

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**на диссертационную работу Ломовской Яны Владимировны
на тему: «Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-
индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного
провоспалительного микроокружения», представленную на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности**

1.5.22. – Клеточная биология

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Ломовской Яны Владимировны посвящена решению важной проблемы – выяснению молекулярно-клеточных механизмов устойчивости к цитотоксическому действию белка TRAIL миелоидных лейкозных клеток и путей её преодоления таргетными соединениями - индукторами поверхностной экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) остаётся серьезной проблемой современности, главным образом из-за формирования у лейкозных клеток разнообразных механизмов устойчивости к действию противоопухолевых препаратов. Цитокин TRAIL является естественным компонентом противоопухолевого иммунитета. На ранних стадиях развития ОМЛ в организме может формироваться устойчивость у опухолевых клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу, что способствует прогрессии заболевания и осложняет использование этого цитокина в терапии лейкозов. В аспекте изучения механизмов резистентности к TRAIL-индуцированному апоптозу у лейкозных клеток особый интерес представляют механизмы, связанные с условиями микроокружения лейкозных клеток. Для ОМЛ характерно накопление гиперклеточной опухолевой массы в костном мозге, которая формирует особое воспалительное микроокружение для лейкозных клеток. Такое воспалительное микроокружение способно посредством различных механизмов, требующих изучения, поддерживать экспансию и защищать лейкозные клетки от индукции гибели, реализуемой в том числе с помощью препаратов на основе TRAIL. Таким образом, работа Ломовской Я.В. безусловно является актуальной, а результаты, полученные в процессе выполнения данной работы, имеют важное фундаментальное значение и применимы для поиска новых подходов к эффективной фармакотерапии острых миелоидных лейкозов.

Содержание и структура диссертационной работы

Диссертационная работа Ломовской Я.В. построена по стандартному плану и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, а также выводы и список цитируемой литературы,

насчитывающий 322 источника, все из которых являются зарубежными. Работы изложена на 123 страницах, содержит 4 таблицы и 31 рисунок.

Представленная диссертационная работа в полной мере соответствует требованиям ВАК по оформлению, изложению материала и объему, предъявляемым к структуре кандидатских диссертаций.

В первом разделе главы «Обзор литературы» автор вначале подробно излагает современные представления об эпидемиологии, патогенезе и классификации ОМЛ. Исчерпывающе раскрыты современные терапевтические подходы, а также описана проблема лекарственной устойчивости ОМЛ. Следующий раздел посвящен цитокину TRAIL, его сигнальным путям, потенциалу и сложностям применения TRAIL в терапии опухолевых заболеваний. Отдельный раздел с множеством подразделов подробно и ясно описывает влияние динамики TRAIL-рецепторов на устойчивость опухолевых клеток к TRAIL-индуцированной гибели.

В главе «Материалы и методы» автор приводит список используемых в работе реактивов. Приведены объекты исследования и условия их культивирования – постоянная клеточная линия моноцитарных лейкозных клеток THP-1 и нативные макрофаги, полученные из моноцитов периферической крови. Работа выполнена с применением широкого диапазона современных экспериментальных методов и подходов, таких как проточная цитофлуориметрия, секвенирование РНК, ПЦР в реальном времени, а также анализ полученных данных с помощью биоинформатического подхода. Методы, используемые в диссертации, полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Можно с уверенностью сказать, что работа выполнена на высоком методическом уровне.

Глава «Результаты и обсуждение» обоснованно разделена на 5 разделов, которые логически связаны между собой по смыслу и соответствуют поставленным задачам. В первом разделе автор показывает возможность появления прикрепленных клеток в модели гиперклеточного микроокружения – культуре клеток высокой плотности линии THP-1. Затем во втором разделе автор проводит детальную характеристику полученных клеток, выявляя формирование у прикрепленных клеток линии THP-1ad макрофагоподобного фенотипа. Проведенный в третьем разделе цитотоксический анализ действия TRAIL показал, что лейкозные макрофагоподобные клетки обладают повышенной устойчивостью к TRAIL-индуцированной гибели. Четвёртый раздел главы посвящен выяснению механизма устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели. Биоинформатический анализ данных секвенирования транскриптома выявил активацию путей, опосредующих провоспалительную активацию и миелоидную

