WPŁYW PRODUKTÓW UTLENIENIA LIPIDÓW NA WŁAŚCIWOŚCI ORAZ PROCES ELEKTROPORACJI DWUWARSTWOWYCH PŁASKICH BŁON LIPIDOWYCH

INFLUENCE OF THE LIPID PEROXIDATION PRODUCTS ON PROPERTIES AND ELECTROPORATION PROCESS OF THE PLANAR BILAYER LIPID MEMBRANES

Hanna Misiak, Krystian Kubica*

Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Katedra Inżynierii Biomedycznej, 50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27

*e-mail: Krystian.Kubica@pwr.edu.pl

STRESZCZENIE

Alternatywnym sposobem zwiększenia biernej przepuszczalności błon biologicznych dla cząsteczek biologicznie aktywnych, w tym leków, jest elektroporacja. Pod wpływem pola elektrycznego o odpowiednich parametrach w fazie lipidowej błon biologicznych pojawiają się pory. Podatność błony na elektroporację zależy od wielu czynników, w tym otoczenia komórki oraz od stanu lipidów tworzących błony. Wyniki badań doświadczalnych oraz teoretycznych dotyczące wpływu wybranych produktów utlenienia lipidów na podatność błony na elektroporację nie prowadzą do jednoznacznych konkluzji. Celem niniejszej pracy jest zbadanie wpływu wszystkich produktów utlenienia lecytyny jajecznej obecnych w utlenionej lecytynie na przebieg elektroporacji. Produkty utlenienia lecytyny zbadano techniką spektroskopii podczerwieni. Pomiary wartości parametrów elektrycznych i elektroporacyjnych utworzonych błon przeprowadzono za pomocą potencjostatu-galwanostatu w układzie 4-elektrodowym. Porównanie wyników badań z użyciem błon utworzonych z lecytyny utlenionej oraz nieutlenionej wykazało spadek wartości pojemności właściwej, wzrost rezystancji oraz stabilności błony zawierającej produkty utlenionej lecytyny. Uzyskane wyniki badań mogą być przydatne w optymalizacji protokołów elektroporacyjnych u pacjentów szczególnie narażonych na czynniki utleniające np. większą ekspozycję na UV.

Słowa kluczowe: elektroporacja, utlenienie lipidów, parametry elektroporacyjne

ABSTRACT

An alternative way of increasing the passive permeability of biological membranes to biologically active molecules, including drugs, is electroporation. Electric field of the relevant parameters applied to biological membranes creates pores in lipid part of membranes. Membrane susceptibility to electroporation depends on many factors: external environment of the cell, as well as a condition of membrane lipids. The results of experimental and theoretical research on influence of selected products of lipid oxidation on membrane susceptibility to electroporation do not lead to clear conclusions. The aim of this study is to examine the impact of all the products of oxidation of egg lecithin on the electroporation process. The oxidation of lecithin was examined by infrared

spectroscopy. Measurements of the electrical membrane characteristics and parameters of electroporation were performed using a potentiostat-galvanostat in a four-electrode system. Comparison of the results obtained in experiments performed on oxidized and unoxidized lecithin have revealed a decline in the value of the specific capacity, an increase in the resistance, and stability of the membrane containing the oxidized lipids. These results may be useful in optimizing protocols of electroporation for patients, particularly those exposed to oxidizing agents, e.g. exposure to UV.

Keywords: electroporation, lipids oxidation, parameters of electroporation

1. Wstęp

1.1. Elektroporacja

Błona komórkowa stanowi nieprzenikalną barierę dla wielu substancji. Dlatego niektóre cząsteczki nie są w stanie przedostać się do lub z komórek w sposób bierny, a w ich transporcie uczestniczą np. białka (transport aktywny, nośnikowy oraz poprzez białka kanałowe) lub pęcherzyki lipidowe (endo- lub egzocytoza). Alternatywnym sposobem zwiększania biernej przepuszczalności błon dla cząsteczek, dla których błona była nieprzepuszczalna lub przepuszczalna w nikłym stopniu, jest elektroporacja (EP). Pod wpływem pola elektrycznego o odpowiednich parametrach w fazie lipidowej błon biologicznych pojawiają się pory, których wielkość i czas życia jest przedmiotem wielu badań. Utworzenie alternatywnej drogi wymiany molekularnej pomiędzy wnętrzem komórki i jej otoczeniem znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach takich jak: biologia, biotechnologia i medycyna [1, 2, 3].

Od lat pięćdziesiątych XX wieku wiadomo, że impulsy elektryczne prowadzą do inaktywacji mikroorganizmów takich jak *Escherichia coli, Streptococcus faecalis, Bacillus subtilis, Streptococcus cremoris* i *Micrococcus radiodurans* [4], dlatego elektroporacja może stanowić alternatywę pasteryzacji w przemyśle spożywczym [5]. Ponieważ EP jest metodą nietermiczną, więc pozwala na zachowanie smaku, koloru i struktury danego produktu, jest stosowana głównie do pasteryzacji produktów ciekłych takich jak np. sok pomarańczowy [6]. W przemyśle spożywczym stosuje się elektroporację nieodwracalną, która znalazła także zastosowanie w medycynie jako alternatywa dla termicznej ablacji tkanek (głównie jako narzędzie w chirurgii) przy usuwaniu zmian nowotworowych ze szczególnym uwzględnieniem zmian usytuowanych w okolicach dużych naczyń krwionośnych [7, 8]. Elektroporacja znalazła także zastosowanie jako metoda ułatwiająca fuzję błon lipidowych zarówno biologicznych, jak i sztucznych. Proces ten nosi nazwę elektrofuzji. Jego molekularny mechanizm, podobnie jak mechanizm elektroporacji, nie został jeszcze dokładnie poznany, jednak metoda ta jest stosowana w wielu laboratoriach [9, 10] do badania np. warunków elektrofuzji komórek [11, 12, 13].

Terapia genowa stanowi obiecujące narzędzie do walki z chorobami genetycznymi zarówno nabytymi, jak wrodzonymi. Polega na wprowadzeniu materiału genetycznego do komórek organizmu z dysfunkcjami, który pozwoliłby na przywrócenie im prawidłowego funkcjonowania. Dotychczas transfer dużych cząsteczek, jak DNA i RNA do komórek był realizowany za pomocą nośników,w tym wirusowych. EP może stanowić alternatywną metodę dostarczania materiału genetycznego [14], ponieważ pole objęte terapią jest ograniczone do obszaru wyznaczonego przez elektrody. Dzięki temu nie powoduje wysokiej odpowiedzi immunologicznej i ma znacznie większą wydajność w porównaniu do metody bazującej na wektorach wirusowych [15]. Zastosowanie EP w połączeniu z terapią fotodynamiczną powoduje minimalizację efektów ubocznych działania fotouczulaczy, ponieważ przy terapii łączonej, można zmniejszyć dawki fotouczulaczy [16, 17].

