

На правах рукописи



Косьянова Александра Асадовна

**ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛОФАЗИМИНА НА МОДЕЛИ
ГЛИОБЛАСТОМЫ**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Дальневосточный федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель:

Брюховецкий Игорь Степанович – доктор медицинских наук, доцент.

Официальные оппоненты:

Глушаков Руслан Иванович – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», научно-исследовательский центр, научно-исследовательский отдел (медико-биологических исследований), начальник.

Оковитый Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии и клинической фармакологии, заведующий.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

Защита диссертации состоится «30» мая 2024 г. в 11 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета 24.1.158.02, созданного на базе ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», по адресу 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 и на сайте <https://iemspsb.ru/external/kosyanova-aleksandra-asadovna/>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Мухин Валерий Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Глиобластома (ГБ) – одна из самых смертоносных опухолей головного мозга человека. Прогноз крайне неблагоприятный, при условии выполнения всех требований современного протокола лечения ГБ, известного как протокол *Роджера Ступпа* (Stupp et al., 2009), медиана выживаемости больных составляет 15 мес. Последующая комбинация хирургического лечения с химиотерапией иногда может продлить жизнь больного (Yang et al., 2022). Однако химиопрепараты не могут сдерживать прогрессирование опухоли (Naser et al., 2022), поскольку не способны эффективно уничтожать в организме больного опухолевые стволовые клетки (ОСК).

ОСК способны к быстрому самообновлению путем симметричного деления (Guan et al., 2020), что достигается при активации ряда внутриклеточных механизмов (Ou et al., 2020), среди которых ключевую роль играет эмбриональный сигнальный путь *Wnt* (Latour et al., 2021; Varzegar-Behrooz et al., 2023). Источником лигандов, активирующих этот сигнальный каскад, является M2-поляризованная микроглия и некоторые другие клетки микроокружения ОСК (Fan et al., 2021), формирующие «секреторные петли» и продуцирующие *Wnt*-белки в ответ на стимуляцию иммуносупрессивными цитокинами (Matias et al., 2019). Подобная стимуляция приводит к повышению уровня β -катенина в цитоплазме ОСК (Khan et al., 2023), что усиливает фенотипическую пластичность, пролиферативную активность и степень анаплазии опухолевых клеток (ОК), ведет к рецидиву ГБ и предопределяет негативный исход болезни.

Эффективных способов фармакологической коррекции этих механизмов не существует, однако определенные успехи в области иммунотерапии глиом (Mahmoud et al., 2023; Stupp et al., 2023) позволяют предположить, что комбинация лекарственных средств, подавляющих синтез и биологическую активность β -катенина с опухолево-клеточными и дендритноклеточными вакцинами, может дестабилизировать взаимоотношение ОСК с локальным иммуносупрессивным микроокружением, заблокировать внутриклеточные механизмы фенотипической гетерогенности и пластичности ОСК, повысить антиглиомную активность цитостатиков и продлить жизнь больного. В этой связи особый интерес представляют перепрофилируемые лекарственные средства, среди которых высокую противоопухолевую активность при раке кишечника, раке яичников, трижды-негативном раке молочной железы и ряде других инвазивных карцином (Katanaev et al., 2023) показал противолепрозный препарат клофазимин (КФЗ).

Цель работы: изучить противоопухолевый потенциал клофазимина на экспериментальных моделях глиобластомы *in vitro* и *in vivo*.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние клофазимина на клетки глиобластомы *in vitro*;
2. Показать влияние клофазимина на антиглиомную эффективность цитостатиков *in vitro*;

3. Установить наличие антиглиомного эффекта клофазимина в комбинации с химиолучевой терапией *in vivo*;

4. Описать антиглиомную активность клофазимина при комбинации с иммунотерапией *in vivo*.

Научная новизна. На экспериментальных моделях ГБ *in vitro* показана зависимость между пролиферативной активностью опухолевых клеток (ОК) и содержанием в них β -катенина, а также прямая зависимость между содержанием этого белка и резистентностью ОК к темозоломиду (ТМЗ). Показано, что с увеличением содержания β -катенина ОК становятся более подвижными, что сопровождается усилением экспрессии в них миграционного N-кадгерина и антигенов пронеурального – CD133 и мезенхимального – CD44 фенотипа. Показана способность клофазимина угнетать подвижность клеток ГБ, более выраженная в отношении ОК с индуцированной резистентностью к ТМЗ, а также усиление цитостатического действия клофазимина по мере усиления степени анаплазии ОК. Установлено, что клофазимин оказывает дозозависимое цитотоксическое действие на ОК, эффективность которого обратно пропорциональна степени их дифференцировки и усиливается в комбинации с темозоломидом. Установлены IC_{50} клофазимина в отношении ОК линии С6 – $37,6 \pm 3,2$ мкмоль/л, для линии U87MG и T98G – $29,0 \pm 1,3$ и $38,3 \pm 4,1$ мкмоль/л, соответственно. Показана способность клофазимина усиливать цитотоксическую активность ТМЗ, ломустина, 5-фторурацила в отношении ОК линий С6 и U87MG, а также паклитаксела в отношении клеток ГБ линии T98G, описано усиление антиглиомного действия при комбинации клофазимина с ломустином и карбоплатином в отношении клеток линии T98G с индуцированной резистентностью к ТМЗ.

В эксперименте *in vivo* показана способность клофазимина усиливать цитотоксическое действие химиолучевой терапии (ХЛТ) у крыс с глиомой С6, что сопровождается снижением содержания в неопластической ткани β -катенина, уменьшением размера опухоли и улучшением функционального статуса экспериментальных животных. Комбинация ХЛТ с клофазимином и опухолево-клеточной (ОКВ) вакциной сопровождается усилением локального противоопухолевого иммунного ответа и увеличения содержания интерлейкинов (ИЛ) 1 β и 18 в сыворотке крови. Комбинация ХЛТ с клофазимином и дендритноклеточной вакциной (ДКВ) обогащает опухолевую ткань маркерами IBA1⁺ CD68⁺ клеток М1-поляризованной микроглии, что сопровождается снижением содержания β -катенина в веществе мозга и увеличением выживаемости экспериментальных животных.

Теоретическая и практическая значимость. Создана экспериментальная модель глиобластомы с индуцированной резистентностью к ТМЗ и показана прямая зависимость между содержанием β -катенина в ОК с наиболее агрессивным иммунофенотипом эпителиально-мезенхимального перехода, характеризующегося усилением анаплазии и модификацией иммуноцитохимического (ИЦХ) профиля ОК в виде увеличения содержания миграционного N-кадгерина, снижения содержания адгезионного E-кадгерина, экспрессией в ОК антигена CD44, усилением их подвижности и ростом резистентности к ТМЗ и другим противоопухолевым препаратам.

Показано цитостатическое и цитотоксическое воздействие на ОК этого типа с использованием комбинации цитостатиков и клофазимина. Установлены IC_{50} наиболее востребованных в нейроонкологии цитостатиков в отношении ОК с индуцированной резистентностью к ТМЗ и установлены эффективные комбинации ТМЗ, цитостатиков и клофазимина, что позволит внести важные коррективы в существующие клинические рекомендации по лечению ГБ.

Показана возможность усиления противоопухолевого действия ХЛТ при комбинации с клофазимином, а также возможность усиления антиглиомного эффекта лечения при комбинации ХЛТ, клофазимина и экспериментальной иммунотерапии с использованием опухолевых клеточной и дендритноклеточной вакцин, что сопровождается модификацией микроокружения ОСК и снижением содержания β -катенина в опухолевой ткани и веществе мозга. Возможность увеличения выживаемости экспериментальных животных с перевитой глиомой при использовании клофазимина позволит разработать новые схемы лечения ГБ, в том числе новые схемы неoadьювантной химиотерапии.

Методология и методы исследования. Проведенное проспективное, контролируемое, рандомизированное, открытое, исследование является самостоятельной научно-исследовательской работой, методология которой базируется на совокупности лабораторных, инструментальных, статистических методов и современным представлениям о центральной роли *Wnt*-сигнального пути в биологии стволовых клеток и ключевой роли ОСК в патогенезе ГБ. Центральным тезисом работы является стратегически важная роль β -катенина в механизмах фенотипической пластичности ОК и способности клофазимина подавлять биологическую активность β -катенина, что сопровождается усилением цитотоксического и цитостатического действия лекарственных препаратов в отношении ОСК. В работе использована комбинация методов воздействия на внутриклеточные механизмы сигнального пути *Wnt* с иммунотерапией, дестабилизирующей взаимодействие ОСК с микроокружением, что повышает эффективность лекарственной терапии. Исследование одобрено этическим комитетом ДВФУ (протокол № 8 от 08.06.2023 г.).

Положения, выносимые на защиту:

1. Клофазимин обладает высоким противоопухолевым потенциалом.
2. Клофазимин увеличивает эффективность антиглиомной химиотерапии.
3. β -катенин является важнейшей мишенью для регуляции ОСК.
4. Комбинация клофазимина с иммунотерапией сопровождается развитием аддитивного эффекта.

Степень достоверности и апробация результатов. Фактические материалы, представленные в диссертации, полностью соответствуют первичной документации. Достоверность полученных результатов и выводов основывается на достаточном объеме выборки и статистической обработке с расчетом стандартного отклонения и критериям достоверности, использовании современных методов исследования, корректном анализе полученных данных. Материалы работы доложены на 5 региональных и международных конференциях и конгрессах.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК / реферируемых базами данных Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы – материалы и методы, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов и заключения. Работа включает 7 таблиц и 41 рисунок. Список литературы содержит 245 литературных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Стандартизованные линии опухолевых клеток (ОК). Использованы клеточные линии U87MG и T98G ГБ человека, С6 глиомы крысы, полученные из Американской коллекции клеточных культур (АТСС). Характеристики культур соответствовали паспортным параметрам и подтверждены сертификатами соответствия. Клетки культивировали по стандартным методикам.