дифференцировку в TRAIL-резистентных клетках THP-1ad, а также потенциальное участие ИЛ-1 β в формировании резистентности клеток THP-1ad к TRAIL. Методами количественной ПЦР было выявлено повышение экспрессии антиапоптотического гена BIRC3, а с помощью проточной цитометрии обнаружено снижение числа клеток, несущих проапоптотические TRAIL-рецепторы DR4 и DR5 у клеток THP-1ad. В пятом, заключительном, разделе исследована возможность подавления устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели у макрофагоподобных клеток THP-1ad с помощью низкомолекулярных индукторов экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов туникамицина и субериоланилид гидроксамовой кислоты (SANA). Применение этих веществ достоверно повышало число клеток, экспрессирующих DR5, а также увеличивало представленность данного рецептора на клеточной поверхности, что эффективно повышало чувствительность макрофагоподобных лейкозных клеток к цитотоксическому действию TRAIL.

Диссертационная работа завершается разделом «Заключение», в котором диссертант суммирует полученные результаты, приводя схему потенциального механизма повышения устойчивости дифференцированных макрофагоподобных клеток ОМЛ THP-1ad к TRAIL-индуцированной гибели, которая наглядно и достаточно полно иллюстрирует основной итог проделанной работы.

Выводы, сформулированные в работе, полностью соответствуют цели и задачам исследования и базируются на обширном экспериментальном материале. Автореферат полностью и адекватно отражает содержание диссертации и соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ.

Достоверность и новизна полученных результатов

В диссертационной работе впервые показана возможность появления лейкозных клеток с более злокачественным фенотипом, который характеризуется TRAIL-резистентностью и макрофагоподобной дифференцировкой при сохранении активной пролиферации. Толчком к появлению данных клеток является гиперклеточное воспалительное микроокружение. Важным результатом работы является выяснение автором механизма устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ к цитотоксическому действию белка TRAIL, основанного на потери проапоптотических TRAIL-рецепторов и повышении экспрессии ингибитора апоптоза cIAP2. Впервые показано потенциальное участие ИЛ-1 β в роли потенциального медиатора, связывающего провоспалительную активацию и устойчивость к TRAIL у дифференцированным макрофагоподобных лейкозных клеток. Кроме того, в работе показана возможность преодоления устойчивости

макрофагоподобных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели с помощью индукторов поверхностной экспрессии рецепторов смерти TRAIL.

Научная новизна и практическая значимость работы не вызывают сомнений. Представленные в диссертационной работе Ломовской Я. В. результаты интересны и важны в контексте понимания механизмов воздействия патологического микроокружения на функционирование злокачественно трансформированных клеток. С практической точки зрения, полученные результаты показывают не только вероятность возникновения более злокачественных клонов, устойчивых к эффекторам противоопухолевого иммунитета в патологически измененных условиях микроокружения клеток ОМЛ, но также потенциальную возможность направленной фармакологической коррекции данных процессов.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати. По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ, из них 5 научных статей, входящих в перечень ВАК РФ, Web of Science и Scopus.

Пожелания и замечания

Диссертация Ломовской Я.В. производит прекрасное впечатление качественно выполненной работы. Диссертационная работа изложена логично и ясно, хорошим профессиональным научным языком. Принципиальные замечания и возражения по работе отсутствуют. При ознакомлении с текстом диссертации возник ряд уточняющих вопросов, которые хотелось бы дополнительно обсудить, но которые ни в коей мере не снижают высокой научной и практической ценности рецензируемой работы:

1. Как вы можете объяснить различия в str-локусах родительской и адгезионной линий ТНР-1 при их молекулярно-генетической идентификации?
2. Как можно интерпретировать участие только интегрина avb5, но не avb3 или других молекул адгезии, в прикреплении адгезионной линии ТНР-1ad? С чем может быть связана ключевая роль именно интегрина avb5 в этом процессе? Чем можно объяснить различия с ТНР-РМА, а именно почему набор молекул адгезии у последних больше?
3. Как вы считаете, почему, несмотря на дифференцировку, адгезионные клетки ТНР-1ad в отличие от ТНР-РМА, сохраняют способность к пролиферации?
4. Вы показываете снижение количества рецепторов клеточной гибели на поверхности клеток. Наблюдали ли вы аналогичный результат в данных секвенирования РНК? Снижаются ли количества транскриптов, соответствующих цитотоксическим TRAIL-рецепторам DR4/DR5? И изменяется ли количество рецепторов/транскриптов рецепторов-ловушек?

