

Jan Fiedurek¹, Marcin Skowronek¹, Jerzy Jamroz²

¹uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

²Akademia Rolnicza w Lublinie

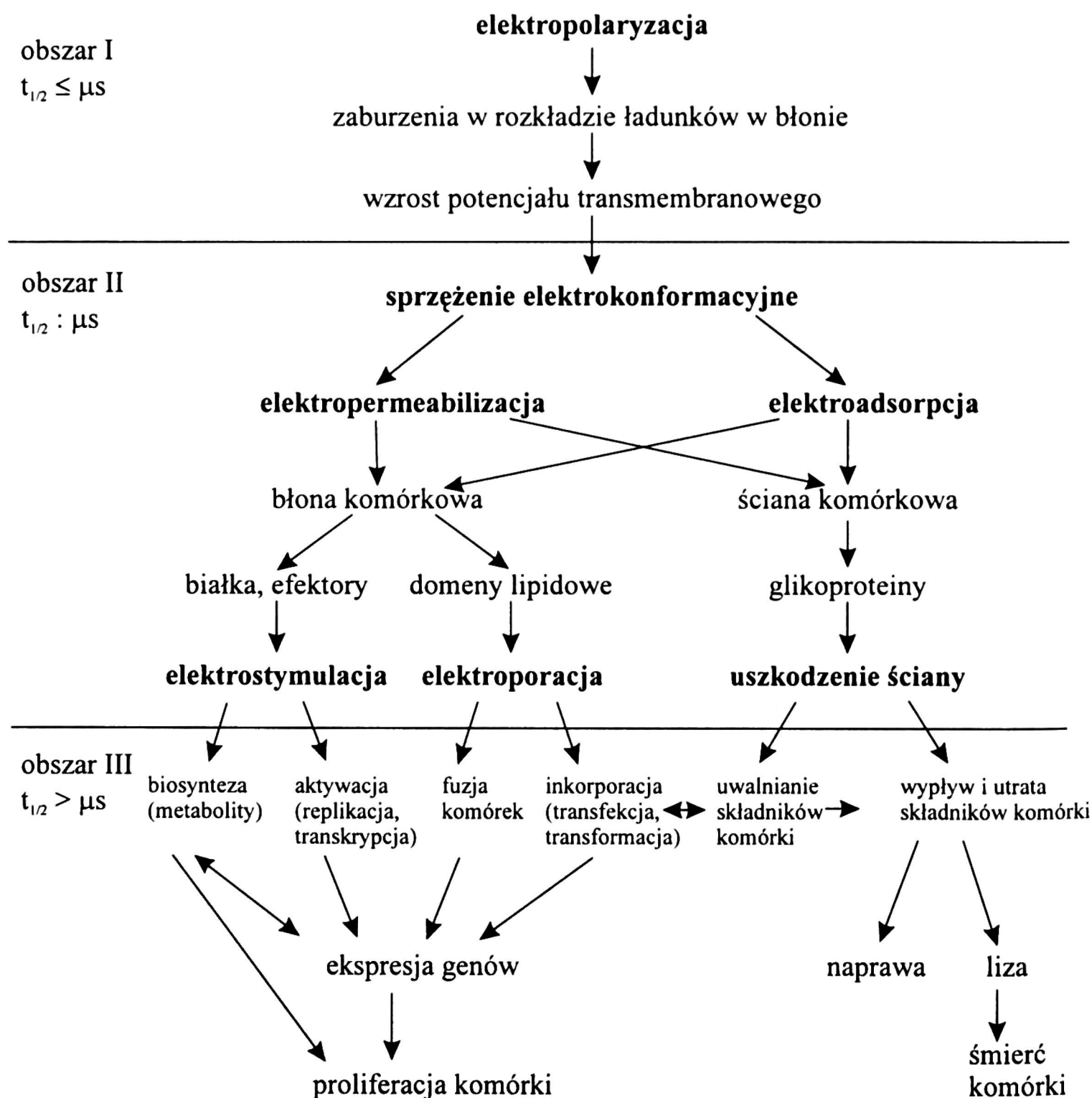
Zmiany strukturalne i fizjologiczne w układach biologicznych indukowane pulsacyjnym polem elektrycznym

Słowa kluczowe: pulsacyjne pole elektryczne, elektroporacja, zmiany strukturalne, elektrostymulacja

1. Wpływ pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) na komórkę

Zastosowanie pola elektrycznego w układach biologicznych obejmuje indukcję biochemicznych i fizjologicznych reakcji w komórkach, tkankach i w całym organizmie. W komórce poddanej działaniu PEF, indukowane napięcie transmembranowe przyczynia się do formowania porów w membranie i prowadzi do wzrostu jej przepuszczalności. To zjawisko określono jako elektroporacja i wykorzystano m.in. do transfekcji genów, otrzymywania przeciwciał monoklonalnych oraz elektrochemioterapii guzów nowotworowych. Mechanizm elektroporacji nie jest do końca wyjaśniony. Według modelu Zimmermanna [49], pod wpływem pola elektrycznego na zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni błony komórkowej indukowane są ładunki o przeciwnych znakach. Gdy potencjał transmembranowy osiąga wartość krytyczną (ok. 1 V), wówczas wzajemne przyciąganie ładunków prowadzi do formowania dużej ilości porów w błonie komórkowej. Proces ten może być odwracalny, jeżeli nastąpi zjawisko ponownego zasklepienia porów. Jeżeli jednak wartości natężenia pola elektrycznego znacznie przekroczą wartość krytyczną (czyli taką, która prowadzi do powstania krytycznego potencjału transmembranowego), wówczas powstanie porów może stać się zjawiskiem nieodwracalnym, prowadzącym do zniszczenia komórki.

