
ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Н.И. Ботошан, М.К. Болога, С.Е. Берзой

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗРЯДНЫХ И ТОКОВЫХ РЕЖИМОВ ЭЛЕКТРОПЛАЗМОЛИЗА

*Институт прикладной физики АН РМ,
ул. Академией, 5, г. Кишинев, MD-2028, Республика Молдова*

Экспериментально доказано, что между двумя сторонами клеточной мембраны существует разность потенциала (потенциал покоя), составляющая 50–80 мВ, при этом среда заряжена по отношению к внутренней поверхности мембраны положительно. Такая поляриность поддерживается специальным механизмом, локализованным в мембране, и нуждающимся в энергии (ионный насос). Механизм действия "насосов" остается пока неизвестным. Подразделяют перенос зарядов через мембрану на активный транспорт, обеспеченный действием "насосов", и пассивный, происходящий за счет диффузии [1]. Отметим, что клеточная мембрана очень тонкая, толщиной порядка 50–70 Å; диэлектрическая постоянная липидного бимолекулярного слоя $\epsilon \approx 3,5$; его удельное сопротивление $\rho \approx 10^9$ Ом·см; относительная вязкость по сравнению с водой $\eta_l / \eta_s \approx 10-100$.

Потенциал мембраны в основном определяется различной концентрацией ионов Na^+ и K^+ по разные стороны. На противоположных сторонах мембраны поддерживается различная концентрация ионов, причем внутри клетки мало ионов натрия и много ионов калия, а вне клетки наоборот. Поверхность липидной мембраны усеяна сквозными порами диаметром 5–10 Å, площадь которых составляет примерно 0,06% поверхности всей мембраны. Радиусы ионов $\text{Na}^+ \approx 1,9$ и $\text{K}^+ \approx 2,66$ Å. В [2, 3] дается простое объяснение действия "насосов" при помощи "рассасывания" объемного заряда внутри замкнутого проводящего объема. Обратим внимание на область сферической формы. Если среда, заключенная в замкнутой области, обладает диэлектрической постоянной ϵ_a и удельной проводимостью σ , то за время $\tau = \frac{\epsilon_a}{\sigma}$ во внутренней области замкнутого объема происходит полное "рассасывание" зарядов. При этом поверхностная плотность заряда, определенная процессом "рассасывания", возрастает по закону:

$$\sigma_Q = \frac{Q}{4\pi R_c} \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right).$$

Здесь рассмотрен случай замкнутого объема сферической формы радиуса R_c , но для процесса "рассасывания" геометрическая форма замкнутого объема не принципиальна. Однако для клетки с ее особой структурой – мембранной оболочкой с избирательной проводимостью в отношении к различным ионам среды, процесс "рассасывания" зарядов является виновником активного транспорта через мембрану. По-видимому, частично гидратированные ионы натрия и калия во внутренней области клетки соотносятся диаметрами как $\frac{D_K}{D_{Na}} > 1$, кроме того, $D_{Na} < D$, а $D_K > D$, где D – средний диаметр мембранных пор. Если клетка находится в свободном состоянии (вне среды), то на внешней поверхности мембраны образовывается избыток положительного заряда, перенесенного мембранным транспортом через поры ионами натрия. На внутренней поверхности образуется избыток отрицательного заряда, равного заряду, недостающему для нейтрализации среды, и унесенного ионами натрия заряда.

Например, для макроклетки аксона кальмара эта разность зарядов составляет всего 20 ммоль/л, однако она достаточна для обеспечения высокой напряженности электрического поля на мембране порядка $10^4 - 10^5$ В/см, что предопределено малой ее толщиной.

Напряженность поля на мембране E_Q отлична от нуля лишь в области толщины мембраны и равна:

$$\vec{E}_Q = \frac{Q\vec{r}}{4\pi\epsilon_a r^3}, (R_c - \delta \leq r \leq R_c),$$

где Q – избыток заряда на поверхности мембраны. Учитывая, что среда не обладает свободным зарядом (нейтральная среда), избыток заряда в точности равен заряду "рассасывания" из внутриклеточного замкнутого объема в соответствии с формулой Максвелла.

