

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук профессора Оковитого Сергея Владимировича 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

Глиобластома – агрессивная глиальная опухоль астроцитарного ряда, IV степени злокачественности, согласно классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ). Средняя выживаемость составляет менее 20 месяцев, и менее 5% пациентов выживают более 5 лет. Стандартная терапия включает радикальное хирургическое вмешательство, облучение и химиотерапию. Несмотря на комплексное лечение медиана выживаемости больных составляет 15 мес. Недостаточную эффективность химиолучевой терапии связывают с опухолевыми стволовыми клетками (ОСК). Их доминирующее положение в иерархии опухолевых клеток и способность к взаимодействию с локальным иммуносупрессивным микроокружением, активирующим *Wnt*- сигнальный каскад, и ведущие к увеличению содержания внутриклеточного β -катенина, позволяет им выжить и запустить процессы пролиферации, что ведет к прогрессированию заболевания и предопределяет его негативный исход.

Комбинация лекарственных средств, подавляющих синтез и биологическую активность β -катенина с иммунотерапией может блокировать 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 ряде инвазивных карцином показал противолепрозный препарат клофазимин.

Таким образом, работа А.А. Косьяновой по изучению противоопухолевого потенциала клофазимина на экспериментальных

моделях глиобластомы, является актуальным и фундаментальным научным исследованием.

Научная новизна

Новизна диссертационной работы Косьяновой А.А. не вызывает сомнений. Автором проведен сравнительный анализ иммуноцитохимического профиля контрольных и химиорезистентных клеток глиобластомы и установлено, что химиорезистентные клетки характеризуются увеличением содержания β -катенина, усилением экспрессии миграционного N- кадгерина и антигенов пронеурального - CD133 и мезенхимального - CD44 фенотипа. Впервые исследована противоопухолевая активность клофазимина на моделях глиобластомы *in vitro* и *in vivo*. Автором установлено, что в концентрации 37,6 мкмоль/л он вызывает гибель половины популяции клеток глиомы C6; концентрации 29,0 мкмоль/л и 38,3 мкмоль/л соответствуют IC_{50} для клеток линий U87MG и T98G глиобластомы человека. Автор работы впервые продемонстрировал, что клофазимин усиливает цитотоксическое действие темозоломида, ломустина и 5-фторурацила в отношении клеток глиальных опухолей линий C6 и U87MG, а также цитотоксическое действие карбоплатина и паклитаксела в отношении глиобластомы человека линии T98G. Автором установлено, что цитотоксическое действие ломустина и карбоплатина в отношении химиорезистентных опухолевых клеток линии T98G глиобластомы в комбинации с клофазимином достоверно возрастает.

Впервые автором представлен противоопухолевый эффект клофазимина на модели глиомы высокой степени злокачественности у крыс. Также впервые исследован эффект комбинации клофазимина и экспериментальной иммунотерапии и ее влияния на продолжительность жизни экспериментальных животных.

Практическое и теоретическое значение исследования

Работа Косьяновой А.А. является комплексным исследованием, в ходе которого получены новые для изучаемой области знания результаты.

Выполненное на различных методических уровнях, исследование привносит дополнительные знания, касающиеся актуальной проблемы фармакологии - разработке более эффективных лекарственных препаратов и их комбинаций для лечения агрессивных форм злокачественных новообразований.

Разработанная *in vitro* модель резистентной к лечению глиобластомы может быть использована для поиска эффективных антиглиомных средств, а разработанный алгоритм экспериментальной терапии, может быть положен в основу дальнейших разработок новых схем неoadъювантной терапии.

Материалы работы также могут быть включены в курсы лекций по фармакологии, онкологии, клеточной биологии, а также в курсы усовершенствования и переподготовки врачей-онкологов.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений,
выводов, практических рекомендаций, сформулированных в
диссертации**

Научно-методические подходы, использованные автором при планировании, выполнении и анализа экспериментальной работы, соответствуют современным требованиям, предъявляемым медико-биологическим наукам, что стало залогом обоснованности выводов, к которым пришел автор.