Według Astumiana i Berga [1], efekty działania pola elektrycznego na komórkę można zgrupować w 3 obszarach, w zależności od tego, jak szybko się pojawiają i jak długo trwają. Zależności pomiędzy poszczególnymi efektami przedstawiono na rysunku 1.



Rysunek 1. Efekty działania pola elektrycznego na komórkę wg Astumiana i Berga [1]

Pod wpływem działania pola elektrycznego stwierdzono dwa typy stresów zlokalizowanych w ścianie komórkowej: stres krótki i stres przedłużony [27–31, 34]. Ich występowanie zależało od częstotliwości pola elektrycznego. Przy częstotliwości w zakresie „MHz” dominował „krótki stres”, zaś w obszarze „kHz” obserwowano „długi stres”. Stres krótki zmienił kształt membrany i w rezultacie kształt komórek. Stały stres powodował zmiany gęstości powierzchni membrany, która ostatecznie ulegała destabilizacji.

Jako rezultat elektroporacji może pojawić się zakłócenie w funkcjonowaniu komórek. Przy częstotliwości pola wynoszącej 10^2 – 10^3 Hz komórka ulegała destrukcji, kiedy amplituda drgań membrany była zbliżona do amplitudy pola, a nie do jego częstotliwości. Przy częstotliwości 10^4 Hz lepkość membrany ulegała obniżeniu wskutek

drgań własnych i wykazywała większą podatność na destrukcję. Przy dalszym wzroście częstotliwości pola elektrycznego lepkość spadała do bardzo niskich wartości i przy 10^5 Hz błona komórkowa ulegała destrukcji [30, 31].

Wewnątrzkomórkowe białka (IMP) występują w dwuwarstwie lipidowej membrany. Pełnią one rolę podobną do kanałów jonowych lub receptorów. Kierunek przepływu prądu i pola elektrycznego mogą oddziaływać na białka błonowe, wywołując zjawiska elektroforezy i elektroosmozy [2]. Na podstawie wielu doświadczeń dowiedziono, że pole elektryczne o częstotliwości 50 Hz powodowało zmiany dystrybucji wewnątrzkomórkowych protein w kulturze komórek, a także było przyczyną wzrostu proliferacji limfocytów *in vitro* i wytwarzania kilku specyficznych cytokinin. Wiadomo, że białka błonowe i wewnątrzkomórkowe pełnią różne funkcje, niezbędne dla wielu fundamentalnych procesów, głównie związanych z adhezyjnymi właściwościami komórki. Zatem każdy akt ich dystrybucji może pomóc w zrozumieniu biologicznych skutków działania pola elektrycznego i wyjaśnienia mechanizmu interakcji z membraną komórkową. Wiele hipotez dotyczących mechanizmów interakcji zakłada, że podstawowe efekty pola elektrycznego pojawiają się przy plazmie membrany. Pod wpływem PEF proteiny mają tendencję do łączenia się i aglomeracji [30, 31].

Poryny są kanałami białkowymi zlokalizowanymi w zewnętrznej błonie bakterii gramujemnych. Są one dobrze poznane na poziomie biochemicznym i strukturalnym. Dzięki zastosowaniu technik elektrofizjologicznych rozpoznano klasyczne, niespecyficzne poryny (Omp C, Omp F, pho E). Uzyskane informacje umożliwiły poznanie rozkładu molekuł białkowych potrzebnych do otrzymania szczegółowych danych o działaniu kanałów [7]. Interesujące rezultaty otrzymano podczas działania polem elektrycznym na niespecyficzne proteiny formujące pory w zewnętrznej membranie. Otwarcie dużych porów wywoływało większy przepływ prądu, co umożliwiło zastosowanie elektrody rejestrującej każdorazowo przepływ jonów przez dwuwarstwę lipidową. Wskazania elektrod mogą być wykorzystane do podtrzymywania potencjału transmembranowego na stałym poziomie, niezależnie od kierunku ruchu jonów. Przy braku dodawanych białek przepływ jonowy w poprzek dwuwarstwy jest bardzo słaby. Kiedy dodane poryny do membrany „wstawiono” w dwuwarstwę lipidową, przewodnictwo jonów wzrastało dzięki utworzeniu w błonie „dziur”. Kanały zachowywały się jak stale otwarte pory, których funkcja była niezależna od napięcia [7]. Schindler i Rosenbusch [39] nie obserwowali efektów „dziur” przy napięciu większym niż 150 mV. Autorzy określili takie zachowanie molekuł białkowych jako zależne od napięcia zamykanie kanałów. Technika ta pozwala na badanie w naturalnym środowisku pojedynczych kanałów zlokalizowanych w małym wycinku membrany. W niektórych wypadkach komórki utrzymują ogromną liczbę porów w stanie zamkniętym, przez co mogą regulować swoją aktywność. Na przykład komórka nerwowa posiada tysiące kanałów, które w większości pozostają zamknięte. Otwarcie kanałów może być wynikiem depolaryzacji i prowadzi do zmian przepuszczalności błony. Dlatego neurony są głównie odpowiedzialne za szybkie przewodzenie, gdyż pozostają cały

czas w stanie pobudzenia. W doniesieniach naukowych z zakresu neuronowego galwanotropizmu wykazano, że rozwijające się aksony i dendryty rosną wzdłuż linii pola elektrycznego. McCaig [23, 24] oraz McCaig i Rajnicek [25] badali reakcję neuronów na elektryczną stymulację w rozwijającym się zarodku. Okazało się możliwe sterowanie wzrostem aksonów podczas działania na nie polem elektrycznym. Neurony zorientowane w kierunku katody miały skłonność do wydłużania się i były znacznie dłuższe niż te, które orientowały się w kierunku anody.

