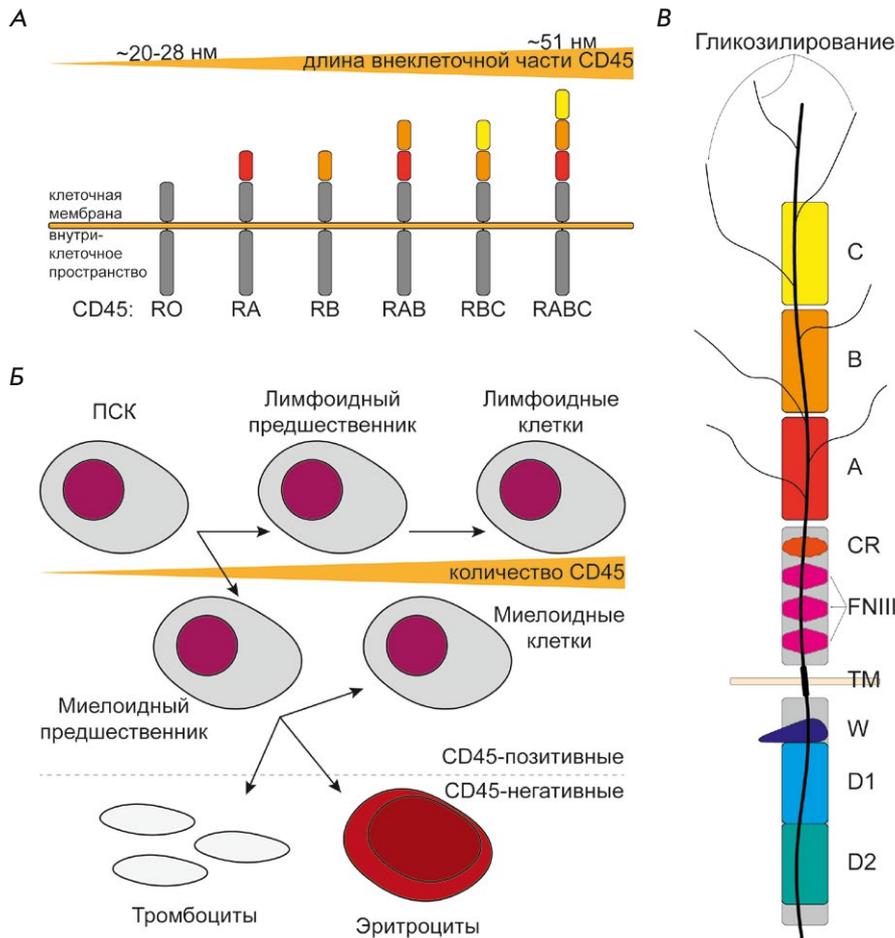
**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** CD45, T- и B-лимфоциты, T-клеточный рецептор, онкологические заболевания, химерный антигенный рецептор.

## ВВЕДЕНИЕ

Тирозинфосфатазу человека CD45 (Protein tyrosine phosphatase, PTP) кодирует ген *PTPRC*, который содержит 35 охарактеризованных экзонов, три из которых (4–6) [1, 2] имеют гомологичные энхансеры и сайленсеры альтернативного сплайсинга пре-мРНК. Несмотря на теоретически большое разнообразие возможных вариантов, у человека обнаружены только шесть изоформ CD45: RO (экзоны 3, 7, 8), RA (экзоны 3, 4, 7, 8), RB (экзоны 3, 5, 7, 8), RAB (экзоны 3, 4, 5, 7, 8), RBC (экзоны 3, 5–8) и RABC (экзоны 3–8) (рис. 1А). Изоформы CD45 представлены на всех клетках гемопоэтического происхождения (за исключением безъядерных эритроцитов и тромбоцитов), причем количество CD45 коррелирует со степенью дифференцировки клеток [3, 4] (рис. 1Б).

Внеклеточная часть CD45 состоит из пяти структурных областей. N-Концевая область вытянута и сильно гликозилирована. Именно она определяет изоформу рецептора. Остальные участки внеклеточного домена CD45, общие для всех изоформ, – это три домена фибронектина типа III и об-

ласть, содержащая пять консервативных остатков цистеина. Важно отметить, что изоформа CD45 регулирует чувствительность T-клеток к активации при распознавании антигена. Предполагают, что из-за большого объема и структурной «жесткости» CD45 выталкивается из центральной области при формировании иммунологического синапса (ИС) при сближении мембран антигенпрезентирующих (АПК) и T-клеток [5]. Количество и тип изоформ CD45 в T-клетках изменяются в зависимости от степени их дифференцировки – в наивных и покоящихся клетках преимущественно представлены более крупные изоформы CD45. В свою очередь, активированные T-клетки синтезируют изоформы CD45, в которых отсутствует большинство или все домены, кодируемые вариabельными экзонами [2]. Гликопротеин CD45 содержит один трансмембранный домен (рис. 1В) и три внутриклеточных: клиновидный, D1 и D2. Frederick C.A. и соавт. показали, что фосфатазной активностью обладает только проксимальный домен D1 (ранее установили, что D2 необходим для функционирования фосфатазы в живых клетках) [6, 7].