Достаточный объем выборки и проведенных экспериментальных наблюдений свидетельствуют об объективности и достоверности полученных результатов. Получение достаточного количество образцов для последующего изучения позволило обеспечить статистическую мощь исследования. Результаты обработки данных исследования отражены в рисунках и таблицах, наглядно демонстрирующих степень достоверности и доказательность выводов и основных положений, сформулированных в работе.

Структура диссертационной работы и ее оформление

Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста. Включает в себя введение, обзор литературы, описания материалов и

методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, состоящего из 245 источников, в том числе 33 - отечественных и 212 - зарубежных авторов. Диссертация написана хорошим литературным языком и легко читается.

Во введении автор раскрывает актуальность проблемы исследования и степень разработанности темы, формулирует цель и задачи, новизну, теоретическую и практическую значимость, методы и методологию исследования, представляет степень достоверности и результаты апробации работы, а также положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы включает в себя данные зарубежных и отечественных литературных источников, раскрывает современные представления об эпидемиологии, этиологии, патогенезе глиобластомы, молекулярно-генетических механизмах возникновения резистентности к существующей терапии. Проведен обзор существующих схем лечения и экспериментальных подходов. Обоснован выбор перепрофилируемых лекарственных средств в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. Раскрыты известные на сегодняшний день аспекты механизма действия противолепрозного препарата клофазимин.

В главе «Материалы и методы исследования» дано описание материала, который автор использовал для реализации поставленной цели. Исследование проведено с использованием стандартизированных линий опухолевых клеток: клеточных линий глиобластомы человека, крысы и 150 лабораторных животных. К сожалению, автором не указан источник получения лабораторных животных, а также отсутствует указание на отечественный документ, регламентирующий работу с ними.

Автором приведены методы культивирования клеток, методы получения опухолевых клеток и дендритноклеточной вакцин, оценка миграции опухолевых клеток *in vitro*, МТТ теста, проточной цитометрии, иммуногистохимии, иммуноферментного анализа, вестерн-блоттинга, ПЦР

исследования, моделирования глиобластомы *in vivo*, статистической обработки данных.

Глава 3 посвящена результатам собственных исследований. Создана экспериментальная модель химиорезистентной глиобластомы. Установлено, что приобретение химиорезистентности сопровождается усилением анаплазии и модификацией иммуноцитохимического профиля ОК в виде увеличения содержания β -катенина, миграционного N-кадгерина, снижения содержания адгезионного E-кадгерина, экспрессией в клетках антигена CD44, усилением их подвижности и ростом резистентности к другим цитостатикам. Показано цитостатическое и цитотоксическое воздействие на ОК этого типа с использованием комбинации цитостатиков и клофазимина. Определены IC_{50} цитостатических препаратов в отношении химиорезистентных опухолевых клеток глиобластомы и установлены эффективные комбинации темозоломида, цитостатиков и клофазимина.

Автором дана сравнительная оценка различных вариантов экспериментальной терапии крыс с глиомой С6. Показана возможность усиления противоопухолевого действия химиолучевой терапии в комбинации с клофазимином. Автором показано, что экспериментальная иммунотерапия усиливает антиглиомную эффективность химиолучевой терапии в комбинации с клофазимином, что сопровождается увеличением содержания ИЛ 1 β и 18 в сыворотке крови, обогащением IBA1⁺ CD68⁺ клеток M1-провоспалительной микроглии опухолевой ткани, снижением содержания β -катенина в веществе мозга и увеличением выживаемости экспериментальных животных в 3,7 раз по сравнению с контрольной группой.

К сожалению, некоторые рисунки плохо читаются из-за мелкого размера и содержат различные шрифты.

Глава «Обсуждение результатов» включает в себя обсуждение полученных результатов, сопоставление с известными литературными данными, представлены основные полученные результаты, а также

рассмотрены перспективы дальнейших исследований по данной тематике. Рукопись диссертации завершается «Заключением», которое объединяет всю работу и подводит итоги исследования.