2. Zastosowanie zmiennego pola elektrycznego o wysokim napięciu do niszczenia drobnoustrojów w żywności

Opracowanie nowej metody utrwalania żywności, łączącej w sobie skuteczność procesów termicznych z jednoczesnym wyeliminowaniem ich wad, jest jednym z wyzwań dla technologów żywności. Tradycyjne termiczne procesy, jak pasteryzacja czy sterylizacja, mogą przyczyniać się do zmiany wartości odżywczej żywności. Przykładem ujemnego wpływu wysokiej temperatury może być stuprocentowa utrata witamin: D, E, biotyny, kwasu pantotenowego podczas gotowania mleka. Jedną z alternatywnych metod utrwalania produktów żywnościowych jest wykorzystanie pulsacyjnego pola elektrycznego. W czasie działania PEF temperatura wzrasta nieznacznie, tj. nie więcej niż o 5°C, co nie wpływa na zmianę cech fizycznych lub straty wartości odżywczej żywności. Doniesienia naukowe z ostatnich lat, dotyczące inaktywacji: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus delbruecki*, *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Escherichia coli* (tab. 1), pozwalają oczekiwać szybkiego wprowadzenia metody PEF do praktyki przemysłowej utrwalania żywności, zwłaszcza że wysoką skuteczność wyjaławiania osiągnięto w produktach płynnych, jak: mleko, soki i zupy. Wartość logarytmicznego spadku drobnoustrojów zależała od intensywności impulsu elektrycznego, czasu jego trwania oraz częstotliwości. Niszczenie drobnoustrojów polem elektrycznym o wysokim natężeniu zostało zaproponowane przez Gosslinga w 1960 roku. Pod wpływem oddziaływania PEF na komórki powstają w nich pęknięcia membran i tworzą się pory, co prowadzi do wzrostu przepuszczalności błony oraz utraty jej integralności. Dysfunkcja błony prowadzi do przeciekania składników lub lizy komórki (rys. 1). Dlatego skutkiem działania pola elektrycznego jest inaktywacja komórek węgietatywnych bakterii i drożdży. Śmierć komórek nie jest spowodowana ogrzaniem czy elektrolizą, ale czynnikiem bójącym jest natężenie pola i czas trwania procesu [37].

W badaniach nad inaktywacją bakterii *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* i *Bacillus subtilis* przez impulsy pola elektrycznego stwierdzono, że powodem zniszczenia bakterii były reakcje utlenienia białek enzymatycznych ważnych dla metabolizmu komórki. Większe komórki, np. drożdży, były bardziej podatne na procesy inaktywacyjne, natomiast przetrwalniki okazały się odporne na działanie impulsów elektrycznych [18]. Mleko, w którym znajdowały się bakterie *Bacillus subtilis* i *Lactobacillus del-*

Tabela 1. Wpływ PEF na drobnoustroje, tkanki i enzymy

Gatunek	Parametry PEF	Skutki działania pola	Literatura
<i>Escherichia coli</i>	19,5 kV · cm ⁻¹ , 0,1% NaCl	spadek przeżywalności o ok. 99%	[37]
<i>Escherichia coli</i>	12,5 kV · cm ⁻¹ , 5 impulsów, 0,1% NaCl, kwas benzoesowy (1000 ppm), pH 3,4	redukcja ilości żywych bakterii o 5,6 stopnia logarytmu, synergistyczny wpływ pola elektr. i kwasu	[22]
<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	16 kV · cm ⁻¹ , 60 (<i>E. coli</i>) lub 50 impulsów (<i>S. aureus</i>), 200–300 μs, SMUF (Simulated Milk Ultrafiltrate)	<i>E. coli</i> — redukcja ilości żywych kom. o 4 stopnie logarytmu, <i>S. aureus</i> zaś o 3 stopnie logarytmu	[33]
<i>Escherichia coli</i>	6–8 kV · cm ⁻¹ , 24 ms, pojedynczy impuls, w buforze Tris 1 mM, pH 7,6, z dodatkiem 270 mM sacharozy	ubytek ATP w komórce o ok. 25–30%	[8]
<i>Staphylococcus aureus</i>	19,5 kV · cm ⁻¹ , 20 mM bufor fosforanowy, pH 7,2	spadek przeżywalności o ok. 99%	[37]
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	16 kV · cm ⁻¹ , 200–300 ms, 40–50 impulsów, SMUF	redukcja ilości żywych bakterii o 4–5 stopnie logarytmu	[32]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40 kV · cm ⁻¹ , 64 impulsy, 4 μs, sok jabłkowy	redukcja ilości żywych komórek z 8·10 ⁷ do 4·10 ⁴ ; zmiany morfologiczne — kurczenie cytoplazmy, uszkodzenia ściany kom., uszkodzenia błony jądrowej, tworzenie się nienormalnie wydłużonych komórek	[10]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3 kV · cm ⁻¹ , 3 ms, Bufor: 20 mM Hepes, 1 M sorbitol	uzyskanie wydajności transformacji plazmidem pYES 2 na poziomie 2,4·10 ⁶ transformantów na μg DNA	[36]
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	8,75 kV · cm ⁻¹ , 4 ms, 1,2 M sorbitol	uzyskanie wydajności transformacji plazmidem pAU-SK na poziomie 3,5·10 ⁵ transformantów na μg DNA	[13]

Cd. tabeli 1.

