

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертационную работу**

**Сенотова Анатолия Сергеевича**

**«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 темы диссертации**

Диссертация Сенотова А.С. посвящена изучению одной из самых насущных проблем современной медицины - механизмов резистентности опухолей к терапии. Актуальность темы диссертационной работы Сенотова А.С. обусловлена недостаточной эффективностью современных фармакологических подходов к лечению пациентов с острым миелоидным лейкозом, причиной которой является резистентность злокачественных клеток как к действию противоопухолевых препаратов, так и к эффекторам противоопухолевого иммунитета. При этом ключевые молекулярные механизмы резистентности клеток острого миелоидного лейкоза до сих пор остаются не вполне известными. В этом аспекте особый интерес представляют механизмы, связанные с условиями микроокружения лейкозных клеток, и те уникальные условия, которые опосредованы накоплением гиперклеточной опухолевой массы в костном мозге. При этом происходит формирование новых межклеточных взаимодействий с различными генетическими и эпигенетическими перестройками в лейкозных клетках и подавлением локального иммунного надзора, что существенно отличается от начальных стадий заболевания до формирования гиперклеточной опухолевой массы. Получение новых фундаментальных знаний о процессах, происходящих в данных условиях, важно для поиска новых подходов к эффективной лекарственной терапии, в тм числе иммунотерапии, острых форм миелоидного лейкоза.

### **Содержание и структура диссертационной работы**

Диссертация Сенотова А. С. включает в себя введение, обзор литературы (Глава 1), описание материалов и методов исследования (Глава 2), изложение результатов и их обсуждение (Глава 3), заключение, выводы, список цитируемой литературы (296 источников) и список сокращений. Объем работы составляет 132 страницы. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 3 таблицами.

В разделе «**Введение**» обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи работы, изложены новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, описана методология исследования, определены выносимые на защиту положения, обоснован личный вклад автора работы, а также приведены сведения о публикациях и апробации работы на конференциях.

В главе 1 «**Обзор литературы**» представлены современные данные по этиологии и патогенезу острого миелоидного лейкоза, о структуре, функциях и применении противоопухолевого цитокина TRAIL, а также о возможных механизмах устойчивости злокачественных клеток к его цитотоксическому действию. Представленный материал не оставляет сомнений в научно-практической значимости выбранной темы исследований. Обзор написан достаточно профессионально, читается с интересом, диссертант достаточно хорошо ориентируется в научной литературе. Обзор содержит достаточное число цитирований и авторских выводов.

В главе 2 «**Материалы и методы**» автором детально описаны примененные в ходе работы экспериментальные методики. Методы полностью соответствуют поставленным задачам. Диапазон использованных методик исчерпывающий и полностью соответствует современному мировому уровню. Можно с уверенностью заключить, что исследование проведено диссертантом на высоком методическом уровне.

Глава 3 «**Результаты и обсуждение**» может быть условно разделена на несколько смысловых частей, логично связанных между собой и соответствующих поставленным задачам. В первой части автор демонстрирует возникновение устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза в трехмерных культурах высокой плотности к цитотоксическому действию рекомбинантного человеческого белка izTRAIL, являющегося модификацией природного цитокина TRAIL с добавленной последовательностью изолейциновой «застежки». Автор показывает общность данного феномена на примере 4-х линий клеток острого миелоидного лейкоза. Также диссертант отмечает, что TRAIL-резистентность в трехмерных высокоплотных культурах носит обратимый характер, не зависит напрямую от числа клеток в культуре и не зависит непосредственно от трехмерного строения культуры высокой плотности. Далее приводятся результаты изучения молекулярных механизмов резистентности клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности. С помощью биоинформатического анализа результатов секвенирования транскриптомов модельных клеток острого миелоидного лейкоза THP-1 показана активация провоспалительных сигнальных и метаболических путей, а также идентифицированы основные участники, такие как ФНО-альфа и транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B. Далее, на основе экспериментальных данных,

полученных с помощью проточной цитометрии, иммуноблоттинга и ОТ-ПЦР, автором показаны изменения экспрессии проапоптотических рецепторов смерти TRAIL DR4 и DR5, а также цитоплазматических адаптерных компонентов рецепторного комплекса DISC и представителей основных антиапоптотических семейств IAPs, происходящие в клетках острого миелоидного лейкоза при повышении их резистентности к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности.

