

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Глушакова Руслана Ивановича  
на диссертационную работу Косьяновой Александры Асадовны на тему  
«Противоопухолевый потенциал клофазимина на модели глиобластомы»,  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология

### Актуальность исследования

Несмотря на активное развитие молекулярной биологии и таргетной терапии злокачественных новообразований, в настоящее время эффективное лечение глиобластомы заключается в максимальном сочетании хирургической агрессии и/или радиотерапевтического воздействия и противоопухолевой лекарственной терапии, при этом арсенал цитостатиков, используемых для лечения злокачественных новообразований центральной нервной системы, крайне ограничен. Необходимость поиска как новых мишеней, так и эффективных лекарственных средств для лечения глиобластом является крайне актуальной задачей экспериментальной и клинической онкологии в тесном взаимодействии с фармакологией и молекулярной биологией.

Существующий несколько десятилетий глобальный порядок регистрации и вывода на рынок новых лекарственных препаратов при всей своей тенденции к модернизации и поиску новых лекарственных мишеней оставил «за бортом истории» лекарственные субстанции, которые были синтезированы в XX веке, так как расширение показаний для этих субстанций не окупает затраты на клинические исследования. Точечное репозиционирование эффективности лекарственных средств, проводимое научными организациями и малыми научными группами, нередко позволяет расширить показания для уже зарегистрированных лекарственных средств. В

отношении нейрональных опухолей лекарственные препараты с *Wnt*-сигнальным каскадом в качестве мишени, активация которого ведет к активации клеточной пролиферации. В данной связке «лиганд-мишень» противолепрозный препарат клофазимин, ранее продемонстрировал свою противоопухолевую активность в исследованиях *in vitro* с несколькими стандартно используемыми клеточными линиями: рака молочной железы, колоректальной аденокарциномы и рака яичников. Механизм противоопухолевой активности клофазимина, как предполагается, опосредован подавлением экспрессии генов *Wnt*-сигнального каскада, что сопровождается снижением уровня цитоплазматического  $\beta$ -катенина и приводит к подавлению пролиферативной активности опухолевых клеток.

Таким образом, работа А.А. Косьяновой по изучению противоопухолевого потенциала клофазимина на экспериментальных моделях глиобластомы, является актуальным и фундаментальным научным исследованием с возможностью практического внедрения полученных результатов.

### **Научная новизна**

Несмотря на определенный реализм рецензента относительно настоящего и будущего лекарственного лечения глиобластом, можно постулировать, что диссертанткой были впервые получены крайне интересные результаты. Впервые установлена зависимость между пролиферативной активностью опухолевых клеток глиобластомы и содержанием в них  $\beta$ -катенина, между содержанием этого белка и химиорезистентностью опухолевых клеток глиобластомы. Продемонстрировано повышение подвижности химиорезистентных опухолевых клеток и усиление в них экспрессии миграционного N- кадгерина и антигенов пронеурального - CD133

и мезенхимального - CD44 фенотипа. Продемонстрирована способность клофазимина угнетать подвижность клеток глиобластомы, более выраженная в отношении химиорезистентных опухолевых клеток. Автором впервые установлено дозозависимое цитотоксическое действие клофазимина на клетки глиобластомы. Показана его способность усиливать цитотоксическую активность темозоломида и некоторых других широко используемых в нейроонкологии цитостатиков.

Клофазимин усиливает противоопухолевое действие химиолучевой терапии у крыс с глиомой C6, что сопровождается снижением содержания  $\beta$ -катенина в неопластической ткани, уменьшением размера опухоли и улучшением функционального статуса экспериментальных животных. Автором впервые показано, что комбинация химиолучевой терапии с клофазимином и экспериментальной иммунотерапией сопровождается увеличением содержания CD45<sup>+</sup> CD68<sup>+</sup> иммунцитов и интерлейкинов 1 $\beta$  и 18 в крови крыс с глиомой C6, увеличением числа провоспалительной CD68<sup>+</sup> микроглии в опухолевом очаге, а также снижением содержания  $\beta$ -катенина в веществе мозга и максимальной выживаемостью экспериментальных животных.

Рецензируемая работа может быть квалифицирована как доказательное исследование в области экспериментальной и клинической фармакологии, а также экспериментальной онкологии.