Gatunek	Parametry PEF	Skutki działania pola	Literatura
Dżdżownica <i>Lampito mauritii</i> — świeżące komórki jamy ciała	240 V · cm ⁻¹ , bufor- PBS (zbuforowany roztwór soli fizjologicznej), pH 7,4	zwiększenie intensywności bioluminescencji, zwiększenie zużycia tlenu z podłoża	[38]
Szczur — mitochondria	30 kV · cm ⁻¹ , 100 μs, 10 Hz, 5 mM ditiotritol	indukcja syntezy ATP	[43]
Szczur — wysepki Langerhansa	3,4 kV · cm ⁻¹ , 200 μs, 3 impulsy	znaczący wzrost sekrecji insuliny	[46]
Kura — jelitowe komórki nabłonkowe	0,31–1,79 mV · cm ⁻¹ , 0,14–0,55 ms, 80 Hz, bufor – 10 mM HEPES, pH 7,4	wzrost szybkości pobierania Ca ²⁺ przez komórki o 60–70%	17]
Świnia domowa — skrawki skóry	napięcie do 240 V czas do 30 min 1 ms, 20–100 Hz	zwiększenie penetracji błękitu metylenowego przez skórę	[15]
Ludzkie eryocyty	dla Ca: 30 V · cm ⁻¹ , 100 kHz dla Na: 20 V · cm ⁻¹ , 1 MHz dla K: 20 V · cm ⁻¹ , 1kHz	indukcja transportu kationów poprzez aktywację Na,K-ATP-azy i Ca-ATP-azy	[42]
Ludzkie komórki warstwy rogowej naskórka	1,3–13 mA · cm ⁻² , 1godz.	wyraźne zaburzenia w strukturze wewnętrzkomórkowych lipidów	[6]
Tytoń — tkanka kallusowa	50 μA, 50 Hz, 30 dni, MS medium z dodatkiem 0,1 mg · dm ⁻³ kwasu α-naftalenooctowego i 1 mg · dm ⁻³ 6-benzyloaminopuryny	wzrost liczby pędów wyrostych z kallusa o 50–200% w porównaniu z kontrolą	[5]
Enzymy:			
Plazmina	45 kV · cm ⁻¹ , 50 impulsów, SMUF, pH 6,11	redukcja aktywności enzymu o 90%	[44]
Na ⁺ , K ⁺ -ATP-aza	20 V · cm ⁻¹ , 300–1000 Hz	stymulacja aktywności enzymu	[43]

bruecki, poddano PEF i wykazano bójcze działanie natężenia $16 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ na te bakterie. Ta niekonwencjonalna metoda utrwalania żywności jest szeroko rozwijana. Wzrost temperatury podczas stosowania PEF jest minimalny. Przeżywanie komórek wegetatywnych zależy od doboru napięcia, liczby impulsów, czasu trwania impulsu oraz temperatury materiału żywnościowego. Optymalny dobór tych parametrów dla uzyskania lepszego efektu bójczego zależy jednak od gatunku bakterii. Bakterie gramujemne są mniej odporne na działanie pola elektrycznego niż gramodatnie [14, 26].

Po zadziałaniu PEF na bakterie *E. coli* 0157:H7 stwierdzono znaczny spadek ich przeżywalności w płynnej zawieszynie. Wyniki badań wskazują na wzrost efektywności działania PEF w obecności substancji chemicznej hamującej wzrost drobnoustrojów. Inaktywacja drastycznie wzrastała w obecności kwasu benzoesowego i sorbowego [22]. Buechler i in. [4] stwierdzili, że pod wpływem PEF tworzyły się pory w błonie cytoplazmatycznej, co spowodowało brak równowagi osmotycznej, której rezultatem było naruszenie struktury pierwszorzędowej białek. Środowisko jonowe wzmacnia lizę komórek. Destrukcja membrany *E. coli* pojawia się, kiedy indukowany potencjał błony przewyższa krytyczny poziom 1 V, który odpowiada zewnętrznemu polu $10 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$. Przepuszczalność błony *E. coli* K₁₂ jest funkcją wartości natężenia pola elektrycznego i czasu jego działania [11, 12]. W warunkach liniowego wzrostu liczby impulsów od czasu działania PEF wykazano, że przeżywalność komórek *E. coli* spadała gwałtownie w czasie pierwszego impulsu, a każdy dodatkowy miał mniejszy efekt bójczy niż poprzedni. Podobne wyniki uzyskał Jayamar i in. [14]. Zhang i in. [48] również obserwowali inaktywację *S. cerevisiae*, która wzrastała w zakresie od 3 do 5 impulsów. Dalszy wzrost liczby impulsów nie wpływał na zwiększenie stopnia inaktywacji. Pomimo różnych warunków przebiegu inaktywacji jednoznacznie stwierdzono, że trudniej osiągnąć jałowość w produktach spożywczych niż w roztworach buforowych. Jest to wynikiem wyższego stężenia różnego rodzaju jonów w żywności, których obecność ma wpływ na rezystywność.

Firma Krupp Maschinentchnik GmbH opracowała technikę Elsteril do pasteryzacji i sterylizacji rozrzedzonych, przewodzących prąd elektryczny produktów spożywczych, natomiast rozwiązanie patentowe firmy Pure Pulse Technologies Inc. obejmuje proces sterylizacji przy użyciu impulsów pola elektrycznego produktów mlecznych, soków owocowych, masy jajowej itp. [21].