В финале главы «Результаты и обсуждение» показана принципиальная возможность подавления резистентности клеток острого миелоидного лейкоза при повышении их резистентности к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности с использованием низкомолекулярных ингибиторов выявленных мишеней, в частности, транскрипционного фактора NF-kB и антиапоптотического белка Bcl-2.

В разделе «**Заключение**» автор суммирует полученные данные с помощью схемы гипотетического механизма повышения TRAIL-резистентности у клеток ОМЛ в трехмерных высокоплотных культурах, имитирующих накопление лейкозных клеток в пространстве костного мозга, которая наглядно и достаточно полно иллюстрирует основной итог работы.

#### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций**

Диссертантом сформулированы 4 положения, выносимые на защиту, которые соответствуют 4 выводам. Выводы полностью соответствуют результатам работы. Обсуждение полученных результатов лишено спекулятивности и опирается на полученные экспериментальные данные.

#### **Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций**

Достоверность полученных в работе результатов обусловлена использованием современных и проверенных методик исследования, которые подробно описаны в главе «Материалы и методы». Постановка и результаты экспериментов описаны достаточно подробно, приведены все необходимые контроли. Обработка и представление результатов выполнено в общепринятой и понятной форме. Полученные выводы согласуются между собой и не противоречат существующим научным представлениям.

Новизна работы не вызывает сомнений. В работе впервые показан феномен возникновения обратимой резистентности клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности. Впервые выявлены механизмы такой резистентности, основанные на активации провоспалительных сигнальных путей, регулируемой ФНО-альфа и опосредованной NF-kB. Впервые показано, что этот процесс сопровождается изменением экспрессии проапоптотических рецепторов смерти TRAIL и антиапоптотических представителей семейств IAP и Bcl-2, а также

показана принципиальная возможность подавления резистентности клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности с помощью низкомолекулярных ингибиторов.

### **Замечания и вопросы**

Несмотря на общий высокий уровень представленной диссертационной работы, имеется ряд замечаний.

В первую очередь хотелось бы отметить, что автору стоило бы обратить внимание на пунктуацию: местами кажется, что запятые расставлены произвольно без учета правил русского языка, что иногда мешало уловить смысл и немного портило впечатление от работы, которая по своей сути является очень качественно выполненной.

В литературном обзоре не указаны терапевтические подходы к лечению ОМЛ в рамках клинических рекомендаций. Учитывая, что диссертация посвящена резистентности клеток ОМЛ к TRAIL, подразумевается, что TRAIL-опосредованный путь может стать потенциальной мишенью для разработки новых подходов к терапии ОМЛ, поэтому следовало бы подробнее описать имеющиеся стандарты лечения.

Также хотелось бы пожелать использовать русскую транслитерацию в названиях препаратов, таких как навитоклакс, дуланермин, мапатумумаб.

Сокращение ДЭГ («дифференциально экспрессируемые гены») не следует склонять с учетом падежей («ДЭГов»), это придает научному тексту разговорный жанр (стр.73, 76).

Часть «Заключение» перегружена обсуждением результатов работы. Было бы логичнее перенести финальную схему и часть текста в отдельную главу «Обсуждение».

В отдельных местах обращают на себя внимание выражения от множественного лица («мы использовали/исследовали/показали, что ...»). С одной стороны, ясно, что часть результатов исследования представлена в публикациях совместно с соавторами. Но с другой стороны, диссертационная работа – это персональная научная работа автора, поэтому я бы рекомендовала использовать обезличенные речевые обороты («Было показано, что ...»).

Что касается вопросов к работе, в обзоре литературы представлены данные о том, что дифференцировка лейкозных клеток может существенно снижать их чувствительность к TRAIL-индуцированному апоптозу. И далее в работе имеются указания на то, что у клеток острого миелоидного лейкоза в трехмерных культурах высокой плотности появляются признаки дифференцировки. Поясните, возможно ли, что у клеток в данных экспериментальных условиях запускаются процессы дифференцировки и привносит ли это свой вклад в формирование резистентности к TRAIL-индуцированному апоптозу?

В работе было показано, что для клеток миелоидного лейкоза MV4-11, U937, HL-60 и K562 выявляется повышение устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели в ВПК, тогда как повышение TRAIL-устойчивости клеток KG-1 в ВПК было наименее значимо. Однако из графика на Рисунке 12 видно, что линия KG-1 является более устойчивой к TRAIL, чем другие линии, также и в низкой плотности. Думаю, обсуждение этого эффекта украсило бы работу.

