

«УТВЕРЖДАЮ»

директор ИТЭБ РАН

к.ф.-м.н. Селезнева И.И.



2023 г.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Диссертация *«Повышение резистентности клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности»* выполнена в лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН. В период подготовки диссертации соискатель Сенотов Анатолий Сергеевич работал в лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН в должности научного сотрудника.

Сенотов Анатолий Сергеевич в 2007 г. окончил Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского с присуждением квалификации «Биолог» по специальности «Биология» (диплом ВСА 0616351 от 13.07.2007 г., рег. №342). В 2020 г. Окончил аспирантуру РАН на базе ИТЭБ РАН с присуждением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь» по специальности 06.06.01 – Биологические науки (диплом 105004 0008124 от 14.09.2020 г., рег. №003). С 2015 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, заведующий лабораторией Фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН.

На открытом семинаре Секций Ученого Совета ИТЭБ РАН «Биомедицина» и «Биоэнергетика» от 05 октября 2023 года по итогам рассмотрения диссертации Сенотова А.С. *«Повышение резистентности клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности»* принято следующее **заключение:**

Диссертация Сенотова А.С. является законченной научно-квалификационной работой, посвященной исследованию повышения устойчивости клеток острого

миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных высокоплотных клеточных культурах. Для достижения цели, заключающейся в изучение устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза к действию цитотоксического лиганда TRAIL в трехмерных высокоплотных культурах *in vitro*, в работе были использованы современные методы клеточной биологии, биохимии и биофизики. Результаты, полученные в диссертации Сенотова А.С. являются актуальными как с фундаментальной, так и прикладной точек зрения. В частности, результаты исследования расширяют современные представления о молекулярных механизмах повышения устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу в клетках острого миелоидного лейкоза в трехмерных высокоплотных клеточных культурах *in vitro*. Практическое значение полученных результатов заключается в возможности разработки новых стратегий подавления первичной резистентности клеток острого миелоидного лейкоза, находящихся в состоянии гиперклеточности в костном мозге. 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**

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) занимают второе место в структуре онкологических заболеваний и составляют 25% из всех злокачественных новообразований у детей, причем 15-30% пациентов не достигают ремиссии после химиотерапии и, более чем у 60% пациентов в течение первых трех лет развивается рецидив (Клинические рекомендации ОМЛ, 2020). Таким образом, для ОМЛ характерна низкая эффективность терапии, которую связывают с формированием лекарственной устойчивости. Лекарственную устойчивость ОМЛ можно разделить на 2 типа: первичную, опосредующую низкую эффективность первого курса терапии, и вторичную, возникающую уже при повторных курсах. Наибольший интерес, с точки зрения формирования первичной устойчивости, представляют условия микроокружения клеток ОМЛ, прежде всего в костном мозге (КМ). Условия микроокружения клеток ОМЛ обусловлены как компонентами стромы КМ – мезенхимными клетками и внеклеточным матриксом, так и собственно лейкозными клетками. Накопление лейкозных клеток в ограниченном пространстве КМ способствует образованию уникального окологломерульного микроокружения, обеспечивающего повышение устойчивости к клеточной гибели. Таким образом, изучение устойчивости клеток ОМЛ к индукции гибели в условиях их накопления в ограниченном пространстве может приблизить нас к пониманию критических механизмов глобальной лекарственной устойчивости ОМЛ. При этом, интерес вызывает повышение не только лекарственной устойчивости, но и резистентности клеток ОМЛ к действию медиаторов противоопухолевого иммунитета.



Цитокин TRAIL (TNF alpha Related Apoptosis Inducing Ligand) – мембранно-связанный белок семейства ФНО, представленный на внешней клеточной мембране цитотоксических Т-клеток, NK-клеток и миелоидных дендритных клеток. Данный белок является одним из главных молекулярных эффекторов противоопухолевого иммунитета и индуцирует селективный рецептор-опосредованный апоптоз трансформированных клеток, связываясь с мембранными рецепторами DR4 и DR5. Однако оказалось, что уже в условиях *in vitro* клетки солидных опухолей (карцином, сарком и т.д.) приобретают TRAIL-резистентность в условиях накопления клеток в ограниченном пространстве, в двумерных (конфлюентные культуры) и трехмерных (клеточные сфероиды) многоклеточных структурах. В литературе отсутствуют данные о возможности повышения TRAIL-резистентности у клеток ОМЛ в схожих условиях. С учетом того, что клетки ОМЛ не зависят от прикрепления и культивируются в суспензии, в отличие от клеток солидных опухолей, нами была предложена простая трехмерная *in vitro* модель, имитирующая накопление лейкозных клеток в ограниченном пространстве КМ – стационарные высокоплотные культуры, культивируемые без смены питательной среды. В данной модели впервые показана принципиальная возможность повышения устойчивости клеток ОМЛ как к действию химиотерапевтических препаратов, так и к цитотоксическому действию rhTRAIL.

В работе представлены результаты исследования механизмов повышения резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных высокоплотных культурах, имитирующих накопление лейкозных клеток в пространстве костного мозга.

#### **Научная новизна**

В работе впервые показано возникновение резистентности клеток ОМЛ к TRAIL – индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности. Этот феномен обратим и не связан с ограничением проникновения белка TRAIL к клеткам. Впервые установлено, что повышение TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в трехмерных культурах высокой плотности основано на TNF-регулируемом и NF- $\kappa$ 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.

#### **Связь темы с планом основных научных работ учреждения**

Представленные результаты получены при выполнении исследований в рамках постановления Правительства РФ от 09.04.10 №220 «Мегагранты» (договор №14.Z50.31.0028).