3. Elektroporacja jako metoda wprowadzenia makrocząsteczek do komórek

W badaniach nad mechanizmami kontrolującymi procesy fizjologiczne w komórce od wielu lat wykorzystuje się metody wprowadzania do cytoplazmy specyficznych makrocząsteczek: monoklonalnych przeciwciał, wybranych białek lub ich frakcji, oligonukleotydów, kwasów nukleinowych oraz liposomów itp. [35, 40, 42, 50]. Iniek-

cja tych molekuł prowadzi do zmiany procesów metabolicznych komórek, które są podstawą wytwarzania wielu produktów. Ważne jest zatem opracowanie stosunkowo łatwych, a jednocześnie nietoksycznych i tanich technik, pozwalających na wprowadzenie makrocząsteczek do komórek. Techniki te polegają na krótkotrwałym zniesieniu integralności błony plazmatycznej, czyli wytworzeniu w niej na tyle dużych porów, aby badane cząsteczki mogły wnikać do cytoplazmy, ale na tyle małych, aby możliwe było ich zasklepienie po pewnym czasie, charakterystycznym dla danego typu komórek. Ważne jest, aby proces ten jak najmniej uszkadzał komórkę i nie zakłócał jej podstawowych procesów fizjologicznych. Jedną z tych metod jest elektroporacja.

Działanie na komórki impulsami elektrycznymi prowadzi, jak to już wcześniej wspomniano, do powstania w niej porów o średnicy do kilkunastu nm. Przerwanie ciągłości błony zachodzi wtedy, gdy potencjał błonowy w wyniku przyłożonego napięcia przekroczy 0,5–1,0 V. Wartość ta zależy od rodzaju i rozmiarów komórki, natężenia pola elektrycznego, czasu trwania impulsu. Pole elektryczne uszkadza błonę komórkową, kiedy jego natężenie wynosi od kilkuset do kilkunastu tysięcy $V \cdot cm^{-1}$. Optymalny czas trwania impulsu i natężenia pola wyznaczone są eksperymentalnie dla każdego typu komórek. Elektroporacja jest najczęściej wykorzystywana do wprowadzenia do komórek fragmentów DNA (tab. 1), różnych białek, np. histonów (m.c. 20 kDa), owoalbumin (m. cz. 45 kDa), immunoglobulin G (m. cz. 150 kDa), katalazy (m. cz. 240 kDa), ferrytyny (m. cz. 445 kDa) [45], a także cząstek o średnicy koloidalnego złota (o średnicy 5–20 nm) i lateksu (o średnicy 0,1 μm) [20]. Elektroporacji mogą być poddane zarówno komórki zwierzęce, jak i roślinne, przylegające do podłoża lub pozostające w roztworze. Stan przepuszczalności błon dla makrocząsteczek po elektroporacji może utrzymywać się przez kilka minut do kilkunastu godzin, w zależności od rodzaju komórek, natężenia pola elektrycznego, czasu trwania impulsu, temperatury i składu chemicznego środowiska.

4. Wykorzystanie elektrycznej stymulacji w leczeniu trudno gojących się ran

Pierwsze doniesienie o użyciu kierunkowego przepływu prądu do stymulacji gojenia ran opublikowano w 1968 roku. W leczeniu wrzodów występujących na nodze użyto prądu o ujemnej polarności i amplitudzie 0,1 mA. Polarność stymulujących elektrod była zmieniana podczas cyklu gojenia, z tym że zawsze badania były zapoczątkowane przyłożeniem ujemnej elektrody do rany. Badania kliniczne wskazują na korzystny wpływ elektrycznej stymulacji na gojenie się ran skóry czy okaleczeń. Stwierdzono, że terapeutyczne efekty elektrycznej stymulacji zależne są od pozycji i kształtu elektrody. Przyspieszenie efektu terapeutycznego wrzodów uciskających

rdzeń kręgowy uzyskano po umieszczeniu anody na obszarze rany, katodę zaś przyłożono na nienaruszonej skórze po przeciwnych stronach rany. Szybsze gojenie się rany zaobserwowano w bardziej wilgotnym środowisku, umożliwiającym lepszy przepływ prądu. Dla porównania, przy ustawieniu obu elektrod na nienaruszonej skórze, po przeciwnych stronach rany, efekt leczniczy był nieznaczny [16]. Kształt i pozycja elektrod mają znaczący wpływ na ostateczny wynik gojenia ran. Najlepsze wyniki osiągnęto przy użyciu pierścieniowej anody przylegającej do zdrowej skóry na brzegach rany, podczas gdy kolista katoda pokrywała zewnętrzną powierzchnię podskórną. Zastosowane rozwiązania nie stanowią utrudnień w klinicznym postępowaniu przyspieszającym gojenie ran.

5. Wpływ pola elektrycznego na izolowane komórki i tkanki zwierzęce

Pole elektryczne może być stosowane w celu zwiększenia przepuszczalności komórek β , wyizolowanych z wysepek Langerhansa. Gdy natężenie pola elektrycznego uległo zwiększeniu, obserwowano wzrost sekrecji insuliny z wysepek z poziomu $0,8 \pm 0,13$ do $1,4 \pm 0,2$ ng na wysepkę na godzinę. Badania ultrastrukturalne komórek β nie wykazały szkodliwych zmian w ich strukturze po stymulacji prądem [46]. Z cytowanych wyników badań wynika, że pod wpływem PEF komórki trzustki ulegają znacznemu wzrostowi w swojej zewnętrznej powierzchni i akumulują więcej jonów Ca^{2+} . Po zadziałaniu pola elektrycznego o wysokim natężeniu ($3,4 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$) na komórki trzustki stwierdzono, że sekrecja insuliny może być modulowana kierunkowo przez koncentrację wapnia, w przewidywanych fizjologicznie zakresach.