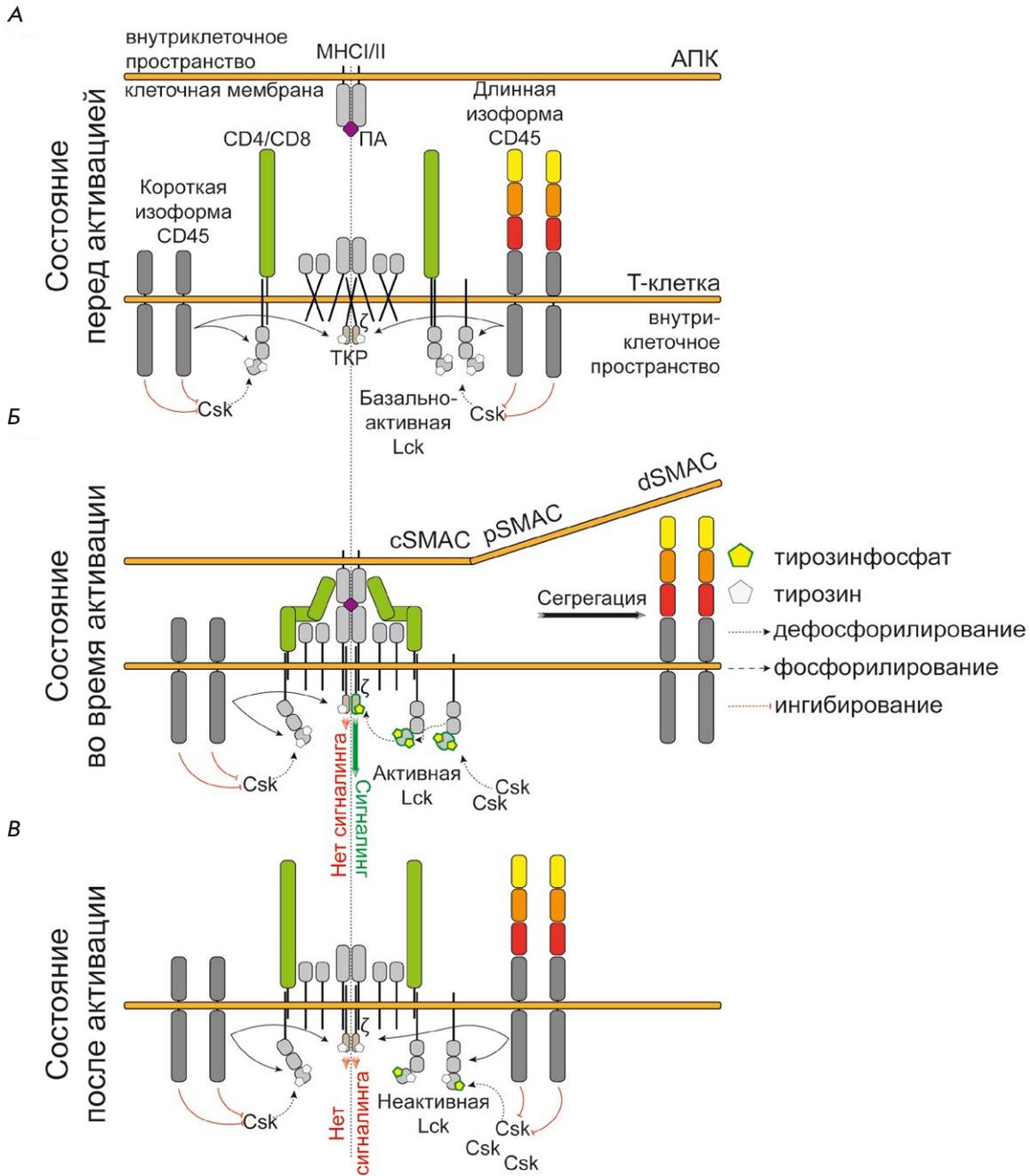
**Рис. 1.** Структура и распространенность изоформ CD45 в клетках крови. А – у человека найдены 6 основных изоформ CD45, которые отличаются по составу внеклеточной части в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК гена *PTPRC*; Б – CD45 локализован на мембране всех клеток гемopoэтического происхождения, за исключением тромбоцитов и эритроцитов. В процессе дифференцировки клеток количество рецептора увеличивается; В – структура CD45RABC. ПСК – плюрипотентная стволовая клетка; А, В, С – внеклеточные участки CD45, которые определяют изоформу; CR (cysteine rich region) – богатая цистеином область; FNIII (fibronectin type III) – домены фибронектина типа III; ТМ – трансмембранный домен; W – клиновидный домен; D1 – домен с фосфатазной активностью; D2 – домен, необходимый для функционирования CD45 в клетке

**ФУНКЦИИ CD45 В КЛЕТКАХ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ**

**Роль и функции CD45 в Т-клетках**

Участие CD45 в активации клеток иммунной системы впервые было продемонстрировано для сигнального каскада Т-клеточного рецептора (ТКР). Анализ Т-клеток, не экспрессирующих CD45, показал, что эта фосфатаза важна на начальной стадии передачи сигнала от ТКР [8] (рис. 2). В неактивированной Т-клетке CD45 дефосфорилирует тирозинкиназу Lck (Protein tyrosine kinase, PTK) и субъединицу CD3ζ комплекса CD3/ТКР. Lck – основной субстрат фосфатазы CD45, которая может дефосфорилировать как ингибирующий тирозин (Y505) на С-конце киназы, так и активирующий тирозин (Y394) [9, 10]. При дефосфорилировании ингибирующего тирозина Y505 CD45 конкурирует с тирозинкиназой Csk, которая ингибирует Lck [11]. A. Courtney с коллегами исследовали двоякую функцию фосфатазы и пришли к выводу, что CD45 регулирует силу и частоту поступающего через ТКР сигнала, действуя на разные субстраты. Изменяя активность CD45, они обнаружили, что фосфатаза поддерживает значительное

количество Lck в активном состоянии, но препятствует активации CD3ζ. Детальное изучение динамики формирования иммунного синапса показало, что перед активацией комплекс ТКР имеет неактивную конформацию и не взаимодействует с главным комплексом гистосовместимости (Major histocompatibility complex, МНС) I или II класса. В это время CD45 ингибирует привлечение киназы Csk [12], а также дефосфорилирует CD3ζ и Lck (рис. 2А). При взаимодействии клеток молекулы CD45 и Lck сначала привлекаются в центральный надмолекулярный кластер активации (Central supramolecular activation cluster, cSMAC) с помощью ТКР. Однако в процессе формирования ИС, CD45 «выталкивается» в дистальный надмолекулярный кластер активации (Distal supramolecular activation cluster, dSMAC) [13–17] (рис. 2Б). По-видимому, исключение CD45 из ИС связано с размерами молекулы, а также с высоким гликозилированием и сиализированием [18–20] (при этом сокращение эктодомена CD45 увеличивает совместную локализацию фосфатазы и ТКР и снижает активность последнего [5, 20–23]). Кроме того, удаление CD45 из центра ИС необходи-



**Рис. 2.** Роль CD45 в передаче сигнала активации Т-клеточного рецептора. Показаны стадии активации Т-клетки – до активации (А), активация (Б) и завершение активации (В). В процессе цикла активации меняется состав и фосфорилирование участников ИС – в начале (А) киназа Lck находится в состоянии базальной активности за счет дефосфорилирования фосфатазой CD45, превалирующего над фосфорилированием киназой Csk; в состоянии активации (Б) CD45 «сегрегируется» в dSMAC, за счет ригидной и объемной структуры (длинные изоформы), а Lck переходит в активную форму благодаря аутофосфорилированию и превалирующей над Csk концентрации, тем самым фосфорилируется CD3 $\zeta$ , что обеспечивает дальнейший сигналинг; в это время синтезируются короткие изоформы CD45, постепенно проникающие в cSMAC, и там же накапливается Csk, что приводит к переходу Lck в неактивную форму и окончанию сигналинга (В). МНС I/II – главный комплекс гистосовместимости I или II класса; АПК – антигенпрезентирующая клетка; ПА – презентированный антиген;  $\zeta$  – CD3 $\zeta$ ; ТКР – Т-клеточный рецептор; Lck, Csk – протеинкиназы; cSMAC, pSMAC, dSMAC – central, peripheral, distal supramolecular activation cluster – центральный, периферический, дистальный надмолекулярный кластер активации

мо, чтобы в центральной части синапса равновесие сдвинулось в сторону киназ. В результате изменения баланса возможным становится фосфорилирование CD3 $\zeta$ , что обеспечивает проведение сигнала активации ТКР. Для завершения цикла активации в области ИС начинают скапливаться молекулы Csk и изоформа CD45RO [2], которая постепенно проникает в центральную область ИС и смещает равновесие между киназами и фосфатазами в сторону фосфатаз, дефосфорилирует CD3 $\zeta$  и активирующий тирозин Lck (рис. 2B). Сигнал ослабевает, и состав изоформ CD45 меняется в сторону увеличения их длины и объема, а Lck снова возвращается в состояние базальной активности.

