

Streszczenie

Nowotwory wywodzące się z tkanki mięśniowej to jedne z najczęstszych nowotworów obserwowanych u człowieka w pierwszej dekadzie życia oraz u zwierząt. Ich szybki i utajony rozwój stanowi poważny problem diagnostyczny. Wiąże się z tym ich późna wykrywalność oraz wdrożenie drastycznych metod leczenia. Zastosowanie elektroporacji (EP) w celu podniesienia wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia może skutecznie wprowadzić komórki nowotworowe na drogę apoptozy. EP pozwala na modulację wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia za pomocą krótkich wysokonapięciowych impulsów elektrycznych, które tymczasowo destabilizują błonę komórkową tworząc w niej hydrofilowe pory. Co ciekawe, nagłe podwyższenie poziomu Ca^{2+} w cytozolu wpływa odmiennie na komórki prawidłowe i nowotworowe. Procesy zachodzące w wyniku zaburzenia homeostazy wapniowej nie zostały dotąd prześledzone dla prawidłowych oraz patologicznych komórek mięśniowych.

W rozprawie doktorskiej przeprowadzono badania optymalizacji parametrów terapii opartej na elektroporacji z jonami wapnia (ang. *calcium electroporation* – CaEP) do komórek linii mięśniowych oraz nowotworowych. Wyniki badań opublikowano w dwóch artykułach naukowych ze współczynnikiem wpływu (IF). Celem badań było ustalenie optymalnych parametrów CaEP, które mają wpływ na indukcję śmierci mięśniowych komórek nowotworowych przy jednoczesnym zachowaniu prawidłowych komórek otaczających nowotwór. W celu wyjaśnienia zjawisk zachodzących w obu typach komórek stworzono dwa modele badawcze: *in vitro* oraz *in vivo*. W modelu *in vitro* wykorzystano dwie prawidłowe mięśniowe linie komórkowe: L6 – szczurze prawidłowe mioblasty mięśni szkieletowych i C2C12 – mysie prawidłowe mioblasty mięśni szkieletowych oraz dwie linie nowotworowe: Wehi-164 – mysie komórki włókniakomięsaka (*Fibrosarcoma*) i RD – ludzkie komórki mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego (*Rhabdomyosarcoma*). W modelu *in vivo* wykorzystano myszy NMRI-*Foxn1^{nu}* z podskórnym rosnącym ludzkim mięśniakomięśakiem prążkowanokomórkowym. W wyniku podjętych badań wykazano, że komórki nowotworowe są w 50% bardziej wrażliwe na działanie CaEP niż komórki prawidłowe, a ich śmierć indukowana była głównie na drodze apoptozy. Wyniki badań wykazały, że komórki prawidłowe pozostawały obojętne na działanie terapii. Komórki te charakteryzowały się zwiększeniem proliferacji do ok. 10%. Udowodniono, iż za odmienne reakcje komórkowe są odpowiedzialne systemy utrzymujące homeostazę wapniową, czyli pompy i kanały wapniowe, których ekspresja i aktywność była zaburzona w komórkach

27.04.18r.
Szewczyk Anna

nowotworowych. Przeprowadzone badania wykazały także kilkukrotnie wyższy poziom wewnątrzkomórkowego wapnia w komórkach nowotworowych traktowanych terapią. Komórki prawidłowe w krótkim czasie po terapii usuwały nadmiar wapnia do poziomu kontrolnego. Również analiza badań *in vivo* potwierdziła redukujący wpływ CaEP na komórki nowotworowe *Rhabdomyosarcoma*.

Uzyskane wyniki przyczynią się do poszerzenia wiedzy z zakresu wewnątrzkomórkowej sygnalizacji wapniowej oraz pozwolą lepiej zrozumieć różnice w funkcjonowaniu komórek prawidłowych i nowotworowych. Badania stanowią również podwalinę do dalszych prac nad rozwojem nowoczesnych metod walki ze schorzeniami mięśniowymi takimi jak dystrofia, miopatie czy nowotwory.

28.04.18r.
Siewczyk Anna

Abstract

Soft tissue sarcoma derived from muscle cells is one of the most common tumors found in children and animals. Its fast and latent development raises diagnostic issues as a result of the late detection force drastic treatment. Calcium electroporation (CaEP) is an innovative method developed from electrochemotherapy (ECT) applied in cancer treatment. It can modulate intracellular calcium levels using short high-voltage electric pulses that cause temporary cell membrane destabilization and create hydrophilic pores. Interestingly, sudden cytosolic Ca^{2+} concentration increases affect both normal and malignant cells. Processes followed by calcium homeostasis disturbance in normal and pathological muscle cell have not yet been investigated.

The results presented in this doctoral thesis focus on selection of CaEP parameters that may provoke malignant cell death pathway and are concurrently safe to use in normal muscle cells surrounding malignant tissue. *In vitro* model systems are composed of several different cell lines: (1) L6; a normal rat skeletal muscle cell line; (2) C2C12; a normal mouse skeletal muscle cell line; (3) Wehi-164; a mouse fibrosarcoma cell line; and (4) RD; a human rhabdomyosarcoma cell line. An *in vivo* model system using with NMRI-*Foxn1^{nu}* mice was then developed.

The results showed a 50% reduction in cell viability after CaEP in cases of malignant cells as compared to normal cells. The apoptosis was the main type of the cell death pathway. However, normal muscle cells remained less sensitive to CaEP influence, and an approximately 10% increase in proliferation compared to control cells was observed. Moreover, it was proven that calcium pump and channel expressions were altered after CaEP in malignant cells. Further analyses exhibited a several-fold increase in intracellular calcium concentration that persisted in malignant cells after CaEP. In contrast, in normal muscle cells a short time after CaEP the calcium excess levelled off compared to control cells. Likewise, *in vivo* studies proved CaEP effectiveness in rhabdomyosarcoma cell reduction.

The results contribute to a broader knowledge of intracellular calcium signaling and provide a better understanding of divergence between normal and pathological cell functions. The research provides a solid foundation for further development of an innovative way to treat muscle diseases such as dystrophies, myopathies, or sarcomas.

27.04.18.
Szewczyk Anna