W leczeniu arytmii serca stosowany jest miejscowy silny szok elektryczny, zwany defibrylacją. Może on jednak indukować dysfunkcję serca prowadzącą do poszokowej arytmii, przy jednoczesnym braku skutecznej defibrylacji. Na ten stan organizmu wpływa wysokie natężenie pola elektrycznego, które powoduje zmiany przepuszczalności membrany. Efektem takiego szoku w wypadku miocytów z zarodków kurzych jest przedłużony (do 1 minuty) okres nienormalnego skurczu, który zależy od nagromadzenia kationów wapnia [19]. Przy niskiej jego zawartości, poszokowy skurcz ulega znacznej redukcji, co może sugerować, że wzrost stężenia cytosolowego wapnia powodowany jest szokiem elektrycznym. Skurcz zanika, kiedy potencjał membranowy spada do wyjściowych wartości. W dynamice nagromadzania wewnątrzkomórkowego wapnia obserwowano dwie fazy czasowe: pobudzenie kanałów i drugi okres, znacznie dłuższy, wyróżniający się wzrostem stężenia jonów wapnia, które mogą być przyczyną uszkodzenia komórki. W komórkach wystawionych na działanie PEF obserwowano polaryzację i depolaryzację błony odpowiednio w miejscu wejścia i wyjścia przyłożonego potencjału. Jeśli potencjał transmembranowy osiąga poziom kry-

tyczny, błona staje się wysoko przepuszczalna i to jest przyczyną przejściowego formowania się mikrozmian. Niespecyficzna przepuszczalność błony rośnie wraz ze wzrostem natężenia, co przyczynia się do wzrostu stężenia wapnia międzykomórkowego. Szczegółowy mechanizm poszokowej dysfunkcji i roli cytosolowego wapnia nie jest — jak dotąd — wyjaśniony [19].

Interesujące wyniki uzyskano w badaniach nad komórkami pochodzącymi od zdolnych do bioluminescencji dżdżownic z gatunku *Lampito mauritii*. Zastosowanie PEF spowodowało zwiększenie intensywności bioluminescencji. Oprócz tego, przy natężeniu pola większym niż $125 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ zaobserwowano fuzje komórek. Wyższe jego wartości (powyżej $300 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$) powodowały całkowity zanik bioluminescencji. Wraz z tworzeniem się porów w bioświecących komórkach stwierdzono większe zużycie rozpuszczonego w pożywce tlenu [38]. Postępy w badaniach nad bioluminescencją zaowocowały wprowadzeniem aktywnych jonów do bioświecących komórek. Były one podstawą optymalizacji warunków środowiska do osiągnięcia maksymalnej bioluminescencji [3]. Spadek stężenia tlenu po działaniu pola elektrycznego można wyjaśnić przekształceniem go w formy reaktywne. W warunkach doświadczenia stymulacja prądem otwiera kanały w komórkach, przez które tlen dyfunduje i reaguje z lucyferyną, substratem bioluminescencyjnej reakcji, w reakcji katalizowanej przez lucyferazę. W takich komórkach zachodzą znaczące zmiany w intensywności luminescencji.

6. Zastosowanie PEF do indukcji syntezy metabolitów

Krótkotrwała indukcja inokulum za pomocą pulsacyjnego pola elektrycznego może znacząco poprawić wyniki przemysłowych fermentacji mikrobiologicznych. Konidia *Aspergillus niger* wystawiono na działanie PEF, a następnie wykorzystano jako inokulum do przeprowadzenia fermentacji cytrynowej. Przy zastosowaniu parametrów: $2,85 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$, 1 ms, 1Hz stwierdzono czterdziestoprocentowy przyrost kwasu cytrynowego w stosunku do hodowli kontrolnej. Stymulacja polem elektrycznym spowodowała także znaczące zwiększenie wykorzystania tlenu dostępnego w podłożu [9]. Zastosowanie PEF może również zwiększyć wydajność fermentacji alkoholowej. Badania nad drożdżami *Kluyveromyces marxianus* IMB3, hodowanymi na laktozie, wykazały, że krótkotrwała indukcja inokulum za pomocą PEF o natężeniu $2,4 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ prowadzi do zwiększenia wydajności procesu do 35% po 20 godz. fermentacji [41]. Zastosowanie pola elektrycznego jest stosunkowo prostym rozwiązaniem technicznym i dlatego może być efektywną metodą poprawy wydajności procesów biotechnologicznych.

7. Wpływ pola elektrycznego na aktywność enzymów

Pole elektryczne może wpływać na aktywność niektórych enzymów. Wpływ ten może być zarówno negatywny, jak i pozytywny. Pole elektryczne o wysokim natężeniu powoduje zazwyczaj częściową lub całkowitą inaktywację enzymów. Aktywność plazminy, enzymu pochodzącego z krowiego mleka, zawieszanej w SMUF (simulated milk ultrafiltrate), jest zredukowana o 90% po zastosowaniu 50 impulsów o natężeniu $45 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ [44]. Z drugiej strony, słabe pole elektryczne może zwiększać aktywność enzymatyczną. Pole o parametrach $20 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, 300–1000 Hz powoduje stymulację Na^+ , K^+ -ATP-azy z ludzkich erytrocytów [43]. Również dehydrogenaza alkoholowa może być stymulowana polem elektrycznym, ale tylko wówczas, gdy jest wbudowana w błonę komórkową. Enzym zawieszony w roztworze nie podlega elektrostymulacji [47].

