

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА  
24.1.232.01 (Д 002.285.01), СОЗДАННОГО НА БАЗЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО  
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ПУШИНСКИЙ  
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ  
НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета

от 20 июня 2024 г. № 85

О присуждении гражданке Российской Федерации, Ломовской Яне Владимировне, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения» по специальности 1.5.22. – «клеточная биология» принята к защите 18 апреля 2024 г. (протокол заседания № 82), диссертационным советом 24.1.232.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 142290 Московская обл., г. Пушкино, проспект Науки, д.3, приказ Минобрнауки России от 07 ноября 2019 года РФ №1069/нк, с изменениями, внесенными приказами Минобрнауки России № 118 от 24 февраля 2021, №561/нк от 3 июня 2021 г., № 24/нк от 28 января 2021 г., № 1162/нк от 12 октября 2022 г. и № 475/нк от 21 мая 2024 г..

Соискатель Ломовская Яна Владимировна, 22 апреля 1995 года рождения, в 2016 г. окончила естественно-научный факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тульский государственный университет» (ТулГУ) по направлению 06.03.01 – Биология с присуждением квалификации бакалавр, в

2018 г. окончила с отличием магистратуру ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт» (ПущГЕНИ) по направлению 06.04.01 – Биология с присуждением квалификации магистр, в 2022 г. окончила очную аспирантуру ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН) по направлению 06.06.01 – Биологические науки с присуждением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь». С 2016 года по настоящее время работает в лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН в должности научного сотрудника.

Диссертация выполнена в лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН. Научный руководитель – кандидат биологических наук, Фадеев Роман Сергеевич, заведующий лабораторией фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН.

#### **Официальные оппоненты:**

1. Богуш Татьяна Анатольевна – доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель группы молекулярного прогноза опухолей лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины ФГБУ учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России;

2. Яголович Анна Валерьевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории инженерии белка ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

дали **положительные** отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** – ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России), в своём **положительном** отзыве, подписанном д.м.н., профессором, член-корр. РАН Шимановским Николаем



Львовичем, зав. кафедрой молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В. Сергеева и утвержденный д.б.н., профессором РАН Ребриковым Денисом Владимировичем проректором по научной работе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, отметила, что диссертационная работа Ломовской Я.В. является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная задача, раскрывающая клеточно-молекулярные механизмы приобретения устойчивости к компоненту иммунотерапии и противоопухолевого иммунитета - цитотоксическому белку TRAIL, в аспекте индуцированной провоспалительным микроокружением дифференцировки клеток острого миелоидного лейкоза, и освещены пути её преодоления таргетными соединениями - индукторами поверхностной экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов. По объему выполненных исследований, научному и методическому уровню их проведения, актуальности, новизне, значимости для науки и практики полученных результатов диссертационная работа «Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения», полностью удовлетворяет требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (в редакции от 26.09.2022), предъявляемым ВАК Министерства науки и высшего образования РФ к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, что служит основанием для присуждения Ломовской Яне Владимировне учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология.

Соискатель имеет 86 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации - 19 работ, из них 5 статей опубликованы в ведущих рецензируемых научных изданиях, которые включены в перечень ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций, в том числе

иностранном журнале 1 квортиля и 14 тезисов в сборниках материалов всероссийских и международных конференций.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **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., Исследование активации сигнальных путей в TRAIL-резистентных макрофагоподобных клетках острого миелоидного лейкоза// Acta Naturae, 2024, V.60 (1), С. 48–58. DOI: 10.32607/actanaturae.27317.

Показано с помощью биоинформатического анализа транскриптома у макрофагоподобных TRAIL-резистентных клеток ОМЛ повышение активности провоспалительных сигнальных путей и ассоциированных с ними транскрипционных факторов. Выявлено повышение экспрессии гена BIRC3, кодирующего антиапоптотический белок cIAP2. Обнаружен ключевой молекулярный участник – ген IL1B, потенциально связывающий процессы провоспалительной активации и формирования устойчивости к TRAIL у макрофагоподобных клонов ОМЛ.

