

Warszawa, 16.09.2019 r.

Tytuł pracy: **Preparaty siRNA w terapii genowej czerniaka w badaniach *in vitro* i *in vivo***

Doktorantka: mgr farm. Joanna Bogusławska-Duch

Promotor: prof. dr hab. n. farm. Maciej Małecki

Katedra Farmacji Stosowanej

Streszczenie

Terapia genowa to innowacyjna forma leczenia. W ostatnich latach leczenie chorych na nowotwory obejmuje również próby kliniczne terapii genowej. Prowadzone są badania wykorzystujące m.in. geny samobójcze, szczepionki z materiałem genetycznym, a także wirusy onkolityczne. Zaproponowana w niniejszej pracy terapia bazująca na cząsteczkach psiRNA jest obiecującą terapią genową dla nowotworów, polegającą na wyciszeniu ekspresji określonych genów.

Czerniak jest jednym z najbardziej agresywnych i złożonych nowotworów. Pomimo postępów w medycynie, rokowania chorych na czerniaka nadal nie są zadawalające.

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) jest kluczowym czynnikiem proangiogennym. VEGF w czerniaku uruchamia procesy związane z angiogenezą, przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej, migracją komórek, inwazją, hamowaniem odpowiedzi immunologicznej oraz sprzyja plastyczności fenotypowej i procesowi EMT.

Czynnik transkrypcyjny SOX10 odgrywa ważną rolę w rozwoju grzebienia nerwowego kręgowców, w tym w ustaleniu i utrzymaniu linii melanocytów. SOX10 jest również silnie wyrażony w guzach czerniaka, a ekspresja SOX10 wzrasta wraz z postępem nowotworu.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena aktywności wyciszającej oraz przeciwnowotworowej (antyangiogennej) preparatów psiRNA wyciszających VEGF i SOX10 na komórki mysiego czerniaka linii B16-F10 w badaniach *in vitro* i *in vivo*.

W niniejszej pracy opracowano preparaty/formulacje farmaceutyczne bazujące na plazmidowych wektorach psiRNA wyciszających gen *SOX10* i *VEGF*, które tworzą kompleksy z lipidami kationowymi (psiRNA: nośnik). Do badań wykorzystano komórki mysiego czerniaka linii B16-F10. Eksperymenty przeprowadzono w oparciu o metody: ocena wydajności transfekcji i aktywności wyciszenia preparatów psiRNA (mikroskop fluorescencyjny, fluorescencyjny licznik komórek, qPCR, Western blot) oraz ocena aktywności

przeciwnowotworowej (antyangiogennej) stosowanych formułacji farmaceutycznych (analiza wpływu preparatów zawierających psiSOX10 oraz psiVEGF na wzrost i unaczynienie nowotworów B16-F10 u myszy laboratoryjnych C57BL/6J).

Wyniki badań *in vitro* wykazały, że komórki B16-F10 wydajnie transfekują niewirusowe preparaty psiRNA: Lyovec (74-89%) oraz psiRNA: Attractene (83-93%). Rezultaty dalszych badań *in vitro* wskazują na skuteczną aktywność wyciszającą zaprojektowanych preparatów psiRNA. Zauważono, że wyciszenie genów *VEGF* i *SOX10* preparatami psiRNA wpłynęło na poziom ekspresji następujących genów związanych z kancerogenezą czerniaka: *COL18A1*, *IL6*, *TNF*, *FLT4*, *NRP2*, *Mage-b16*. Warty uwagi jest fakt, iż wyciszenie *SOX10* w komórkach czerniaka B16-F10 zwiększa ekspresję genu *COL18A1* w porównaniu z preparatem hamującym sam *VEGF*. Gen *COL18A1* koduje kolagen alfa-1 typu XVIII. Jest to endostatyna zmniejszająca proliferację komórek śródbłonna i angiogenezę.

Wyniki badań *in vivo* pokazują, że poziom hemoglobiny w guzach myszy traktowanych formułacjami psiRNA był ponad 6-krotnie niższy od kontroli, zaś liczba naczyń krwionośnych w obrębie guzów w przypadku myszy poddanych działaniu preparatów psiRNA była o ok. 40% mniejsza od prób kontrolnych. Masa i objętość guzów zarówno przy podaniu myszom podskórnym komórki czerniaka transfekowanych preparatami psiRNA jak i przy ostrykiwaniu zwierząt doguzowo utworzonymi formułacjami psiRNA były mniejsze niż w kontrolach o około 60-80%, w zależności od podanego preparatu psiRNA. Ponadto, najmniejszą wartość wymienionych wielkości miały próby badane wyciszające *VEGF* wraz z *SOX10*.

Niski wzrost guzów B16-F10 traktowanych formułacjami psiSOX10 i psiVEGF wynika z ograniczenia aktywności angiogennej komórek B16-F10 na drodze hamowania ekspresji genów *SOX10* i *VEGF* – stymulatorów angiogenezy nowotworowej. Nowatorskie badanie dowodzi również, że równoczesne hamowanie *SOX10* i *VEGF* potęguje działanie antyangiogenne, a tym samym przyczynia się do znacznego zatrzymania wzrostu zmian nowotworowych.