Материалы и реагенты для культуральных работ. Культуральная среда Игла модифицированная Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM, кат. № 21068028); культуральная среда RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, кат. № 51800019); бессывороточная среда «CellGroDC» (кат. № 20801-0500 «CellGenix», Германия); антибиотик-антимикотик 100X: 10000 уд.ед./мл пенициллин/стрептомицин, 25 мкг/мл фунгизона (кат. № 15240096); эмбриональная телячья сыворотка (Fetal Bovine Serum, FBS кат. № 16000044); трипсин, модифицированный ЭДТА (0,25%, кат. № 25200056). Все реагенты производства компании Gibco (США). Рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, G-CSF (кат. № SRP3331, Merck, США); интерлейкин 4 (кат. № I17003, Merck, США); DAPI (NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent (кат. № R37606, Invitrogen, США); PBS (PhosphateBuffered Saline (10X), кат. № A1286301, Gibco, США); МТТ набор (MTT Cell proliferation assay kit, кат. № V13154, Invitrogen, США); раствор Хэнкса (Hank`S Balanced Salt Solution, HBSS, кат. № H6648 Merck, США).

Лекарственные субстанции. Темозоломид (T2577), ломустин (CCNU, L0745000), карбоплатин (C2538), 5-фторурацил (68941957), иринотекан (100286906), паклитаксел (33069624), клофазимин (2030639), целекоксиб (169590425), диклофенак натрия (15307796). Все лекарственные субстанции производства компании Merck (США).

Экспериментальные животные. Использовано 150 половозрелых крыс-самцов линии Вистар массой тела 180-220 г в начале эксперимента. Содержание и уход за животными осуществляли в соответствии с требованиями стандартов GLP, Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, директивой ЕС 2010/63/EU по экспериментам на животных; руководством национального института здоровья США по уходу и использованию лабораторных животных. Все исследования на животных

соответствовали рекомендациям ARRIVE и AVMA по эвтаназии 2013 г. Эксперимент *in vivo* одобрен Локальным этическим комитетом ДВФУ (протокол № 8 от 08.06.2023 г.).

Клетки костного мозга. Клетки получали согласно стандартной методике (Kovina et al., 2019). Животных одного помета (сиблингов) умерщвляли в соответствии с рекомендациями ARRIVE и AVMA, стерилизовали 5 мин. в 70% этаноле. Бедренные кости перетирали с добавлением 5 мл HBSS с 10 Ед/мл гепарина и полученную суспензию пропускали через 70 мкм фильтр, промывали, центрифугировали 5 мин. при 340g. Клетки ресуспендировали и подсчитывали в камере Горяева. Использование клеток костного мозга в эксперименте согласовано с Этическим комитетом ДВФУ (протокол № 1 от 10.01.2019 г.).

Опухолевоклеточная вакцина (ОКВ). Получение ОКВ состояло из 6 циклов моментального замораживания $3 \cdot 10^7$ клеток глиомы C6 до -196°C и оттаивания до комнатной температуры в фосфатно-солевом буфере без криопротектора.

Дендритноклеточная вакцина (ДКВ). Клетки костного мозга культивировали согласно стандартной методике (Балдуева И.А., 2020). Дифференцировку мононуклеарных CD45⁺ клеток в незрелые ДК проводили в сбалансированной бессывороточной среде «CellGro DC» с добавлением ГМ-КСФ (72 нг/мл) и ИЛ-4 (20 нг/мл). На 7-е сутки вносили лизированные ОК, инкубировали 48 ч, осаждали центрифугированием, отмывали в 5 мл 0,9% раствора NaCl и проверяли жизнеспособность и использовали в эксперименте *in vivo* в количестве 10^5 клеток на животное.

Метод получения клеток ГБ с индуцированной химиорезистентностью. Клетки T98G культивировали в среде, содержащей ТМЗ 150 мкмоль/л, в течение 72 ч. Мертвые клетки удаляли отмывкой средой после первого цикла обработки. Оставшиеся жизнеспособные клетки культивировали в свежей среде с добавлением 150 мкмоль/л ТМЗ в течение еще 72 ч. Через 72 ч мертвые клетки удаляли отмывкой свежей средой, а оставшиеся жизнеспособные клетки оставляли для повторного роста на 72 ч. Для подтверждения резистентности к ТМЗ проводили МТТ тест согласно протоколу производителя. Необработанные клетки использовали в качестве контроля.

Метод изучения цитотоксического действия лекарственных веществ *in vitro*. Клетки ($3 \cdot 10^4$) высевали в 24-луночные планшеты, культивировали в течение 24 ч (Greiner Bio-One Ltd.; 662160), затем ПКС меняли на новую с добавлением клофазимина и темозоломида, ломустина, 5-фторурацила, иринотекана, паклитаксела в концентрациях полумаксимального ингибирования. В качестве контроля использовали интактные ОК. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ теста согласно протоколу производителя. Необработанные клетки использовали в качестве контроля.

Метод проточной цитометрии. Исследование проводили на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter). Для каждого образца анализировали не менее 10000 событий. Чтобы отличить одиночные клетки от агрегатов, использовали сочетания пикового и интегрального сигнала флюоресценции DAPI. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения «Kaluzza Software, 10

UserNetworkPack» (FullVersion) и «ModFit TL» (Verity Software House). Результат выражали в виде процента клеток позитивных по каждому маркеру.

Вестерн-блоттинг белков проводили по стандартной методике производителя используя следующие первичные кроличьи антитела: актин (Abcam, ab8227; 1:1000), гистон H3 (Abcam, ab1791, 1:1000) E-кадгерин (Cell Signaling Technology, 3195, 1:500), N-кадгерин (Cell Signaling Technology, 4061, 1:200), β -катенин (8480; Cell Signaling Technology, 1:1000), а также вторичные козы антитела (Abcam, ab150077; 1:1000). Результаты проявляли с использованием автоматического иммунохимического анализатора Beckman Coulter (UniCel DxI 800).

ПЦР исследование. Для оценки уровня мРНК к β -катенину использовали ПЦР-анализ с обратной транскрипцией с использованием набора TRIzol™ Plus. Комплементарную ДНК получали из 1 мкг общей РНК из каждого образца с использованием SuperScript® VILO™ cDNA Master Mix. Все реагенты использовали в соответствии с инструкцией производителя Thermo Fisher Scientific.

Метод моделирования ГБ у животных. Животных наркотизировали путем в/б введения смеси (содержащей 200 мкл Золетил/Рометар 1:4). Клетки глиомы ($0,3 \cdot 10^6$ в 5 мкл) имплантировали в область каудопутамена с помощью стереотаксического аппарата (Narishige) в соответствии со стереотаксическими координатами атласа крыс Swanson: Ар – 1; Л – 3,0; V – 4,5; ТБС – 2,4 мм. Клетки вводили шприцем Hamilton со скоростью 5 мкл/мин. Опухоль была подтверждена через 10 дней с помощью магнитно-резонансной томографии на аппарате «Bruker's PharmaScan®» (США).

МРТ головного мозга проводили на МР-томографе «Bruker's PharmaScan®» (США) под общим наркозом с применением специальной магнитной катушки для мелких лабораторных животных. Объем опухолевого узла определяли по формуле: $V = 4/3 \cdot \pi \cdot abc$, где a , b , c – полуоси эллипсоида.

Метод экспериментального облучения *in vivo*. Животных наркотизировали путем в/б введения смеси (100 мкл Золетил/Рометар 1:4) и облучали в 24 Грея за 4 фракции.

Метод фармакологического тестирования *in vivo* животных с перевитой глиомой разделили на 5 равных групп (n=30) (Табл. 1):

Таблица 1 – Распределение экспериментальных животных по группам в рамках блока *in vivo*

Группа	Схема лечения
Контроль	–
ХЛТ	Облучение в 24 Грея за 4 фракции + ТМЗ 20 мг/кг перорально 7 дней
ХЛТ + КФЗ	Облучение в 24 Грея за 4 фракции + ТМЗ 20 мг/кг перорально + клофазимин 30 мг/кг перорально 7 дней
ОКВ + КФЗ	Облучение в 24 Грея за 4 фракции + ТМЗ 20 мг/кг перорально + клофазимин 30 мг/кг перорально 7 дней, на 8-й день ОКВ подкожно по 30 мкл
ДКВ + КФЗ	Облучение в 24 Грея за 4 фракции + ТМЗ 20 мг/кг перорально + клофазимин 30 мг/кг перорально 7 дней, на 8-й день ДКВ внутривенно

Морфологическое и иммуногистохимическое исследование выполнено по стандартному протоколу. Серийные срезы толщиной 7 мкм готовили на криостатном микротоме 60 (MicromHM 560, Thermo Scientific, США), окрашивали гематоксилин – эозином (Sigma-Aldrich, США) на 0,1 М ацетатном буфере с pH=3,5 (кат. № 31048,

FLUKA). Препараты изучали с помощью микроскопа AxioScope A1 и фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия).

Метод иммуноферментного анализа. Содержание β -катенина оценивали с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Оптическую плотность определяли на микропланшетном спектрофотометре BioRad xMark при длине волны $\lambda=450$ нм. Результат по каждой пробе вычисляли по калибровочной кривой, усредняли показатели 6 параллельных проб (в нг/мл).