Видимо, за счет такого механизма регуляции ТКР CD45 препятствует спонтанной активации Т-клеток, предотвращая гиперактивацию и ее негативные последствия [24], индуцированные низкоаффинными антигенами или в отсутствие антигена. J. Zikherman с коллегами изменяли уровень синтеза CD45 и Csk и показали, что баланс этих молекул играет ключевую роль в развитии Т-клеток. В процессе созревания клеток в тимусе на этапах позитивной и негативной селекции регулируются базальная и индуцибельная передачи сигналов от ТКР. CD45 играет одновременно позитивную и негативную роли при распознавании антигена. Изменение уровня Csk регулирует только базальную передачу сигнала. При этом одинаковое уменьшение количеств Csk и CD45 разнонаправленно изменяло базальный сигналинг на одну и ту же величину. Таким образом, колебания уровня CD45 необходимы для правильного осуществления двух процессов: регуляции индуцибельного сигналинга при позитивной и негативной селекции и компенсации Csk при поддержании базальной активности Т-клеток [25, 26]. На мышцах с дефицитом CD45, с делетированными экзонами 6 [27], 9 [28] или 12 [29], была показана ведущая роль CD45 в переходе двойных негативных (Double negative, DN, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) в двойные позитивные (Double positive, DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) тимоциты [30]. Начало и постепенные изменения в синтезе корцепторов CD4 и CD8 в процессе дифференцировки тимоцитов зависят от сигналов, генерируемых пре-ТКР и ТКР. Для осуществления этих фенотипических и функциональных изменений необходимо участие CD45. Дефицит Lck, являющейся важным участником ТКР сигналинга под контролем CD45, проявился похожим на отсутствие CD45 образом [31] – у мышей также был нарушен переход Т-клеток из двойных негативных в двойные позитивные [30], а количество зрелых периферических Т-лимфоцитов не превышало 5–10% от уровня животных дикого типа [27, 28].

### Роль и функции CD45 в В-клетках

В В-клетках CD45 также играет важную роль в модуляции сигнала, передаваемого через ВКР, и необходим для нормального развития В-клеток и адекватной реакции на антиген. У мышей с дефицитом CD45 нарушено полноценное созревание В-клеток [27, 28, 32]. Интересно, что количество периферических В-клеток при этом не уменьшается, но заметно меняется их фенотип. В селезенке значительно снижается популяция зрелых В-клеток (IgD<sup>high</sup> IgM<sup>low</sup>), а также популяция, несущая маркер CD23 и молекулы МНС II класса [32]. При мутации в экзоне 9 CD45 у мышей увеличивается количество периферических незрелых В-клеток (IgM<sup>high</sup>) [28]. Важно отметить, что В-клетки без CD45 не пролиферировали в ответ на стимуляцию ВКР (поликлональными анти-IgD/анти-IgM-антителами), однако при стимуляции других путей активации (липополисахаридом (ЛПС), интерлейкином 4 (ИЛ-4) и моноклональным анти-CD40-антителом) пролиферация CD45-негативных В-клеток была такой же, как в контрольных клетках.

J. Cyster и соавт. [33] обнаружили, что naive В-клетки, изолированные из мышей с дефицитом CD45, в ответ на стимуляцию антигеном меньше использовали киназный каскад ERK/RSK/EGR1 и показывали низкий уровень мобилизации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>. Проявилась разница и в маркерах активации CD86 и CD54, уровень которых у CD45-негативных В-клеток был ниже, чем у CD45-позитивных. Однако при стимуляции клеток фоболовым эфиром в сочетании с иономицином было показано, что CD45-негативные и CD45-позитивные В-клетки активируются одинаково.

Важно отметить роль CD45 в герминальных центрах и аутоиммунных заболеваниях. Показано, что высокоаффинные аутореактивные В-клетки не проходят селекцию в костном мозге нативных и CD45-дефицитных мышей. Однако потеря CD45 позволила низкоаффинным аутореактивным В-клеткам пройти позитивный отбор. В процессе селекции из-за отсутствия CD45 такие В-клетки не запускали каскад ERK/RSK/EGR1, а мобилизация внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> в ответ на аутоантиген у них была значительно ниже, чем у высокоаффинных, что защитило аутореактивные клетки от элиминирования. Таким образом, CD45 по-разному регулирует активацию ВКР и ТКР. В отличие от ТКР, увеличение количества CD45 оказывает положительный эффект на сигналинг ВКР, усиливает активацию киназных каскадов ERK/RSK/EGR1 и PI3K/AKT/mTOR, а также мобилизацию внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> [34]. Киназы семейства Src (Src family kinases, SFK), участву-

ющие в каскаде ВКР, при увеличении синтеза CD45 активнее дефосфорилируются по ингибирующему тирозину (Y507), в то время как количество фосфорилированного активирующего тирозина (Y416) у них остается на прежнем уровне [35]. Уменьшение количества CD45 не влияет на уровень  $Ca^{2+}$ , так как в В-клетках присутствует фосфатаза CD148, частично дублирующая функции CD45 [35].

### **Роль и функции CD45 в макрофагах**

Адгезией лейкоцитов к внеклеточному матриксу и другим клеткам управляют белки семейства интегринов [36, 37]. В регуляции опосредованного интегрином фагоцитоза, а также дифференцировки и активации макрофагов, вызванных адгезией, принимают участие мишени фосфатазы CD45 – SFK [38–40]. Т. Roach с коллегами показали, что в отсутствие CD45 нарушалась регуляция интегрин-опосредованной адгезии и повышалась активность PTK Hck и Lyn – SFK, активных в клетках миелоидного происхождения [41]. Опосредованная CD45 регуляция киназ Hck и Lyn в макрофагах отличается от регуляции SFK в Т- и В-клетках, где активность CD45 необходима в большей степени для дефосфорилирования ингибирующих тирозинов на С-концах Lck и Fyn и повышения их активности [42–44]. Одновременное увеличение фосфорилирования С-концевых тирозинов и активности SFK в CD45-негативных макрофагах указывает на то, что фосфатаза ингибирует SFK. Вероятно, это происходит за счет дефосфорилирования автокаталитического тирозина.

