

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

СЕНОТОВА АНАТОЛИЯ СЕРГЕЕВИЧА

на тему «Повышение резистентности клеток

острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология

Актуальность избранной темы

Доля онкологических заболеваний крови составляет до 6% в структуре всех злокачественных пролиферативных заболеваний в Российской Федерации. Острые миелобластные лейкозы (ОМЛ) диагностируются как у взрослых, так и у детей, что указывает на высокую социальную значимость разработки способов ранней диагностики и эффективной терапии ОМЛ. ОМЛ также могут развиваться как вторичное онкологическое заболевание после химиотерапии или лучевой терапии первичных опухолевых узлов. Даже при оптимальной стратегии лечения, у больных в значительной доле случаев развивается лекарственная устойчивость, препятствующая излечению и/или долгосрочной ремиссии. В формировании лекарственной устойчивости вовлечены не только опухолевые клетки, но и их микроокружение, прежде всего в костном мозге (КМ), где опухолевые клетки функционируют в условиях ограниченного пространства. Исследование механизмов развития такой резистентности клеток ОМЛ к индукции гибели химио- и иммунопрепаратами в условиях их накопления в ограниченном пространстве, является важной научной задачей для разработки путей преодоления лекарственной устойчивости. Одной из возможных моделей, на которой могут быть изучены механизмы такого формирования лекарственной устойчивости, являются трехмерные культуры клеток острого миелобластного лейкоза. Именно поэтому, изучение резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности *in vitro*, которому посвящена работа Сенотова А.С. является актуальной задачей.

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

Диссертация Сенотова А.С. построена по стандартной схеме, и содержит все необходимые разделы: обзор литературы, материалы и методы исследования, описание результатов исследования и их обсуждение, выводы и список цитированной литературы. Работа изложена на 132 страницах, содержит 26 рисунков и 3 таблицы; список цитируемой

литературы включает 296 источников.

В своей работе в качестве основной цели исследования Сенотов Анатолий Сергеевич указывает изучение резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности *in vitro*. Для достижения поставленной цели им были сформулированы 3 задачи, которые были успешно решены, что отражено в выводах.

Обзор литературы посвящен фактически представлен двумя разделами, первый из которых раскрывает эпидемиологию распространения ОМЛ, классификацию и прогностическим факторам, влияющим на терапию ОМЛ. Второй раздел посвящен цитокину TRAIL, его сигнальным путям и потенциалу применения TRAIL в противоопухолевой терапии. Тематика обзора позволяет хорошо погрузиться в тему диссертационной работы, оценить перспективность исследования и уровень компетенции соискателя.

Исследование построено логически – от получения трехмерных клеточных культур ОМЛ с резистентностью к TRAIL, через изучение роли изменений про- и антиапоптотических белков в развитии резистентности, до нахождения препаратов, способных преодолевать такую резистентность. Положения диссертации основаны полностью подкреплены полученными результатами. На примере клеток ТНР-1 найдены и проанализированы группы генов, экспрессия которых отличается для культур высокой плотности и низкой плотности. Показано, что в регулировании дифференциального ответа культур высокой плотности и низкой плотности на стимуляцию белком TRAIL ключевая роль принадлежит ФНО альфа.

Методологически работа выполнена с применением современным экспериментальных методов, таких как проточная цитофлуориметрия, вестерн блот анализ, транскриптомный анализ и ПЦР. Сенотовым А.С. оптимизированы условия получения трехмерных культур ОМЛ высокой плотности. Все указанные методы позволили выполнить работу на высоком экспериментальном уровне.

Диссертационная работа Сенотова А.С. производит хорошее впечатление. Выводы, сформулированные в работе, базируются на обширном экспериментальном материале. Автореферат полностью и адекватно отражает содержание диссертации.

Достоверность и новизна полученных результатов

Идея исследования механизмов повышения резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных высокоплотных культурах, имитирующих накопление лейкозных клеток в пространстве костного мозга, безусловно заслуживает внимания.

В работе впервые показано, что возникновение резистентности клеток ОМЛ к TRAIL – индуцированному апоптозу не связано с ограничением проникновения белка TRAIL

к клеткам, культивируемым в виде культур высокой плотности. Впервые установлено, что повышение TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в трехмерных культурах высокой плотности основано на TNF-регулируемом и NF- κ B опосредованном увеличении экспрессии антиапоптотических белков семейств IAP и BCL-2. Показана принципиальная возможность подавления резистентности клеток ОМЛ к TRAIL – индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности с помощью ВНЗ миметика Navitoclax. В работе выполнены необходимые экспериментальные и технические повторы, обработка результатов проведена с применением статистической обработки данных методом дисперсионного анализа ANOVA.