#### **Практическое и теоретическое значение исследования**

Теоретическое значение работы заключается в разработке экспериментальной модели рецидивирующей глиобластомы, что открывает новые возможности в изучении механизмов резистентности к существующей химиотерапии. Подтвержденная экспериментальными данными противоопухолевая активность клофазимина на модели глиобластомы как в

комбинации с иммунотерапией, так и без нее, демонстрирует перспективность поиска препаратов для лечения нейрональных опухолей среди *Wnt*-ингибиторов.

Экспериментальные данные используются в учебном процессе ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет». Материалы работы также могут быть включены в курсы лекций по фармакологии, клеточной биологии, онкологии.

Полученные результаты прошли всестороннюю апробацию. По материалам диссертации автором опубликовано 5 статей в научных журналах, входящих в список ВАК России, и реферируемых базами данных Scopus / Web of Science.

#### **Степень обоснованности и достоверности исследований**

Диссертационная работа представляет собой серию экспериментальных наблюдений по типу «субстанция-эффект», объединенных общей целью и отличающейся поставленными задачами. Научно-методические подходы, использованные автором при планировании и проведении серии экспериментов, анализе данных, соответствуют современным требованиям к медико-биологическим наукам. Обращает на себя внимание набор современных методов исследования: проточная цитофлуиметрия, вестерн-блоттинг белков, ПЦР-анализ с обратной транскрипцией. Это позволяет квалифицировать результаты диссертационной работы как достоверные, а основные положения, выносимые на защиту, и выводы, обоснованными.

Представленные в диссертации данные следует рассматривать как новые, имеющие важное теоретическое и практическое значение для базисной и клинической фармакологии и онкологии.

## Структура и оформление работы

Диссертация написана в классическом стиле и имеет традиционную структуру: введение, обзор литературы, главу с описанием материалов и методов, главу с описанием результатов собственных исследований и главу с их обсуждением, заключение, выводы, практические рекомендации, список использованной литературы, перечень сокращений. Научная работа иллюстрирована 41 рисунком и 7 таблицами. Литературный указатель содержит 245 ссылок, из них 33 отечественных и 212 иностранных.

Во введении (С.5-9) обоснован выбор темы исследования, показана ее актуальность и научная новизна, теоретическая и практическая и значимость полученных результатов, определены цель и задачи исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту. Представлены данные об апробации результатов исследования на международных конференциях и конгрессах.

Обзор литературы (С. 10-33) содержит современное представление об эпидемиологии и патогенезе глиобластомы. Представлены обоснования выбора перепрофилируемых лекарственных препаратов с *Wnt*-ингибирующей активностью, в частности, клофазимина, в качестве перспективного направления поиска нового антиглиомного препарата. Следует отметить, что в работе имеются определенные терминологические особенности, которые по большей степени связаны с вариативностью перевода с иностранных источников для неспециалиста в области клинической онкологии, например, «ингибиторы иммунного чек-пойнта», миелоидная лейкемия», отсутствие символа % при указании индекса Карновского. Однако данные погрешности не снижают ценности данной главы.

В главе «Материалы и методы» (С. 34-45) приведено описание и происхождение используемых клеточных линий, реагентов,

экспериментальных животных. Использован и описан широкий набор современных методов *in vitro* и *in vivo* исследований.

В главе «Результаты собственных исследований» (С.45-89) автор описывает иммуноцитохимическую характеристику чувствительных к лекарственным средствам и химиорезистентных опухолевых клеток глиобластомы. продемонстрирована корреляционная связь между пролиферативной активностью опухолевых клеток, содержанием в них  $\beta$ -катенина и резистентностью к темозоломиду. Установлено, что увеличением содержания  $\beta$ -катенина опухолевые клетки становятся более подвижными, усиливается экспрессия в них миграционного N-кадгерина и антигенов пронеурального - CD133 и мезенхимального - CD44 фенотипа.

В главе описаны результаты по оценке цитотоксической и цитостатической активности перепрофилируемых лекарственных препаратов на опухолевых и химиорезистентных опухолевых клетках глиобластомы. Показана способность клофазимина угнетать подвижность клеток глиобластомы. Установлено, что клофазимин оказывает дозозависимое цитотоксическое действие на опухолевые клетки глиобластомы. Определены  $IC_{50}$  наиболее востребованных в нейроонкологии цитостатиков в отношении химиорезистентных клеток и выявлены эффективные комбинации темозоломида, цитостатиков и клофазимина.