### **Роль и функции CD45 в нейтрофилах**

В экспериментах на мышцах с дефицитом киназ Hck, Fgr и Lyn [45] показано, что потеря SFK снижает адгезию нейтрофилов и уровень посттрансляционных модификаций белков. Нарушалась Rab27a-зависимая мобилизация эластазы нейтрофилов и везикул, содержащих интегрин  $\alpha3\beta1$  и  $\alpha6\beta1$ . Это привело к нарушению и миграции нейтрофилов через базальную мембрану сосудов, и экстравазации при воспалении [45]. Hck и Fgr вовлечены в хемотаксис-зависимый окислительный стресс и полимеризацию F-актина [46]. SFK также связаны с регуляцией транскрипции мРНК многих важных цитокинов и хемокинов, которые синтезируются нейтрофилами конститутивно или при стимуляции (интерлейкинами-1, -6, -8, -10, -12; фактором некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ); гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором и др.) [47, 48]. W. Liles и соавт. [49] показали, что окислительный стресс, индуцированный активатора-

ми нейтрофилов, усиливался при активации CD45 с помощью антител. В свою очередь, L. Harvath с коллегами [50] продемонстрировали, что CD45 взаимодействует с молекулами, ассоциированными с рецепторами лейкотриена B4 и компонента C5a системы комплемента, и регулирует хемотаксис нейтрофилов в ответ на стимуляцию соответствующими лигандами. Н. Gao с коллегами [51] обнаружили, что колокализация рецепторов CD45 и Fc $\gamma$ RIIa приводит к снижению антителозависимой цитотоксичности нейтрофилов, но одновременно повышает продукцию ИЛ-6 при активации через Fc $\gamma$ RIIa. J. Zhu с коллегами [52] показали, что CD45 в нейтрофилах усиливает сигналинг G-белок-связанных рецепторов, повышает мобилизацию  $Ca^{2+}$  и активность киназ PI3K и ERK.

### **Роль и функции CD45 в дендритных клетках**

Дендритные клетки (ДК) играют важную роль в обеспечении связи между врожденным и адаптивным иммунитетом. CD45 участвует в формировании этих функциональных различий, так как его специфические изоформы (CD45RB) маркируют разные популяции ДК. Чужеродные молекулы связываются с паттернраспознающими рецепторами (в число этих рецепторов входят TLR), что запускает программу созревания ДК. Этот процесс определяет дальнейшую ДК-опосредованную активацию наивных Т-клеток вместе с их ответом на презентуемый антиген [53]. Предполагают, что ранние этапы сигнальных каскадов TLR регулируют SFK [54]. Сигнал от TLR приводит к увеличению трансляции костимулирующих молекул, которые необходимы для активации наивных Т-клеток, а также секреции провоспалительных цитокинов, таких, как ИЛ-12, ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ , влияющих на тип генерируемых эффекторных Т-клеток [55]. TLR является одним из ключевых компонентов активации ДК. Хотя основные элементы сигнальных путей этих рецепторов известны, вклад SFK подробно не описан. Сравнительный анализ дендритных клеток, изолированных из нативных и CD45-дефицитных мышей [56], показал, что CD45 не требуется для развития ДК, но влияет на их созревание, вызванное агонистами TLR. CD45 влияет на фосфорилирование Lyn, Hck и Fyn и снижает ЛПС-индуцированную активацию Lyn. CD45 позитивно влиял на TLR4-индуцированную секрецию провоспалительных цитокинов и интерферона- $\beta$  (ИФН- $\beta$ ). Также CD45 по-разному влиял на активацию TLR – негативно (TLR2 и TLR9 или MyD88-зависимая продукция цитокинов) и позитивно (TLR3 и TLR4 или MyD88-независимая секреция ИФН- $\beta$ ) [56].

### Роль и функции CD45 в NK-клетках

Многие из известных рецепторов NK-клеток (CD16, NK1.1, NKG2D, NKp44 и др.) ассоциированы с внутриклеточными белками FcεRIγ, DAP10 или DAP12, которые содержат иммунорецепторные тирозиновые мотивы активации (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) [57]. CD45 регулирует активность SFK, которые фосфорилируют остатки тирозина в ITAM и иницируют активирующий сигнальный каскад [58]. D. Hesslein с коллегами показали, что CD45-негативные NK-клетки при стимуляции рецепторов Lu49H и NKG2D были лишь на 20% менее цитотоксичными, чем контрольные CD45-позитивные NK, тогда как при стимуляции рецептора CD16 различия отсутствовали. Однако секреция цитокинов и хемокинов была значительно ниже в CD45-негативных NK [59]. Таким образом, CD45 может по-разному влиять на один и тот же сигнальный путь активации. Вероятно, сила и/или продолжительность сигнала определяют вовлеченность CD45. Высвобождение цитотоксических гранул происходит в течение минут после активации рецептора, в непосредственной близости от многих сигнальных компонентов клетки, задействованных в активации. В свою очередь, секреция цитокинов [60] – более длительный процесс, включающий в себя передачу сигнала активации транскрипции, синтез и созревание мРНК, трансляцию и секрецию. Таким образом, высвобождение цитокинов требует устойчивой сигнализации, в то время как для цитотоксического ответа NK достаточно кратковременной стимуляции [61].

### Роль CD45 в онкологических заболеваниях

В гемопоэтических опухолевых заболеваниях уровень синтеза CD45 зависит от типа рака. Так, J. Feuillard с коллегами определили, что при хроническом лимфобластном лейкозе (ХЛЛ) атипичные опухолевые клетки и малое количество CD45 на их поверхности являются положительным маркером выживаемости пациентов [62]. Потерю CD45 обнаружили у пациентов с лимфомой Ходжкина [63] и детским острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) [64]. Более высокий уровень синтеза CD45 у пациентов с ОЛЛ ассоциирован с повышенной вероятностью рецидива опухоли [65]. Участие CD45 в патогенезе множественной миеломы (ММ) остается неясным [66]. У пациентов с ММ одновременно обнаруживались как CD45-позитивные, так и CD45-негативные опухолевые клетки [67]. Увеличение экспрессии CD45 повышает чувствительность клеток ММ к 17-диметиламиноэтиламино-17-деметоксигельданамицину, ингибитору шаперона HSP90 [67], и различным апоптотическим стиму-

лам, например, окислительному стрессу и стрессу эндоплазматического ретикулума [68]. Независимо от наличия CD45 в клетках ММ, стимуляция ИЛ-6 способна запускать сигнальный каскад JAK/STAT, однако пролиферировать после активации способны только CD45-позитивные клетки [69]. Общая выживаемость пациентов с преобладанием CD45-позитивных клеток ММ была ниже, чем при преобладании CD45-негативных клеток [70]. С другой стороны, при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДВКЛ) роль CD45 охарактеризована существенно лучше. Фосфатаза CD45 служит рецептором галектина 3 [71], транскрипция гена которого повышена в клетках ДВКЛ [72]. Галектин 3 обладает антиапоптотическим действием [73]. Связываясь с CD45, галектин 3 остается закрепленным на клеточной мембране. Показано, что его удаление увеличивает количество апоптотических опухолевых клеток [71].