Innym medycznym zastosowaniem EP jest wprowadzanie leków przez skórę [18, 19]. Badania nad skutecznością stosowania EP w tym celu były przeprowadzane zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [20]. Wydajność tego procesu zależy od parametrów impulsu elektroporacyjnego (amplitudy, częstotliwości, kształtu, czasu trwania impulsu) oraz właściwości fizyko-chemicznych leku (ładunek, lipofilność, masa cząsteczkowa) [21]. Wydajność wprowadzania substancji czynnej przez skórę możne być zwiększona poprzez łączne stosowanie EP z ultradźwiękami, jonoforezą lub wybranymi związkami chemicznymi [21, 22, 23]. Można zatem przy odpowiednio dobranych parametrach impulsu elektroporacyjnego

wprowadzać do organizmu leki o różnym działaniu np. przeciwbólowym [24], przeciwzapalnym [23], anestetycznym [25] czy cytostatycznym [26].

Jednym ze szczególnych przypadków przezskórnego dostarczania leków z udziałem EP jest elektrochemioterapia (ECT) [27]. Polega ona na zwiększeniu skuteczności chemioterapii z wykorzystaniem np. bleomycyny i cis platyny [28]. Wspomaganie chemioterapii elektroporacją pozwala na zwiększenie wydajności działania leku, a przez to zmniejszenie jego dawek i toksycznych efektów ubocznych. Testy wykazały, ze można uzyskać nawet 500-krotny wzrost skuteczności bleomycyny *in vitro* w porównaniu do standardowych metod jej wprowadzania [29], co przekłada się na niemal 75% wzrostu skuteczności tego leku *in vivo* [27, 30].

Ponieważ zastosowanie EP do docelowego wprowadzania leków jest stosunkowo nowym rozwiązaniem, ciągle pracuje się nad optymalizacją parametrów procesu oraz wykorzystywanego do zabiegów sprzętu [24, 31, 32]. Opracowania te mają na celu obniżenie dyskomfortu odczuwanego przez pacjenta w trakcie zabiegu oraz zwiększenie wydajności procesu [33].

Na wydajność i przebieg elektroporacji ma wpływ wiele czynników, które modyfikują właściwości dwuwarstw lipidowych. Mogą one stabilizować lub destabilizować dwuwarstwę, wpływając w ten sposób na jej podatność na EP. Surfaktanty stosuje się jako modyfikatory właściwości błon lipidowych również w elektroporacji skóry, w celu zwiększenia wydajności procesu [23]. Wykazano, że C12E8 (glikol polioksyetylenowy), obniża napięcie przebicia błon lipidowych [34] nawet siedmiokrotnie [35]. Nie wszystkie surfaktanty wpływają w taki sam sposób na właściwości błon lipidowych. To, czy będą zwiększać czy zmniejszać podatność błon na EP, zależy od ich struktury chemicznej. Na przykład inny surfaktant P188 (poloxamer) działa antagonistycznie do wspomnianego już C12E8 i podwyższa napięcie przebicia dwuwarstw lipidowych [35, 36], obniża ich pojemność elektryczną i wydłuża czas odtwarzania ciągłej struktury membrany po elektroporacji [36].

Skład lipidowy błony ma znaczący wpływ na jej właściwości i funkcje. Cholesterol obecny w błonach komórkowych zwiększa uporządkowanie i upakowanie lipidów w części hydrofobowej membrany, zmniejsza jej przepuszczalność, a tym samym podatność na elektroporację [37, 38]. Ponadto jego specyficzna budowa (sztywne pierścienie i mała grupa hydrofilowa) determinuje umiejscowienie cholesterolu w dwuwarstwie, powodując zmniejszenie średnicy pora w porównaniu do błon bez cholesterolu [39]. Wykazano także, że zawartość utlenionego cholesterolu w membranach znacznie zwiększa odporność błon na EP [45].

Jeśli utleniony cholesterol zmniejsza podatność błony na zmiany w wyniku działania pola elektrycznego, to należy postawić pytanie, jaki wpływ wywierają inne produkty utlenienia lipidów tworzących błony?

Wyniki symulacji komputerowych metodą Dynamiki Molekularnej sugerują, że obecność produktów utleniania lipidów w błonach powoduje zmniejszenie ich grubości, zwiększenie ich podatności na EP (przez obniżenie napięcia granicznego wywołujące powstanie pora i skrócenie czasu potrzebnego na jego utworzenie) [40, 41, 42]. Badania przeprowadzone na liniach komórkowych potwierdzają wzrost wrażliwości błon na EP w obecności utlenionych lipidów [40, 41, 43]. Również badania doświadczalne przeprowadzone na BLM (ang. *black lipid membranes* – czarne błony lipidowe) osadzonych na podłożu stałym sugerują, że wywołane promieniowaniem UV utlenianie lipidów powoduje powstawanie zmian w organizacji dwuwarstwy, prowadzące do wytworzenia porów [44].

Oprócz omówionych dotychczas czynników modyfikujących membrany, a przez to mających wpływ na przebieg EP, istotne są również czynniki fizyczno-chemiczne, takie jak temperatura, pH czy siła jonowa elektrolitu, w którym zawieszone są linie komórkowe, liposomy lub BLM. Wymienione czynniki mają wpływ na warunki eksperymentalne, które determinują parametry elektroporacyjne błon lipidowych. Wzrost temperatury powoduje zmiany właściwości mechanicznych błon, obniżając napięcie powierzchniowe i zwiększając ich płynność, doprowadzając do obniżenia potencjału przebicia membran [45]. Również wzrost siły jonowej buforu wpływa obniżająco na napięcie przebicia błon [45].

1.2. Wpływ utlenienia lipidów na właściwości błon lipidowych

Zainteresowanie procesem utleniania struktur biologicznych oraz sposobami kontrolowania tego procesu ciągle wzrasta ze względu na jego znaczenie fizjologiczne, jak i patologiczne [46]. Lipidy są

podstawowym budulcem błon biologicznych i warunkują przebieg wielu procesów fizjologicznych. Dlatego wystąpienie dysfunkcji błon komórkowych jest kluczowe dla procesów życiowych każdej komórki. Kontrola zawartości poszczególnych rodzajów lipidów w błonach biologicznych warunkuje prawidłowe funkcjonowanie komórek. Zatem utlenienie lipidów nie powinno być obojętne dla prawidłowej fizjologii komórek.

Wyniki prac eksperymentalnych oraz uzyskanych technikami symulacji komputerowych przynoszą rozbieżne informacje. Obecność produktów utleniania lipidów w błonach zaburza ich płynność. Istnieją prace, w których wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia produktów utlenienia lipidów w błonach ich płynność rośnie [47, 48] oraz takie, gdzie wykazano przeciwny efekt [49, 50, 51]. Znane są także doniesienia mówiące, iż obecność utlenionych lipidów w błonie nie wpływa ani na sposób upakowania lipidów w dwuwarstwie [52], ani na zmianę jej płynności [53]. Różnice te mogą wynikać z różnych sposobów utleniania lipidów w poszczególnych eksperymentach [54, 55]. Trudności w interpretacji wyników badań prowadzonych na utlenionych błonach biologicznych wynikają ze złożoności procesu utlenienia (różnego czasu przebiegu poszczególnych jego etapów oraz stabilności powstałych produktów).

