

«УТВЕРЖДАЮ»

**Проректор по научной работе
Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования**

**«Санкт-Петербургский
государственный университет»**

С. В. Микушев

19 апреля 2024 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» на диссертационную работу Косьяновой Александры Асадовны «Противоопухолевый потенциал клофазимина на модели глиобластомы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6. – фармакология, клиническая фармакология

Актуальность темы исследования. Диссертационная работа Косьяновой Александры Асадовны посвящена актуальной проблеме – изучению противоопухолевого потенциала клофазимина на экспериментальных моделях глиобластомы *in vitro* и *in vivo*.

Глиобластома (ГБ) – одна из самых злокачественных и наиболее агрессивных первичных опухолей головного мозга человека, которая имеет крайне неблагоприятный прогноз, при условии выполнения всех требований современного протокола комплексного лечения ГБ, медиана выживаемости больных составляет 15 мес. Последующая комбинация хирургического лечения с химиотерапией иногда может продлить жизнь больного, но химиопрепараты не могут сдержать прогрессирование опухоли, поскольку не способны эффективно уничтожать в организме больного опухолевые стволовые клетки (ОСК).

В настоящее время эффективных способов фармакологической коррекции этих механизмов не существует, однако определенные успехи в области иммунотерапии глиом 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, блокировать внутриклеточные механизмы фенотипической гетерогенности и пластичности ОСК, повысить антиглиомную активность цитостатиков и продлить жизнь больного.

В ряде исследований была показана высокая противоопухолевая активность противолепрозного препарата клофазимина (КФЗ), в частности при раке кишечника, раке яичников и трижды-негативном раке молочной железы.

Обоснованность и достоверность результатов исследований определяется большим объёмом проведенного исследования.

Адекватный дизайн и корректная статистическая обработка полученных результатов, их чёткое представление в виде обстоятельных описаний, рисунков и таблиц, а также достаточный анализ позволяют классифицировать результаты настоящей работы как достоверные, а положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации как обоснованные.

Диссертационную работу отличают высокое методологическое качество и строгий научный подход к изучению проблемы.

Выполненная работа соответствует паспорту специальности:

- 3.3.6. – фармакология, клиническая фармакология – «Изучение структуры назначения лекарственных средств при профилактике и лечении различных заболеваний путем проведения ретроспективных и проспективных фармакоэпидемиологических исследований» фармакоэпидемиологических исследований», «Разработка формулярной системы лекарственных средств: доля медицинских учреждений».

Научная новизна работы не вызывает сомнения. На экспериментальных моделях ГБ *in vitro* показана зависимость между пролиферативной активностью ОК и содержанием в них β -катенина, а также прямая зависимость между содержанием этого белка и резистентностью ОК к 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 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 IC50 клофазимина в отношении ОК линии С6 - $37,6 \pm 3,2$ мкмоль/л, для линии U87MG и T98G $29,0 \pm 1,3$ мкмоль/л 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 опухолеро-клеточной (ОКВ) вакциной сопровождается усилением локального противоопухолевого иммунного ответа и увеличения содержания ИЛ 1 β и 18

в сыворотке крови. Комбинация ХЛТ с клофазимином и дендритноклеточной вакциной (ДКВ) обогащает опухолевую ткань маркерами IBA1+ CD68+ клеток M1-поляризованной микроглии, что сопровождается снижением содержания β -катенина в веществе мозга и увеличением выживаемости экспериментальных животных.

Научная и практическая значимость настоящей работы определяется полученными в ходе проведённых исследований результатами, имеющими практическую и клиническую 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 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 IC50 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 и клофазимина с экспериментальной иммунотерапией с использованием опухолевых дендритноклеточной 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 неоадьювантной химиотерапии.

Структура, содержание и оформление диссертации. Результаты исследования представлены на 148 страницах печатного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы – материалы и методы, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов и заключения. Работа включает 7 таблиц и 41 рисунков. Список литературы содержит 245 источников.

Во введении раскрыта актуальность рассматриваемой проблемы, четко сформулированы цель и соответствующие задачи исследования, определены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, ясно описаны методология работы, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробации результатов, личный вклад автора в проведенное исследование, структура и объем работы.

В первой главе (обзор литературы) автором изложено обоснование применения клофазимина и других перепрофилируемых лекарственных средств, обладающих доказанной Wnt ингибирующей активностью, которые могут снизить уровень β -катенина в ОСК.

Литературный обзор носит аналитический характер, подчёркивая глубокое понимание и знание автором проблемы в целом и указывая на существование недостаточно известных аспектов проблемы.

В главе «Материалы и методы исследования» автором представлена информация о методологических подходах и использованных методах исследования.