2. Kobyakova M.I., Senotov A.S., Krasnov K.S., **Lomovskaya Y.V.**, Odinkova I.V., Kolotova A.A., Ermakov A.M., Zvyagina A I., Fadeeva I.S., Fetisova E.I., Akatov V.S., Fadeev R.S., Pro-Inflammatory Activation Suppresses TRAIL-induced Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells// Biochemistry (Moscow), 2024, V. 89 (3), pp. 431-440. DOI: 10.1134/S0006297924030040.

Исследование механизма формирования обратимой TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в условиях высокой плотности, основанного на провоспалительной клеточной активации и реализуемого за счет снижения экспрессии проапоптотических рецепторов DR4 и DR5 на поверхности клеток и увеличения содержания антиапоптотических белков Ливин и cIAP2.

3. **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., 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// *Biomolecules*, 2022, V. 12(2). P. 150. DOI: 10.3390/biom12020150.

Показано возникновение устойчивых к TRAIL-индуцированной гибели дифференцированных клеток ОМЛ, охарактеризован их макрофагоподобный фенотип и выявлено снижение экспрессии проапоптотических DR4 и DR5 на клеточной поверхности.

4. **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., Myeloid differentiation increases resistance of leukemic cells to TRAIL-induced death by reducing the expression of DR4 and DR5 receptors // *Biochemistry (Moscow)*, Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology, 2022, V. 17, P. 43–57. DOI: 10.1134/S1990747822060101.

Обнаружено, что направленная дифференцировка лейкозных клеток в миелоидном направлении, за исключением эритроидоподобного, повышает их TRAIL-резистентность, подавляя экспрессию рецепторов DR4 и DR5 на их поверхности, а стимуляция экспрессии DR5 подавляет TRAIL-резистентность дифференцированных лейкозных клеток.

5. **Evstratova (Lomovskaya)Y.V.**, Kobyakova M.I., Novikova V.V., Senotov A.S., Akatov V.S., Fadeev R.S., Monocyte-Macrophage Differentiation Suppresses the Expression of Proapoptotic Receptors to Apo2L/TRAIL and Increases Resistance to TRAIL-Induced Apoptosis // *Biophysics*, 2019, V. 64, P. 729–731. DOI: 10.1134/S0006350919050038.

Выявлено снижение экспрессии проапоптотических рецепторов к TRAIL и повышение устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу при дифференцировке клеток ОМЛ в моноцитарно-макрофагальном направлении и при созревании нормальных моноцитов периферической крови в макрофаги.

В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах и текст не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

**официального оппонента д.б.н. Богущ Т.А. – отзыв положительный.**

Замечания: 1) уточняющего характера о форме XX для локуса AMEL в результатах STR-анализа для клеток ОМЛ ТНР-ad; 2) вопрос о том, какие ещё интегрины могут принимать участие в адгезии клеток ТНР-1ad к поверхности внеклеточного матрикса помимо исследованных?

**Официального оппонента к.б.н. Яголович А.В. – отзыв положительный.** Замечания уточняющего характера: 1) о различиях в результатах STR-анализа между родительской и адгезионной линиями клеток ОМЛ ТНР-1; 2) о роли интегрин  $\alpha V\beta 5$  в адгезии клеток ТНР-1ad и различиях в адгезии в сравнении с клетками ТНР-1PMA; 3) относительно сохранения пролиферации клеток ТНР-1ad, несмотря на дифференцировку, в отличие от клеток ТНР-1PMA. Вопросы: 1) касается исследования экспрессии проапоптотических TRAIL рецепторов DR4 и DR5. Наблюдается ли снижение число транскриптов рецепторов DR4 и DR5, а также рецепторов ловушек? 2) Рассматривалась ли возможность применения в работе таргетных ингибиторов cIAP2 и ИЛ-1 $\beta$ ?

**Ведущей организации – отзыв положительный.**

Замечания: 1) дискуссионного характера о возможности исследованных в работе маркеров макрофагальной дифференцировки свидетельствовать о приобретении клетками ТНР-1ad провоспалительного фенотипа, который выявил биоинформатический анализ; 2) уточнить, с чем может быть связано показанное на рис. 6 отсутствие поляризации актина у клеток ТНР-1ad и ТНР-1PMA в отличие от нативных макрофагов; 3) следовало бы определить разницу между используемыми понятиями: «показатель обогащения» и «нормализованный показатель обогащения»; 4) замечание редакционного характера. Вопрос: 1) «В разделе 3.5.3 указано, что индукторы экспрессии TRAIL рецепторов туникамицин и SAHA были использованы в нетоксичных концентрациях, однако, на рис. 30 при их использовании показано снижение числа клеток до 70%, как это можно объяснить?



**Положительные, не содержащие критических замечаний отзывы на автореферат представили:**

1. к.б.н. Хундерякова Н. В., старший научный сотрудник лаборатории митохондриального транспорта ИТЭБ РАН;

2. д.б.н. Федотчева Т. А., профессор кафедры, главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной фармакологии НИИ трансляционной медицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ;

3. к.б.н. Соловьева А. О., зав. лабораторией фармакологических активных соединений НИИ клинической и экспериментальной лимфологии ИЦиГ СО РАН;

4. к.б.н. Авхачева Н. В., и.о. директора ИБП РАН – обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН;

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что д.б.н., проф., заслуженный деятель науки Богуш Т. А. является компетентным специалистом в области онкологии, клеточной и молекулярной биологии, в том числе в области изучения механизмов развития онкогенеза и злокачественной трансформации клеток, лекарственной устойчивости опухолевых клеток, разработки новых таргентных и иммунобиологических противоопухолевых препаратов; к.б.н. Яголович А.В. является компетентным специалистом в области генной инженерии, клеточной биологии, онкологии, фармакологии, нанотехнологии, связанной с разработкой и скринингом биологически активных соединений. Они имеют публикации по соответствующим темам в ведущих научных рецензируемых журналах.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» МЗ РФ известен своими достижениями в области изучения строения и жизнедеятельности клеток, онкогенеза, а также молекулярных и клеточных механизмов резистентности опухолевых клеток и

путей ее фармакологического преодоления, что позволяет объективно определить научную и практическую ценность диссертации Я.В. Ломовской.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

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 цитотоксическому действию белка TRAIL с сохранением активной клеточной пролиферации;

впервые охарактеризован макрофагоподобный фенотип TRAIL-резистентных клеток ОМЛ, полученных в условиях долговременной трехмерной суспензионной культуры высокой плотности;

впервые обнаружено, что формирование TRAIL-резистентности при макрофагоподобной дифференцировке у клеток ОМЛ сопровождается конститутивной активацией транскрипционных факторов IRF1, IRF7, STAT3, STAT6, NF- $\kappa$ B, AP-1, и провоспалительных сигнальных путей, ассоциированных с ИФН $\alpha$  и ИФН $\gamma$ , ИЛ-6 и ФНО $\alpha$ ;

выявлено, что основными механизмами устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ к действию TRAIL являются подавление экспрессии проапоптотических TRAIL - рецепторов DR4 и DR5 и повышение экспрессии ингибитора каспаз cIAP2;

показано, что цитокин ИЛ-1 $\beta$  может выступать в качестве ключевого регулятора, связывающего процесс воспалительной активации и формирование TRAIL-резистентности при макрофагоподобной дифференцировке клеток ОМЛ;

установлено, что резистентность к TRAIL-индуцированной гибели у дифференцированных макрофагоподобных клеток ОМЛ может эффективно подавляться с помощью низкомолекулярных агентов (туникамицин и



субероиланилид гидроксамовой кислоты) - индукторов поверхностной экспрессии проапоптотического рецептора DR5;

предложен принципиально новый механизм формирования резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели, основанный на макрофагоподобной дифференцировке, индуцированной провоспалительной активацией в условиях гиперклеточного микроокружения, и реализуемый за счет подавления экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов и повышения экспрессии ингибитора апоптоза cIAP2.

Теоретическая значимость исследования обусловлена тем, что в представленной работе получены результаты, важные, как для понимания нормальной физиологии клеток, так и для понимания фундаментальных основ взаимодействия лейкозных клеток с компонентами противоопухолевого иммунитета, влияния условий патологического гиперклеточного воспалительного микроокружения на функционирование лейкозных клеток и развитие механизмов ускользания от иммунного надзора в процессе возникновения и прогрессии ОМЛ.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, полученные данные о преодолении устойчивости с помощью низкомолекулярных агентов показывают принципиальную возможность коррекции изучаемых процессов, связанных с устойчивостью клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели. Полученные данные могут способствовать разработке новых или улучшению существующих подходов к лечению ОМЛ, включая подавление первичной резистентности лейкозных клеток при опухолевой гиперплазии костного мозга.

Применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, т.е. с получением обладающих новизной результатов) использован комплекс базовых методов клеточной и молекулярной биологии, биохимии и биофизики: культивирование постоянных клеточных линий ОМЛ человека и нативных макрофагов моноцитарного происхождения, проточная цитометрия, световая и конфокальная микроскопия, спектрофото- и

флуорометрия, иммуноферментный анализ, количественная ПЦР, секвенирование РНК и биоинформатический анализ.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

репрезентативность выборок данных и воспроизводимость результатов;  
результаты получены на сертифицированном научном оборудовании с использованием высоко качественных расходных материалов и современных методик сбора и обработки данных, соответствующих поставленным целям и задачам;

идея базируется на анализе собственных результатов и качественном и/или количественном совпадении авторских результатов с результатами, имеющимися в современной научной литературе, в тех случаях, когда такое сравнение является обоснованным;

установлено качественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках;

использованы современные методы анализа и статистической обработки экспериментальных данных;

Полученные данные прошли экспертизу в рецензируемых научных журналах и докладах на профильных российских и международных научных конференциях.

Большинство авторских результатов получено впервые.

Личный вклад автора определяется его непосредственным участием на всех этапах выполнения работы, включая планирование, проведение научных экспериментов, обработку, интерпретацию полученных данных, подготовку научных публикаций и представление результатов на научных конференциях.

В ходе защиты диссертации Ломовской Я.В. не было высказано критических замечаний.

Соискатель в полной мере ответил на заданные ему в ходе заседания вопросы, уточняющего характера об использовании типов программного обеспечения и выборе критериев при анализе сети белок-белковых взаимодействий, о преимуществе или недостатках string-анализа, об определении генов-



концентраторов, путях активации ядерного фактора NF- $\kappa$ B, о способах нормировки данных, полученных методом ПЦР, используемых «референсах» при определении показателя кратности изменения экспрессии мРНК, о расшифровке вводимой в текст аббревиатуры MFI (средняя интенсивность флуоресценции), о количестве проведенных повторов при определении прироста клеточной популяции (кривой роста) и величине стандартного отклонения при графическом отображении кривой роста.

На заседании 20 июня 2024 года, протокол № 85, диссертационный совет **принял решение:** за выяснение клеточно-молекулярных механизмов устойчивости к цитотоксическому действию белка TRAIL миелоидных лейкозных клеток и путей ее преодоления таргетными соединениями – индукторами поверхностной экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов присудить Ломовской Я.В. учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав учёного совета, проголосовали: за присуждение учёной степени – 19, против присуждения учёной степени – «0», недействительных бюллетеней – «0».

Председатель

диссертационного совета 24.1.232.01

д.б.н., проф. Озолин О. Н.

Ученый секретарь

диссертационного совета 24.1.232.01

д.б.н. Дегтярева О. В.

20 июня 2024 г.