Dotychczas możliwe było zbadanie wpływu poszczególnych produktów utleniania na właściwości błony komórkowej, czego dokonał w 2007 r. Wong-Ekkabut z zespołem, na podstawie symulacji komputerowych [55]. Badali jedynie wpływ terminacji łańcuchów węglowodorowych grupą aldehydową oraz wodoronadtlenkową. Okazało się, że takie utlenienie cząsteczek lipidów prowadzi do zmian ich konformacji i lokalizacji w dwuwarstwie. Utlenione łańcuchy zwracały się w kierunku fazy wodnej, a wchodzący w ich skład atom tlenu tworzył wiązania wodorowe z cząsteczkami wody. Taka zmiana konformacyjna lipidów skutkowała wzrostem średniego pola powierzchni przypadającego na jedną cząsteczkę lipidu – co prowadziło do zmniejszenia grubości błony oraz sprzyjało powstawaniu defektów wodnych i wzrostowi przepuszczalności błony dla wody. Efekt ten jest zależny proporcjonalnie od stężenia utlenionych lipidów w błonie [55].

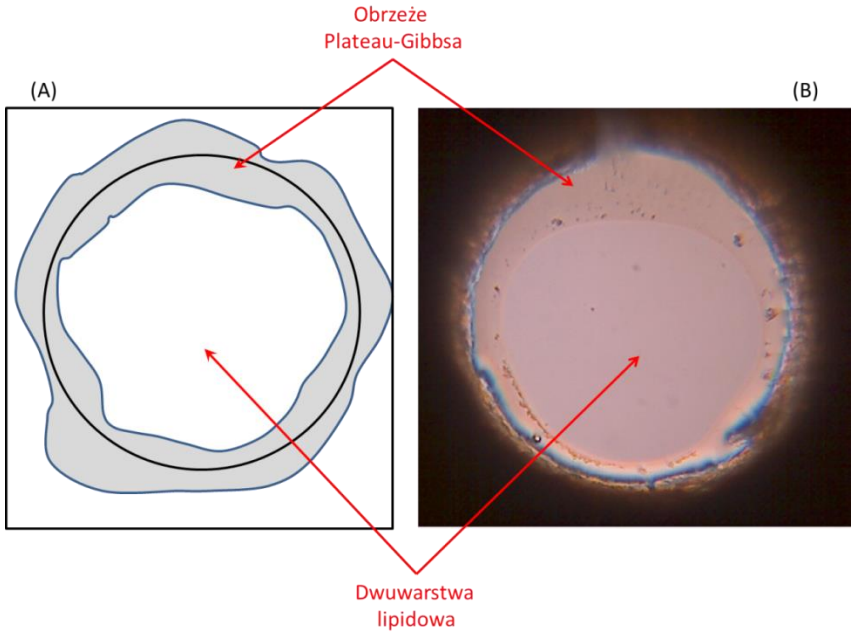
Badania doświadczalne – techniką spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS) oraz teoretyczne – metodą dynamiki molekularnej, wykazały, że dodatek utlenionych lipidów do błon powoduje wzrost ruchliwości lipidów zarówno lokalnie, w obszarze głów polarnych lipidów, jak i globalnie – wzrost dyfuzji lateralnej. Stopień tych zmian zależy od budowy utlenionego lipidu [56]. Obecność grup aldehydowych (końcowe produkty utleniania) w łańcuchach węglowodorowych lipidów ma mniejszy wpływ na zmianę ruchliwości polarnych głów lipidowych niż wodoronadtlenków (początkowych produktów utleniania), ponieważ grupa aldehydowa jest mniej polarna niż wodoronadtlenkowa. Powyższe badania dowodzą, że różne produkty utlenienia lipidów mają inny wpływ na właściwości błony i nie należy uogólniać wniosków w tym zakresie [57].

Konsekwencją powstawania i wbudowania w membrany produktów utleniania lipidów jest zaburzenie funkcji organizmu, prowadzące do stanów chorobowych i patologicznych [58, 59], takich jak: miażdżyca [60, 61, 62, 63] cukrzyca [60, 61] reumatoidalne zapalenie stawów [60, 61], powstawanie zmian rakowych [64], stany zapalne i choroby neurodegeneracyjne [65] jak choroba Alzheimera [66] czy choroba Parkinsona [67].

2. Materiały i metody

Badania zostały przeprowadzone na dwuwarstwowych płaskich błonach lipidowych (BLM) metodą Muellera-Rudina [68]. Do badań wykorzystano teflonowe naczynko podzielone cienką ścianką na dwie komory o pojemności 8 ml. W przegrodzie wywiercono otwór o średnicy 1,1 ± 0,1 mm, w którym w trakcie eksperymentu formowała się BLM. Do zawieszania membran stosowano roztwór lecytyny w dodekanie i n-heksanie o stężeniu 20 mg/ml. Do wykonania roztworów stosowano L-α fosfatydylocholinę (lecytynę jajeczną – Fluka o czystości >99%) oraz jej drugą, utlenioną w kontakcie z powietrzem atmosferycznym, postać. Utleniona lecytyna zawierała wszystkie naturalne produkty utlenienia. Na otwór w przegrodzie komory nanoszono roztwór lecytyny w n-heksanie i pozostawiano do odparowania rozpuszczalnika (60 min). Tak przygotowane naczynko pomiarowe napełniano 0,01M buforem HEPES o pH = 7,0 zawierającym 0,1M KCl. Do tworzenia membran lipidowych wykorzystano roztwór formujący, który stanowił roztwór lecytyny w dodekanie. Kroplę tego roztworu nanoszono przy użyciu pipety na otwór w przegrodzie teflonowej. Po upływnie kilkunastu minut w otworze powstawała membrana

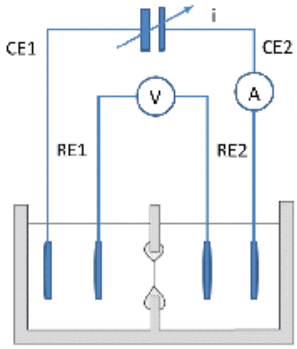
w postaci dwuwarstwy lipidowej (p. rys. 1). Proces formowania się dwuwarstwy był monitorowany w czasie rzeczywistym poprzez obserwację wyglądu membrany oraz rejestrację jej pojemności elektrycznej.



Rys. 1. Schematyczna prezentacja (A) oraz rzeczywisty obraz (B) błony lipidowej utworzonej w otworze o średnicy 1 mm w przegrodzie teflonowej dzielącej dwie komory

2.1. Potencjostat-galwanostat

Pomiary wartości parametrów elektrycznych i elektroporacyjnych utworzonych błon przeprowadzono za pomocą potencjostatu-galwanostatu, którego konstrukcje i sposób działania opisano w literaturze [69, 70]. Wszystkie pomiary zostały przeprowadzone w układzie 4-elektrodowym (elektrody Ag/AgCl) zilustrowanym na rysunku 2.