В главе дана сравнительная оценка различных вариантов экспериментальной терапии крыс с глиомой С6. Установлено, что клофазимин усиливает противоопухолевое действие химиолучевой терапии у крыс с перевитой глиомой, что сопровождается снижением содержания  $\beta$ -катенина в неопластической ткани, уменьшением размера опухоли и улучшением функционального статуса экспериментальных животных. Комбинация химиолучевой терапии и экспериментальной иммунотерапии с клофазимином

сопровождается увеличением содержания ИЛ 1 $\beta$  и 18 в сыворотке крови, обогащением IBA1<sup>+</sup> CD68<sup>+</sup> клеток M1-провоспалительной микроглии опухолевой ткани, снижением содержания  $\beta$ -катенина в веществе мозга и увеличением выживаемости экспериментальных животных в 3,7 раз по сравнению с контрольной группой.

В главе «Обсуждение результатов» (С.90-113) имеет место анализ и сопоставление полученных автором данных с данными ведущих отечественных и зарубежных авторов.

В заключении (С. 114-116) проведен анализ полученных данных, рассмотрены механизмы усиления химиолучевой терапии и показаны способы комбинированного воздействия на опухолевые стволовые клетки, приводящие к химио- и радиорезистентности.

Выводы (С.117) хорошо обоснованы полученными данными и соответствуют поставленной цели и задачам.

В целом диссертационная работа Косьяновой А.А. представляет собой законченное исследование, выполненное на современном научно-методологическом уровне. Принципиальных вопросов и замечаний по теме диссертации не имеется, приведенные ниже вопросы исключительно в виде научной дискуссии:

1. Какие еще лекарственные средства или гормоны, незарегистрированные как противоопухолевые средства, потенциально могут воздействовать на *Wnt*-сигнальный каскад? И возможно ли использовать потенциальные активаторы *Wnt*-сигнального каскада для усиления регенерации, например, при лечении обширных повреждениях кожи?

2. Как, на Ваш взгляд, системная токсичность клофазимина будет ограничивать его внедрение в клиническую практику?

3. Исходя из механизма действия клофазимина и противоопухолевых препаратов, имеющих показания для лечения глиобластом, с какими препаратами возможно сочетать клофазимин?

4. Глиобластома является одной из самых васкуляризированных злокачественных новообразований? Каково, на Ваш взгляд и по данным литературы, влияние клофазимина на опухолевый неоангиогенез?

### **Заключение**

Диссертационная работа Косьяновой Александры Асадовны «Противоопухолевый потенциал клофазимина на модели глиобластомы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершенной научно-квалификационной работой. Автором представлено решение актуальной задачи, направленной на выявление ранее неизвестных фармакологических свойств противолепрозного препарата клофазимина, который в комбинации с иммунотерапией усиливает антиглиомное действие химиолучевой терапии. Полученные результаты имеют существенное теоретическое и практическое значение для фармакологии и онкологии.

Работа полностью соответствует паспорту специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология п.5. «Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культуре клеток; п.6 «Изучение фармакодинамики и фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция полученных данных с биологических моделей на человека»

По актуальности темы, задачам, новизне и значимости результатов, обоснованности научных выводов представленная работа соответствует



требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в п.п.9-14 «Положения ВАК МО РФ о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 335 , от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168, от 11.09.2021 №1539), а ее автор Косьянова Александра Асадовна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология.

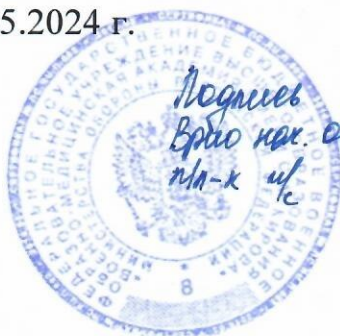
**Официальный оппонент:**

Начальник научно-исследовательского отдела  
(медико-биологических исследований) НИЦ

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская  
академия им. С.М. Кирова» Минобороны России  
доктор медицинских наук

Р.И. Глушаков

02.05.2024 г.



Подпись Р.И. Глушакова заверено  
Врио нач. отд. НИЦ ФГБВОУ ВО

Н. Латылов

Название и адрес организации: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации  
194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6. Тел.: +7 (812) 292-32-20; e-mail: vmeda-na@mil.ru