

Streszczenie

Według światowych danych epidemiologicznych rak prostaty (PCa, *prostate cancer*) jest diagnozowany u ponad miliona mężczyzn rocznie. Z uwagi na często powolny rozwój oraz rozpoznanie w późnym wieku, nie zawsze istnieją wskazania do leczenia radykalnego z wykorzystaniem standardowych form terapii (leczenie operacyjne, radioterapia) zwłaszcza w grupie chorych niskiego i pośredniego ryzyka z chorobą ograniczoną do narządu. Jednocześnie formy terapii zachowawczej tj. aktywny nadzór lub baczne wyczekiwanie nie zawsze są akceptowane przez pacjenta. Powyższe podkreśla potrzebę poszukiwania i rozwoju minimalnie inwazyjnych metod leczenia.

Krótkie impulsy elektryczne mogą wywołać efekt permeabilizacji czyli zwiększenia przepuszczalności błon biologicznych. Zjawisko to zostało nazwane elektroporacją. W przeciwieństwie do większości fokalnych terapii, efekt cytotoksyczny technologii opartych na elektroporacji nie wynika z uszkodzeń termicznych komórek nowotworowych, lecz z permeabilizacji ich błony komórkowej. Wstępnym etapem do wdrażania dalszych protokołów terapeutycznych opartych na elektroporacji są badania *in vitro*, które pozwalają na wyjaśnienie mechanizmów ich działania. Celem niniejszej pracy doktorskiej, opartej o cykl publikacji, jest zbadanie efektów biologicznych krótkich impulsów elektrycznych na modelach komórkowych raka gruczołu krokowego.

Do badań efektów biologicznych krótkich impulsów elektrycznych użyto cytometrii przepływowej, mikroskopii konfokalnej i fluorescencyjnej. Ponadto dokonano pomiaru przeżywalności i mobilności komórek oraz aktywności kaspaz. By zwizualizować elektroporację mikrosekundową z jonami wapnia przeprowadzono *in silico* symulację dynamiki molekularnej.

Badania potwierdzają obiecujące efekty krótkich impulsów elektrycznych na komórki raka prostaty. Elektroporacja z jonami wapnia zwiększa efekt cytotoksyczny zarówno przy zastosowaniu nano- jak i mikrosekundowych impulsów. Metoda ta może zapewnić skuteczniejszą ablację oraz zmniejszyć ryzyko wznowy miejscowej choroby. Permeabilizacja komórek przez impulsy nanosekundowe może być kontrolowana przez natężenie pola elektrycznego, jak również przez częstotliwość impulsów. Nanosekundowe impulsy o częstotliwościach MHz-owych wykazują wyraźnie zwiększoną cytotoksyczność w porównaniu do impulsów o niższych częstotliwościach. Elektroporacja impulsami nano- lub mikrosekundowymi bez jonów wapnia wywołuje apoptozę komórek nowotworu prostaty. Jeżeli komórki są ekspozowane na impulsy elektryczne w buforze ze zwiększonym stężeniem jonów wapnia mechanizm ich śmierci zależy od długości impulsu. Zmniejszona mobilność komórek nowotworowych, oraz zmiany w cytoszkielecie komórek po terapii, ilustrują potencjał krótkich impulsów elektrycznych w zapobieganiu przerzutom nowotworu stercza.

Abstract

Every year over one million patients are diagnosed with prostate cancer (PCa). Due to slow progression and typically late age at onset, radical treatment (surgery, radiation) cannot always be indicated, especially for low and medium-risk localized PCa. Simultaneously, conservative treatment, i.e. watchful waiting and active surveillance, does not always gain acceptance from patients. The latter calls for the development of new, effective, safe, and minimally invasive therapies.

The observation that an application of pulsed electric fields (PEFs) resulted in increased permeability of the cell membrane has led to the discovery of the phenomenon called electroporation. *In vitro* research helps to elucidate the potential of PEFs, and constitutes the first step for further technology development. The aim of Ph.D. thesis was to evaluate the effects of pulsed electric fields on human prostate cancer models.

In the project, we used flow cytometry and confocal and fluorescence microscopy. Moreover, we performed cell viability assay, caspase activity analysis and, wound healing assay to investigate the biological effect of PEFs on PCa cells. For *in silico* investigation of calcium electroporation, we conducted the molecular dynamics simulation.

The research confirms the promising effect of PEFs on PCa cells. Electroporation with calcium has a chance to enhance the oncological outcome of the nanosecond as well as microsecond pulses. The cell membrane permeabilization by nanosecond pulses can not only be controlled by electric field intensity but also with pulse frequency. MHz compression of nanosecond PEFs bursts proved to additionally enhance the effectiveness of the therapy. The cancer cells exposed to electric pulses presented disrupted cytoskeleton and impaired mobility. Thus, PEFs have the potential to prevent or slow down the progression of metastasis. Depending on the pulse duration and the Ca^{2+} content in the electroporation buffer, the mechanism of death may differ. Standalone electroporation promotes rather an apoptotic type of cell death. Differently, for the cells electroporated in buffer containing Ca^{2+} , cell death mechanisms depend on the pulse duration. Short electric pulses showed potential for an application as focal therapy of prostate cancer.