Rys. 2. Komory pomiarowe przedzielone przegrodą teflonową z otworem, w którym formowana jest dwuwarstwa lipidowa. Za pomocą pary elektrod CE1 i CE2 wymuszany jest przepływ prądu o ustalonej wartości. Druga para elektrod RE1 i RE2 służy do pomiaru napięcia po obu stronach błony lipidowej

Komora pomiarowa wraz z elektrodami umieszczona została w klatce Faradaya w celu uniknięcia zakłóceń. Za pomocą pary elektrod CE1-CE2 wymuszano przepływ prądu o ustalonych wartościach, natomiast para elektrod RE1-RE2 pozwalała rejestrować zmiany potencjału w poprzek membrany.

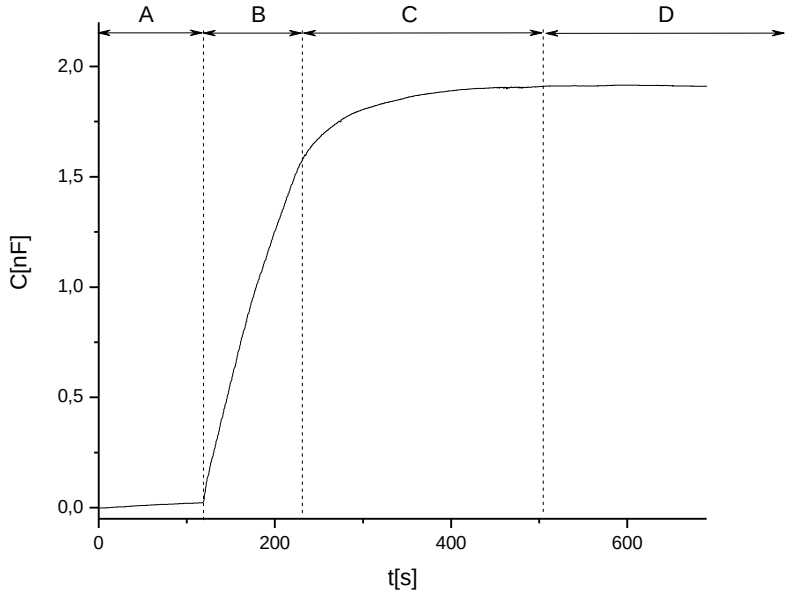
2.2. Pomiar pojemności

Pojemność elektryczna jest charakterystycznym parametrem BLM, ponieważ dwuwarstwa lipidowa rozdzielająca dwa roztwory może być modelowana jako kondensator. BLM składa się z trzech warstw ułożonych w kolejności hydrofilowa–hydrofobowa–hydrofilowa, różniących się wartością pojemności elektrycznej. Pojemność warstw hydrofilowych jest o wiele większa od pojemności warstw hydrofobowych, dlatego to ona decyduje o wartości pojemności całkowitej BLM [71]. Jeśli traktujemy BLM jako pojedynczy kondensator, jego pojemność można wyznaczyć ze wzoru:

$$C = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon S}{d} \tag{1}$$

gdzie:
C– pojemność całkowita membrany,
ε_0 – przenikalność elektryczna w próżni,
ε – efektywna względna przenikalność elektryczna membrany,
S – pole powierzchni dwuwarstwy,
d – efektywna grubość membrany.

Na podstawie zarejestrowanych krzywych zmian pojemności BLM w czasie można określić właściwości membran i kinetykę ich samoorganizacji w strukturę dwuwarstwy. Analiza kształtu krzywych zależności zmian pojemności BLM w funkcji czasu pozwala na podział procesu formowania się BLM na kilka etapów (p. rys. 3).



Rys. 3. Zmiana pojemności błony lipidowej w trakcje formowania dwuwarstwy lipidowej

W opisanych tu eksperymentach przyjmowano, że dwuwarstwa jest stabilna (proces formowania został ukończony), jeśli zmiana jej pojemności w ciągu 60 s nie była większa niż 10 pF [72]. Taka membrana została poddana dalszym badaniom – pomiarom rezystancji i parametrów elektroporacyjnych (napięcie oraz czas przebicia).

Ponieważ otwór, w którym zawieszana jest BLM nie jest całkowicie wypełniony dwuwarstwą (pewną część powierzchni otworu zajmuje obrzeże Plateau-Gibbsa), konieczne jest wyznaczenie pojemności specyficznej BLM (C_m), która jest określana jako stosunek pojemności całkowitej membrany do rzeczywistej powierzchni dwuwarstwy zgodnie ze wzorem:

$$C_m = \frac{C}{S} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{d} \tag{2}$$

2.3. Pomiar rezystancji

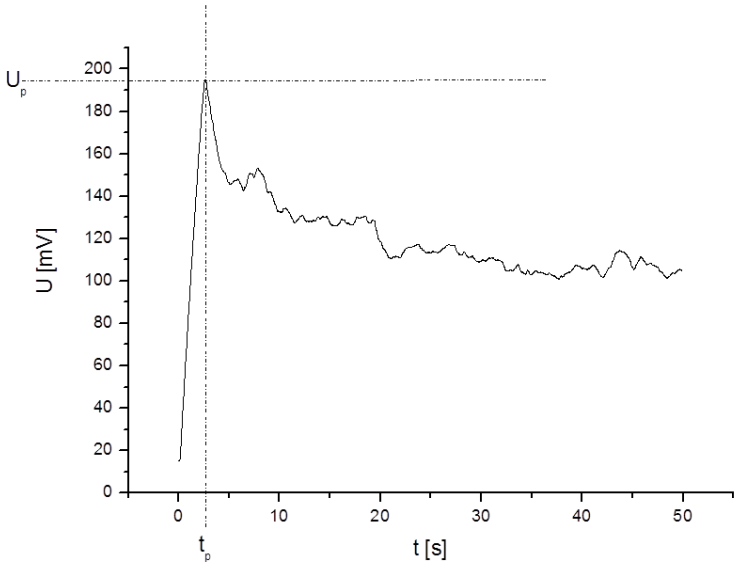
Kolejnym parametrem BLM jest rezystancja elektryczna. Jej wartość waha się w zakresie gigaomów [70, 73] i podobnie, jak wartość pojemności, zależy od warunków eksperymentalnych (stosowane lipidy, rozpuszczalniki, metody formowania BLM). Przedstawienie dwuwarstwy jako równoległe połączenie rezystancji (R_M) oraz pojemności (C_M) jest prawdziwe dla takich wartości natężeń prądu, które nie powodują powstania porów. Jeśli por nie powstanie, napięcie mierzone w poprzek membrany można wyznaczyć z zależności (3):

$$U_M = i \cdot R_M \tag{3}$$

Zazwyczaj wartość rezystancji jest wyznaczana z wykorzystaniem prawa Ohma poprzez rejestrację krzywych woltoamperometrycznych i taką metodę stosowano w niniejszej pracy. Krzywe woltoamperometryczne były rejestrowane w układzie 4-elektrodowym w zakresie od –50 do 50 mV ze skokiem napięcia 10 mV/s.