5. Рассматривали ли вы возможность применения в работе таргетных ингибиторов cIAP2 и ИЛ-1 β ?

Заключение

Диссертация Ломовской Яны Владимировны на тему: «Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология, является самостоятельной, законченной научно-исследовательской работой, посвященной актуальной теме. Поставленная цель и задачи полностью решены. Автореферат и опубликованные научные работы отражают содержание диссертации. Диссертация Ломовской Я.В. соответствует требованиям, изложенным в п. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от «24» сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждение ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология.

Научный сотрудник лаборатории инженерии
белка ФГУН Институт биоорганической
химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)
кандидат биологических наук
специальность 03.01.02 – Биофизика

Яголович Анна Валерьевна

117997, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-
Маклая, дом 16/10
телефон: +7 (926) 378-01-55
e-mail: anne-gor2002@yandex.ru
подпись к.б.н. Яголович А.В. заверяю

Ученый секретарь ИБХ РАН
телефон: +7 (495) 330-59-74
e-mail: voleinik@mail.ru



Олейников В.А.

Дата отзыва: «23» мая 2024 г.

Председателю совета по защите диссертаций на
соискание ученой степени кандидата наук, на
соискание ученой степени доктора наук 24.1.232.01
(Д 002.285.01) на базе ФГБУН «Федеральный
исследовательский центр «Пущинский научный
центр биологических исследований Российской
академии наук»
чл.-корр. РАН Фесенко Е.Е.

ЛИЧНОЕ СОГЛАСИЕ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Я, Яголович Анна Валерьевна, кандидат биологических наук (03.01.02. - Биофизика), научный сотрудник лаборатории инженерии белка ФГБУН Института биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, даю своё согласие выступить в качестве оппонента по диссертации Ломовской Яны Владимировны на тему: «Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микро-окружения» на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – «Клеточная биология».

Согласна на включение моих персональных данных в аттестационное дело и дальнейшую их обработку, необходимую на основании нормативных документов Правительства, Минобрнауки и ВАК, на размещение их в сети Интернет на сайте ФИЦ ПНЦБИ РАН, на сайтах ВАК, в Единой информационной системе.

Не являюсь членом экспертного совета ВАК.

Сведения об официальном оппоненте

Название специальности и шифр: 03.01.02 – Биофизика

Ученая степень: кандидат биологических наук

Ученое звание: нет

Место работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), адрес: 117997, г. Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