Podsumowanie

Badania nad wpływem pola elektrycznego dotyczącego oddziaływania na szeroki wachlarz struktur biologicznych i różne grupy organizmów żywych. Działaniu pola poddaje się m.in. poszczególne enzymy, organella komórkowe oraz całe organizmy żywe — począwszy od bakterii, poprzez drożdże i grzyby nitkowate, a skończywszy na komórkach i tkankach organizmów wyższych. Jak dotąd największe aplikacyjne znaczenie może mieć zastosowanie technologii PEF do inaktywacji drobnoustrojów w produktach spożywczych. Dużym praktycznym krokiem jest wykorzystanie PEF do zwiększenia wydajności transformacji genowych. Mało rozpoznany, ale obiecującym tematem badawczym jest oddziaływanie PEF na enzymy, a w szczególności na wydajność syntezy różnego typu metabolitów, zwłaszcza tych produkowanych na skalę przemysłową w procesach fermentacji mikrobiologicznej. Niewątpliwie lepsze poznanie mechanizmów oddziaływania PEF na struktury biologiczne może przynieść wiele korzyści ekonomicznych i naukowych, jednak wymaga to dalszych wnikliwych i szeroko zakrojonych badań.

Literatura

- [1] Astumian D., Berg H. 1991. Direct electric field effects and sequential processes in biosystems. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 25: 455–462.
- [2] Benz R. 1988. Structure and function of porins from Gram-negative bacteria. *Rev. Microbiol.* 42: 359–393.
- [3] Berg H. 1987. Electrotransfection and electrofusion of cells and electrostimulation of their metabolism. *Stud. Biophys.* 119: 17–20.

- [4] Buechler L.K., Kusumoto S., Zhang H., Rosenbuch J.P. 1991. Plasticity of *Escherichia coli* porins channels. *J. Biol. Chem.* 266: 2446–2450.
- [5] Cogalniceanu G., Radu M., Fologea D., Moisoï N., Brezeanu A. 1998. Stimulation of tobacco shoot regeneration by alternating weak electric field. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 44: 257–260.
- [6] Craane-Van Hinsberg I.W.H.M., Verhoef J.C., Spies F., Bouwstra J.A., Gooris G.S., Junginger H.E., Bodde H.E. 1997. Electroperturbation of the human skin barrier in vitro: II. Effects on stratum corneum lipid ordering and ultrastructure. *Micros. Res. Techn.* 37: 200–213.
- [7] Delcour A.H. 1997. Function and modulation of bacterial porins: insights from electrophysiology. *FEMS Microbiol. Lett.* 152(2): 115–123.
- [8] Eynard N., Rodriguez F., Trotard J., Teissie J. 1998. Electrooptics studies of *Escherichia coli* electropulsation: orientation, permeabilization, and gene transfer. *Biophys. J.* 75: 2587–2596.
- [9] Fiedurek J. 1999. Influence of a pulsed electric field on the spores and oxygen consumption of *Aspergillus niger* and its citric acid production. *Acta Biotechnol.* 19: 179–186.
- [10] Harrison S.L., Barbosa-Canovas G.V., Swanson B.G. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* structural changes induced by pulsed electric field treatment. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 30(3): 236–240.
- [11] Hülshager H., Niemann E. 1980. Lethal effects of high-voltage pulses on *Escherichia coli* K₁₂. *Radiation Environ Biophys.* 18: 281–288.
- [12] Hülshager H., Potel J., Niemann E. 1981. Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiation Environ. Biophys.* 20: 53–65.
- [13] Ishiguro J., Kobayashi W. 1995. A practical method for fission yeast transformation by electroporation. *Jpn. J. Genet.* 70: 1–6.
- [14] Jayamar S., Castle G., Margaritis A. 1992. Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high-voltage pulses. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 1412–1420.
- [15] Johnson P.G., Gallo S.A., Sek Wen Hui, Oseroff A.R. 1998. A pulsed electric field enhances cutaneous delivery of methylene blue in excised full-thickness porcine skin. *J. Invest. Dermatol.* 111(3): 457–463.
- [16] Karba R., Semrov D., Vodownik L. 1974. DC electrical stimulation for chronic wound healing enhancement. Part 1-2. Clinical study and determination of electric field distribution in the numerical wound model. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 43: 265–270.
- [17] Klavinsh I.E., Galvanovsky Y.Y., Dreimanis A.P. 1991. Low-frequency electromagnetic pulses enhance Ca²⁺ uptake by chick small intestine in vitro. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 25: 437–445.
- [18] Knorr D., Geulen M., Grahl T., Sitzmann W. 1994. Food application of high electric field pulses. *Trends Food Sci. Technol.* 5: 71–77.
- [19] Krauthamer V., Jones J.L. 1997. Calcium dynamics in culture heart cells exposed to defibrillatore-typ electric shocks. *Life Science* 60: 1977–1985.
- [20] Lambert H., Pankov R., Gauthier J.H., Hancock R. 1990. Electroporation — mediated uptake of proteins into mammalian cells. *Biochem. Cell. Biol.* 68: 729–734.
- [21] Lewicki P. 1998. Tendencje w rozwoju technologii żywności. *Przem. Spoż.* 9: 31–35.