2.4. Parametry elektroporacyjne (napięcie i czas przebicia błony)

Napięcie przebicia (U_p) jest rozumiane jako napięcie, przy którym powstaje elektropor. Natomiast czas przebicia (t_p) jest to czas, po którym zaszła elektroporacja. Nie należy tu mylić terminu napięcie przebicia z napięciem, które powoduje przerwanie (zniszczenie) BLM. Do wyznaczenia wartości parametrów elektroporacyjnych zastosowano chronopotencjometrię. Jest to metoda stałoprądowa polegająca na rejestracji zmian potencjału w czasie przepływu prądu o stałym natężeniu przez badany układ [73, 74]. Jeśli przyjąć, że elektrycznym modelem dwuwarstwy może być równoległe połączenie rezystancji oraz pojemności, to różnica potencjałów po obu stronach membrany rośnie powoli wraz ze wzrostem natężenia prądu wymuszonego przez elektrody prądowe, a następnie przyjmuje stałą wartość, zależną od rezystancji membrany. Jeśli zwiększy się natężenie prądu płynącego przez BLM wzrośnie również wartość napięcia. Wzrost będzie następował do czasu przebicia membrany, czyli powstania elektropora. Jego obecność w membranie obniża jej rezystancję. Dalsza część krzywej (p. rys. 4) obrazuje fluktuacje średnicy elektropora, co przejawia się w oscylacjach napięcia na membranie. Zbyt wysokie natężenie prądu powoduje nieodwracalne przebicie membrany czyli zniszczenie jej. W tym przypadku obserwujemy nagły wzrost napięcia do pewnej wartości maksymalnej, a następnie spadek napięcia do zera [72]. Zatem odpowiednio dobrane natężenie prądu prowadzi do powstania pojedynczego stabilnego pora, bez zniszczenia membrany [75, 76]. W takich warunkach następuje powolne ładowanie membrany, a powstanie pierwszego pora powoduje nagły spadek potencjału transbłonowego, co uniemożliwia powstawanie kolejnych porów [73]. Podczas elektroporacji BLM można spodziewać się uzyskania jednej z trzech charakterystycznych krzywych chronopotencjometrycznych. Ich kształt zależy od wielkości natężenia prądu stosowanego do elektroporacji [72]. Moment powstania pora i spadku potencjału jest opisany przez parametry elektroporacyjne membrany – napięcie (U_p) oraz czas przebicia (t_p). Parametry te można wyznaczyć na podstawie krzywych chronopotencjometrycznych. Rysunek 4 przedstawia typową krzywą elektroporacyjną uzyskaną podczas opisanych w tym artykule badań. Na wykresie zaznaczono kluczowe parametry elektroporacyjne. Po powstaniu elektropora na krzywej widoczne są nieregularne fluktuacje napięcia transbłonowego spowodowane otwieraniem i zamykaniem się powstałego pora [76, 77].



Rys. 4. Zmiany napięcia mierzonego w poprzek dwuwarstwy lipidowej.
W chwili t_p gdy napięcie przyjmuje wartość U_p następuje utworzenie pora w dwuwarstwie

2.5. Analiza stopnia utlenienia lecytyny

Jedną z metod badania produktów utlenienia lecytyny jest analiza widm spektralnych w zakresie podczerwieni. Rejestrację widm obu lecytyn, utlenionej oraz nieutlenionej, dokonano za pomocą spektrofotometru ATR-FTIR NICOLET 6700 Thermo Scientific metodą całkowitego wewnętrznego odbicia na krysztale diamentowym. Uzyskane widma podlegały obróbce z wykorzystaniem oprogramowania OMNIC, Excel oraz Origin Pro. Każda próbka była skanowana stukrotnie (widmo jest wynikiem uśrednienia 100 skanów), a eksperyment powtarzano 3 razy. Widma były rejestrowane w zakresie od 4000 do 400 cm^{-1} z rozdzielczością 4 cm^{-1}.

3. Wyniki

3.1. Analiza stanu utlenionej lecytyny

Aby określić zmiany, które zaszły w utlenionej lecytynie porównano widma w zakresie podczerwieni lecytyny nieutlenionej oraz utlenionej. Na podstawie danych literaturowych dokonano identyfikacji drgań odpowiednich grup atomów w cząsteczce lecytyny (p. tabela 1), których zmiany mogą świadczyć o zajściu procesu utleniania [78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102].

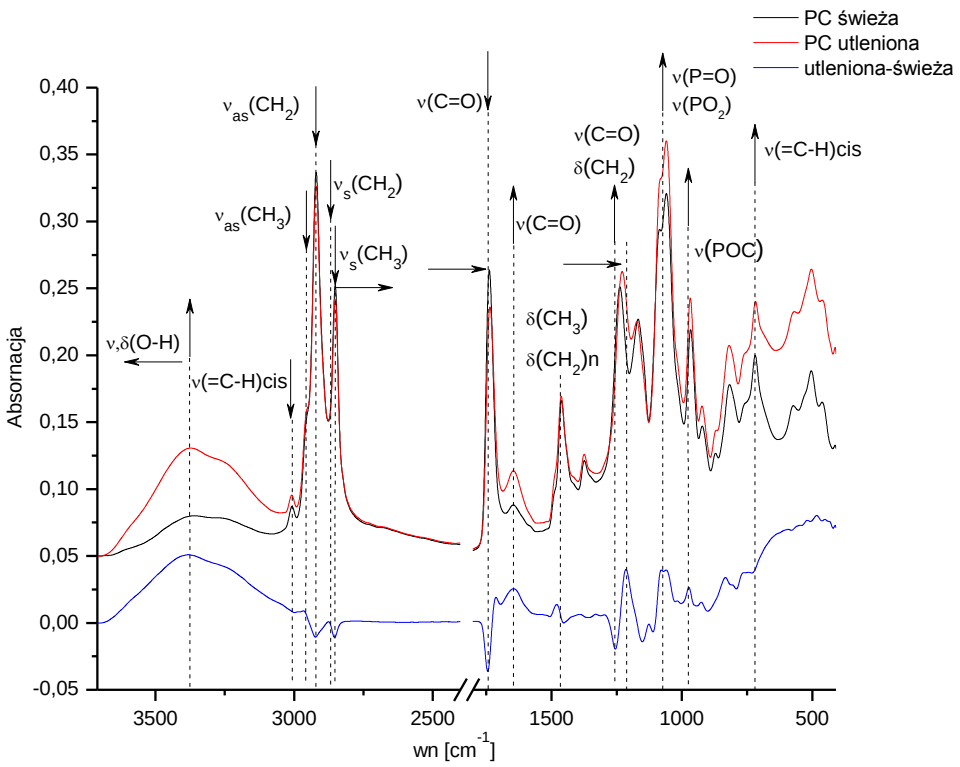
Rysunek 5 przedstawia widma spektroskopii IR dla obu lecytyn oraz ich różnicę (widmo lecytyny utlenionej minus widmo lecytyny nieutlenionej) w zakresie od 4000 do 400 cm^{-1}. Strzałkami zaznaczono kierunek zmian (wzrost amplitudy pasma – strzałka skierowana do góry, obniżenie amplitudy pasma – strzałka skierowana jest w dół, strzałka w prawo/lewo – przesunięcie pasma odpowiednio w prawo/ lewo) specyficznych pasm obrazujących drgania poszczególnych atomów w cząsteczkach lecytyny. W paśmie 3010 cm^{-1} widoczne są drgania atomów wodoru przyłączonych do atomów węgla przy wiązaniu podwójnym w konfiguracji *cis* w nienasyconych kwasach tłuszczowych [92, 94, 95, 96, 103, 104, 105, 106] oraz drganiom atomów grupy CH_2 rozciągającym asymetrycznym odpowiadają pasma przy 2921 cm^{-1} [93, 107] i symetrycznym przy 2851 cm^{-1} [82, 85, 92, 93]. Dla drgań asymetrycznych nastąpił zanik (osłabienie) jednego z pasm w widmie lecytyny utlenionej. Podobne zmiany odnotowano również dla pasm grup $–CH_3$ oscylacji asymetrycznych (2958 cm^{-1}) [93, 105]. Pasmo drgań symetrycznych (2871 cm^{-1}) grup CH_3 nie uległo przesunięciu. Porównanie widm zarejestrowanych dla lecytyny świeżej i utlenionej pokazało, że na widmie lecytyny utlenionej, w porównaniu do lecytyny