Решающим фактором устойчивости солидных опухолей к действию иммунитета является иммуносупрессивное микроокружение опухоли (Tumor microenvironment, ТМЕ). В микроокружении опухоли можно выделить несколько слоев, в которые входят клетки разных типов, причем довольно значительную часть их составляют иммунные клетки миелоидного происхождения, которые под действием опухолевых сигналов становятся иммуносупрессивными (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC) [74, 75]. Для MDSC характерны поверхностные маркеры CD11b и Gr-1. Основная функция этих клеток – подавление эффекторных функций NK- и Т-клеток [76, 77]. Показано также, что MDSC усиливают иммуносупрессивную активность АПК [78], которые могут подавлять активность Т-клеток. S. van Vliet с коллегами показали, что макрофаги и ДК ингибируют эффекторные Т-клетки с помощью MGL (Macrophage galactose-type lectin), одного из лектиновых рецепторов С-типа [79]. Взаимодействие MGL с CD45 эффекторных Т-клеток снижало их пролиферацию и приводило к апоптозу. Обнаружено также [80], что рецептор маннозы на ДК взаимодействует с CD45 на цитотоксических Т-клетках и приводит к их ингибированию, перепрограммированию и развитию иммунологической толерантности.

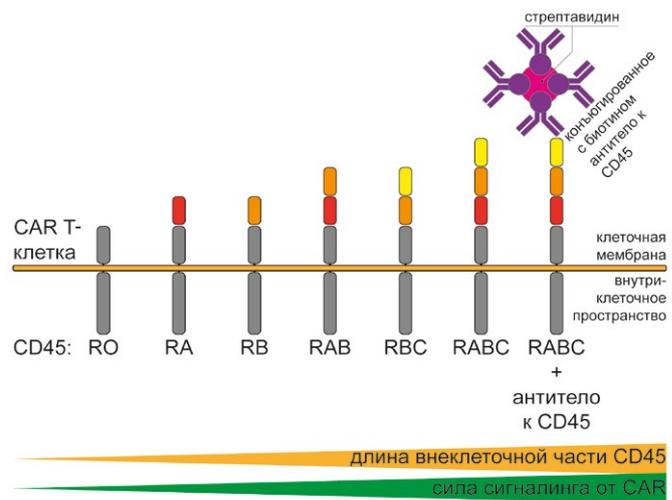
### ВЛИЯНИЕ CD45 НА АКТИВНОСТЬ CAR

Химерные антигенные рецепторы (Chimeric antigen receptors, CAR) – это рекомбинантные рецепторы, которые позволяют нацеливать клетки иммунной системы на поверхностные опухоль-ассоциированные антигены (Tumor-associated antigen, TAA) [81]. CAR – это трансмембранная молекула, которая

включает антигенраспознающий домен (как правило, это одноцепочечный переменный фрагмент антитела), трансмембранный домен, внутриклеточные костимулирующие домены (наиболее используемые – CD28, 4-1BB, OX40) и сигнальный домен (обычно CD3 $\zeta$ ) [82]. На данный момент известно несколько поколений CAR, которые различаются количеством костимулирующих доменов либо набором дополнительных внутриклеточных доменов [83]. Несмотря на схожую функциональность, активация CAR и ТКР по-разному влияет на пролиферацию клеток и цитотоксический ответ [84].

### Структурные и функциональные различия ТКР и CAR

В отличие от ТКР, которые активируют Т-клетки после распознавания от 1 до 10 молекул МНС, для активации CAR требуется тысячи молекул поверхностного ТАА [84, 85]. Существует множество различий между CAR и ТКР, которые объясняют повышенный порог количества антигена, необходимый для эффективной активации Т-клеток. Во-первых, средство рецептора к лиганду: ТКР связывают МНС с антигеном с микромолярным средством [85], а CAR связывают свои лиганды с наномолярным средством [86]. Повышенная аффинность связывания CAR изменяет кинетику выключения рецептора, способность к многократной активации и механорецепторную функцию – свойства, которые, как считается, вносят свой вклад в способность ТКР воспринимать низкие уровни лиганда [87, 88]. После взаимодействия с антигеном ТКР и связанные с ним CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\gamma$  и CD3 $\zeta$  собирают многокомпонентные сигнальные комплексы [89, 90]. CAR взаимодействуют с некоторыми сигнальными белками ТКР, однако количественные и качественные изменения в сборке сигнальных комплексов и структуре ИС меняют чувствительность к антигенам [84, 91]. Визуализация синапсов CAR и ТКР показала, что CAR-синапсы в меньшей степени зависят от взаимодействия молекулы межклеточной адгезии 1 с интегрином  $\alpha$ L $\beta$ 2 и для них характерна измененная, по сравнению с ТКР, локализация Lck [92–94]. Актиновые кольца в CAR-синапсе значительно меньше, чем в ТКР, что обуславливает более быструю передачу механических сигналов и диссоциацию CAR Т-клетки от клетки-мишени. Сигнал в CAR-синапсе инициируется быстрее и с большей интенсивностью, в то время как продолжительность сигнала короче, чем у ТКР-синапса. Это ускоряет вовлечение CAR Т-клетки во взаимодействие с клеткой-мишенью, вызывает быстрое высвобождение цитотоксических гранул в ИС и стремительный цитолиз опухолевых клеток [94].



**Рис. 3.** Влияние длины внеклеточной части CD45 на сигналинг CAR. За счет увеличения длины внеклеточной части CD45 усиливается сегрегация молекулы во время активации CAR Т-клетки и, соответственно, повышается сигналинг CAR. CAR Т-клетка – chimeric antigen receptor modified T cell – Т-клетка, модифицированная химерным антигенным рецептором

### Влияние CD45 на проведение сигнала при активации CAR

Выведение молекул CD45 в дистальную область ИС облегчает фосфорилирование Lck и CD3 $\zeta$  и обеспечивает тесный контакт комплекса рецептор–антиген [5]. Karlsson и соавт. показали, что исключение CD45 также необходимо для активации CAR19, что аналогично активации ТКР [95]. Логично, что активация и CAR, и ТКР зависит от исключения CD45 из области формирования ИС. И в том, и в другом случае важную роль в проведении сигнала должны играть субстраты CD45 – SFK. Установлено как влияют размер CAR, расстояние до узнаваемого эпитопа ТАА и длина CD45 на проведение сигналов от CAR и активацию CAR19 Т-клеток [96]: при увеличении внеклеточного домена CAR снижается выведение CD45 из области ИС, фосфорилирование участников сигналинга и выброс провоспалительных цитокинов. Причем такая же зависимость наблюдается и при изменении расстояния до узнаваемого эпитопа ТАА. Обратные последствия имеет увеличение длины CD45, причем не важно по какой причине: это верно и для различных изоформ CD45, и в случае увеличения объема молекулы с помощью специфических антител (рис. 3). Полученные данные подтверждают модель кинетической сегрегации для CAR Т-клеток [97], предложенную Karlsson в своих экспериментах [95].