Так как клетка не находится в свободном состоянии, а всегда окружена средой, то из-за наличия мембранного транспорта в окружающей клетку среде возникает потенциал Нернста:

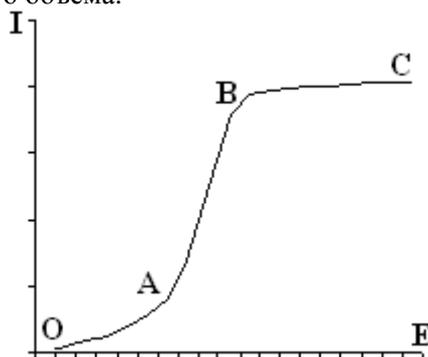
$$E_H = E_O + \frac{0,058}{n} \lg C,$$

где C – концентрация раствора в окружении клетки, n – валентность ионов, E_O – энергия ионной активации.

Фактически потенциал Нернста указывает на то, что границей клетки в среде является не клеточная оболочка, а окружающее клетку облако ионного заряда, взаимосвязанного с состоянием и мембранным транспортом клетки. Поэтому вблизи клеток в среде течет так называемый диффузионный ток I_D , возникающий из-за стремления ионов среды выравнять концентрацию путем нейтрализации избыточного заряда на внешней оболочке клетки. Этот процесс выравнивания концентрации в области пространства вблизи клетки обеспечивает ее обмен веществ с окружающей средой – это и есть суть живой клетки.

Схематический график полного миграционного тока, проходящего в окружающем клетку растворе, представлен на рисунке. На участке OA проявляется остаточный ток, на AB – скачок тока, соответствующий процессу зарядки мембраны путем "рассасывания" зарядов в замкнутом объеме внутри клетки, BC – участок сатурации, где сила тока лимитирована скоростью диффузии ионов.

Заметим, что диффузионный клеточный ток определяет процесс перестройки клетки, то есть фазовые преобразования основной структуры, которые могут привести к дегидратации, высвобождению жировых молекул мембраны, или к изменениям окислительно-восстановительных процессов как в области, непосредственно примыкающей к поверхности клетки, так и внутри ее. Естественно, самое радикальное воздействие электрического тока – это полный плазмолиз клеток, когда разрушается структура замкнутого проводящего объема.



Для выяснения некоторых общих особенностей разрушительного процесса рассмотрим отдельный элементарный заряд q на поверхности мембраны, внедренный во внешнее электрическое поле $\vec{E} = \vec{k}E$, где \vec{k} – единичный вектор направления вдоль декартовой оси – Oz . На заряд с поверхности мембраны действуют: сила $q\vec{E}$ внешнего поля; электрическая сила поля \vec{E}_Q мембраны $q\vec{E}_Q$; сила нормальной реакции поверхности мембраны \vec{N} и сила трения \vec{F}_{mp} , другими словами, сила сопротивления перераспределению заряда на поверхности мембраны.

Согласно закону Ньютона

$$m\vec{a} = q\vec{E} + q\vec{E}_Q + \vec{N} + \vec{F}_{mp},$$

где m – масса заряженной частицы, \vec{a} – вектор ускорения.

Учитывая сферическую модель клетки, запишем векторное уравнение движения заряженной частицы с поверхности мембраны клетки в естественных координатах: \vec{n} – единичного вектора нормали к поверхности сферической клетки (переменная r); $\vec{\tau}$ – единичного вектора касательной к поверхности (переменная φ); \vec{b} – единичного вектора бинормали (переменная θ). В этом случае

$$\vec{E}_Q = -\vec{n}E_Q, \vec{N} = \vec{n}N, \vec{F}_{mp} = \vec{b}F_{mp}, \vec{E} = \vec{n}E \cos \theta - \vec{b}E \sin \theta, \vec{a} = \vec{n}a_r + \vec{b}a_b,$$

система уравнений движения принимает вид:

$$\begin{cases} ma_r = qE \cos \theta - qE_Q + N, \\ ma_b = -qE \sin \theta - F_{mp}, \\ F_{mp} = fN, \end{cases}$$

где f – обобщенный коэффициент силы трения.

Частицы внешним полем уносятся с поверхности мембраны, это происходит при условии $N=0$, и следовательно, модуль ускорения процесса равен

$$a = \frac{q}{m} \sqrt{E^2 - 2EE_Q \cos \theta + E_Q^2}.$$

Отметим, что процесс возможен только в интервале углов $0 \leq \theta \leq \pi/2$, причем частицы уносятся с полюса (вершины направления оси Oz) только при $E > E_Q$:

$$a(\theta = 0) = \frac{q|E - E_Q|}{m}.$$

Угловой конус поверхности уноса заряда зависит от значения напряженности внешнего поля и ограничен условием

$$\cos \theta \geq \frac{E_Q}{E}.$$

В этом соотношении можно рассматривать только напряженности $E > E_Q$, так как при $E < E_Q$ в уравнениях движения следует сохранить силу нормальной реакции N . При $E \cong E_Q$ унос заряда происходит в точке полюса, при $\theta = 0$. Процесс заряда с внешней стороны мембраны приводит к дестабилизации структуры клетки, и при $E \gg E_Q$, возможно, к разрушению клеточного строения – уничтожению стенок замкнутого объема.