świeżej, w zakresie (3750–3150) cm^{-1} odnotowano obecność pasma odpowiadającego drganiom -O-H w wodoronadtlenkach (LOOH), pierwotnych produktach utlenienia lipidów [91, 103]. Wykonanie widm różnicowych pozwoliło oszacować wielkości zmian amplitud drgań w analizowanych pasmach. Oprócz pomiaru amplitudy dokonano również pomiaru pola powierzchni pod pikiem w opisywanym obszarze (3750–3150) cm^{-1} oraz wyznaczona została jego szerokość połówkowa. Pole powierzchni pod pikiem w badanym zakresie jest trzykrotnie większe dla próbki utlenionej w porównaniu do nieutlenionej Szerokość połówkowa również ulega powiększeniu w przypadku lecytyny utlenionej. Takie zachowanie potwierdza powstanie pierwotnych produktów utleniania lipidów czyli wodoronadtlenków [84, 85, 86, 100].

Tabela 1. Położenia pasm (w cm^{-1}), charakter drgań, rodzaj oscylacji (ν_a – drganie rozciągające, δ_a - zginające i kołyszące, γ - wachlarzowe, s – symetryczne, a_s - asymetryczne) lecytyny jajecznej w widmach IR.

Wn [cm^{-1}]	**Drganie**	**Charakter drgań**
3010	ν_a (C-H)	słabe
2956	ν_a (CH_3)	średnie
2920	ν_a (CH_2)	bardzo mocne
2871	ν_s(CH_3)	średnie
2851	ν_s(CH_2)	mocne
1740/1739	ν (C=O)	mocne
1645	ν (C=O)	słabe
1463/1464	δ(CH2)n, δ(CH_3)	średnie
1439	δ(CH2)n, δ(CH_3)	średnie
1415	δ (αCH_2)	słabe
1375/1376	δ(CH_3)	słabe
1239/1238	γ_w(CH_2)	mocne
1168/1169	ν (C-O)	mocne
1144	ν (C-O-C)	średnie
1114/1118	ν (P=O)	średnie
1092/1090	ν_s (P=O), ν (C-O-C)	mocne
1055	ν (PO_2)	bardzo mocne
968/969	ν (P-O-C),	średnie
720/719	δ /rocking (CH_2) i (HC=CH)	średnie

W przypadku utlenionej lecytyny nastąpiła zmiana konfiguracji łańcuchów kwasów tłuszczowych z *cis* na *trans* (zmniejszenie amplitudy przy 3010 cm^{-1} oraz 720 cm^{-1} z jednoczesnym wzrostem amplitudy przy 968 cm^{-1}). Dodatkowo amplituda drgań C=O dla α, β nienasyconych aldehydów przy 1740 cm^{-1} maleje, co może oznaczać, iż doszło do nasycenia łańcuchów kwasów tłuszczowych. Największy wzrost intensywności drgań (124%) występuje w paśmie obrazującym drgania atomów grupy aldehydowej, znajdującej się w pobliżu wiązań podwójnych C=C. Tak duża zmiana w tym obszarze widma świadczy o tym, że lecytyna utleniona znajduje się w końcowej fazie utleniania – aldehydy należą do końcowych produktów utlenienia. Wyniki sugerują również, że nastąpił spadek liczby drgań zginających dla $(CH_2)_n$ oraz rozciągających dla CH_2, co mogło być spowodowane kilkoma czynnikami: zmianą konfiguracji łańcuchów z *cis* na *trans*, wzrostem nasycenia łańcuchów węglowodorowych lub przerwaniem wiązań podwójnych. Za zmianą konfiguracji *cis* na *trans* oraz wzrostem nasycenia łańcuchów węglowodorowych w próbce przemawia również spadek drgań rozciągających ν(C-O-C) w paśmie 1092 cm^{-1} oraz drgań zginających δ(CH_3) w paśmie 1375 cm^{-1}, co świadczyłoby o zmianie swobody ruchów łańcuchów węglowodorowych. Powyższa analiza sugeruje, że lecytyna utleniona znajduje się w końcowej fazie procesu utleniania [85].



Rys. 5. Widmo w podczerwieni lecytyn: jajecznej nieutlenionej (czarna linia) oraz utlenionej (czerwona linia). Kolorem niebieskim oznaczono różnicę widma lecytyny utlenionej i nieutlenionej

Porównanie wartości stosunku amplitud dla drgań ν_a(C-H)*cis*/$\nu_{as}CH_3$ pozwoliło sprawdzić czy łańcuchy węglowodorowe uległy nasyceniu. Skróceniu łańcuchów odzwierciedla stosunek amplitud dla drgań $\nu_{as}CH_2/\nu_{as}CH_3$ [79, 108]. Wyznaczone wartości obliczonych stosunków obrazują niewielki wzrost nasycenia łańcuchów oraz ich skrócenie w próbce lecytyny utlenionej w porównaniu do świeżego odczynnika (p. tabela 2). Skrócenie łańcuchów węglowodorowych wchodzących w skład lipidu wiąże się z ich przerwaniem, a to oznaczałoby, że w skład próbki wchodzą nie tylko łańcuchy węglowodorowe przyłączone do głów lipidowych, ale również węglowodory niebudujące cząsteczek lipidów. Tego typu zmiany zostały potwierdzone przez obserwowalny wzrost intensywności drgań rozciągających C=O w paśmie 1711 cm^{-1} w karboksylowej grupie funkcyjnej.

Tabela 2. Stosunki amplitud widm lecytyny jajecznej (eggPC) oraz eggPC utlenionej pozwalające określić następujące podczas utleniania zmiany nasycenia oraz długości łańcuchów węglowodorowych wchodzących w skład lecytyny

próbka	Obliczany parametr	
	Av_a(C-H)*cis*/$Av_{as}(CH_3)$	$Av_{as}(CH_2)/Av_{as}(CH_3)$
eggPC	0,264	0,234
eggPC utleniona	0,240	0,255

Podsumowując, w lecytynie utlenionej łańcuchy węglowodorowe, wchodzące w skład lipidu, ulegają izomeryzacji z konfiguracji *cis* na *trans* oraz zwiększa się ich stopień nasycenia (zanik wiązań podwójnych). Dochodzi również do skrócenia łańcuchów węglowodorowych na skutek przerwania jednego z wiązań podwójnych. Stąd w próbce oprócz cząsteczek lipidu znajdują się cząsteczki węglowodorów, powstałych w wyniku przerwania łańcuchów węglowodorowych w miejscu wystąpienia wiązania podwójnego.