Оценка выживаемости экспериментальных животных с перевиваемой опухолью проводилась построением кривой Каплана–Майера.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ «GraphPad Prism 4.0» (GraphPad Software, США). Применяли U-тест Манна–Уитни для малых групп. Результаты считались статистически значимыми при $U < U_{crit} = 46$ ($n=15$) для $\alpha=0,05$; и $U < U_{crit} = 51$ ($n=15$) для $\alpha=0,01$. Результаты исследований представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Дисперсионный анализ проводился с применением F-теста для сравнения множественных данных ($n_1=270$, $m_1=6$ – для ИЦХ; $n_2=72$, $m_2=6$ – для вестерн блоттинга; $n_3=40$, $m_3=4$ – для ПЦР; $n_4=150$, $m_4=5$ – для эксперимента *in vivo*), после чего проводился парный *post hoc* t-test с поправкой Бонферрони ($\alpha=0,05$). Результаты считались статистически значимыми при значениях частоты ошибок по семейству $p < \alpha$. IC₅₀ рассчитывалось с использованием модели нелинейной регрессии.

Результаты и обсуждение

Исследование противоопухолевой эффективности клофазимина на модели глиобластомы *in vitro*

Оценка влияния систематической обработки ОК темозоломидом. ОК, используемые в эксперименте, окрашивались антителами против ключевых маркеров опухолей нейроглиального ряда (Табл. 2).

Таблица 2 – Иммуноцитохимическая характеристика ОК, используемых в эксперименте.

%	С6		U87MG		T98G	
	Контроль	Резистентные к ТМЗ	Контроль	Резистентные к ТМЗ	Контроль	Резистентные к ТМЗ
PCNA	54,2 \pm 2,3	13,7 \pm 1,5	45,7 \pm 3,5	18,3 \pm 1,1	50,7 \pm 5,3	20,5 \pm 2,2
CD133	4,2 \pm 1,5	12,7 \pm 2,8	4,1 \pm 1,8	15,5 \pm 4,2	90,2 \pm 8,5	92,9 \pm 1,4
CD44	25,6 \pm 3,5	57,1 \pm 4,8	35,9 \pm 3,96	63,2 \pm 5,7	52,9 \pm 6,3	71,3 \pm 5,2
GFAP	9,5 \pm 2,1	3,5 \pm 1,2	11,5 \pm 2,5	8,8 \pm 5,2	3,4 \pm 2,2	2,5 \pm 3,2
β -катенин	25,8 \pm 1,9	56,7 \pm 2,3	28,1 \pm 1,76	44,4 \pm 4,5	32,6 \pm 1,1	49,6 \pm 3,7*
Е-кадгерин	31,2 \pm 4,6	21,9 \pm 2,1	36,5 \pm 3,7	22,1 \pm 1,3	52,1 \pm 0,9	49,4 \pm 1,7
N-кадгерин	17,9 \pm 1,3	35,8 \pm 3,5*	32,6 \pm 2,8	42,4 \pm 1,2	36,4 \pm 1,3	58,6 \pm 5,1*

Контрольные ОК обладали высокой пролиферативной активностью, которая была максимальной в отношении клеток линии С6. Число ОК иммунореактивных в отношении ключевого маркера пронеурального типа ОСК – антигена CD133 не превышало 4% в отношении клеток С6 и U87MG. Клетки линии T98G

характеризовались высоким содержанием клеток CD133⁺ иммунофенотипа. Число ОК, экспрессирующих интегральный антиген CD 44, известный как рецептор гиалуроновой кислоты, в культуре ОК было довольно велико, достигая максимальных значений в культуре ОК линии T98G. До трети популяции ОК окрашивались антителами к β -катенину, который был локализован преимущественно в цитоплазме (Рис. 1).

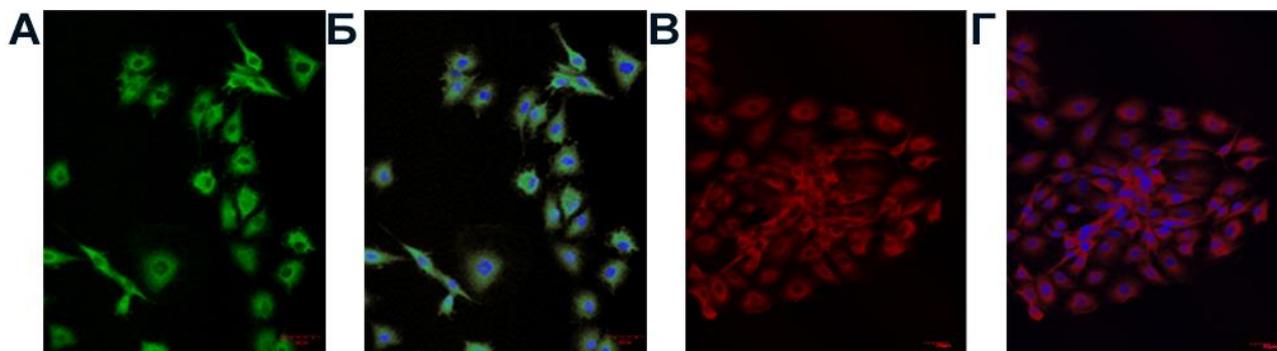


Рисунок 1 – Иммуноцитохимическая характеристика клеток С6 глиомы крысы, окраска антителами против: А. CD133; В. β -катенина. Б, Г. объединенные изображения с DAPI. Флуоресцентная лазерная микроскопия.

Обработка ТМЗ приводила к снижению количества пролиферирующих клеток, что особенно заметно для ОК линии С6, где количество PCNA-иммунореактивных клеток снижалось до $13,7 \pm 1,5\%$, и сопровождалось модификацией иммуноцитохимического профиля ОК. В культурах линии С6 и U87MG отмечалось некоторое увеличение числа элементов CD133⁺ иммунофенотипа. Одновременно, в культуре ОК линий С6 и U87MG число ОК иммунореактивных в отношении антигена CD44 возрастало до $56,7 \pm 2,3$ и $63,2 \pm 5,7\%$, соответственно, что практически вдвое больше в сравнении с контролем. Эта тенденция отмечена и в культуре ОК линии T98G, где их число составило $71,3 \pm 5,2\%$ от всей клеточной популяции.

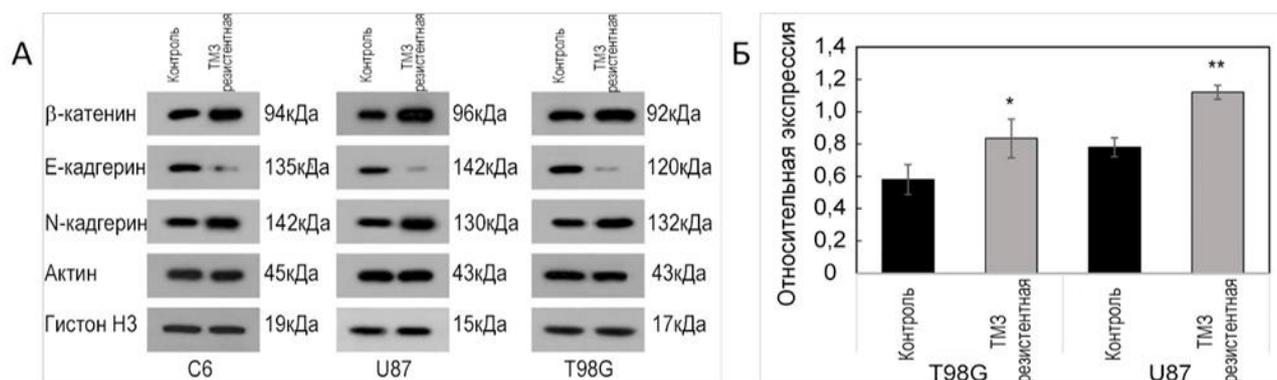


Рисунок 2 – Результаты: А. вестерн-блоттинга (цитоплазматический белок актин, и ядерный гистон H3 - контроль); Б. Уровень мРНК β -катенина в ОК линии U87MG и T98G.

С увеличением содержания элементов мезенхимального CD44⁺ фенотипа в культуре ОК с индуцированной резистентностью к ТМЗ возрастало число элементов, окрашивающихся антителами к β -катенину и миграционному N-кадгерину, при одновременном снижении уровня адгезионного E-кадгерина. Наблюдаемые изменения подтверждались данными вестерн-блоттинга (Рис. 2 А) и ПЦР – исследования (Рис. 2 Б).

С приобретением фармакорезистентности к ТМЗ степень дифференцировки ОК снижается, что сопровождается увеличением в составе клеточной популяции числа элементов иммунореактивных в отношении антигенов пронеурального – CD133 и CD44-мезенхимального фенотипа, накоплением в опухолевых клетках β -катенина и увеличением содержания в ОК миграционного N-кадгерина.

Иммуноцитохимическая характеристика клеток костного мозга крысы, использованных в эксперименте. Клетки, выделенные из костного мозга здоровых крыс, прикреплялись к поверхности планшета, выживали и пролиферировали, формируя скопления клеток округлой и полигональной формы (Рис. 3 А, Б). На момент начала культивирования 43,3±3,3% окрашивались антителами к антигену CD45.

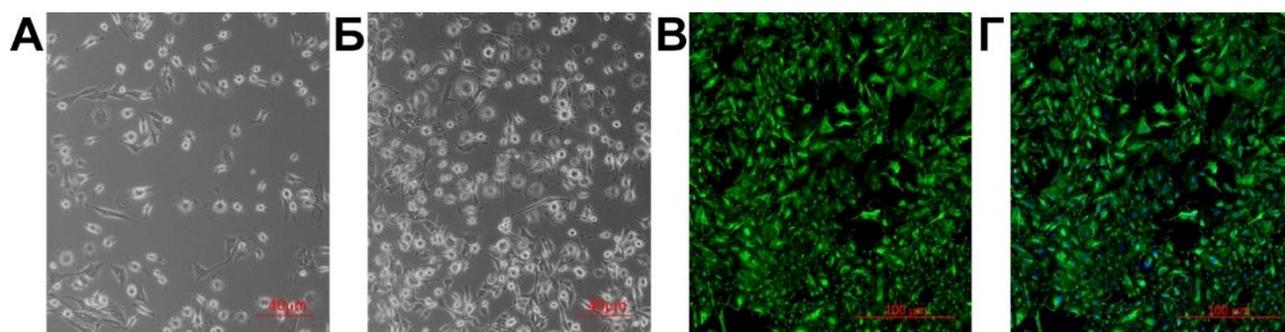


Рисунок 3 – Клетки костного мозга. А, Б. 3 и 7 день культивирования, световая микроскопия; В, Г. ИЦХ окраска антителами против CD45; объединенные изображения с DAPI. Флуоресцентная лазерная микроскопия.