При определенных условиях переноса и "рассасывания" зарядов внутри клетки процесс уноса заряда является обратимым, и лишь значительное превышение полевого воздействия, или при длительном действии поля, превышающем возможности стабилизации, происходит разрушение жизнеспособной структуры клетки. Однако, как отмечалось, значения E_Q очень велики, и превышение их возможно только в высоковольтных полях. Разрушение клеточного строения путем электрических разрядов в биологической среде приводит к образованию проводящих токовых каналов и сильному нагреву сырья вплоть до пригорания. Оказывается, воздействовать на состояние клетки и ее структуру можно и при помощи миграционного тока через окружающий клетку раствор. Согласно рисунку существует область значений напряженности внешнего поля (участок AB), при которых происходит усиление обменного процесса через мембрану, интенсивная активация которого за определенные промежутки времени приводит к дестабилизации структуры клетки – электроплазмолизу в умеренном токовом режиме.

Рассмотрим возможность разрушения жизнеспособной структуры клетки на примере сферической формы, обладающей способностью накапливать заряды на модельном сферическом конденсаторе емкости:

$$C = 4\pi\epsilon_0\epsilon \frac{R_c(R_c - \delta)}{\delta},$$

где $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12}$ Ф/м – электрическая постоянная, ϵ – относительная диэлектрическая восприимчивость среды, R_c – внешний радиус оболочки сферической модельной клетки, δ – внутренний радиус клеточной липидной мембраны.

Учитывая, что толщина клеточной мембраны $\delta \ll R_c$, для оценки значения величины емкости клеток $C_{кл}$ получаем выражение

$$C_{\text{кл}} = 4\pi\epsilon_a \frac{R_c^2}{\delta},$$

где ϵ_a – абсолютная диэлектрическая проницаемость липидной клеточной мембраны.

Оценочные вычисления емкости клетки дают значения $C_{\text{кл}} \approx 1$ фФ (фемтофарада), что для структуры столь мелких размеров является громадной величиной. Биологическая среда состоит из огромного количества клеток, составляющих в электрическом поле решетку $mC_{\text{кл}}$ параллельных и $C_{\text{кл}}/n$ последовательных соединений, и обладает значительной реактивной емкостью. Для оценки емкости среды можно применить аппроксимацию:

$$C = \frac{S}{2kR_c d} C_{\text{кл}},$$

где S – площадь поперечника контактных электродов, d – расстояние между электродами, R_c – радиус клеточной оболочки, k – коэффициент упаковки клеток сырья; плотной упаковке соответствует $k = 1$, в общем случае $k > 1$.

Разрушительная способность тока будет проявляться в случае перекрытия напряженностью поля обработки области скачка диффузионного тока (см. рисунок). Разрушительный процесс наилучшим образом проявляется в цепи переменного (импульсного) тока, так как разрушению способствует не само значение тока, а быстрота его изменений. В цепи переменного (импульсного) тока

наряду с чисто реактивным емкостным сопротивлением – $X_c = -\frac{1}{\omega C_s}$ (ω – частота переменного тока),

биологическая среда обладает омическим (активным) сопротивлением – R , которое следует учесть при определении полного сопротивления.

В начале обработки биологической среды током ее активное и реактивное сопротивления складываются геометрически

$$Z = \sqrt{R^2 + X_c^2},$$

так как они соединены последовательно (отдельные проводящие токовые каналы отсутствуют). Поэтому $U=IZ$, где $I = \frac{dQ}{dt} = \frac{d(CU)}{dt} = U \frac{dC}{dt}$, с учетом постоянного значения амплитуды напряжения

на электродах камеры электрической обработки. Изменение реактивной емкости среды – C описывается дифференциальным уравнением:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{1}{Z}.$$

Следовательно, в начальной стадии обработки наличие тока в биологической среде обязано изменению емкости, которое впоследствии приводит к разрушению клеточного строения путем дестабилизации клеточной мембраны.

