

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор биологических наук, профессор РАН

Ребриков Денис Владимирович



«13» мая 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации – на диссертационную работу Ломовской Яны Владимировны «Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. - Клеточная биология.

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Ломовской Я.В. посвящена выяснению механизмов устойчивости к цитотоксическому действию TRAIL клеток острого миелоидного лейкоза, которая формируется в процессе дифференцировки в условиях провоспалительного гиперклеточного микроокружения, а также поиску способов её подавления.

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является наиболее распространенным типом лейкоза среди взрослых людей, который до сих пор трудно поддается излечиванию. Использование химиотерапии остаётся основным стандартом лечения ОМЛ, однако, высокая токсичность совместно с низкой эффективностью и избирательностью противоопухолевых препаратов требует поиска новых, а также усовершенствования уже существующих стратегий фармакотерапии ОМЛ. Разработка противоопухолевых препаратов, обладающих таргетным (направленным) цитотоксическим действием именно в отношении опухолевых клеток, является востребованным направлением в фармакологии. Цитокин TRAIL, являясь компонентом естественного противоопухолевого иммунитета в организме, способен индуцировать избирательный апоптоз опухолевых клеток, что делает его перспективным кандидатом на роль противоопухолевого препарата. Однако препараты на основе лиганда TRAIL показывают низкую клиническую эффективность в лечении опухолевых заболеваний, в том числе ОМЛ, главным образом из-за формирования у опухолевых клеток резистентности к его апоптоз-индуцирующему действию. С этой точки зрения выяснение механизмов и поиск способов подавления устойчивости к действию TRAIL у клеток ОМЛ является актуальной задачей. Актуальным и важным является также использование гиперклеточных культур для моделирования условий воспалительного микроокружения лейкозных клеток в костном мозге *in vitro*. Таким образом, диссертационная работа Ломовской Яны Владимировны, направленная на выяснение механизма резистентности к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке клеток острого миелоидного лейкоза в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения, и поиск возможности её подавления, является несомненно актуальной и востребованной задачей в фундаментальной, а также клинической медицине и фармакологии.

Научная новизна работы и полученных результатов

Все основные результаты диссертационной работы Ломовской Я.В. получены впервые и с использованием современных методов молекулярной биологии, цитологии, биохимии и биофизики. В частности, впервые показана возможность дифференцировки клеток ОМЛ в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения *in vitro*. Установлено, что такая дифференцировка сопровождается приобретением клетками ОМЛ макрофагоподобных признаков и формированием устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели при сохранении активной клеточной пролиферации. Выявлено, что основными механизмами устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ к действию TRAIL являются потеря проапоптотических TRAIL-рецепторов DR4 и DR5 и повышенная экспрессия ингибитора апоптоза cIAP2.

Методами биоинформатики выявлено, что устойчивость к TRAIL при макрофагоподобной дифференцировке клеток ОМЛ формируется в условиях активации провоспалительных внутриклеточных сигнальных путей. Также установлено, что ключевым регулятором формирования TRAIL-резистентности у макрофагоподобных клеток ОМЛ может выступать ИЛ-1 β , индуцирующий провоспалительную активацию. Продемонстрировано, что применение Туникамицина и SAHA индуцирует экспрессию проапоптотического TRAIL-рецептора DR5, тем самым подавляя резистентность макрофагоподобных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели.

Степень обоснованности и достоверности полученных результатов

Степень обоснованности и достоверности научных результатов, положений и выводов, представленных в диссертации, подтверждается достаточным для адекватной статистической обработки количеством проведенных экспериментов и корректным анализом полученных результатов, для обработки которых были использованы общепринятые статистические методы. Все результаты, представленные в диссертационной работе, достоверны и воспроизводимы, что подтверждается использованием

современного оборудования и методов исследования. Достоверность полученных результатов подтверждается также 4-мя публикациями в рецензируемых журналах, индексируемых в РИНЦ, Web of Science и Scopus, а также представлением материалов исследований в виде 16-ти тезисов на российских и международных конференциях.

Научная и практическая значимость результатов работы

Не вызывает сомнений, что полученные в ходе выполнения диссертационной работы данные позволяют установить новые отдельные клеточно-молекулярные аспекты формирования устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза к цитотоксическому действию белка TRAIL в условиях, имитирующих провоспалительное микроокружения лейкозных клеток. Полученные в работе данные важны как для разработки и улучшения подходов клинического применения препаратов на основе TRAIL для лечения ОМЛ, так и для понимания фундаментальных основ взаимодействия лейкозных клеток с компонентами противоопухолевого иммунитета и развития механизмов ускользания от иммунного надзора в процессе возникновения и прогрессии ОМЛ. Представленные данные о возможности эффективного ингибирования устойчивости лейкозных клеток к цитотоксическому действию TRAIL с помощью низкомолекулярных агентов - туникамицина и SAHA, могут найти дальнейшее применение в разработке фармакотерапии больных ОМЛ.

Помимо этого, материалы диссертации могут быть использованы в учебном процессе для подготовки методических материалов и курсов лекций вузов медицинского и биологического направлений.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Ломовской Я.В. оформлена в соответствии с правилами ВАК и имеет классическую структуру, включая все необходимые разделы: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», а также «Заключение», «Выводы», «Список работ, опубликованных по теме диссертации», «Список

литературы» и «Благодарности». Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и проиллюстрирована 31 рисунком. Список литературы обширен, состоит из 322 зарубежных источников.

Во «Введении» автор представляет актуальность и значимость работы, логично обосновывая цель, задачи исследования и положения, выносимые на защиту. В данном разделе отражена новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, обосновывается достоверность полученных результатов, описан личный вклад автора, указаны сведения об апробации полученных данных, а также приведены сведения о публикациях результатов диссертации.

В первой главе представлен обширный «Обзор литературы» по тематике диссертационной работы, состоящий из трёх разделов с многочисленными подразделами. В данном разделе подробно отражены современные представления об этиологии, патогенезе, классификации, диагностике и терапии острых миелоидных лейкозов. Приводятся литературные данные о лекарственной устойчивости клеток ОМЛ и о участии воспалительного микроокружения лейкозных клеток в прогрессии ОМЛ. Следующие два раздела литературного обзора посвящены цитокину TRAIL, описанию его сигнального пути и применению препаратов на его основе в лечении опухолевых заболеваний. Подробно изложены сведения о роли рецепторов к TRAIL в устойчивости опухолевых клеток к индукции клеточной гибели.

В главе «Материалы и методы» автором детально описаны используемые реактивы и протоколы методов исследований, представлены протокол получения рекомбинантного белка TRAIL и объекты исследований – постоянные клеточные линии ОМЛ человека и макрофаги, моноцитарного происхождения.

Экспериментальная глава «Результаты и обсуждение» является самой обширной из всех частей диссертации, изложена на 40 страницах и состоит

из 5 разделов. В данной главе отражена экспериментальная работа, сделанная автором, в соответствии с поставленной целью и задачами диссертации. Каждый раздел главы начинается с краткого обзора, логически поясняющего необходимость конкретного исследования и связь с предыдущим разделом. Обсуждение результатов заключается в подробном анализе полученных данных, их интерпретации, что сопровождается ссылками на литературные источники.

В разделе «Заключение» приведено обобщение полученных результатов и приведена ёмкая иллюстрация предполагаемого механизма повышения устойчивости дифференцированных макрофагоподобных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели. Выводы работы полностью базируются на результатах проведенного исследования, логично и лапидарно отражают основные положения диссертации, являются полностью обоснованными и соответствуют поставленным в диссертации цели и задачам.

Текст автореферата лаконично отражает содержание диссертационной работы и соответствует требованиям ВАК РФ. Тема представленной диссертации, её положения и выводы соответствуют паспорту научной специальности 1.5.22. – «Клеточная биология», и отрасли науки (биологические науки) в части пп. 10, 16 и 19 (п.10. Изучение закономерностей цито- и гистогенеза, клеточной дифференцировки; п.16. Особенности биологии трансформированных клеток. Механизмы трансформации, п.19. Клеточные технологии как основа для разработки терапевтических подходов для лечения различных патологий).

Вопросы, рекомендации и замечания

В ходе анализа работы возникли небольшие вопросы и замечания, которые носят дискуссионный и технический характер.

1. С чем может быть связано показанное на рисунке 6. отсутствие поляризации актина у клеток THP-1ad и THP-1PMA в отличие от нативных макрофагов?

2. Могут ли маркеры макрофагальной дифференцировки, приведенные в таблице 6, свидетельствовать также о приобретении клетками THP-1ad провоспалительного фенотипа, который выявил биоинформатический анализ? Если да, то какие?

3. На рисунке 17., а также в разделе 3.4.1 приводится как нормализованный показатель обогащения, так и показатель обогащения. Поясните, пожалуйста, разницу между двумя этими понятиями.

4. В разделе 3.5.3 указано, что индукторы экспрессии TRAIL рецепторов туникамицин и SAHA были использованы в нетоксичных концентрациях, однако, на рисунке 30 при их использовании показано снижение числа клеток до 70%, как это можно объяснить?

5. В работе присутствует ряд стилистических и пунктуационных погрешностей.

Вместе с тем, приведенные выше вопросы и замечания не снижают научной значимости и положительного впечатления от диссертационной работы Ломовской Я.В.

Заключение

Анализ диссертационной работы свидетельствует о профессиональном уровне автора и надежности научно-методических подходов для доказательства положений, выносимых на защиту, и выводов. Работа Ломовской Я.В. представляет собой полноценное, грамотно спланированное и проведенное научное исследование на актуальную тему, имеющую как практическое, так и фундаментально-научное значение.

Диссертационная работа Ломовской Яны Владимировны «Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения» отвечает всем требованиям пп. 11, 13 и 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым

ВАК к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Ломовская Я.В., заслуживает присвоения ученой степени кандидата наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика П.В. Сергеева (протокол № 12 от «7» мая 2024 г.).

Отзыв составил заведующий кафедрой молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика П.В. Сергеева федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор

Николай Львович Шимановский

Подпись чл.-корр. РАН проф. Н.Л. Шимановского заверяю:

Ученый секретарь ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Минздрава России, к.м.н., доцент



О.М. Демина

Адрес: 117997 г. Москва, ул. Островитянова, д. 1, телефон: (495) 434-03-29;
электронная почта: rsmu@rsmu.ru



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России)

ул. Островитянова, д. 1, стр. 6. г. Москва, 117513
ИНН 7728095113 | КПП 772801001 | ОГРН 1027739054420
Тел./факс: +7 495 434 0329, +7 495 434 6129 | E-mail: rsmu@rsmu.ru

16 апреля 2024 г.

Председателю диссертационного совета
24.1.323.01 (Д 002.285.01) при
Федеральном исследовательском
центре "Пущинский научный центр
биологических исследований
Российской академии наук"»
Члену-корреспонденту РАН
Фесенко Е.Е.

Уважаемый Евгений Евгеньевич!

Настоящим письмом Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (далее - ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России) подтверждает согласие выступить в качестве ведущей организации по диссертационной работе Ломовской Яны Владимировны на тему: «Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – «Клеточная биология», и направляет сведения об ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, а также сведения о лице, составившем отзыв ведущей организации на данную диссертационную работу (Приложение).

Приложение: на 3 стр. в 1 экз.

Проректор по научной работе
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова,
Доктор биологических наук, профессор РАН



Ребриков Денис Владимирович

Сведения о ведущей организации

по кандидатской диссертации «Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – «Клеточная биология».

Полное название ведущей организации	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации
Сокращенное наименование в соответствии с уставом	ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России
Ведомственная принадлежность	Министерства здравоохранения Российской Федерации (Минздрава России)
Почтовый индекс, адрес	117997, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1
Адрес официального сайта в сети «Интернет»	https://rsmu.ru/
Телефон	+7 (495)434-14-22
Адрес электронной почты	rsmu@rsmu.ru
Фамилия Имя Отчество должность, ученая степень, ученое звание руководителя ведущей организации	Лукьянов Сергей Анатольевич – Ректор, академик РАН, доктор биологических наук, профессор
Фамилия Имя Отчество лица, утвердившего отзыв ведущей организации, ученая степень, ученое звание	Ребриков Денис Владимирович – проректор по научной работе, доктор биологических наук, профессор, профессор РАН
Лаборатории, кафедры и другие научные подразделения, деятельность которых связана с направлением диссертации	Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В. Сергеева медико-биологического факультета, кафедра общей и клеточной биологии медико-биологического факультета, кафедра биохимии медико-биологического факультета
Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<p>1. Fedotcheva T.A., Shimanovsky N.L. Pharmacological Strategies for Overcoming Multidrug Resistance to Chemotherapy. Pharm Chem J 56, 1307–1313 (2023). https://doi.org/10.1007/s11094-023-02790-8.</p> <p>2. Федотчева Т.А., Шимановский Н.Л. Фармакологические способы преодоления резистентности опухолей к гормональной, таргетной и иммунотерапии. Химико-фармацевтический журнал. -2023. -Т. 57 (2). - С. 3-11. doi: 10.30906/0023-1134-2023-57-2-3-11.</p> <p>3. Роговский В.С., Мельников М.В., Матюшин А.И.,</p>

- Шимановский Н.Л. Влияние полифенолов и стероидов на продукцию интерлейкина-6 опухолевыми клеточными линиями HELA и K562. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2022. Т. 85 (11). - С. 14-18. doi: 10.30906/0869-2092-2022-85-11-14-18
4. Fedotcheva T.A., Shimanovsky N.L., Fedotcheva N.I. Progestins as anticancer drugs and chemosensitizers, new targets and applications. *Pharmaceutics*. - 2021. - V. 13 (10). doi: 10.3390/pharmaceutics13101616.
5. Fedotcheva T.A., Fedotcheva N.I. Protectors of the mitochondrial permeability transition pore activated by iron and doxorubicin. *Current Cancer Drug Targets*. - 2021. - V. 21 (6). - P. 514-525. doi: 10.2174/1568009621999210120192558.
6. Fedotcheva T.A., Sheichenko O.P., Fedotcheva N.I. New properties and mitochondrial targets of polyphenol agrimoniin as a natural anticancer and preventive agent. *Pharmaceutics*. - 2021. - V. 13 (12). doi: 10.3390/pharmaceutics13122089.
7. Свешникова Е.Д., Степанова Д.С., Семейкин А.В., Шимановский Н.Л. Усиление активатором пируватдегидрогеназы дихлорацетатом натрия антипролиферативного действия доксорубина на опухолевых клетках. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. - 2020. - V. 83 (12). - С. 23-26. doi: 10.30906/0869-2092-2020-83-12-23-26
8. Kudryavtsev K.V., Sokolov M.N., Varpetyan E.E., Shimanovskii N.L., Fedotcheva T.A., Kirsanova A.A., Fedotcheva N.I. A Pregnane steroid as the chiral auxiliary in 1,3-dipolar azomethine ylide's cycloaddition: asymmetric synthesis and anticancer activity of novel hybrid compounds. *ChemistrySelect*. - 2020. - V. 5 (37). - P. 11467-11470. doi: 10.1002/slct.202003345.
9. Федотчева Т.А., Свешникова Е.Д., Шеина Н.И., Соколов М.Н., Кудрявцев К.В., Федотчева Н.И., Шимановский Н.Л. Синтез и цитостатическая активность новых производных 17-ацетата мепрегнола в отношении культуры опухолевых клеток HELA. *Химико-фармацевтический журнал*. - 2020. - Т. 54 (2). - С. 17-23. doi: 10.30906/0023-1134-2020-54-2-17-23.
10. Rogovskii V.S., Shimanovskii N.L., Popov S.V., Sturov N.V. The possibility of preventive and therapeutic use of green tea catechins in prostate cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. - 2019. - V. 19 (10). - P. 1223-1231. doi: 10.2174/1871520619666190404153058
11. Акопджанов А.Г., Шимановский Н.Л., Степанова Д.С., Федотчева Т.А., Пулиш А.В., Гусейнзаде Н.Г., Колик Л.В., Кончечков Е.М. Цитотоксическое действие атмосферной холодной плазмы на опухолевые клетки HELA и его изменение в присутствии фармакологических веществ. *Биофизика*. - 2019. - Т. 64 (6). - С. 1134-1137. doi: 10.1134/S0006302919060127.

Ведущая организация подтверждает, что соискатель ученой степени и ее научный руководитель (консультант) не являются ее сотрудниками, а также в ведущей организации не

ведутся научно-исследовательские работы, по которым соискатель ученой степени является руководителем или работником организации-заказчика, или исполнителем (соискателем).

Сведения о лице, составившего отзыв научной организации

Фамилия Имя Отчество	Шимановский Николай Львович
Ученая степень	доктор медицинских наук
Ученое звание	профессор
Отрасль науки, научная специальность/специальности, по которым защищена диссертация	Шифр специальности – 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки)
Наименование организации, являющейся основным местом работы, должность	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой, кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика П.В. Сергеева медико-биологического факультета заведующий лабораторией, НИЛ молекулярной фармакологии НИИ трансляционной медицины

Даем согласие на включение 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.

Ученый секретарь
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России
кандидат медицинских наук, доцент



О.М. Демина