Влияние клофазимина на подвижность клеток ГБ в тесте зарастания царапины в клеточном монослое. В контрольной культуре ОК линии С6 время зарастания царапины составило – 61,4±3,2 ч, для линии клеток линии U87MG – 55,3±3,3 ч и для Т98G – 60,5±4,5 ч. Под влиянием тестируемых препаратов подвижность ОК снижалась, увеличивалось время зарастания царапины в клеточном монослое. Данный эффект наиболее выражен у КФЗ – в концентрации 10 мкмоль/л время зарастания царапины в культуре клеток линии С6 увеличивалось до 79,2±4,5 ч. Наблюдаемый эффект усиливался с ростом концентрации КФЗ до 50 мкмоль/л, дальнейшее увеличение концентрации препарата сопровождалось развитием цитотоксического эффекта.

В культуре ОК линии U87MG сохранялась динамика, отмеченная при анализе культуры линии С6, при этом с ростом концентрации КФЗ до 50 мкмоль/л подвижность ОК достоверно снижалась. Дальнейшее увеличение дозы целекоксиба сопровождалось усилением цитостатического эффекта, однако итоговое время зарастания царапины в клеточном монослое в культуре ОК, содержащих целекоксиб в концентрации 250 мкмоль/л, было сопоставимо с таковым в культуре, содержащей 50 мкмоль/л КФЗ.

Важно, что в отношении клеток линии Т98G в диапазоне сравниваемых концентраций сохранялся цитостатический эффект КФЗ, который в концентрации 10 мкмоль/л обнаруживал достоверные отличия от интактного контроля и был сопоставим с целекоксибом.

Влияние клофазимина на подвижность фармакорезистентных клеток T98G в тесте зарастания царапины в клеточном монослое. Под влиянием перепрофилируемых тестируемых препаратов подвижность фармакорезистентных ОК снижалась более выражено по сравнению с интактной культурой, что проявлялось увеличением времени зарастания царапины в клеточном монослое. Данный эффект был наиболее выражен у КФЗ, который в концентрации 10 мкмоль/л увеличивал время зарастания царапины в культуре клеток до $120,45 \pm 13,7$ ч (Рис. 4 А). Наблюдаемый эффект усиливался с ростом концентрации КФЗ до 50 мкмоль/л, дальнейшее увеличение концентрации препарата сопровождалось развитием цитотоксического эффекта.

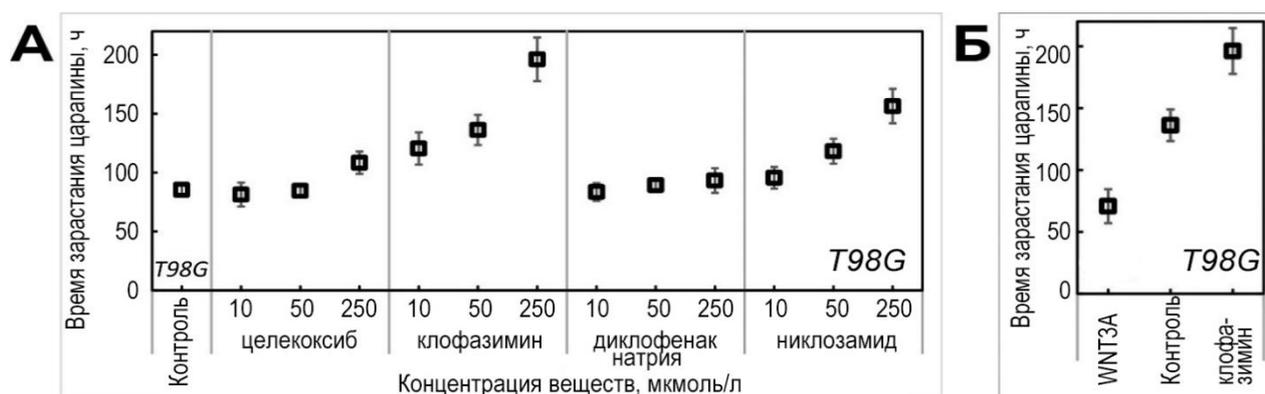


Рисунок 4 – Влияние перепрофилируемых лекарственных средств на подвижность ОК: А. ОК линии T98G в тесте зарастания царапины в клеточном монослое; Б. при стимуляции Wnt3A белком.

При обработке ОК Wnt3A белком подвижность клеток резко возросла по сравнению с интактным контролем, время зарастания царапины составило $72,5 \pm 6,5$ ч против $137,5 \pm 4,0$ ч (Рис. 4 Б). КФЗ в концентрации 50 мкмоль/л существенно снижал подвижность фармакорезистентных ОК, данный параметр составил $196,4 \pm 14,5$ ч.

Цитотоксическое действие клофазимина на модели глиобластомы. Клофазимин обладал наибольшей антиглиомной активностью в линейке протестированных ЛС, вызывая при концентрации $37,6 \pm 3,2$ мкмоль/л гибель более половины популяции клеток линии С6 за 24 ч наблюдений (Рис. 5 А). IC_{50} целекоксиба для ОК линии С6 составила $48,4 \pm 3,9$ мкмоль/л. Цитотоксическое действие целекоксиба уступало клофазимину и было сопоставимо с никлозамидом, IC_{50} которого для линии С6 составила $53,4 \pm 4,7$ мкмоль/л. Антиглиомный эффект всех протестированных ЛС существенно превосходил диклофенак.

Клетки ГБ линии U87MG обладали довольно высокой чувствительностью к клофазимину (Рис. 5 Б), которая в диапазоне полуингибирующих концентраций превосходила линию С6 ($IC_{50} = 29,0 \pm 1,3$ мкмоль/л). Подобная динамика характерна для целекоксиба и никлозамида, для данной линии ОК их IC_{50} составили $30,1 \pm 2,5$ и $44,3 \pm 0,7$ мкмоль/л, соответственно.

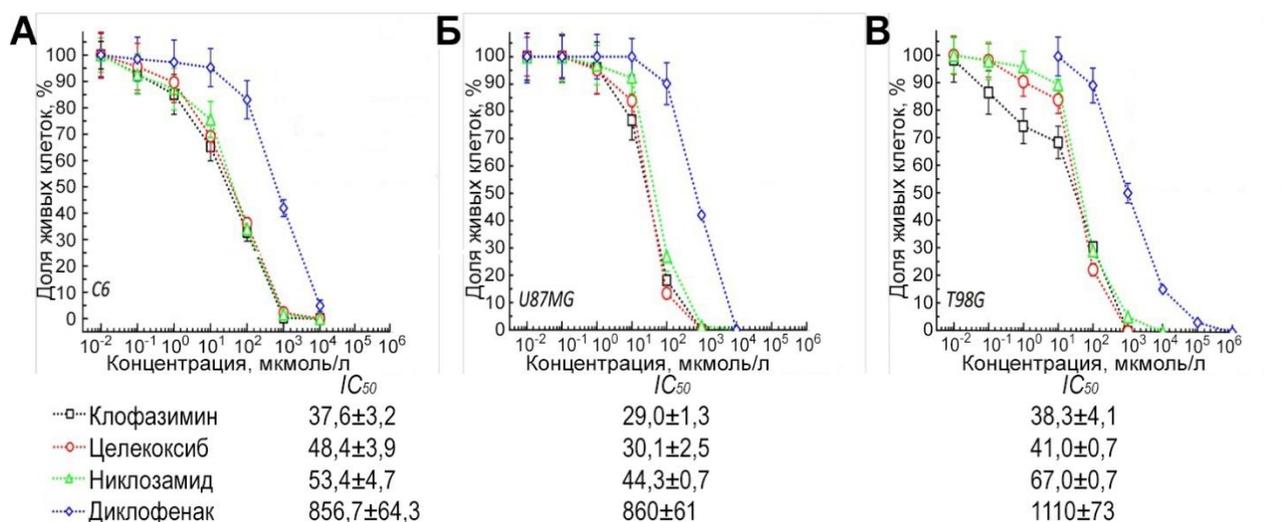


Рисунок 5 – Цитотоксическая активность ЛС в отношении ОК: А. линии С6, Б. линии U87MG, В. T98G. По оси ОХ – концентрации ПЛС, мкмоль/л; по оси ОУ – доля живых ОК, в % за 24 ч экспозиции.

Цитотоксическая эффективность клофазимина в отношении клеток ГБ линии T98G была сопоставима с линией С6. После 24 ч наблюдений IC_{50} для ОК линии T98G составила $38,3 \pm 4,1$ мкмоль/л. Целекоксиб и никлозамид в более высоких концентрациях сохраняли цитотоксический эффект, уступающий клофазимину (Рис. 5 В).

Влияние клофазимина на антиглиомную эффективность цитостатиков *in vitro*. В результате МТТ теста рассчитаны IC_{50} цитостатических лекарственных препаратов (Табл. 3).

Препарат, мкмоль/л	С6	U87MG	T98G
Ломустин (CCNU)	41,5±5,3	75,4±8,5	92,3±9,5
5-фторурацил (5-ФУ)	7,5±1,9	9,3±1,2	15,4±0,8
Иринотекан (ИТК)	3,5±1,2	4,6±0,4	6,3±0,4
Карбоплатин (КБП)	10,2±3,7	9,7±1,6	19,9±1,1
Паклитаксел (ПТС)	5,8±1,1	3,5±0,9	9,4±0,7

Таблица 3 – IC_{50} цитостатических лекарственных препаратов для ОК в эксперименте.