Удобной характеристикой для описания воздействия тока на вещество является разность фаз ψ между током и напряжением. Известно, что ток, обеспеченный реактивной емкостью, отстает по фазе от активного тока на $-\pi/2$. В таком случае разность фаз ψ является отрицательной величиной, заключенной в интервале значений $(-\pi/2, 0)$, и определяется отношением реактивной и активной составляющих полного сопротивления:

$$\operatorname{tg} |\psi| = \frac{1}{R\omega C}.$$

Проинтегрированное уравнение на величину модуля разности фаз имеет вид:

$$\frac{1}{\sin |\psi|} - \ln \left| \operatorname{tg} \left(\frac{\pi}{4} - \frac{|\psi|}{2} \right) \right| = \omega t.$$

Развитие процесса во времени ($t \rightarrow \infty$) определено в основном первым членом уравнения и, следовательно, $|\psi|$ стремится к нулю. Это означает исчезновение реактивного емкостного сопротивления или разрушение клеточного строения среды.

Отметим, что рассмотренный случай последовательного соединения X_c и R соответствует жестким биологическим средам с незначительным содержанием межклеточного раствора, какими являются ткани животного происхождения. В растительных средах межклеточный раствор обеспечивает образование токовых каналов с началом электрической обработки среды. В этом случае следует

рассмотреть параллельное соединение активного и реактивного сопротивлений, чему соответствует геометрическое сложение проводимостей:

$$I = U \frac{dC}{dt} = U \sqrt{\frac{1}{R^2} + \omega^2 C^2}.$$

Интегрирование этого уравнения приводит к соотношению

$$\frac{1}{2} \ln \frac{1 + \cos |\psi|}{1 - \cos |\psi|} = \omega t,$$

преобразование которого дает результат:

$$|\psi| = \arccos(\text{th} \omega t),$$

указывающий на то, что при устремлении времени к бесконечности модуль разности фаз стремится к нулю. Следовательно, и в этом отдельном случае существования параллельных проводящих каналов разрушению клеточного состояния соответствует нулевое значение разности фаз.

Эти расчеты носят оценочный характер, так как наряду с реактивным емкостным сопротивлением изменяется и активная составляющая путем генерации носителей тока в околклеточном растворе; здесь также не учтена способность среды к образованию круговых замкнутых токов и генерации магнитной индуктивности. Основное условие появления магнитных характеристик среды – это поддержание отличной от нуля производной по времени от тока среды, $-\frac{dI}{dt}$. Эти вопросы требуют

отдельного специального исследования и выдвижения модельных магнитных характеристик клетки.

Заключение

На основе свойств клеточных мембран биологических сред обосновываются два метода плазмолиза, – высоковольтный, разрядный, и в умеренном токовом режиме. Для доказательства основных отличий разрушительного действия на биологическую среду используются основная характеристика состояния клетки – потенциал липидной клеточной мембраны и условие существования селективного транспорта сквозь мембрану. Генератором переноса через мембрану и в окружающем пространстве вблизи клетки является процесс "рассасывания" электрических зарядов из внутриклеточной области – области протоплазмы (цитоплазмы), внутренних органелл и центральной вакуоли растительной клетки. Действие механизма электрического равновесия для сферического конденсатора, каким является клетка, окутанная цельной мембраной, порождает миграционный ток в непосредственной близости к оболочке клетки, являющимся основным механизмом обмена между окружающим раствором и внутренним замкнутым объемом клетки. Показано, что уничтожение мембранного потенциала, являющегося характеристикой жизнеспособности клетки, можно реализовать полем уносом заряда с внешней оболочки клетки или усилением миграционного обмена, разрушающего электрические характеристики структуры клетки, приводящего к исчезновению разности фаз между реактивным и активным сопротивлением среды, которое является признаком полной дестабилизации структурного равновесного состояния клетки – ее плазмолиза.

Отметим, что при обосновании принципа плазмолиза не учтены возможные эффекты изменения величины тока, связанные с реактивной индуктивностью среды, а также не учтена возможность генерации носителей тока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нобел П. Физиология растительной клетки. М., 1973.
2. Калашиников С.Г. Электричество. М., 1977.
3. Ботошан Н.И., Болога М.К., Берзой С.Е. Время релаксации Максвелла и электризация проводящих сред // Электронная обработка материалов. 2003. № 6. С. 44–52.

Поступила 21.08.03

Summary

Analysis of biological tissue treatment modes at electroporation was carried out. The limit of disappearance of phase displacement between current and voltage is used as a criterion of cell destruction. It is noted that the capacitance of a medium is defined by a characteristic of the cell membrane capability to accumulate the electric charges.