### **Конкретное личное участие автора в получении результатов**

Диссертационная работа выполнена автором лично. Постановка научной проблемы и формулировка рабочей гипотезы, планирование эксперимента, анализ и интерпретация полученных результатов осуществлялись совместно с научными руководителями. Поиск и анализ литературы по теме диссертации, экспериментальные исследования и статистическая обработка первичных данных, написание и оформление диссертации выполнено автором самостоятельно. Результаты исследования в виде публикаций в научных периодических изданиях и докладов на конференциях представлены совместно с соавторами.

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

Достоверность полученных результатов обеспечена репрезентативным количеством материала, глубокой проработкой темы и методов исследования. Эксперименты проводились на современном сертифицированном оборудовании. Обработка данных и подтверждение достоверности полученных результатов проводилась с использованием современных статистических методов и программ. Полученные в ходе работы результаты соответствуют данным, представленным в научной литературе, и соответственно интерпретируются.

### **Практическая значимость работы**

Показана возможность подавления резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности, при использовании ВНЗ миметика Navitoclax. Данные результаты имеют значение для разработки новых подходов в иммунотерапии ОМЛ.

### **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 материалы диссертационной работы доложены на V Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 16-18 декабря 2019 года), 19-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, Россия, 20-24 апреля 2015 г.), Abs. European Leukemia Net (ELN) Frontiers Meeting (Berlin, Germany, 16-19 October 2014), EMBO Workshop «Cellular and molecular mechanism of tumour–microenvironment crosstalk» (Tomsk, Russia, 9-12 July 2015), 1-й Международной конференции для молодых ученых «Mitochondrial pores and



channels as pharmacological targets» (Пушино, Россия, 29-30 октября 2014 г.).

**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 20 работ, в том числе 5 научных статей в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК, 1 глава в монографии, 1 патент и более 15 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. The Increase in the Drug Resistance of Acute Myeloid Leukemia THP-1 Cells in High-Density Cell Culture Is Associated with Inflammatory-like Activation and Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins / M. Kobayakova, Y. Lomovskaya, A. Senotov, A. Lomovsky, V. Minaychev, I. Fadeeva, D. Shtatnova, K. Krasnov, A. Zvyagina, I. Odinkova, V. Akatov, R. Fadeev // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23(14). P. 7881.

2. Появление признаков дифференцировки и провоспалительного фенотипа у клеток острого миелоидного лейкоза THP-1 при повышении их TRAIL-резистентности в агрегатах in vitro / М.И. Кобякова, Я.В. Евстратова, А.С. Сенотов, А.И. Ломовский, В.В. Минайчев, А.И. Звягина, М.Е. Соловьева, И.С. Фадеева, В.С. Акатов, Р.С. Фадеев // Биол. мембраны. – 2021. – Т. 38, № 1. - с. 61–70.

3. Improved Anticancer Effect of Recombinant Protein izTRAIL Combined with Sorafenib and Peptide iRGD / R. Fadeev, A. Chekanov, M. Solovieva, O. Bezborodova, E. Nemtsova, N. Dolgikh, I. Fadeeva, A. Senotov, M. Kobayakova, Y. Evstratova, R. Yakubovskaya, V. Akatov // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20(3). P. 525.

4. Клеточная агрегация повышает лекарственную устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза / Р.С. Фадеев, М.Е. Соловьева, Д.А. Слядовский, С.Г. Захаров, И.С. Фадеева, А.С. Сенотов, Н.В. Долгих, А.К. Голенков, В.С. Акатов // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. - 2015. - Т. 32. № 2. - с. 125-134.

5. Ингибирование активации NF-κB снижает устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в многоклеточных агрегатах / Р.С. Фадеев, М.Е. Соловьева, Д.А. Слядовский, С.Г. Захаров, И.С. Фадеева, А.С. Сенотов, А.К. Голенков, В.С. Акатов // Биофизика. - 2015. - Т. 60, № 6. - с. 1146-1150.

**Монографии:**

1. Фадеев Р.С. Повышение лекарственной устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах / Р.С. Фадеев, М.И. Кобякова, С.Г.

Захаров, И.С. Фадеева, А.С. Сенотов, Т.А. Митина, А.К. Голенков, В.С. Акатов // В кн.: «Митохондриальные поры, каналы и устойчивость клеток к повреждающим воздействиям». Изд.: Synchronobook - 2016. - с. 172-182.

### Патенты

1. Патент №2653442 Российская Федерация, МПК C12N 5/00 (2006.01). Способ персонифицированного скрининга действия веществ на лейкозные клетки *ex vivo* : №2015156455 : заявл. 29.12.2015 : опубл. 04.07.2017 / Акатов В.С., Фадеев Р.С., Фадеева И.С., Сенотов А.С., Митина Т.А., Захаров С.Г., Голенков А.К. – 13 с. : ил. – Текст : непосредственный.

Решение семинара: Диссертация Сенотова Анатолия Сергеевича на тему «Повышение резистентности клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности» 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 23 членов секции Ученого совета. Результаты голосования: «за» – 23, «против» – нет, «воздержалось» – нет, протокол №5 от 05.10.2023.

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»  
в.н.с., к.б.н. заведующий лабораторией  
исследований генома  
142290, г. Пущино, Московская обл., ул.  
Институтская, д. 3.  
Телефон: +7 (4967) 73-94-28  
e-mail: ao\_ermakovy@rambler.ru

Ермаков Артём Михайлович



Подпись: Куликова А.В.  
Ермакова А.М.

Удостоверяю-Зам. зав. ОДОУ  
С. Г. БАКАНОВА