- [22] Liu X., Yousef A.E., Chism G.W. 1997. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by the combination of organic acids and pulsed electric field. *J. Food Safety* 16: 287–299.
- [23] McCaig C.D. 1988. Nerve guidance a role for bio-electric fields. *Prog. Neurobiol.* 30: 449–468.
- [24] McCaig C.D. 1990. Nerve growth in a small applied electric field and the effect of pharmacological agents on rate and orientation. *J. Cell Sci.* 95: 617–622.
- [25] McCaig C.D., Rajnicek A.M. 1991. Electric field, nerve growth and nerve regeneration. *Exp. Physiol.* 76: 473–494.
- [26] Palaniappan S., Sastry S., Ritcher E. 1990. Effect of electricity on microorganisms: a review. *J. Food Proc. Pres.* 14: 393–414.
- [27] Pawłowski P., Fikus M. 1989. Bioelectrorheological model of the cell. 1. Analysis of stress and deformations. *J. Theor. Biol.* 137: 321–337.
- [28] Pawłowski P., Fikus M. 1991. Shear deformation of the spherical shell acted on by an external electric field: possible application to cell deformation experiments. *Z. Naturforsch.* 46c: 487–494.
- [29] Pawłowski P., Fikus M. 1993. Bioelectrorheological model of the cell. 4. Analysis of the extensile deformation of cellular membrane in alternating electric field. *Biophys. J.* 65: 535–540.
- [30] Pawłowski P., Szutowicz J., Marszałek P., Fikus M. 1993. Bioelectrorheological model of the cell. 5. Electroporation and electrodestruction of cellular membrane in alternating electric field. *Biophys. J.* 65: 541–549.
- [31] Pawłowski P., Szutowicz I., Różycki S., Zieliński J., Fikus M. 1996. Bioelectrorheological model of the cell. 6. Experimental verification of the rheological model of cytoplasmic membrane. *Biophys. J.* 70: 1024–1026.
- [32] Pothakamury U.R., Monsalve-Gonzalez A., Barbosa-Canovas G.V., Swanson B.G. 1995. High voltage pulsed electric field inactivation of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii*. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 35(1): 101–107.
- [33] Pothakamury U.R., Monsalve-Gonzalez A., Barbosa-Canovas G.V., Swanson B.G. 1995. Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. *J. Food Research Int.* 28(2): 167–171.
- [34] Poznański J., Pawłowski P., Fikus M. 1992. Bioelectrorheological model of the cell. 3. Viscoelastic shear deformation of the membrane. *Biophys. J.* 61: 612–620.
- [35] Prasanna G.L., Panda T. 1997. Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology. *Bioproc. Engin.* 16: 261–264.
- [36] Prasanna G.L., Panda T., Rao P.P. 1997. Transformation of intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* by square wave pulses using castellated microelectrodes. *Bioproc. Engin.* 16: 265–268.
- [37] Sale A., Hamilton W. 1967. Effect of high electric field on microorganism. I. Killing of bacteria and yeast. *Biochem Biophys. Acta* 148: 781–788.
- [38] Santhanam K.S.V., Haram N.S., Rao L. 1997. Electric field effects on bioluminescent cells of *Lampito mauritii*: electrofusion and enhancement of bioluminescence intensity. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 43: 197–204.

- [39] Schindler H., Rosenbusch J.P. 1981. Matrix protein in planar membranes: Clusters of channels in native environment and their functional reassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2302–2306.
- [40] Serpersu E.H., Tsong T.Y. 1984. Activation of electrogenic Rb^+ transport of (Na,K)-ATPase by an electric field. *J. Biol. Chem.* 259: 7155–7162.
- [41] Simpson J., Brady D., Rollan A., Barron N., McHale L., McHale A.P. 1995. Increased ethanol production of electric-field stimulated *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media at 45°C. *Biotechnol. Lett.* 17: 757–760.
- [42] Tsong T.Y., Kinoshita K. 1985. Use of voltage pulses for the pore opening and drug loading and the subsequent resealing of red blood cells. *Bibl. Haematol. (Basel)*. 51: 1081–14.
- [43] Tsong T.Y. 1992. Molecular recognition and processing of periodic signals in cells: study of activation of membrane ATPases by alternating electric fields. *Biochim. Biophys. Acta.* 1113: 53–70.
- [44] Vega-Mercado H., Powers J.R., Barbosa-Canovas G.V., Swanson B.G. 1995. Plasmin inactivation with pulsed electric fields. *J. Food Science* 60: 1143–1146.
- [45] Vienken J., Jeltsch E., Zimmermann V. 1978. Penetration and entrapment of large particles in erythrocytes by electrical breakdown techniques. *Cytobiol.* 182–196.
- [46] Yaseen M., Pedley K., Howell S. 1982. Regulation of insulin secretion from islets of Langerhans rendered permeable by electric discharge. *Biochem J.* 206: 81–87.
- [47] Yun S-E., Yu H., Berg H. 1998. Electric field effects with alcohol dehydrogenase. *Electro-Magnetobiol.* 17: 421–426.
- [48] Zhang Q., Chang F., Barbosa-Canovas G., Swanson B. 1994. Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. Food Preservation 2000 Proceedings, Natick M.
- [49] Zimmermann U. 1986. Electrical breakdown, electroporation and electrofusion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 105: 175–256.
- [50] Zimmermann U., Vienken J., Pilwat G. 1980. Development of drug carrier system: electric field induced effects in cell membranes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 7: 553–574.

Structural changes in biological systems induced by pulsatory electric field

Key words: pulsatory electric field, electroporation, structural changes, electrostimulation

Summary

Investigations on the influence of pulsatory electric field (PEF) involve its impact on a wide scope of biological structures and different groups of microorganisms. The field activity is exerted e.g. on each enzymes, cellular organella, and all living organisms (bacteria, fungi, tissues cells of higher organisms). So far, the widest perspectives of practical application appeared in PEF technology to sterilize the food products. At

present, another practical use of PEF is to increase the efficiency of transformed genes. Moreover, the influence of PEF on level of synthesis of different metabolites (citric acid, alcohol) is also insufficiently recognized. Undoubtedly a better knowledge on acting and the effects of PEF on various biological processes may offer an important way to improve the efficiency of many metabolites; thus, the further more penetrating research of the question would be necessary.

*Adres do korespondencji:
dr hab. Jan Fiedurek, prof. UMCS
Zakład Mikrobiologii Przemysłowej
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin*