

«УТВЕРЖДАЮ»

Врио директора ИТЭБ РАН

Д.Ф.М.Н. Чуев Г.Н.



2024 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук (ИТЭБ РАН)

Диссертация *«Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения»* выполнена в лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН. В период подготовки диссертации соискатель Ломовская Яна Владимировна работала в лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН в должности научного сотрудника.

Ломовская Яна Владимировна в 2016 г. окончила Тульский государственный университет с присуждением квалификации бакалавр «Биология» по профилю «Биохимия» (диплом бакалавра 107118 0574470 от 30.06.2016 г., рег. №9446). В 2018 г. закончила магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Пущинский государственный естественно-научный институт (ПущГЕНИ) на базе Учебного центра биофизики и биомедицины ИТЭБ РАН (диплом магистра с отличием по направлению «Биология» 105024 3356104 от 02.07.2018 г., рег. №1042). С 02.09.18 по 02.09.2022 обучалась в аспирантуре ИТЭБ РАН по специальности «1.5.4. Биохимия». В 2022 г. Окончила аспирантуру РАН на базе ИТЭБ РАН с присуждением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь» по специальности 06.06.01 – Биологические науки (диплом 105024 6001266 от 20.07.2022 г., рег. №0010). С 2016 года по настоящее время работает в лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН в должности научного сотрудника.

Научный руководитель: кандидат биологических наук Фадеев Роман Сергеевич,

ведущий научный сотрудник и заведующий Лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН.

На открытом семинаре Секций Ученого Совета ИТЭБ РАН «Биомедицина» и «Биофармакология и биоинженерия» от 02 апреля 2024 года по итогам рассмотрения диссертации Ломовской Я.В. *«Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения»* принято следующее **заключение:**

Оценка выполненной работы

Диссертация Ломовской Я. В. является законченной научно-квалификационной работой, посвященной исследованию устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения. Для достижения цели, заключающейся в изучении устойчивости клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения *in vitro*, в работе были использованы современные методы клеточной и молекулярной биологии, биохимии и биофизики. Результаты, полученные в диссертации Ломовской Я. В. являются актуальными как с фундаментальной, так и прикладной точек зрения. В частности, результаты исследования расширяют современные представления о молекулярных механизмах повышения устойчивости к TRAIL клеток острого миелоидного лейкоза при макрофагоподобной дифференцировке в условиях провоспалительной активации. Практическое значение полученных результатов состоит в разработке новых стратегий подавления первичной TRAIL-резистентности клеток острого миелоидного лейкоза, при опухолевой гиперплазии костного мозга. Работа отвечает требованиям, предъявляемым ВАК при Минобрнауки России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – «Клеточная биология».

Актуальность темы

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является злокачественным новообразованием, характеризующимся крайне низкой излечиваемостью и выживаемостью, около 30 % пациентов с диагнозом ОМЛ достигают пятилетней выживаемости. Для ОМЛ характерна неконтролируемая экспансия и накопление (гиперклеточность) лейкозных бластов в костном мозге. Костный мозг при ОМЛ приобретает характеристики поврежденной ткани с признаками «стерильного» (без инфекционного) хронического воспаления. Воспалительный процесс в костном мозге способствует уклонению опухолевых клеток от гибели и является маркером плохого прогноза течения заболевания. В свою очередь, хорошо известно, что активация провоспалительных сигнальных путей приводит к

миелоидной дифференцировке нормальных «неопухолевых» моноцитов и гемопоэтических клеток-предшественников. В случае клеток ОМЛ, провоспалительная активация с помощью бактериальных липополисахаридов (ЛПС), также способна индуцировать их дифференцировку в макрофагоподобные клетки. В последнее время появляются данные о том, что дифференцированные, обладающие «зрелым» фенотипом клетки ОМЛ могут не только подавлять активность противоопухолевого иммунитета, но и являются более устойчивыми к действию широкого ряда противоопухолевых препаратов. Таким образом, исследование возможности дифференцировки клеток ОМЛ в условиях «стерильного» воспалительного микроокружения представляет собой актуальную задачу, прежде всего для идентификации новых механизмов развития как лекарственной устойчивости опухолевых клеток, так и устойчивости к компонентам противоопухолевого иммунитета.

Одним из ключевых молекулярных компонентов противоопухолевого иммунитета является родственный ФНО, индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL). Цитокин TRAIL связывается с четырьмя мембраносвязанными рецепторами: проапоптотическими DR4 и DR5, антиапоптотическими DcR1 и DcR2, а также с растворимым антиапоптотическим «рецептором» остеопротегерином. Уникальность цитокина TRAIL заключается в селективной индукции гибели опухолевых клеток, и в отсутствии цитотоксического действия по отношению к здоровым клеткам организма. Однако развитие у опухолевых клеток механизмов защиты от TRAIL-индуцированной гибели, тем самым приобретение способности избегать действия противоопухолевого иммунного надзора, способствует возникновению и прогрессии ОМЛ, а также осложняет разработку таргетной терапии на основе TRAIL.

Ранее, в рамках исследования роли микроокружения в лекарственной устойчивости клеток ОМЛ нами была представлена *in vitro* модель, имитирующая условия микроокружения лейкозных клеток при «стерильном» хроническом воспалении – долговременные трехмерные культуры клеток ОМЛ высокой плотности. В данной работе проведено изучение дифференцировки клеток ОМЛ в долговременных трехмерных культурах высокой плотности, с последующим исследованием их устойчивости к цитотоксическому действию, ключевого молекулярного эффектора противоопухолевого иммунитета, цитокина TRAIL.

Научная новизна

В работе впервые показана возможность макрофагоподобной дифференцировки клеток ОМЛ в условиях, имитирующих клеточное микроокружение при «стерильном» хроническом воспалении, гиперклеточных долговременных трехмерных культурах

высокой плотности. Дифференцированные макрофагоподобные клетки ОМЛ обладают конститутивной устойчивостью к TRAIL-индуцированной гибели. Основными механизмами устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ к действию TRAIL являются потеря проапоптотических TRAIL-рецепторов и повышенная экспрессия ингибиторов апоптоза семейства IAP. Показана возможность подавления устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели с помощью индукторов поверхностной экспрессии TRAIL-рецепторов.

Связь темы с планом основных научных работ учреждения

Представленные результаты получены при выполнении исследований в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований №20-34-90061 (рег. № AAAA-A20-120100890070-8) «Исследование FLT3-зависимой резистентности клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу» и постановления Правительства РФ от 09.04.10 №220 («Мегагранты», договор №14.Z50.31.0028), а также Совета по грантам Президента Российской Федерации в рамках Стипендии Президента РФ (СП-606.2019.4).

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Все полученные результаты, представленные в диссертации, получены автором лично, либо при его непосредственном участии. Вся экспериментальная часть и полученные результаты были выполнены на базе ИТЭБ РАН лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности. Автору диссертационной работы принадлежит ключевая роль в определении цели и задач, анализе литературных данных, самостоятельном планировании и выполнении экспериментов, обработке и интерпретации результатов, представлении и апробации результатов исследований на научных конференциях, подготовке научных публикаций по выполненной работе.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, содержащихся в диссертации

Достоверность полученных результатов диссертации подтверждается достаточным количеством повторов проводимых экспериментов и применением сертифицированного научного оборудования, высококачественных расходных материалов и современных методик при проведении экспериментов. Анализ результатов выполнен с применением пакетов статистического анализа (MS Excel, SigmaPlot), а также языка программирования Python с использованием специализированных библиотек для работы с данными: numpy, pandas, scipy и scikit-learn. Результаты, полученные в работе, статистически достоверны и воспроизводимы. Статистическую обработку данных проводили с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой на

множественное тестирование Хомла-Сидака и теста Вальда с поправкой на множественное тестирование Беньямини-Хохберга. Результаты диссертационного исследования и основные положения работы в полной мере представлены на международных и отечественных конференциях и опубликованы в научных журналах, которые входят в перечень рецензируемых журналов и изданий, рекомендованных ВАК. Научные положения и выводы диссертации обоснованы, достоверны и целиком базируются на экспериментальных данных, полученных автором.

Практическая значимость работы

Показана принципиальная возможность подавления резистентности дифференцированных макрофагоподобных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели при использовании таргетных соединений, таких как индукторы поверхностной экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов. Это представляет интерес для разработки новых стратегий подавления первичной резистентности клеток ОМЛ, при опухолевой гиперплазии костного мозга.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите

Представленная диссертационная работа и опубликованные по ее результатам материалы соответствуют специальности 1.5.22. – «клеточная биология» на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на X Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов, «Симбиоз-2017» (Казань, 2017), Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2017, 2019), Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2017, 2018, 2019), Международной научной конференции молодых ученых «Фундаментальные исследования и инновации в молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии» (Алматы, 2019), XXVI Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные Проблемы Биомедицины - 2020» (Санкт-Петербург, 2020), XI Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Казань, 2020), III Объединённом научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2021), IV Международной научной конференции «Наука Будущего – Наука Молодых» (Москва, 2021).