На рисунке 19 показано, что в ВПК снижается поверхностная экспрессия рецептора смерти TRAIL DR4, но не DR5. Связываете ли вы это с различной ролью рецепторов смерти в клетках лейкоза? Как минимум для клеток линии K562 было показано, что рецептор DR4 более важен для проведения сигнала TRAIL-индуцированного апоптоза, хотя в большинстве солидных опухолей более важную роль играет рецептор DR5.

Поскольку в ходе работы диссертант выявил, что у клеток ОМЛ THP-1 в ВПК активированы внутриклеточные провоспалительные сигнальные пути, в качестве положительного контроля провоспалительной активации был использован липополисахарид (ЛПС). Можете ли вы предположить, почему случае с клетками, обработанными ЛПС, ингибирование TRAIL-индуцированного апоптоза происходит на начальном этапе путем блокирования активации инициаторных каспаз-8/10, а в ВПК – на более поздних этапах апоптоза?

В качестве пожелания на будущее хотелось бы указать на актуальность и перспективность дальнейшего исследования влияния опухолевого микроокружения на сигнальные пути TRAIL в условиях *in vivo* в иммунокомпетентных моделях.

Следует заметить, что высказанные замечания имеют не принципиальный, а рекомендательный характер, и не сказываются на общем уровне работы.

### **Заключение**

Работа выполнена на высоком методическом уровне и по логически обоснованному плану, содержит новые интересные научные данные, четко написана и оформлена. Представленные в работе результаты обладают несомненной фундаментальной и прикладной значимостью. Выносимые на защиту результаты опубликованы в виде статей в журналах из списка ВАК, а также в тезисах международных конференций. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Таким образом, диссертационная работа Сенотова А.С. на тему «Повышение резистентности клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности» является законченной научно-квалификационной работой и полностью соответствует 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, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. - Клеточная биология.

научный сотрудник лаборатории инженерии  
белка ФГБУН Институт биоорганической  
химии им. академиков  
М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук (ИБХ РАН)  
кандидат биологических наук (03.01.02)

Яголович Анна Валерьевна

117997, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-  
Маклая, дом 16/10  
телефон: +79263780155  
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: « 5 » декабря 2023 г.

## Сведения об официальном оппоненте

### Яголович Анна Валерьевна

Ученая степень: кандидат биологических наук (03.01.02 - Биофизика)

Ученое звание: нет

Место работы: ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Должность: научный сотрудник лаборатории инженерии белка

Яголович А.В. специалист в области генной инженерии, клеточной биологии, онкологии, фармакологии, нанотехнологии. Проводит разработку и скрининговые исследования синтезированных соединений, определение их цитотоксического эффекта, разработку наночастиц для доставки биологически активных соединений и молекул, кинетики внутриклеточного проникновения и выведения, исследования их внутриклеточного распределения.

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

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, T. 13, № 5

**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, T. 15, № 2, c. 515

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, T. 23, № 11.

**Yagolovich Anne V.**, Isakova Alina A., Artykov Artem A., Vorontsova Yekaterina V., Mazur Diana V., 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, T. 23, № 20, c. 12687

**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, T. 23, № 11, c. 5860

**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, T. 13, № 9, с. 1413

**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, T. 7, № 1, с. 8

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, T. 9

**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, T. 13, № 4, с. 100762

**Yagolovich A.V.**, Artykov 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. T. 84, № 6, с. 627-636

**Яголович А.В.**, Артыков А.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Гаспарян М.Э. Новый эффективный способ получения рекомбинантного противоопухолевого цитокина TRAIL и его рецептор селективного варианта DR5-B. *Биохимия*. 2019. Т. 84. № 6. С. 808-818.

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.

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.

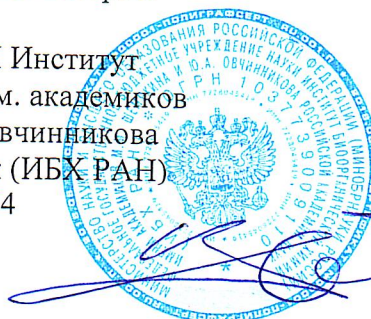
к.б.н., научный сотрудник лаборатории инженерии белка ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)



/Яголович А.В./

подпись к.б.н. Яголович А.В. заверяю

Ученый секретарь ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)  
телефон: +7 (495) 330-59-74  
e-mail: voleinik@mail.ru



/Олейников В.А./