Клофазимин усиливал цитотоксическое действие ТМЗ, ломустина, 5-фторурацила, иринотекана, карбоплатина в диапазоне полуингибирующих концентраций в отношении ОК линии С6 (Табл. 4). Комбинация клофазимина с паклитакселом не приводило к достоверному усилению цитотоксического эффекта цитостатика в отношении интактного контроля.

Клофазимин усиливал цитотоксическое действие ТМЗ, ломустина, 5-фторурацила, паклитаксела в отношении ОК линии U87MG.

Клофазимин усиливал цитотоксическое действие ТМЗ, карбоплатина, паклитаксела в диапазоне полуингибирующих концентраций в отношении ОК контрольной линии T98G (Табл. 4). Комбинация клофазимина с ломустином, 5-ФУ, иринотеканом в диапазоне полуингибирующих концентраций не приводила к достоверному усилению цитотоксического эффекта цитостатиков в отношении интактного контроля.

Таблица 4 – Результаты совместного фармакологического тестирования на клетках глиобластомы *in vitro*.

%	–	ТМЗ	ТМЗ+ КФЗ	ССНУ	ССНУ+ КФЗ	5- ФУ	5-ФУ +КФЗ	ИТК	ИТК+ КФЗ	КБП	КБП+ КФЗ	ПТС	ПТС+ КФЗ
С6	100,00 ±3,24	48,61 ±3,70	32,18 ±3,01	48,49 ±3,95	41,30 ±3,94	45,81 ±4,89	40,23 ±3,72	50,93 ±5,35	43,95 ±5,58	44,88 ±3,96	35,12 ±2,79	51,40 ±4,41	44,65 ±4,65
U87MG	98,61 ±5,80	51,97 ±4,41	39,44 ±3,72	46,17 ±4,87	38,28 ±3,48	46,98 ±4,65	38,84 ±4,65	51,51 ±5,10	47,33 ±3,95	45,12 ±3,95	39,30 ±2,79	49,30 ±4,89	35,58 ±3,02
T98G	97,45 ±8,58	52,33 ±4,65	34,65 ±3,02	48,72 ±4,88	47,10 ±3,02	46,87 ±3,94	44,55 ±3,01	49,07 ±4,19	46,05 ±2,79	51,28 ±5,10	41,53 ±3,02	50,70 ±4,88	36,05 ±3,02

Влияние клофазимина на антиглиомную эффективность цитостатиков на модели глиобластомы с индуцированной резистентностью к темозоломиду. При последовательной двукратной обработке ТМЗ клеток линии Т98G происходило достоверное снижение его цитотоксической активности. Показатель IC₅₀ ТМЗ для линии Т98G составил 972,4±19,6 мкмоль/л против 735,3±23,6 мкмоль/л в контроле.

В диапазоне IC₅₀ для фармакорезистентных ОК (Табл. 5), тестируемые препараты демонстрировали менее выраженное цитотоксическое действие в отношении клеток ГБ (Рис. 6).

Препарат, мкмоль/л	T98G
Ломустин	148,7±13,2
5-фторурацил	37,5±2,9
Иринотекан	11,5±1,3
Карбоплатин	23,8±2,5
Паклитаксел	15,7±1,8

Таблица 5 – IC₅₀ цитостатиков для фармакорезистентных ОК линии Т98G.

КФЗ достоверно усиливал цитотоксическое действие ломустина и карбоплатина в отношении фармакорезистентных ОК Т98G глиобластомы человека (Рис. 6 А, В).

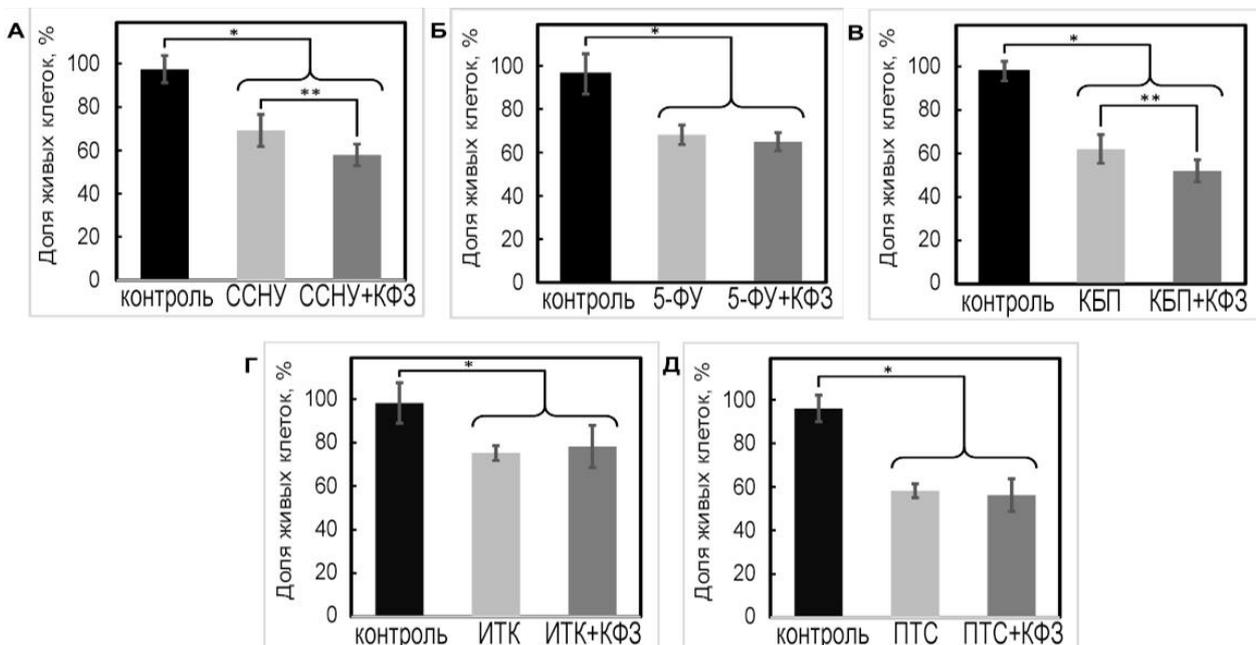


Рисунок 6 – Результаты совместного фармакологического тестирования на фармакорезистентных клетках Т98G глиобластомы человека *in vitro*. По оси ОХ – тестируемые вещества и их комбинация, по оси ОУ – % жизнеспособных клеток за 24 ч экспозиции. Контроль – интактные клетки.

Исследование противоопухолевой эффективности клофазимина на модели глиобластомы *in vivo*

Имплантация клеток глиомы С6 в мозг экспериментальных животных приводила к развитию объемных опухолей (Рис. 7).

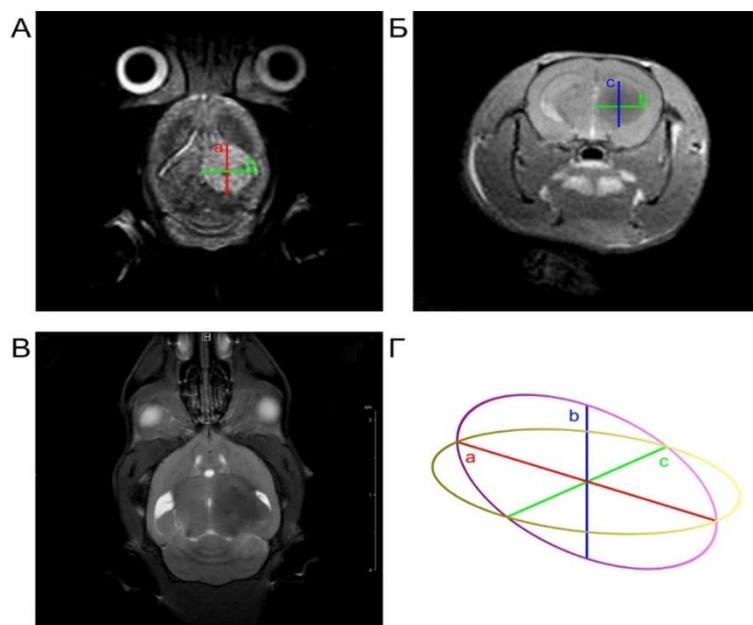


Рисунок 7 – Опухоль в мозге экспериментальных животных (магнитно резонансная томография, T1-взвешенный режим). А. сагиттальное; Б. фронтальное изображения; В-Г. срезы мозга в сагитальной проекции; Е. схема вычисления объема эллипса: а, b, с – полуоси эллипсоида.

Химиолучевая терапия сопровождалась значимым уменьшением объема опухоли в головном мозге крыс (Рис. 8 А), при этом у экспериментальных животных группы ОКВ+КФЗ и ДКВ+КФЗ вызывало достоверно значимое изменение объема опухоли в мозге крыс по сравнению с группой ХЛТ, однако приводило к усилению продукции провоспалительных цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных (Рис. 8 Б). У крыс, получивших после курса химиолучевой терапии дендритноклеточную вакцину и клофазимин повышение уровня цитокинов было более очевидным, однако введение ОКВ в комбинации с клофазимином сопровождалась формированием очагового уплотнения в области введения иммунологического адьюванта.