Ценность научных работ соискателя, соответствие содержания диссертации специальности, полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Результаты исследования полностью изложены в опубликованных работах. По теме диссертации опубликовано 19 работ, в том числе 5 научных статей в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК, и 14 тезисов в сборниках конференций российского и международного уровней. Диссертация соответствует специальности 1.5.22. – «Клеточная биология» и всем требованиям постановления «О порядке присуждения ученых степеней».

Статьи в журналах:

1. Ломовская Я.В. Исследование активации сигнальных путей в TRAIL-резистентных макрофагоподобных клетках острого миелоидного лейкоза / Ломовская Я.В., Краснов К.С., Кобякова М.И., Колотова А.А., Ермаков А.М., Сенотов А.С., Фадеева И.С., Фетисова Е.И., Ломовский А.И., Звягина А.И., Акатов В.С., Фадеев Р.С. // *Acta Naturae* – 2024 – Vol.60 (1), С. 48–58. DOI:10.32607/actanaturae.27317.

2. Kobyakova M.I. Pro-Inflammatory Activation Suppresses TRAIL-induced Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells / Kobyakova M.I., Senotov A.S., Krasnov K.S., Lomovskaya Y.V., Odinokova I.V., Kolotova A.A., Ermakov A.M., Zvyagina A I., Fadeeva I.S., Fetisova E.I., Akatov V.S., Fadeev R.S. // *Biochemistry (Moscow)* – 2024 – Vol. 89, No. 3, pp. 431-440. DOI:10.1134/S0006297924030040.

3. Lomovskaya, Y.V. Macrophage-like THP-1 Cells Derived from High-Density Cell Culture Are Resistant to TRAIL-Induced Cell Death via Down-Regulation of Death-Receptors DR4 and DR5 / Lomovskaya Y.V., Kobyakova M.I., Senotov A.S., Lomovsky A.I.; Minaychev V.V., Fadeeva I.S., Shtatnova D.Y., Krasnov K.S., Zvyagina A.I., Akatov, V.S., Fadeev R.S. // *Biomolecules* – 2022 – Vol. 12(2). P. 150. DOI:10.3390/biom12020150.

4. Lomovskaya Ya.V. Myeloid differentiation increases resistance of leukemic cells to TRAIL-induced death by reducing the expression of DR4 and DR5 receptors / Lomovskaya Ya.V., Kobyakova M.I., Senotov A.S., Fadeeva I.S., Lomovsky A.I., Krasnov K.S., Shtatnova D.Yu., Akatov V.S., Fadeev R.S // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* – 2022 – Vol. 17. P. 43–57. DOI: 10.1134/S1990747822060101

5. Evstratova (Lomovskaya) Y.V. Monocyte-Macrophage Differentiation Suppresses the Expression of Proapoptotic Receptors to Apo2L/TRAIL and Increases Resistance to TRAIL-Induced Apoptosis / Evstratova Y.V., Kobyakova M.I., Novikova V.V., Senotov A.S., Akatov V.S., Fadeev R.S // *Biophysics* – 2019 – Vol. 64. P. 729–731. DOI:

Решение семинара: Диссертация Ломовской Яны Владимировны на тему «Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – «Клеточная биология».

Заключение принято на открытом семинаре Секций Ученого Совета ИТЭБ РАН «Биомедицина» и «Биофармакология и биоинженерия». Присутствовало на заседании 35 человек. Результаты голосования: «за» – 35, «против» – нет, «воздержалось» – нет, протокол №1 от 02.04.2024.

Председатель секции «Биомедицина»
д.б.н. заведующий лабораторией Клеточно-
тканевых механизмов компенсации
функций биообъектов
142290, г. Пущино, Московская обл., ул.
Институтская, д. 3.
Телефон: +7 (4967) 73-06-19
e-mail: 29.04.55@mail.ru

Куликов Александр Владимирович

Председатель секции «Биофармакология и
биоинженерия»
к.б.н. заведующий лабораторией
Фармакологической регуляции клеточной
резистентности
142290, г. Пущино, Московская обл., ул.
Институтская, д. 3.
Телефон: +7 (4967) 73-94-52
e-mail: fadeevrs@gmail.com

Фадеев Роман Сергеевич



Куликова Я.В.
Фадеева Р.С.
ДОСТОВЕРЯЮ-Зав. ОДОУ
О.В. СЕНОТОВА