3.2. Parametry elektryczne BLM

3.2.1. Pojemność

Wyznaczenie pojemności właściwej membrany pozwala na eliminację wpływu rzeczywistej powierzchni dwuwarstwy na uzyskany wynik. Uzyskane wartości pojemności oraz pojemności właściwej BLM utworzonej ze świeżej lecytyny jajecznej oraz utlenionej lecytyny jajecznej zebrano w tabeli 3. Wartość pojemności właściwej dla membran z lecytyny jajecznej jest wyższa od wartości pojemności właściwej błon wykonanych z lecytyny utlenionej.

Tabela 3. Mediana wartości pojemności elektrycznej (C) oraz pojemności właściwej (C_m) BLM utworzonych z lecytyny (eggPC) nieutlenionej oraz utlenionej wyznaczona na zbiorze 34 prób

próbka	Mediana C	MAD	Mediana C_m	MAD
	[nF]		[μF/cm^2]	
eggPC	2,79	0,28	0,42	0,03
eggPC utleniona	2,43	0,17	0,36	0,03

Pojemność właściwa membrany zależy głównie od części hydrofobowej dwuwarstwy. Zatem obniżenie wartości pojemności membran utlenionych sugeruje, że zaszły zmiany w tym obszarze błony. Badania spektroskopowe w zakresie podczerwieni pokazały, że w lecytynie utlenionej nastąpiły zmiany, polegające głównie na izomeryzacji wiązań podwójnych z konfiguracji *cis* w *trans*, powstaniu wodoronadtlenków i aldehydowych produktów utlenienia oraz wzroście nasycenia łańcuchów węglowodorowych, a nawet rozpoczętym procesie ich przerywania. W związku z powyższym BLM stworzone z lipidów utlenionych powinny mieć inne właściwości niż BLM wykonane z lipidów świeżych. Opisane zmiany mają wpływ na upakowanie cząsteczek lipidów w dwuwarstwie, więc i na organizacje części hydrofobowej błony.

Dostępne w literaturze wyniki badań metodami symulacji komputerowych [40, 41, 42, 44, 55, 109, 110, 111] sugerują, iż błony lipidowe zawierające aldehydowe produkty utlenienia lipidów mają mniejszą grubość niż błony z lipidów nieutlenionych (ze względu na większą ruchomość łańcuchów węglowodorowych terminowanych grupą aldehydową). Jeśli potraktować BLM jako dielektryk kondensatora, którego pojemność właściwa C_m zależy wprost proporcjonalnie od stałej dielektrycznej oraz odwrotnie proporcjonalnie od grubości BLM (równanie 2), obniżenie wartości C_m może być spowodowane wzrostem grubości membrany lub spadkiem wartości jej przenikalności dielektrycznej.

3.2.2. Rezystancja

Do parametrów elektrycznych membrany zalicza się również rezystancję BLM. Wartość tego parametru została wyznaczona jako nachylenie krzywych woltoamperometrycznych. Ponieważ wartości rezystancji badanych membran wykazują dużą zmienność wartości (p. tabela 4), warto dokonać podziału uzyskanych wyników na kilka przedziałów wartości.

Tabela 4. Procentowy udział błon o danej rezystancji w populacji BLM utworzonych z lecytyny (eggPC) utlenionej oraz nieutlenionej

Rezystancja BLM			eggPC	eggPC utleniona
			Procentowy udział błon o danej rezystancji w populacji eksperymentalnej [%]	
10^9	Kilkaset GΩ	100–1000	0,39	0,00
	Kilkadziesiąt GΩ	20–100	10,94	6,57
	Kilkanaście GΩ	10–20	27,73	49,48
	Kilka GΩ	1–10	52,73	39,10
10^6	Kilkaset MΩ	100–1000	6,64	4,84
	Kilkadziesiąt MΩ	20–100	0,78	0,00
	Kilkanaście MΩ	10–20	0,39	0,00
	Kilka MΩ	1–10	0,00	0,00

Analizując wartości zebrane w tabeli 4, można zauważyć, że BLM utworzone z nieutlenionej lecytyny wykazują większą rozpiętość wartości rezystancji (od MΩ do setek GΩ) w porównaniu do BLM utworzonych z utlenionej lecytyny (do setek MΩ do dziesiątków GΩ). Porównując najczęściej obserwowane wartości rezystancji dla obu typów błon, można stwierdzić, że w przypadku lecytyny nieutlenionej rezystancje przyjmują najczęściej wartości z przedziału 1–10 GΩ, natomiast dla lecytyny utlenionej z przedziału 10–20 GΩ. Zatem obecność produktów utleniania w błonie powoduje wzrost wartości jej rezystancji. Dodatkowo można stwierdzić, że produkty utleniania lipidów powodują stabilizację membran (zwiększenie powtarzalności uzyskiwanych wyników dla lecytyny utlenionej).

3.3. Parametry elektroporacyjne BLM (U_p i t_p)

Dla badanych BLM wyznaczone zostały także wartości napięć przebicia U_p i czasów przebicia t_p. Elektroporację przeprowadzono przy czterech różnych natężeniach prądu 0,2 nA, 0,4 nA, 0,6 nA, 1,0 nA wymuszonego przez elektrody CE1 i CE2 (p. rys.2). Wartości median napięć przebicia oraz czasów przebicia zestawiono w tabelach 5 i 6.

Tabela 5. Porównanie median napięć przebicia BLM utworzonej z lecytyny utlenionej oraz nieutlenionej dla czterech wartości natężenia prądu wywołującego elektroporację w oparciu o 40 prób

Mediana wartości napięcia przebicia BLM wykonanych z lecytyny i utlenionej lecytyny w funkcji natężenia pola elektrycznego wywołującego EP				
I	eggPC		eggPC utleniona	
	mediana	MAD	mediana	MAD
[nA]	[mV]		[mV]	
0,2	190,00	27,20	226,20	24,87
0,4	211,97	20,39	255,60	24,80
0,6	224,33	34,69	272,68	27,30
1,0	232,42	22,42	273,90	16,40

Tabela 6. Porównanie median czasów przebicia BLM utworzonych z lecytyny utlenionej oraz nieutlenionej dla czterech wartości prądu wywołującego elektroporację w oparciu o 40 prób

Mediana czasu przebicia BLM wykonanych z lecytyny i utlenionej lecytyny w funkcji natężenia pola elektrycznego wywołującego EP				
I	eggPC		eggPC utleniona	
	mediana	MAD	mediana	MAD
[nA]	[s]		[s]	
0,2	7,42	1,44	6,30	0,50
0,4	3,38	0,66	3,54	0,38
0,6	2,06	0,42	2,24	0,36
1,0	1,56	0,36	1,36	0,14

Analiza wyników zebranych w tabeli 5 wskazuje, że wartość napięcia przebicia wzrasta wraz ze wzrostem natężenia prądu wywołującego elektroporację. Tendencja ta jest niezależna od tego czy błona jest wykonana z lipidów utlenionych czy nieutlenionych. Wartości napięć przebicia BLM wykonanych z lipidów utlenionych są zawsze wyższe od wartości napięć przebicia BLM wykonanych z lipidów natywnych. Jest to zgodne z faktem, iż dzięki zmianie konformacji łańcuchów węglowodorowych z *cis* na *trans* wzrasta energia oddziaływań van der Waalsa oraz uporządkowanie lipidów w dwuwarstwie, prowadzące do wzrostu jej grubości. Ponadto wynik ten jest zgodny faktem, iż BLM z lipidów utlenionych charakteryzują się wyższymi wartościami rezystancji w stosunku do BLM z lecytyny świeżej.