Морфологическая характеристика области введения опухолевых клеток вакцины в организм животных с глиомой С6 после ХЛТ. При морфологическом исследовании срезов мягких тканей голени крыс с глиомой С6, в области введения ОКВ

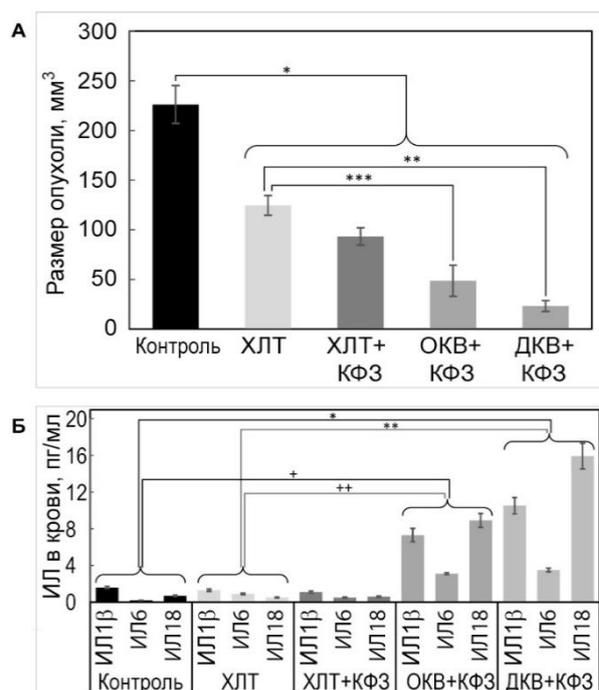


Рисунок 8 – А. Размер опухолевого узла в мозге крыс сравниваемых групп (мм³), 30 день эксперимента; Б. Уровень ИЛ у животных различных групп. Контроль – интактные животные.

определялась трапециевидная зона коагуляционного некроза (Рис. 9 А) с очертаниями некротизированных миоцитов, наличием апоптотических телец, выраженной перифокальной инфильтрацией сегментоядерными нейтрофилами, эозинофилами, лимфоцитами, плазматическими клетками, макрофагами и гигантскими многоядерными клетками (Рис. 9 Б-Г).

Инфильтрация захватывала поперечно-полосатую мышечную и жировую ткань с формированием олеогранулем (Рис. 9 Д), окруженных очагами грануляционной ткани различной степени зрелости с признаками ангиогенеза, полнокровием новообразованных сосудов, скоплениями полиморфноядерных лейкоцитов (Рис. 9 Е).

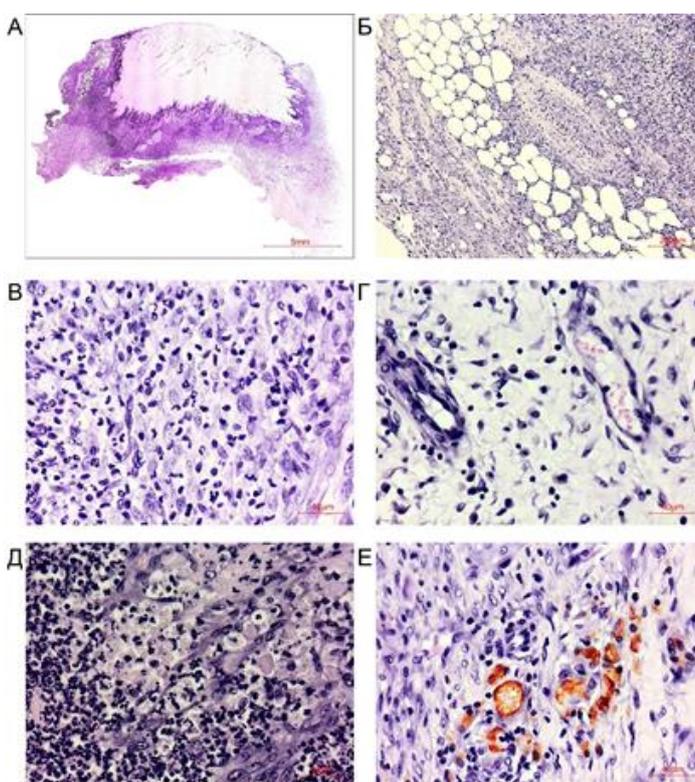


Рисунок 9 – Морфологическая характеристика области введения ОКВ в лапку экспериментального животного, 14 день эксперимента, окраска гематоксилин-эозином.

Оценка морфологических и иммуногистохимических параметров опухоли в мозге крыс при иммунотерапии. ИТ, включающая как введение ОКВ, так и введение ДКВ в комбинации с клофазимином, сопровождается увеличением содержания микроглии в опухоли (Рис. 10 А), воспалительной активацией микроглии (Рис. 10 Б) и уменьшением содержания β -катенина в ткани мозга (Рис. 10 В). Данные иммуногистохимического (ИГХ) исследования (на 28-й день эксперимента, Рис. 11-13) четко коррелировали с результатами ИФА.

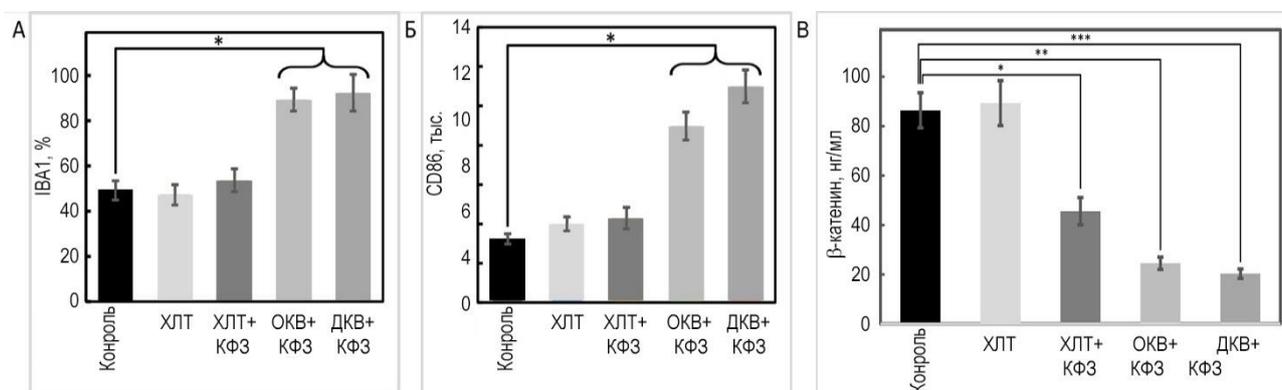


Рисунок 10 – Результаты иммуноферментного анализа ткани мозга крыс с глиомой С6 на содержание: А. IBA1; Б. CD68; В. β -катенина.

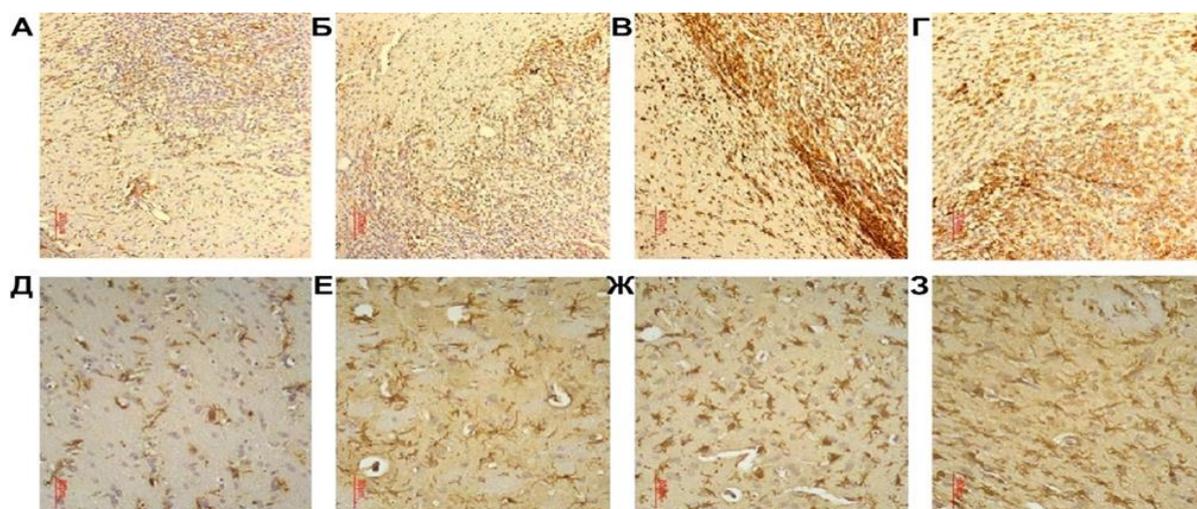


Рисунок 11 – Неопластическая ткань (↑ ряд) и перитуморальная зона (↓ ряд) в мозге крыс с глиомой С6. ИГХ окрашивание антителами против IBA-1: А, Д. ХЛТ; Б, Е. ХЛТ+КФЗ; В, Ж. ОКВ+КФЗ; Г, З. ДКВ+КФЗ.