Результаты, представленные в диссертационной работе, являются новыми и имеют большой потенциал для клеточной биологии и молекулярной онкологии. Данные, полученные Сенотовым А.С. с соавторами о возможности ингибирования устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу у клеток ОМЛ с помощью ВНЗ миметика Navitoclax демонстрируют высокую практическую значимость работы.

Замечания

В результате прочтения работы возникли небольшие замечания, которые имеют дискуссионный или технический характер:

- 1) Хотелось бы более подробного морфологического описания того, что представляет из себя культура высокой плотности. Также было бы полезно хотя-бы гипотетически предположить, чем была обусловлена трехмерная структура культур клеток ОМЛ – молекулами межклеточных контактов или другими взаимодействиями, и насколько точно такая структура моделирует межклеточные взаимодействия клеток, находящихся в костном мозге?
- 2) Не совсем понятно обсуждение данных на рисунке 19 (а) и (б), поскольку не приведены первичные данные по гейтированию популяции положительных клеток. Не понятно, от какой популяции приведены значения СИФ (средней интенсивности флуоресценции, видимо)? Расшифровки самого сокращения СИФ также не фигурирует в Списке сокращений.
- 3) Не понятно, почему уровень каспаз, белков FLIP и PARP оценивали методом вестерн блота, а уровень внутриклеточного BCL2 оценивали проточной цитометрией?
- 4) В работе использовано несколько неблагозвучных выражений, представляющих собой кальку с английского, таких как “*тотальная РНК*”, при описании суммарной клеточной РНК.

Сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не умаляют научной ценности полученных данных и сделанных выводов, и не снижают общего очень хорошего

впечатления от диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Сенотова Анатолия Сергеевича на тему: «Повышение резистентности клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности» является законченной научно-квалификационной работой, имеющей большое научно-практическое значение для клеточной биологии в направлениях: создание клеточных моделей, изучение рецептор-опосредованной клеточной гибели, механизмы внутриклеточной сигнализации. По своей актуальности, новизне, уровню проведенных исследований и практической значимости и полностью соответствует всем требованиям (в том числе пп. 9-14), установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. с изменениями постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335; от 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; от 20.03.2021 г. № 426), а ее автор Сенотов Анатолий Сергеевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.22. — Клеточная биология.

Ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ФГБУН ИХБФМ СО РАН), доктор биологических наук (03.01.03 -Молекулярная биология)



Коваль Ольга Александровна

630090, г. Новосибирск,
пр. Ак. Лаврентьева, 8
телефон: 8 (383) 363-51-90
e-mail: o.koval@niboch.nsc.ru

подпись д.б.н. Коваль О.А. заверяю
Учёный секретарь ФГБУН ИХБФМ СО РАН
телефон: 8 (383) 363-51-55
e-mail: secretary@niboch.nsc.ru

дата отзыва: 20 ноября 2023 г.



Логашенко Е.Б.

Сведения об официальном оппоненте

Коваль Ольга Александровна

Ученая степень: доктор биологических наук (03.01.03 – молекулярная биология)

Ученое звание: нет

Место работы: ФГБУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ФГБУН ИХБФМ СО РАН).

Должность: ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии

Коваль О.А. специалист в области молекулярной онкологии, иммунологии, клеточной и молекулярной биологии, световой и конфокальной микроскопии, проточной цитометрии, иммунофлюоресцентного анализа. Основные направления научной деятельности: исследование механизма действия и противоопухолевой активности рекомбинантных белков, создание опухолевых моделей, исследование онколитического действия рекомбинантных вирусов, модификация и исследование противоопухолевого потенциала НК-клеток человека.

Список основных публикаций в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет по теме диссертации:

1. Патракова Е.А., Бирюков М.М., Троицкая О.С., Новак Д.Д., Милахина Е.В., Гугин П.П., Закревский Д.Э., Швейгерт И.В., **Коваль О.А.** Цитотоксическая активность атмосферной холодной плазменной струи в отношении 3D-клеточной модели рака молочной железы человека (2023). Цитология. 2023 Т.65 № 1 С. 398-53. 10.31857/S004137712301008X. (Перевод: Patrakova, E.A., Biryukov, M.M., O. S. Troitskaya, D. D. Novak, E. V. Milakhina, P. P. Gugin, D. E. Zakrevsky, I. V. Schweigert & **O. A. Koval.** Cytotoxic Activity of a Cold Atmospheric Plasma Jet in Relation to a 3D Cell Model of Human Breast Cancer. *Cell Tiss. Biol.* **17**, 233–246 (2023). <https://doi.org/10.1134/S1990519X23030094>).
2. Patrakova, E.; Biryukov, M.; Troitskaya, O.; Gugin, P.; Milakhina, E.; Semenov, D.; Poletaeva, J.; Ryabchikova, E.; Novak, D.; Kryachkova, N.; Polyakova A., Zhilnikova M., Zakrevsky D., Schweigert I., **Koval O.A.** Chloroquine Enhances Death in Lung Adenocarcinoma A549 Cells Exposed to Cold Atmospheric Plasma Jet. *Cells* **2023**, *12*, 290. <https://doi.org/10.3390/cells12020290>.
3. Nushtaeva, A.; Ermakov, M.; Abdurakhmanova, M.; Troitskaya, O.; Belovezhets, T.; Varlamov, M.; Gayner, T.; Richter, V.; **Koval, O.** “Pulsed Hypoxia” Gradually Reprograms Breast Cancer Fibroblasts into Pro-Tumorigenic Cells via Mesenchymal–Epithelial Transition. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2494. <https://doi.org/10.3390/ijms24032494>.
4. Gugin, P.P., Zakrevskii, D., Milakhina, E.V. Biryukov M.M., **Koval O.A.**, Patrakova E.A., Schweigert I.V. Optimization of the Parameters of a Cold Plasma Jet Produced by Sinusoidal Voltage Excitation for Effective Suppression of Cancer Cell Viability. *Biomed Eng* **56**, 409–413 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10527-023-10246-2>
5. Швейгерт И.В., Закревский Д.Э., Милахина Е.В., Гугин П.П., Бирюков М.М., Патракова Е.А., Троицкая О.С., **Коваль О.А.** Характеристики холодной

- плазменной струи при возбуждении синусоидальным и положительным импульсным напряжениями для медицинских приложений. 2023. Физика плазмы 2023 Т. 49 №5 С. 447-453. 10.31857/S0367292122601400. (Перевод: Schweigert I.V., Zakrevsky D.E., Milakhina E.V., Gugin P.P., Biryukov M.M., Patrakova E.A., Troitskaya O.S., **Koval O.A.** Characteristics of Cold Atmospheric Plasma Jet when Excited by Sinusoidal and Positive Pulse Voltages for Medical Applications. *Plasma Phys. Rep.* **49**, 595–601 (2023). <https://doi.org/10.1134/S1063780X2360010X>).
6. Fan Bai, Yingjie Lu, Yujie Zhi, Yueye Huang, Long Li, Jiaoxiao Luo, Jamolidin Razzokov, **Olga Koval**, Maksudbek Yusupov, Guojun Chen, Zhitong Chen. Air cold atmospheric plasma with patterns for anaplastic squamous cell carcinoma treatment. *Medical Physics* (2023). <https://doi.org/10.48550/arXiv.2304.10380>.
 7. Новак Д.Д., Троицкая О.С., Нуштаева А.А., Жильникова М.В., Рихтер В.А., Мещанинова М.И., **Коваль О.А.** Подавление EGFR ингибирует сферообразование клеток культуры MCF7 со сверхэкспрессией EGFR // *Acta Naturae*. - 2023. - Т. 15. - №2. - С. 59-69. doi: 10.32607/actanaturae.17857. (Перевод: Novak D.D., Troitskaya O.S., Nushtaeva A.A., Zhilnikova M., Richter V.A., Meschaninova M.I., Koval O.A. EGFR Suppression Inhibits the Sphere Formation of MCF7 Cells Overexpressing EGFR // *Acta Naturae*. - 2023. - Vol. 15. - N. 2. - P. 59-69. doi: 10.32607/actanaturae.17857).
 8. Троицкая О.С., Новак Д.Д., Рихтер В.А., **Коваль О.А.** Иммуногенная гибель опухолевых клеток в терапии онкологических заболеваний. *Acta Naturae* (русскоязычная версия). 2022. Т. 14. № 1. С. 40-53.
 9. Ермаков М.С., Нуштаева А.А., Рихтер В.А., **Коваль О.А.** Опухоль-ассоциированные фибробласты и их роль в опухолевой прогрессии. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022. Т. 26. № 1. С. 14-21.
 10. Абдурахманова М.М., Ермаков М.С., Рихтер В.А., **Коваль О.А.**, Нуштаева А.А. Оптимизация подходов к формированию гетерогенных трёхмерных моделей рака молочной железы. *Гены и Клетки*. 2022. Т. 17. № 4. С. 91-103.
 11. Troitskaya O., Nushtaeva A., Savinkova M., Varlamov M., Ermakov M., Richter V., **Koval O.**, Novak D. EGFR transgene stimulates spontaneous formation of MCF7 breast cancer cells spheroids with partly loss of HER3 receptor. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Т. 22. № 23.
 12. Evdokimov A., Popov A., Ryabchikova E., **Koval O.**, Petruseva I., Lavrik O., Romanenko S., Trifonov V., Lavrik I. uncovering molecular mechanisms of regulated cell death in the naked mole rat. *Aging*. 2021. Т. 13. № 3. С. 3239-3253.
 13. Матвиенко Д.А., Горчаков А.А., Кулемзин С.В., **Коваль О.А.**, Волкова О.Ю., Беловежец Т.Н., Чикаев А.Н., Смагина А.С., Ткаченко А.В., Нуштаева А.А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Таранин А.В. Клеточная линия PSCA-CAR-YT, обладающая поверхностной экспрессией химерных антигенных рецепторов и проявляющая цитотоксическую активность по отношению к PSCA-позитивным раковым клеткам человека. Патент на изобретение RU 2712901 C1, 31.01.2020. Заявка № 2018137315 от 22.10.2018.
 14. Troitskaya O., Varlamov M., Nushtaeva A., Richter V., **Koval O.** Recombinant lactaptin induces immunogenic cell death and creates an antitumor vaccination effect *in vivo* with enhancement by an IDO inhibitor. *Molecules*. 2020. Т. 25. № 12. С. 2804.
 15. Subrakova V.G., Kulemzin S.V., Belovezhets T.N., Chikaev A.N., Chikaev N.A., **Koval O.A.**, Gorchakov A.A., Taranin A.V. SHP-2 gene knockout upregulates CAR-driven cytotoxicity of YT NK-cells. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020. Т. 24. № 1. С. 80-86.

16. Richter M., Wohlfromm F., Seyrek K., Lavrik I.N., Kähne T., Bongartz H., Kit Y., Chinak O., Richter V.A., **Koval O.A.** The recombinant fragment of human κ -casein induces cell death by targeting the proteins of mitochondrial import in breast cancer cells. *Cancers*. 2020. T. 12. № 6. С. 1427.
17. Wohlfromm F., Richter M., Seyrek K., Lavrik I.N., Otrin L., Vidaković-Koch T., Kuligina E., Richter V., **Koval O.** Interplay between mitophagy and apoptosis defines a cell fate upon co-treatment of breast cancer cells with a recombinant fragment of human κ -casein and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020. T. 8. № JUN. С. 617762.
18. **Коваль О.А.**, Волкова О.Ю., Горчаков А.А., Кулемзин С.В., Ткаченко А.В., Нуштаева А.А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Таранин А.В. Рекомбинантный пептид EL1, обладающий цитотоксической активностью по отношению к раковым клеткам человека. Патент на изобретение RU 2683221 C1, 26.03.2019. Заявка № 2017142060 от 01.12.2017.
19. Bagamanshina A.V., Troitskaya O.S., Nushtaeva A.A., Yunusova A.Y., Kuligina E.V., Richter V.A., **Koval O.A.**, Starykovych M.O., Kit Y.Y., Richter M., Wohlfromm F., Kähne T., Lavrik I.N. Cytotoxic and antitumor activity of lactaptin in combination with autophagy inducers and inhibitors. *BioMed Research International*. 2019. T. 2019. С. 4087160.
20. Chinak O., Richter V., **Koval O.**, Golubitskaya E., Stepanov G., Zhuravlev E., Pyshnaya I. Nucleic acids delivery into the cells using pro-apoptotic protein lactaptin. *Frontiers in Pharmacology*. 2019. T. 10. № FEB. С. 01043.
21. **Коваль О.А.**, Субракова В.Г., Нуштаева А.А., Беловежец Т.Н., Троицкая О.А., Ермаков М.С., Варламов М.Е., Чикаев А.Н., Кулигина Е.В., Кулемзин С.В., Горчаков А.А., Таранин А.В., Рихтер В.А. CAR-опосредованная антиметастатическая активность модифицированных НК-клеток линии YT. *Гены и Клетки*. 2019. T. 14. № 4. С. 66-71.
22. Kaledin V.I., Nikolin V.P., Popova N.A., **Koval O.A.**, Kuligina E.V., Pyshnaya I.A., Richter V.A., Lushnikova E.L. Antimetastatic effect of liposomal recombinant lactaptin. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018. T. 164. № 6. С. 762-765.
23. Nushtaeva A.A., Stepanov G.A., Semenov D.V., Juravlev E.S., Balahonova E.A., Kuligina E.V., Richter V.A., **Koval O.A.**, Gerasimov A.V., Sidorov S.V., Savelyev E.I. Characterization of primary normal and malignant breast cancer cell and their response to chemotherapy and immunostimulatory agents. *BMC Cancer*. 2018. T. 18. № 1. С. 728.
24. Matvienko D.A., Kulemzin S.V., Smagina A.S., Belovezhets T.N., Chikaev A.N., Volkova O.Y., Chikaev N.A., **Koval O.A.**, Kuligina E.V., Taranin A.V., Gorchakov A.A. Analysis of *in vitro* activity of PSCA-specific cars in the context of human NK cell line YT. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2018. T. 7. № 2. С. 70-77.
25. Беловежец Т.Н., Матвиенко Д., Волкова О.Ю., **Коваль О.А.**, Ткаченко А.В., Кулигина Е.В., Таранин А.В., Рихтер В. Создание и анализ цитотоксической активности *in vitro* НК-клеточной линии человека с экспрессией PSMA-специфичного химерного антигенного рецептора и противоопухолевого агента лактаптина. *Гены и Клетки*. 2018. T. 13. № 3. С. 89-93.
26. Каледин В.И., **Коваль О.А.**, Кулигина Е.В., Лушников Е.Л., Николин В.П., Попова Н.А., Пышная И.А., Рихтер В.А. Противометастатический эффект липосомальной формы рекомбинантного лактаптина. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017. T. 164. № 12. С. 734-738.
27. Кочнева Г.В., Ткачева А.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Юнусова А.Ю., Рябчикова Е.И., Кулигина Е.В., **Коваль О.А.**, Рихтер В.А. Противоопухолевый потенциал рекомбинантного штамма вируса осповакцины, продуцирующего секретируемый химерный белок, состоящий из ГМ-КСФ человека и онкотоксического белка лактаптина. *Биофармацевтический журнал*. 2017. T. 9. № 1. С. 11-21.

Согласна выступить оппонентом диссертации Сенотова Анатолия Сергеевича «Повышение резистентности клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

д.б.н., ведущий научный сотрудник
лаборатории биотехнологии
ФГБУ Институт химической биологии
и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской
академии наук (ФГБУН ИХБФМ СО
РАН)



/Коваль О.А./

подпись д.б.н. Коваль О.А. заверяю

Учёный секретарь
ФГБУ Института химической
биологии и фундаментальной
медицины Сибирского отделения
Российской академии наук (ФГБУН
ИХБФМ СО РАН)
телефон: 8 (383) 363-51-55
e-mail: secretary@niboch.nsc.ru



/Логашенко Е.Б./

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

Я, Коваль Ольга Александровна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ФГБУ ИХБФМ СО РАН), сообщаю о согласии выступить в качестве оппонента по диссертации Сенотова Анатолия Сергеевича на тему: «Повышение резистентности клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности» представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. — «Клеточная биология».

По теме рассматриваемой диссертации имею 27 научных работ.

Согласен на обработку моих персональных.

Не являюсь членом экспертного совета ВАК

д.б.н., ведущий научный сотрудник
лаборатории биотехнологии
ФГБУН Институт химической
биологии и фундаментальной
медицины Сибирского отделения
Российской академии наук
(ФГБУН ИХБФМ СО РАН)



/Коваль О.А./