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Нарушения фосфорилирования – одна из множества причин опухолевых заболеваний. CD45 и другие фосфатазы играют положительную роль в онкогенезе, регулируя проонкогенные механизмы, поэтому они являются потенциальными кандидатами для таргетного элиминирования опухолей или для повышения их чувствительности к радио- или химиотерапии. Прогресс в исследованиях CD45 продолжается с участием новых методов разработки и скрининга ингибиторов CD45, а также технологий, позволяющих блокировать синтез и менять состав изоформ CD45 в первичных клетках крови человека (CRISPR/Cas9). Известные лиганды CD45 (pUL11, E3/49K) и их аналоги также считаются перспективными мишенями для терапии онкологических заболеваний. Показано значение синтеза CD45 опухолевыми клетками для прогнозирования клинического исхода у пациентов с ХЛЛ, ОЛЛ, ММ и ДВКЛ. Течение многих онкологических заболеваний также может зависеть от активности этой фосфатазы. Важным свойством CD45 является характерный состав изоформ, зависящий от дифференцировки клеток. Т-клетки с наивным фенотипом характеризуются наличием CD45RA, а фенотипы центральной и эффектор-ной памяти – содержат CD45RO-изоформы. Такое разделение позволяет легко отобрать интересующую популяцию Т-клеток и затем получить CAR

Т-клетки с заданными свойствами. Например, чтобы снизить вероятность возникновения реакции трансплантат против хозяина, можно использовать Т-клетки памяти, у которых отсутствует маркер CD45RA [98, 99]. Распространенность фосфатазы среди лимфоидных и миелоидных клеток, а также высокий уровень рецептора на мембране [4] делают CD45 крайне привлекательной мишенью для CAR Т-клеточной терапии как в случае гемопоэтических опухолей, так и при кондиционировании гемопоэза реципиента перед трансплантацией костного мозга. Наряду с остальными методами контроля активности CAR Т-клеток, идея регуляции активации CAR с помощью изменения длины CD45 является крайне перспективной [100, 101]. Последние разработки указывают на то, что при создании нового CAR необходимо учитывать соотношение размеров химерного рецептора, таргетированного антигена и CD45 [102]. Еще одна потенциальная возможность, связанная с улучшением CAR Т-клетки, – нокаут гена CD45. CD45 крайне важен при развитии и созревании Т-клеток, однако отсутствие CD45 на CAR Т-клетках может повысить безопасность адоптивной иммунотерапии за счет снижения вероятности развития побочных реакций, связанных с сигналингом ТКР. ●

*Работа выполнена при поддержке РФФ  
(грант № 17-74-30019).*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- Lynch K.W., Weiss A. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 26. P. 24341–24347.
- Tong A., Nguyen J., Lynch K.W. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 46. P. 38297–38304.
- Dahlke M.H., Larsen S.R., Rasko J.E.J., Schlitt H.J. // Leuk. Lymphoma. 2004. V. 45. № 2. P. 229–236.
- Hermiston M.L., Xu Z., Weiss A. // Annu. Rev. Immunol. 2003. V. 21. № 1. P. 107–137.
- Chang V.T., Fernandes R.A., Ganzinger K.A., Lee S.F., Siebold C., McColl J., Jönsson P., Palayret M., Harlos K., Coles C.H., et al. // Nat. Immunol. 2016. V. 17. № 5. P. 574–582.
- Nam H.-J., Poy F., Saito H., Frederick C.A. // J. Exp. Med. 2005. V. 201. № 3. P. 441–452.
- Kashio N., Matsumoto W., Parker S., Rothstein D.M. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 50. P. 33856–33863.
- Trowbridge I.S., Thomas M.L. // Annu. Rev. Immunol. 1994. V. 12. № 1. P. 85–116.
- D’Oro U., Sakaguchi K., Appella E., Ashwell J.D. // Mol. Cell. Biol. 1996. V. 16. № 9. P. 4996–5003.
- Mustelin T., Taskén K. // Biochem. J. 2003. V. 371. № 1. P. 15–27.
- Chow L.M.L., Fournel M., Davidson D., Veillette A. // Nature. 1993. V. 365. № 6442. P. 156–160.
- Castro-Sanchez P., Teagle A.R., Prade S., Zamoyska R. // Front. Cell Dev. Biol. 2020. V. 8. P. 1–31.
- Dustin M.L. // Cancer Immunol. Res. 2014. V. 2. № 11. P. 1023–1033.
- Freiberg B.A., Kupfer H., Maslanik W., Delli J., Kappler J., Zaller D.M., Kupfer A. // Nat. Immunol. 2002. V. 3. № 10. P. 911–917.
- Leupin O., Zaru R., Laroche T., Müller S., Valitutti S. // Curr. Biol. 2000. V. 10. № 5. P. 277–280.
- Johnson K.G., Bromley S.K., Dustin M.L., Thomas M.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 18. P. 10138–10143.
- Davis S.J., Shaw A.S., Dustin M.L. // Semin. Immunol. 2000. V. 12. № 1. P. 5–21.
- Irles C., Symons A., Michel F., Bakker T.R., van der Merwe P.A., Acuto O. // Nat. Immunol. 2003. V. 4. № 2. P. 189–197.
- Burroughs N.J., Wülfing C. // Biophys. J. 2002. V. 83. № 4. P. 1784–1796.
- Cordoba S.-P., Choudhuri K., Zhang H., Bridge M., Basat A.B., Dustin M.L., van der Merwe P.A. // Blood. 2013. V. 121. № 21. P. 4295–4302.
- Carbone C.B., Kern N., Fernandes R.A., Hui E., Su X., Garcia K.C., Vale R.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 44. P. 9338–9345.
- Burroughs N.J., Lazic Z., van der Merwe P.A. // Biophys. J. 2006. V. 91. № 5. P. 1619–1629.
- Choudhuri K., Wiseman D., Brown M.H., Gould K., van der Merwe P.A. // Nature. 2005. V. 436. № 7050. P. 578–582.
- Courtney A.H., Shvets A.A., Lu W., Griffante G., Mollenauer M., Horkova V., Lo W.-L., Yu S., Stepanek O.,