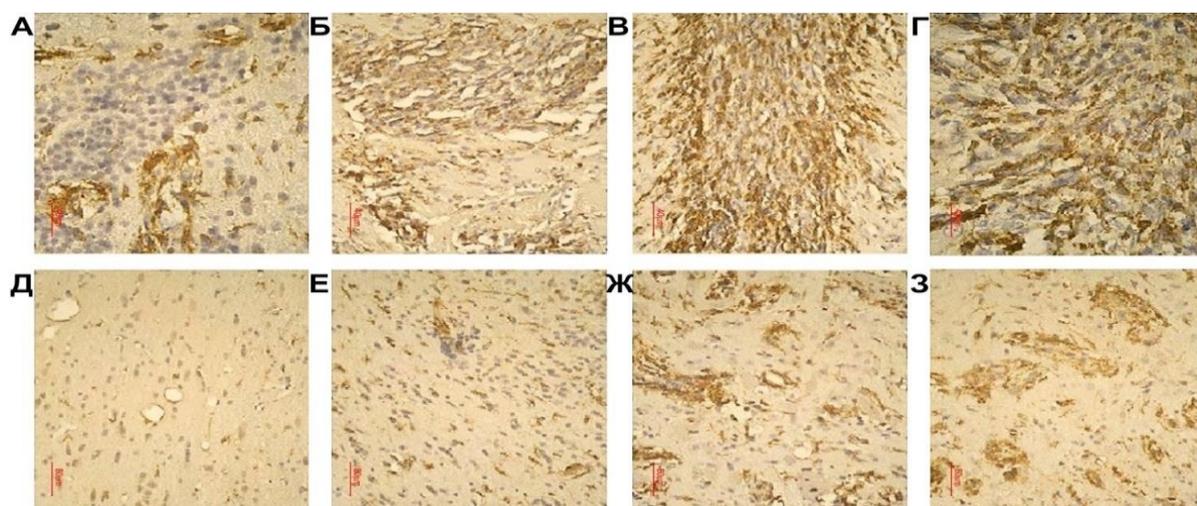


Рисунок 12 – Неопластическая ткань (↑ ряд) и перитуморальная зона (↓ ряд) в мозге крыс с глиомой С6. ИГХ окрашивание антителами против CD68: А, Д. ХЛТ; Б, Е. ХЛТ+КФЗ; В, Ж. ОКВ+КФЗ; Г, З. ДКВ+КФЗ.

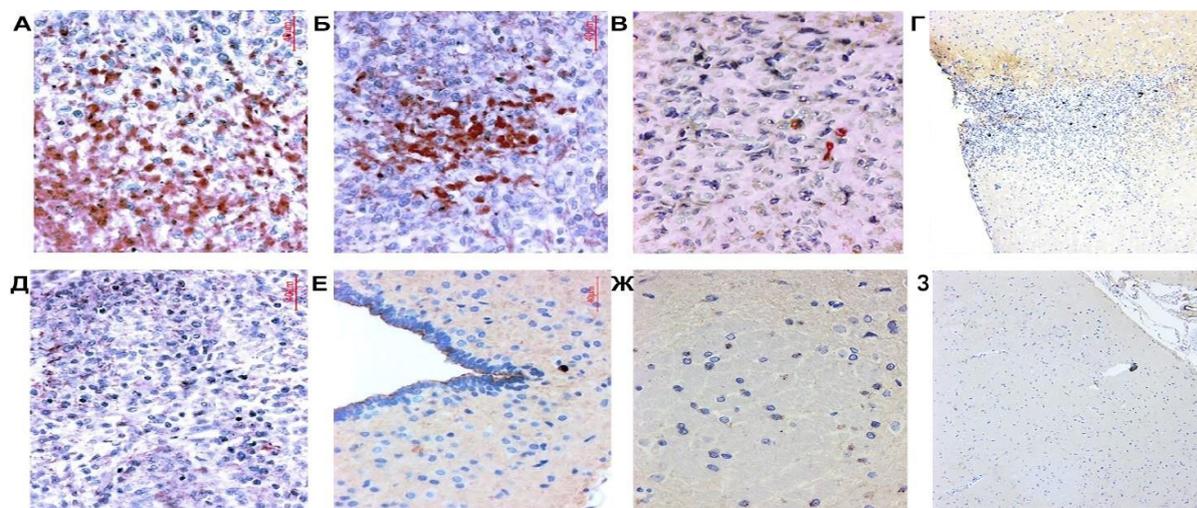


Рисунок 13 – Неопластическая ткань (↑ ряд) и перитуморальная зона (↓ ряд) в мозге крыс с глиомой С6. ИГХ окрашивание антителами против β -катенина: А, Д. ХЛТ; Б, Е. ХЛТ+КФЗ; В, Ж. ОКВ+КФЗ; Г, З. ДКВ+КФЗ.

Выживаемость экспериментальных животных. Медиана выживаемости экспериментальных животных контрольной группы составила $24,5 \pm 2,5$ дня, группы ХЛТ – 45 ± 5 дня (Рис. 14), а группы ХЛТ+КФЗ – 60 ± 12 дней. Медиана выживаемости крыс, получивших ОКВ совместно с клофазимином, была достоверно больше и составила $76,5 \pm 6,5$ дня, что указывает на стратегически важную роль ИТ в лечении ГБ. При этом, у животных группы ДКВ+КФЗ медиана выживаемости была максимальной и составила 90 ± 7 дня.

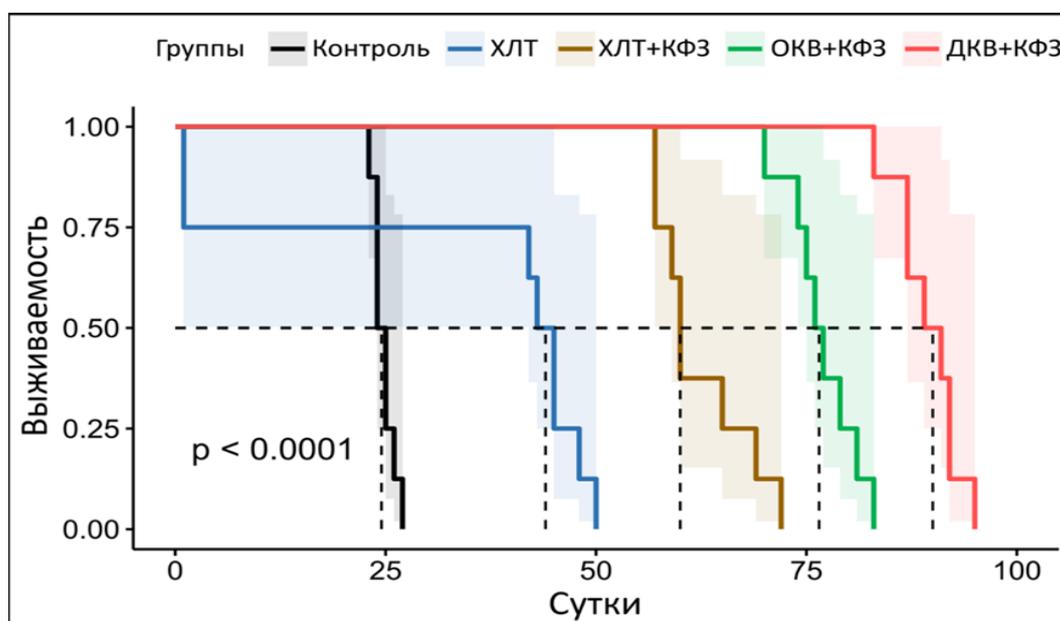


Рисунок 14 – Выживаемость экспериментальных животных по Каплану–Майеру.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Химиотерапия – это достижение человечества и единственный метод, способный продлить жизнь больного ГБ. Существенным ограничением на пути реализации всех антиглиомных возможностей химиотерапии является развитие резистентности к цитостатикам. Результаты настоящего исследования позволяют внести определенный вклад в дискуссию о молекулярных и клеточных механизмах резистентности клеток инвазивных злокачественных глиом к химиопрепаратам.

Согласно результатам проведенных исследований, обработка клеток ГБ цитостатиками сопровождается селекцией ОК определенного фенотипа, экспрессирующих примитивный пронеуральный антиген CD133, который является ключевым маркером ОСК и ассоциируется с крайне неблагоприятным прогнозом. Весьма показательным фактом является увеличение содержания в ОК β -катенина и усиление экспрессии антигена CD44, известного как маркер особо агрессивного «мезенхимального» фенотипа. Картину дополняет накопление в химиорезистентных ОК миграционного N-кадгерина и снижение содержания адгезионного E-кадгерина. Подобное кадгериновое переключение указывает на возросшую инвазивную активность ОК и является ведущим признаком пронеурально-мезенхимального перехода, перманентно генерирующего все новые и новые популяции ОСК.

В реальной клинической практике подобная ситуация не оставляет врачу и больному никаких шансов, кроме как принять неизбежное. Вместе с тем, ломустин и паклитаксел сохраняют довольно высокие цитотоксические свойства в отношении химиорезистентных ОК, а противолепрозный препарат клофазимин в концентрации 37,6 мкмоль/л вызывает гибель половины популяции клеток глиомы линии С6 и демонстрирует приемлемые IC_{50} для клеток глиобластомы линий U87MG и T98G – 29,0 и 38,3 мкмоль/л. В диапазоне полуингибирующих концентраций клофазимин усиливает цитотоксическую активность темозоломида в отношении клеток глиомы линий С6 и T98G, оказывает цитостатическое и цитотоксическое действие на клетки глиом, эффективность которого усиливается в комбинации с другими цитостатиками.

Вероятно, антиглиомный эффект клофазимина связан с подавлением компонентов *Wnt*-сигнального каскада, однако данное предположение нуждается в дальнейшем изучении. Тем не менее, клофазимин еще практически не применялся как антиглиомное средство, и его способность усиливать цитотоксическое действие ТМЗ и некоторых других конвенционных онкологических препаратов свидетельствует о наличии большого антиглиомного потенциала. Об этом свидетельствуют результаты эксперимента *in vivo*, где препарат усиливал антиглиомное действие химиолучевой терапии, что сопровождалось снижением содержания в неопластической ткани β -катенина и улучшением функционального статуса экспериментальных животных.

Однако недостатки химиотерапии – прямое следствие ее несомненных достоинств, лейкопения, токсический агранулоцитоз и иммунодефицит неизбежно сопровождают любую, даже самую эффективную схему лечения цитостатиками. В нашем эксперименте ХЛТ уменьшала объем опухоли в мозге экспериментальных животных, что сопровождалось значительным снижением числа элементов числа CD 45⁺ иммунцитов в кровеносном русле. Подобная ситуация является одним из ключевых критериев клинической релевантности проведенного эксперимента. Неразрывная связь положительного клинического эффекта от химиотерапии и необходимости его удержать путем коррекции лейкопении послужили основанием для утверждения о наступлении эры иммунотерапии в нейроонкологии.

Показательно, что введение ОКВ и ДКВ в организм животных с глиомой С6 после экспериментальной ХЛТ сопровождается усилением противоопухолевого иммунного ответа в виде развития локальной воспалительной реакции, увеличения содержания интерлейкина 1β и 18 в сыворотке крови, увеличением содержания IBA1⁺, CD68⁺ провоспалительно активированной микроглии в опухолевой ткани. Комбинированное использование ДКВ и клофазимина ведет к значительному уменьшению содержания β -катенина в веществе мозга, что сопровождается максимальной выживаемостью экспериментальных животных. Полученные результаты свидетельствует, что иммунотерапия усиливает антиглиомный потенциал клофазимина и подобная комбинация может быть использована не только для коррекции внутренних молекулярных механизмов пластичности ОСК, но и комплексной регуляции микроокружения этого типа клеток (Рис. 15).

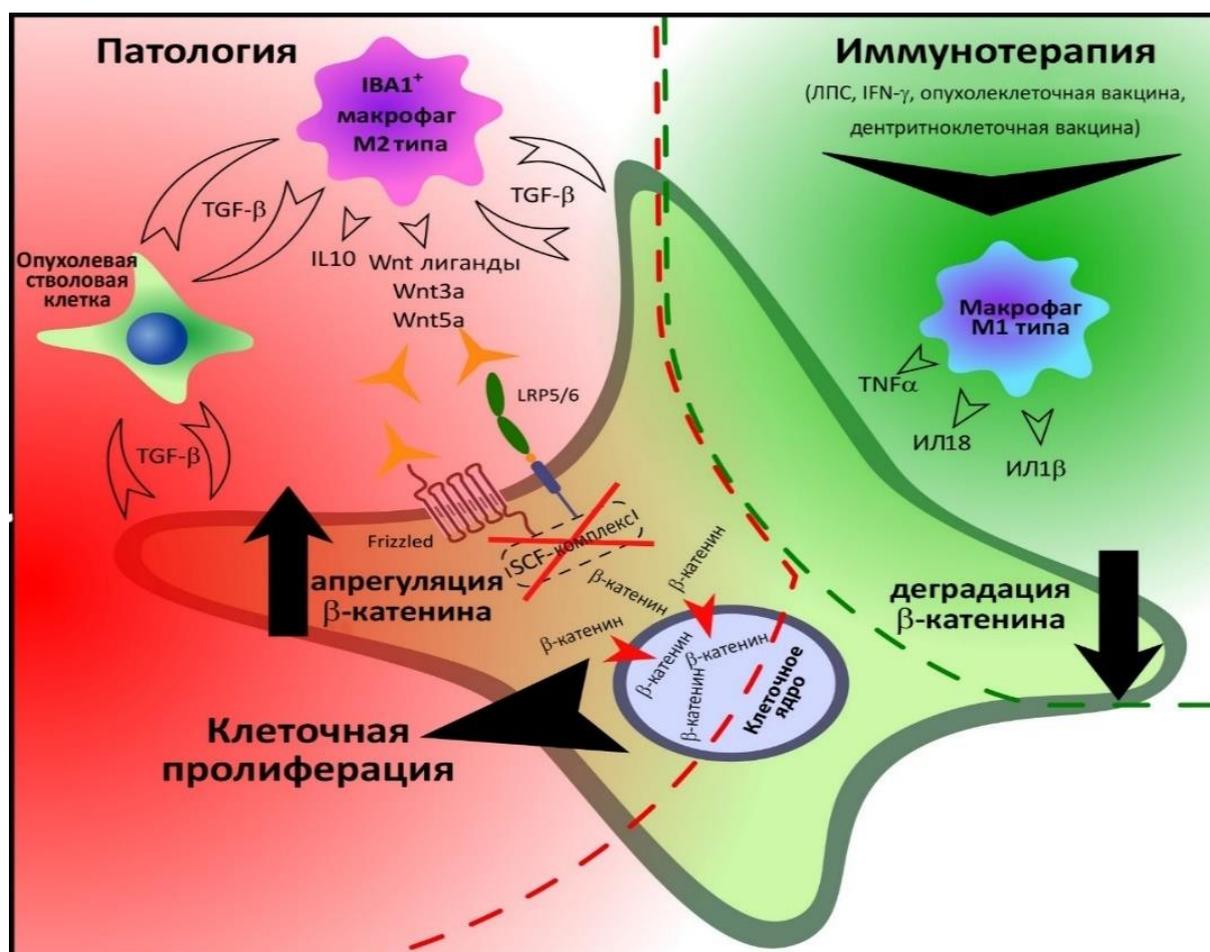


Рисунок 15 – Итоговая схема коррекции внутренних и внешних механизмов пластичности стволовых клеток глиобластомы.

ВЫВОДЫ

1. Клофазимин оказывает дозозависимое цитостатическое и цитотоксическое действие на опухолевые клетки линий U87MG и T98G глиобластомы человека, а также С6 глиомы крысы. Антиглиомная эффективность клофазимина возрастает с увеличением содержания β -катенина в ОК.

2. Клофазимин ($p < 0,05$) усиливает цитотоксическое действие темозоломида, ломустина и 5-фторурацила в отношении клеток глиальных опухолей линий С6 и U87MG, а также цитотоксическое действие карбоплатина и паклитаксела в отношении ОК глиобластомы человека линии T98G. Цитотоксическое действие ломустина и карбоплатина в отношении опухолевых клеток линии T98G глиобластомы с индуцированной резистентностью к темозоломиду в комбинации с клофазимином достоверно ($p < 0,05$) возрастает.

3. Клофазимин усиливает антиглиомное действие химиолучевой терапии, что сопровождается уменьшением объема опухоли в мозге, увеличением массы тела и улучшением функционального статуса экспериментальных животных.

4. Комбинация клофазимина с опухолевомклеточной или дендритноклеточной вакцинами сопровождается увеличением числа $CD45^+$ $CD68^+$ иммунцитов и интерлейкинов 1β и 18 в крови крыс с глиомой С6, усилением воспалительной реакции,

и увеличением числа IBA1⁺ CD68⁺ клеток микроглии в опухолевом очаге, снижению содержания β-катенина в веществе мозга и максимальной выживаемостью экспериментальных животных.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется использовать разработанную модель химиорезистентной линии глиобластомы человека для тестирования новых лекарственных препаратов и их комбинаций.
2. Рекомендуется провести доклинические исследования с целью подтверждения практического значения антиглиомагического действия клофазимина в комбинации с иммунотерапией.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ и/или входящих в международные базы данных Scopus и Web of Science:

1. Bryukhovetskiy, I. Glioblastoma: What can we do for these patients today and what will we be able to do in the future? / I. Bryukhovetskiy, **A. Kosianova**, S. Zaitsev, O. Pak. [et al.] // Prog Brain Res. – 2021. – Vol. 265. – P. 99–118.
2. **Kosianova, A.** Natural molecules as modulators of epigenetic silencing in human cells for cancer care and aging / **A. Kosianova**, V. Tiasto, M. Yatsunskaya, [et al.] // Biological Communications. – 2020. – Vol. 65, № 4. – P. 315–330.
3. **Косьянова, А.А.** Клофазимин усиливает антиглиомагическую активность темозоломида в эксперименте *in vivo* / **А.А. Косьянова**, С.В. Зайцев, О.И. Пак, И.С. Брюховецкий // Дальневосточный медицинский журнал. – 2023. – Т № 3. – С. 72–78.
4. **Косьянова, А.А.** Клофазимин и целекоксиб усиливают противоопухолевое действие темозоломида на модели ГБ *in vitro* / **А.А. Косьянова**, И.С. Брюховецкий // Дальневосточный медицинский журнал. – 2023. – Т № 4. – С.40–47.
5. **Kosianova, A.** Regulation of cancer stem cells and immunotherapy of glioblastoma (Review) / **A. Kosianova**, O. Pak, I. Bryukhovetskiy // Biomedical reports. – 2024. – Vol. 20, № 24. – 17 p.

Публикации в материалах конференций:

1. **Косьянова, А.А.** Разработка темозоломид-резистентной клеточной модели мультиформной глиобластомы для тестирования новых противоопухолевых препаратов / **А.А. Косьянова** // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2023. – Т. 22, № S6. – С.105–106.
2. **Косьянова, А.А.** Изучение антипролиферативной активности лекарственных препаратов с доказанной *Wnt*-ингибирующей активностью на модели глиобластомы T98G *in vitro* / **А.А. Косьянова**, О.С. Гранкина // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2023. – Т. 22, № S6. – С.91–92.

3. Гранкина О.С. Репозиционируемые лекарственные препараты Wnt-ингибиторы в комплексной терапии мультиформной глиобластомы/ О.С. Гранкина, **А.А. Косьянова** // Будущее биомедицины. – 2023. – С. 40.
4. **Косьянова, А.А.** Антиглиомная активность клофазимина *in vivo* / **А.А. Косьянова**, И.А. Выговская, С.В. Зайцев, [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т.21, № S2. – С. 36.
5. **Косьянова, А.А.** Природные соединения как эпигенетические модуляторы старения и связанных с возрастом заболеваний / **А.А. Косьянова**, С.А. Рыбцов, А.М. Каганский // Биопсихологический возраст и здоровье профессионалов. – 2020. – С. 36–44.

Косьянова Александра Асадовна

**ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛОФАЗИМИНА НА МОДЕЛИ
ГЛИОБЛАСТОМЫ**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Формат 60x84/16. Усл. п. л. 1,4. Уч.-изд. л. 1
Тираж 100 экз. Заказ ____

Отпечатано в типографии
Издательства ДВФУ
690091, г. Владивосток, ул. Пушкинская, 10