В главах, посвященных описанию результатов исследования, представлены собственные авторские данные. Приведены результаты, которые позволяют сделать вывод о том, что введение опухолево-клеточной (ОКВ) и дендритно-клеточной вакцины (ДКВ) в организм животных с глиомой

Сб в комбинации с клофазимином сопровождается усилением противоопухолевого иммунного ответа, в виде развития локальной воспалительной реакций, увеличения содержания интерлейкина 1β и 18 в сыворотке крови, увеличением содержания $IBA1+$, $CD68+$ провоспалительно активированной микроглии в опухолевой ткани. Комбинированное использование ДКВ и клофазимина сопровождается максимальной выживаемостью экспериментальных животных 90 ± 7 дней против 45 ± 5 дней в группе ХЛТ.

Глава 4 посвящена описанию фармакологических аспектов антиглиомного действия клофазимина при иммунотерапии. Экстраполяция данных эксперимента на результаты повседневной клинической практики позволила выявить важную деталь: снижение степени дифференцировки ОК, обусловленное процессами ЭМП, вызванными воздействием химиотерапии, сопровождается резким снижением числа лейкоцитов, данный феномен имеет прямую взаимосвязь и фактически предопределяет прогноз.

В заключении автором проанализированы результаты проведенных исследований, которые свидетельствует в пользу того, что ИТ 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, что формирует качественно новый подход к лечению.

Содержательные и обоснованные выводы, соответствующие поставленной цели и задачам, а также предложения (практические рекомендации) логически завершают диссертационную работу. К сожалению, ряд предлагаемых автором рекомендаций носят декларативный характер, т.к. необходимы полные доклинические и клинические исследования описанных комбинаций.

Основные положения работы сформулированы четко, структура работы хорошо продумана. Выводы конкретны и вытекают из сути работы. Диссертация характеризуется хорошей культурой обсуждения.

Оформление диссертации не вызывает особых нареканий, за исключением определенного числа опечаток и использования для ряда таблиц шрифта меньшего кегля, чем для основного текста.

Работа написана хорошим научным языком, представленные сведения аргументированы, свидетельствуют о хорошей научной подготовке диссертанта. Однако, автор нередко использует достаточно пространственные врезки из нормативных документов, без которых вполне можно было бы обойтись.

В целом, работа выполнена на высоком методическом и методологическом уровне, что подтверждается широким спектром использованных современных методов исследования, адекватных поставленным задачам. Поставленную цель в диссертационной работе следует считать достигнутой благодаря корректной методической основе, полученные результаты, обладающие научной новизной, – весьма убедительными, а сформулированные по результатам исследований выводы – аргументированными.

Соответствие автореферата основному содержанию диссертации.

Автореферат отражает основные положения и результаты диссертационного исследования.

Полнота опубликования научных результатов подтверждается 5 статьями в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикаций результатов диссертационных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

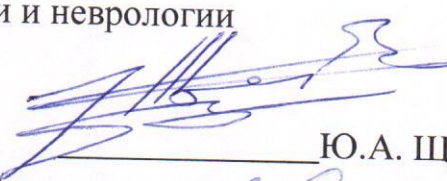
По актуальности темы и решаемых задач; новизне полученных результатов; объему, методическому и методологическому уровню проведенных исследований, теоретической и научно-практической значимости, полноте их опубликования, перспективному вкладу в разработку новых методов лечения и сохранения здоровья человека, диссертационная работа «Противоопухолевый потенциал клофазимина на

модели глиобластомы» Косьяновой Александры Асатовны соответствует паспорту научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология согласно номенклатуре научных специальностей, по которым присуждаются ученые степени (Приказ Министерства науки и высшего образования Российской Федерации от 24.02.2021 № 118), соответствует требованиям, установленным пунктами 9-14 Положения о присуждении учёных степеней, утверждённым Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Отзыв подготовлен д.б.н., профессором, и.о. заведующего кафедрой фармации Медицинского института Санкт-Петербургского государственного университета Ленской Мариной Владимировной.

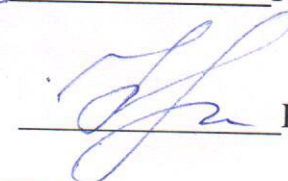
Отзыв обсужден и одобрен на совместном заседании Кафедры нейрохирургии и неврологии; Кафедры гистологии и цитологии; Кафедры фармации Санкт-Петербургского государственного университета, протокол № 3 от 27.03.2024.

академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой нейрохирургии и неврологии
Медицинского института СПбГУ



Ю.А. Щербук

доктор биологических наук, профессор,
и.о. заведующего кафедрой фармации
Медицинского института СПбГУ



К.В. Ленская

Подписи заверяю:

**Заместитель начальника
Управления кадров
главного
управления по организации
работы с персоналом**



Краснова Е.П.

18.04.2024

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»
Адрес: 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7-9. Телефон (812) 328-97-01
E-mail: spbu@spbu.ru