Работа написана хорошим научным языком, все сведения аргументированы, свидетельствуют о хорошей научной подготовке автора.

Основные положения, выносимые на защиту, сформулированы четко, полностью соответствуют цели и задачам исследования. Выводы и практические рекомендации обоснованы и органично следуют из материалов диссертационного исследования и свидетельствуют о достижении цели работы.

Автореферат полностью отражает все основные положения, этапы и результаты диссертационного исследования.

По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ и/или входящих в международные базы данных Scopus и Web of Science, полно отражающих результаты исследования. Результаты работы представлены в 5 тезисах в материалах научных съездов и конференций.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя в исследовании состоит в непосредственном участии планирования научной работы, формулировки цели, задач исследования, определение методологии, общей концепции и дизайна диссертационного исследования. Автором проанализированы данные отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационного исследования, разработана концепция и дизайн исследования. Предложенные автором новые подходы аргументированы и базируются на современных научных представлениях.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований противоопухолевой активности клофазимина в отношении глиобластомы *in vitro* и *in vivo*, а также разработанная *in vitro* модель рецидивирующей глиобластомы могут быть полезны для научно-

исследовательских исследований, проводимых в институтах медико-биологической направленности. Материалы работы также могут быть включены в курсы лекций по фармакологии, клеточной биологии, онкологии.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Диссертационная работа написана в соответствии с требованиями ВАК и соответствует паспорту заявленной научной специальности. Принципиальных замечаний и возражений по диссертационной работе нет, за исключением нескольких мелких, отмеченных выше.

В ходе рецензирования диссертационной работы возникли следующие вопросы, требующие дополнительного пояснения и уточнения:

1. Клофазимин рекомендуется использовать только в составе комбинированной терапии для начального лечения лепроматозной (многобациллярной) лепры для предотвращения развития лекарственной устойчивости к нему. Не может ли расширение возможного применения препарата создать проблемы с развитием более широкой резистентности к нему у микобактерий?

2. Учитывая, что автором показана способность клофазимина усиливать специфическую цитотоксическую активность противоопухолевых препаратов, не будет ли он усиливать и общую токсичность этих препаратов, что может значительно сказаться на качестве жизни пациентов?

3. Бета-катенин имеет важное значение для электрического и механического взаимодействия между кардиомиоцитами. Можно ли ожидать увеличения кардиотоксичности от предлагаемых схем с клофазимином, учитывая его способность и так увеличивать интервал QT?

Все приведенные вопросы и замечания носят дискуссионный характер и не затрагивают существа работы.

Заключение

Диссертация Косьяновой А.А. на тему: «Противоопухолевый потенциал клофазимина на модели глиобластомы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой, на основании проведенных автором исследований, решена актуальная научная задача экспериментальной оценки противоопухолевой активности клофазимины в комбинации с иммунотерапией в отношении глиобластомы, имеющая существенное значение для фармакологии.

По своей актуальности, новизне, объему выполненных исследований, глубине анализа полученных данных, научной и практической значимости диссертация полностью соответствует требованиям п.9 Положения ВАК Минобрнауки Российской Федерации, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. N 842 "О порядке присуждения ученых степеней" (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Косьянова Александра Асатовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6 - Фармакология, клиническая фармакология.

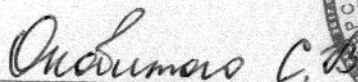
Заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-
фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской
Федерации
доктор медицинских наук, профессор

«02» мая 2024 г.

 С.В.Оковитый

197022, г. Санкт-Петербург, вн. тер. г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул. Профессора
Попова, д. 14 литера А., ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России, тел.: 8 (812) 499-39-00, e-mail:
sergey.okovity@pharminnotech.com

Подпись руки



удостоверяю

02.05.2024

Начальник отдела документации

Павлюк И.В.

ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России