- Chakraborty A.K., et al. // *Sci. Signal.* 2019. V. 12. № 604. P. 1–14.
25. McNeill L., Salmond R.J., Cooper J.C., Carret C.K., Cassidy-Cain R.L., Roche-Molina M., Tandon P., Holmes N., Alexander D.R. // *Immunity.* 2007. V. 27. № 3. P. 425–437.
26. Zikherman J., Jenne C., Watson S., Doan K., Raschke W., Goodnow C.C., Weiss A. // *Immunity.* 2010. V. 32. № 3. P. 342–354.
27. Kishihara K., Penninger J., Wallace V.A., Kündig T.M., Kawal K., Wakeham A., Timms E., Pfeffer K., Ohashi P.S., Thomas M.L., et al. // *Cell.* 1993. V. 74. № 1. P. 143–156.
28. Byth K.F., Conroy L.A., Howlett S., Smith A.J., May J., Alexander D.R., Holmes N. // *J. Exp. Med.* 1996. V. 183. № 4. P. 1707–1718.
29. Mee P.J., Turner M., Basson M.A., Costello P.S., Zamoyska R., Tybulewicz V.L.J. // *Eur. J. Immunol.* 1999. V. 29. № 9. P. 2923–2933.
30. Pingel S., Baker M., Turner M., Holmes N., Alexander D.R. // *Eur. J. Immunol.* 1999. V. 29. № 8. P. 2376–2384.
31. Molina T.J., Kishihara K., Siderovskid D.P., van Ewijk W., Narendran A., Timms E., Wakeham A., Paige C.J., Hartmann K.-U., Veillette A., et al. // *Nature.* 1992. V. 357. № 6374. P. 161–164.
32. Benatar T., Carsetti R., Furlonger C., Kamalia N., Mak T., Paige C.J. // *J. Exp. Med.* 1996. V. 183. № 1. P. 329–334.
33. Cyster J.G., Healy J.I., Kishihara K., Mak T.W., Thomas M.L., Goodnow C.C. // *Nature.* 1996. V. 381. № 6580. P. 325–328.
34. Zikherman J., Doan K., Parameswaran R., Raschke W., Weiss A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 1. P. 3–12.
35. Zhu J.W., Brdicka T., Katsumoto T.R., Lin J., Weiss A. // *Immunity.* 2008. V. 28. № 2. P. 183–196.
36. Springer T.A. // *Nature.* 1990. V. 346. № 6283. P. 425–434.
37. Hynes R.O. // *Cell.* 1992. V. 69. № 1. P. 11–25.
38. English B.K., Ihle J.N., Myracle A., Yi T. // *J. Exp. Med.* 1993. V. 178. № 3. P. 1017–1022.
39. Zaffran Y., Escallier J.C., Ruta S., Capo C., Mege J.L. // *J. Immunol.* 1995. V. 154. № 7. P. 3488–3497.
40. Lichtenberg U., Quintrell N., Bishop J.M. // *Oncogene.* 1992. V. 7. № 5. P. 849–858.
41. Roach T., Slater S., Koval M., White L., McFarland E.C., Okumura M., Thomas M., Brown E. // *Curr. Biol.* 1997. V. 7. № 6. P. 408–417.
42. Cahir McFarland E.D., Hurley T.R., Pingel J.T., Sefton B.M., Shaw A., Thomas M.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 4. P. 1402–1406.
43. Shiroo M., Goff L., Biffen M., Shivnan E., Alexander D. // *EMBO J.* 1992. V. 11. № 13. P. 4887–4897.
44. Sieh M., Bolen J.B., Weiss A. // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 1. P. 315–321.
45. Rohwedder I., Kurz A.R.M., Pruenster M., Immler R., Pick R., Eggersmann T., Klapproth S., Johnson J.L., Alsina S.M., Lowell C.A., et al. // *Haematologica.* 2020. V. 105. № 7. P. 1845–1856.
46. Fumagalli L., Zhang H., Baruzzi A., Lowell C.A., Berton G. // *J. Immunol.* 2007. V. 178. № 6. P. 3874–3885.
47. Cassatella M.A. // *Immunol. Today.* 1995. V. 16. № 1. P. 21–26.
48. Lloyd A.R., Oppenheim J.J. // *Immunol. Today.* 1992. V. 13. № 5. P. 169–172.
49. Liles W.C., Ledbetter J.A., Waltersdorph A.W., Klebanoff S.J. // *J. Immunol.* 1995. V. 155. № 4. P. 2175–2184.
50. Harvath L., Balke J.A., Christiansen N.P., Russell A.A., Skubitz K.M. // *J. Immunol.* 1991. V. 146. № 3. P. 949–957.
51. Gao H., Henderson A., Flynn D.C., Landreth K.S., Ericson S.G. // *Exp. Hematol.* 2000. V. 28. № 9. P. 1062–1070.
52. Zhu J.W., Doan K., Park J., Chau A.H., Zhang H., Lowell C.A., Weiss A. // *Immunity.* 2011. V. 35. № 5. P. 757–769.
53. Janeway C.A., Medzhitov R. // *Annu. Rev. Immunol.* 2002. V. 20. № 1. P. 197–216.
54. Byeon S.E., Yi Y.-S., Oh J., Yoo B.C., Hong S., Cho J.Y. // *Mediators Inflamm.* 2012. V. 2012. P. 1–18.
55. Medzhitov R. // *Nat. Rev. Immunol.* 2001. V. 1. № 2. P. 135–145.
56. Cross J.L., Kott K., Miletić T., Johnson P. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 12. P. 8020–8029.
57. Lanier L.L. // *Curr. Opin. Immunol.* 2003. V. 15. № 3. P. 308–314.
58. Samelson L.E. // *Annu. Rev. Immunol.* 2002. V. 20. № 1. P. 371–394.
59. Hesslein D.G.T., Takaki R., Hermiston M.L., Weiss A., Lanier L.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 18. P. 7012–7017.
60. Valitutti S., Dessing M., Aktories K., Gallati H., Lanzavecchia A. // *J. Exp. Med.* 1995. V. 181. № 2. P. 577–584.
61. Valitutti S., Müller S., Dessing M., Lanzavecchia A. // *J. Exp. Med.* 1996. V. 183. № 4. P. 1917–1921.
62. Rizzo D., Lotay A., Gachard N., Marfak I., Faucher J.-L., Trimoreau F., Guérin E., Bordessoule D., Jaccard A., Feuillard J. // *Am. J. Hematol.* 2013. V. 88. № 9. P. 747–753.
63. Ozdemirli M., Mankin H.J., Aisenberg A.C., Harris N.L. // *Cancer.* 1996. V. 77. № 1. P. 79–88.
64. Ratei R., Sperling C., Karawajew L., Schott G., Schrappe M., Harbott J., Riehm H., Ludwig W.-D. // *Ann. Hematol.* 1998. V. 77. № 3. P. 107–114.
65. Cario G., Rhein P., Mitlöhner R., Zimmermann M., Bandapalli O.R., Romey R., Moericke A., Ludwig W.-D., Ratei R., Muckenthaler M.U. // *Haematologica.* 2014. V. 99. № 1. P. 103–110.
66. Ishikawa H., Mahmoud M.S., Fujii R., Abroun S., Kawano M.M. // *Leuk. Lymphoma.* 2000. V. 39. № 1–2. P. 51–55.
67. Lin H., Kolosenko I., Björklund A.-C., Protsyuk D., Österborg A., Grandér D., Tamm K.P. // *Exp. Cell Res.* 2013. V. 319. № 5. P. 600–611.
68. Liu S., Ishikawa H., Tsuyama N., Li F.-J., Abroun S., Otsuyama K., Zheng X., Ma Z., Maki Y., Iqbal M.S., et al. // *Oncogene.* 2006. V. 25. № 3. P. 419–429.
69. Ishikawa H., Tsuyama N., Kawano M.M. // *Int. J. Hematol.* 2003. V. 78. № 2. P. 95–105.
70. Gonsalves W.I., Timm M.M., Rajkumar S.V., Morice W.G., Dispenzieri A., Buadi F.K., Lacy M.Q., Dingli D., Leung N., Kapoor P., et al. // *Leuk. Res.* 2016. V. 44. P. 32–39.
71. Clark M.C., Pang M., Hsu D.K., Liu F.-T., de Vos S., Gascoyne R.D., Said J., Baum L.G. // *Blood.* 2012. V. 120. № 23. P. 4635–4644.
72. Hoyer K.K., Pang M., Gui D., Shintaku I.P., Kuwabara I., Liu F.-T., Said J.W., Baum L.G., Teitell M.A. // *Am. J. Pathol.* 2004. V. 164. № 3. P. 893–902.
73. Nangia-Makker P., Nakahara S., Hogan V., Raz A. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007. V. 39. № 1. P. 79–84.
74. Schiavoni G., Gabriele L., Mattei F. // *Front. Oncol.* 2013. V. 3. P. 1–15.
75. Laplane L., Duluc D., Larmonier N., Pradeu T., Bikfalvi A. // *Trends Cancer.* 2018. V. 4. № 12. P. 802–809.
76. Gabrilovich D.I., Nagaraj S. // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. V. 9. № 3. P. 162–174.
77. Serafini P., De Santo C., Marigo I., Cingarlini S., Dolcetti L., Gallina G., Zanovello P., Bronte V. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2004. V. 53. № 2. P. 64–72.