Должность: научный сотрудник лаборатории инженерии белка ИБХ РАН

Телефон: +7(926)378-01-55

E-mail: anne-gor2002@yandex.ru

Публикации по теме оппонируемой диссертации

1. Alina A. Isakova, Artem A. Artykov, Ekaterina A. Plotnikova, Galina V. Trunova Varvara A. Khokhlova, Andrey A. Pankratov, Margarita L. Shuvalova, Diana V. Mazur, Nadezhda V. Antipova, Mikhail I. Shakhparonov, Dmitry A. Dolgikh, Mikhail P. Kirpichnikov, Marine E. Gasparian, **Anne V. Yagolovich**. Dual targeting of DR5 and VEGFR2 molecular pathways by multivalent fusion protein significantly suppresses tumor growth and angiogenesis. *Int J Biol Macromol*. 2024 Jan;255:128096.
2. Gileva Anastasia, Trushina Daria, **Yagolovich Anne**, Gasparian Marine, Kurbanova Leyli, Smirnov Ivan, Burov Sergey, Markvicheva Elena. Doxorubicin-Loaded Polyelectrolyte Multilayer Capsules Modified with Antitumor DR5-Specific TRAIL Variant for Targeted Drug Delivery to Tumor Cells. *Nanomaterials*. 2023. Vol. 13. № 5. P. 902.
3. **Yagolovich Anne V.**, Gasparian Marine E., Dolgikh Dmitry A. Recent Advances in the Development of Nanodelivery Systems Targeting the TRAIL Death Receptor Pathway. *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15. № 2. 3. P. 515.
4. Isakova Alina, Artykov Artem, Vorontsova Yekaterina, Dolgikh Dmitry, Kirpichnikov Mikhail, Gasparian Marine, **Yagolovich Anne**. Application of an Autoinduction Strategy to Optimize the Heterologous Production of an Antitumor Bispecific Fusion Protein Based on the TRAIL Receptor-Selective Mutant Variant in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*. 2022. Vol. 23. № 11. P. 581-589.
5. **Yagolovich Anne V.**, Isakova Alina A., Artykov Artem A., Vorontsova Yekaterina V., Mazur Diana Y., Antipova Nadezhda V., Pavlyukov Marat S., Shakhparonov Mikhail I., Gileva Anastasia M., Markvicheva Elena A., Plotnikova Ekaterina A., Pankratov Andrey A., Kirpichnikov Mikhail P., Gasparian Marine E., Dolgikh Dmitry A. DR5-Selective TRAIL Variant DR5-B Functionalized with Tumor- Penetrating iRGD Peptide for Enhanced Antitumor Activity against Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, Vol. 23, №. 20. P. 12687
6. **Yagolovich Anne V.**, Artykov Artem A., Isakova Alina A., Vorontsova Yekaterina V., Dolgikh Dmitry A., Kirpichnikov Mikhail P., Gasparian Marine E. Optimized Heterologous Expression and Efficient Purification of a New TRAIL-Based Antitumor Fusion Protein SRH—DR5-B with Dual VEGFR2 and DR5 Receptor Specificity. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, Vol. 23, № 11, P. 5860.
7. **Yagolovich A.**, Kuskov A., Kulikov P., Kurbanova L., Bagrov D., Artykov A., Gasparian M., Sizova S., Oleinikov V., Gileva A., Kirpichnikov M., Dolgikh D., Markvicheva E. Amphiphilic poly(N-vinylpyrrolidone) nanoparticles conjugated with DR5-specific antitumor cytokine DR5-B for targeted delivery to cancer cells. *Pharmaceutics*, 2021, Vol. 13, № 9. P. 1413.
8. **Yagolovich A.**, Kuskov A., Kulikov P., Kurbanova L., Gileva A., Markvicheva E. Antitumor cytokine DR5-B-conjugated polymeric poly(N-vinylpyrrolidone) nanoparticles with enhanced cytotoxicity in human colon carcinoma 3D cell spheroids. *Materials Proceedings*. 2021. Vol. 7. № 1. P. 8
9. Artykov Artem A., **Yagolovich Anne V.**, Dolgikh Dmitry A., Kirpichnikov Mikhail P., Trushina Daria B., Gasparian Marine E. Death Receptors DR4 and DR5 Undergo Spontaneous and Ligand-Mediated Endocytosis and Recycling Regardless of the

- Sensitivity of Cancer Cells to TRAIL. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021. Vol. 9. P. 733688
10. **Yagolovich Anne V.**, Artykov Artem A., Karmakova Tatiana A., Vorontsova Maria S., Pankratov Andrey A., Andreev-Andrievsky Alexander A., Dolgikh Dmitry A., Kirpichnikov Mikhail P., Gasparian Marine E. Genetically Modified DR5-Specific TRAIL Variant DR5-B Revealed Dual Antitumor and Protumoral Effect in Colon Cancer Xenografts and an Improved Pharmacokinetic Profile. *Translational Oncology*. 2020 Vol. 13, № 4, P. 100762
 11. **Yagolovich A.V.**, Altykov A.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Gasparian M.E. A New Efficient Method for Production of Recombinant Antitumor Cytokine TRAIL and Its Receptor-Selective Variant DR5-B. *Biochemistry (Moscow)*. 2019. Vol. 84. № 6. P. 627-636
 12. Гаспарян М.Э., Артыков А.А., **Яголович А.В.**, Долгих Д.А. Рецепторы смерти как потенциальные мишени для терапии опухолевых заболеваний. *Исследования и практика в медицине*. 2018. Т.5. № S2. С. 253.

Научный сотрудник лаборатории инженерии
белка ФГУН Институт биоорганической
химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)
кандидат биологических наук
специальность: 03.01.02 – Биофизика

Яголович Анна Валерьевна

117997, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-
Маклая, дом 16/10
телефон: +7 (926) 378-01-55
e-mail: anne-gor2002@yandex.ru
подпись к.б.н. Яголович А.В. заверяю

Ученый секретарь ИБХ РАН
телефон: +7 (495) 330-59-74
e-mail: voleinik@mail.ru



Олейников В.А.

Дата: «16» апреля 2024 г.