78. Ostrand-Rosenberg S., Sinha P., Beury D.W., Clements V.K. // *Semin. Cancer Biol.* 2012. V. 22. № 4. P. 275–281.
79. van Vliet S.J., Gringhuis S.I., Geijtenbeek T.B.H., van Kooyk Y. // *Nat. Immunol.* 2006. V. 7. № 11. P. 1200–1208.
80. Schuette V., Embgenbroich M., Ulas T., Welz M., Schulte-Schrepping J., Draffehn A.M., Quast T., Koch K., Nehring M., König J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 38. P. 10649–10654.
81. Gross G., Waks T., Eshhar Z. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 24. P. 10024–10028.
82. Jayaraman J., Mellody M.P., Hou A.J., Desai R.P., Fung A.W., Pham A.H.T., Chen Y.Y., Zhao W. // *EBioMedicine.* 2020. V. 58. P. 1–12.
83. Fu Z., Zhou J., Chen R., Jin Y., Ni T., Qian L., Xiao C. // *Oncol. Lett.* 2020. V. 20. № 4. P. 1–9.
84. Salter A.I., Ivey R.G., Kennedy J.J., Voillet V., Rajan A., Alderman E.J., Voytovich U.J., Lin C., Sommermeyer D., Liu L. // *Sci. Signal.* 2018. V. 11. № 544. P. 1–35.
85. Watanabe K., Terakura S., Martens A.C., van Meerten T., Uchiyama S., Imai M., Sakemura R., Goto T., Hanajiri R., Imahashi N. // *J. Immunol.* 2015. V. 194. № 3. P. 911–920.
86. Hudecek M., Lupo-Stanghellini M.-T., Kosasih P.L., Sommermeyer D., Jensen M.C., Rader C., Riddell S.R. // *Clin. Cancer Res.* 2013. V. 19. № 12. P. 3153–3164.
87. Feng Y., Brazin K.N., Kobayashi E., Mallis R.J., Reinherz E.L., Lang M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 39. P. 8204–8213.
88. Valitutti S., Müller S., Cella M., Padovan E., Lanzavecchia A. // *Nature.* 1995. V. 375. № 6527. P. 148–151.
89. Voisinne G., Kersse K., Chaoui K., Lu L., Chaix J., Zhang L., Goncalves Menoita M., Girard L., Ounoughene Y., Wang H. // *Nat. Immunol.* 2019. V. 20. № 11. P. 1530–1541.
90. Chakraborty A.K., Weiss A. // *Nat. Immunol.* 2014. V. 15. № 9. P. 798–807.
91. Ramello M.C., Benzaid I., Kuenzi B.M., Lienlaf-Moreno M., Kandell W.M., Santiago D.N., Pabón-Saldaña M., Darville L., Fang B., Rix U. // *Sci. Signal.* 2019. V. 12. № 568. P. 1–31.
92. Gudipati V., Rydzek J., Doel-Perez L., Gonçalves V.D.R., Scharf L., Königsberger S., Lobner E., Kunert R., Einsele H., Stockinger H. // *Nat. Immunol.* 2020. V. 21. № 8. P. 848–856.
93. James J.R., Vale R.D. // *Nature.* 2012. V. 487. № 7405. P. 64–69.
94. Davenport A.J., Cross R.S., Watson K.A., Liao Y., Shi W., Prince H.M., Beavis P.A., Trapani J.A., Kershaw M.H., Ritchie D.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 9. P. 2068–2076.
95. Karlsson H., Svensson E., Gigg C., Jarvius M., Olsson-Strömberg U., Savoldo B., Dotti G., Loskog A. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12. P. 1–20.
96. Xiao Q., Zhang X., Tu L., Cao J., Hinrichs C.S., Su X. // *Sci. Immunol.* 2023. V. 7. № 74. P. 1–30.
97. Davis S.J., van der Merwe P.A. // *Nat. Immunol.* 2006. V. 7. № 8. P. 803–809.
98. Chan W.K., Suwannasaen D., Throm R.E., Li Y., Eldridge P.W., Houston J., Gray J.T., Pui C.-H., Leung W. // *Leukemia.* 2015. V. 29. № 2. P. 387–395.
99. Ukrainskaya V., Molostova O., Shelikhova L., Pershin D., Kulakovskaya E., Volkov D., Rakhteenko A., Muzalevskii Y., Kazachenok A., Brilliantova V., et al. // *Blood Adv.* 2022. V. 6. № 19. P. 5582–5588.
100. Stepanov A.V., Kalinin R.S., Shipunova V.O., Zhang D., Xie J., Rubtsov Y.P., Ukrainskaya V.M., Schulga A., Konovalova E.V., Volkov D.V., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022. V. 119. № 46. P. 1–8.
101. Kalinin R.S., Petukhov A.V., Knorre V.D., Maschan M.A., Stepanov A.V., Gabibov A.G. // *Acta Naturae.* 2018. V. 10. № 2. P. 16–23.
102. Kulemzin S.V., Kuznetsova V.V., Mamonkin M., Tarantin A.V., Gorchakov A.A. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. № 1. P. 6–14.