W tabeli 6 zestawiono wartości czasu przebicia (czas, po którym następuje utworzenie się elektropora) dla różnych wartości natężenia prądu wywołującego elektroporację. Analiza wyników wskazuje, że czas po którym następuje przebicie membrany skraca się wraz ze wzrostem natężenia prądu elektroporacyjnego. W zastosowanym układzie i warunkach eksperymentalnych obecność produktów peroksydacji nie miała znaczącego wpływu na wartość czasu przebicia BLM.

Podsumowując, obecność produktów utlenienia lipidów w błonie lipidowej odpowiada za spadek wartości jej pojemności specyficznej. Taki efekt jest wynikiem zwiększenia grubości membrany z jednoczesnym wzrostem jej przenikalności dielektrycznej. Fakt ten potwierdza również nieznaczny wzrost rezystancji błony utworzonej z lecytyny utlenionej w porównaniu do BLM wykonanych z lecytyny świeżej. Można to wytłumaczyć: wzrostem upakowania lipidów w dwuwarstwie (wynikającego z obecności węglowodorów pozostałych w dwuwarstwie po przerwaniu wiązań podwójnych nienasyconych kwasów tłuszczowych), zmianą konfiguracji wiązań podwójnych z *cis* na *trans* lub wzrostem stopnia nasycenia łańcuchów węglowodorowych. Dodatkowo obecność atomów tlenu wchodzących w skład wodoronadtlenków, jak i grup aldehydowych powoduje wzrost przenikalności dielektrycznej błony. Zmiany te nie pozostają bez wpływu na parametry elektroporacyjne błon. Wzrost grubości BLM wywołany obecnością produktów peroksydacji lipidów powoduje obserwowalny wzrost wartości napięć przebicia dla płaskich błon lipidowych. Może to być spowodowane zwiększonym stopniem uporządkowania lipidów w dwuwarstwie i wzrostem oddziaływań van der Waalsa między łańcuchami węglowodorowymi. Kolejną przyczyną tego efektu może być powstawanie wiązań wodorowych, związane z pojawieniem się w części hydrofobowej grup funkcyjnych charakterystycznych dla aldehydów i wodoronadtlenków. Natomiast w przeciwieństwie do obserwowanego wpływu na wartości napięć przebicia, obecność produktów peroksydacji lipidów, wydaje się nie mieć znaczącego wpływu na wartości czasów przebicia BLM.

Uzyskane wyniki badań wpływu obecności produktów utlenienia lipidów na grubość membrany nie są zgodne z doniesieniami literaturowymi, sugerującymi zmniejszenie grubości membrany, spowodowane obecnością wybranych aldehydowych i wodoronadtlenkowych produktów utleniania lipidów. Niezgodność ta wynika z faktu, że w przedstawionym tu układzie pomiarowym tworzone membrany zawierały wszystkie naturalne produkty utlenienia lipidów, natomiast w doświadczeniach i symulacjach opisanych w literaturze prace prowadzono na błonach domieszkowanych tylko wybranymi produktami utlenienia lipidów. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki pozwalają stwierdzić, że obecność produktów utlenienia lipidów w błonie komórkowej wymaga podwyższenia wartości napięć przebicia stosowanych np. podczas wprowadzania materiału genetycznego do linii komórkowych. Ponadto obecność produktów utlenienia lipidów w błonach lipidowych zwiększa stabilność błony, tym samym zmniejsza podatność na elektroporację. Dlatego przed przeprowadzeniem zabiegów wprowadzania substancji aktywnych do komórek, wspomaganych elektroporacją, wskazana byłaby ochrona układu elektrooporowanego, przed działaniem czynników utleniających np. poprzez ograniczenia kontaktu z promieniowaniem ultrafioletowym.

LITERATURA

[1] G.L. Prasanna, T. Panda: *Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology*, Bioprocess Engineering, vol. 16, 1997, s. 261–264.

[2] J.C. Weaver: *Electroporation of Biological Membranes from Multicellular to Nano Scales*, Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2003, s. 754–768.

[3] T.F. Yuan: *Electroporation: an arsenal of application*, Cytotechnology, vol.54, 2007, s. 71–76.

[4] M.M. Gongora-Nieto, D.R. Sepulveda, P. Pedrow, G.V. Barbosa-Canovas, B.G. Swanson: *Food Processing by Pulsed Electric Fields: Treatment Delivery, Inactivation Level, and Regulatory Aspects*, Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie – Ingenta Connect, vol. 35, 2002, s. 375–388.

[5] Q. Zhang, G.V. Barbarosa-Canovas, B.G. Swanson: *Engineering Aspects of Plused Electric Field Pasterization*, Journal of Food Engineering, vol. 25, 1995, s. 261–281.

[6] H.W. Yeom, C.B. Streaker, Q.H. Zhang, D.B. Min: *Effects of Pulsed Electric Fields on the Activities of Microorganisms and Pectin Methyl Esterase in Orange Juice*, Food Microbiology and Safety, vol. 65(8), 2000, s. 1359–1363.

[7] J.F. Edd, L. Horwitz, R.V. Davalos, L.M. Mir, B. Rubinsky: *In vivo Results of a New Focal Tissue Ablation Technique: Irreversible Electroporation*, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, vol. 53(5), 2006, s. 1409–1415.

[8] B. Rubinsky: *Irreversible electroporation in Medicine*, Technology in Cancer Research and Treatment, vol. 6(4), 2007, s. 255–259.

[9] D.S. Dimitrov: *Handbook of Biological Physics*, Chapter 18: *Electroporation and Electrofusion of Membranes*, Elsevier Science B.V., vol. 1, 1995, s. 851–900.

[10] T.Y. Tsong: *Electroporation of cell membranes*, Biophysical Journal, vol. 60, 1991, s. 297–306.

[11] S. Šalomskaitė-davalgienė, K. Čepurnienė, S. Šatkauskas, M.S.Venslauskas, L.M. Mir: *Extent of Cell Electrofusion In Vitro and In Vivo Is Cell Line Dependent*, Anticancer Research, vol. 29, 2009, s. 3125–3130.

[12] J. Teissie, C. Ramos: *Correlation between Electric Field Pulse Induced Long-Lived Permeabilization and Fusogenicity in Cell Membranes*, Biophysical Journal, vol.74, 1998, s. 1889–1898.

[13] A. Ogura, J. Matsuda, R. Yanagimachi: *Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids*, Proceedings of the National Academy of Science, vol. 91, 1994, s. 7460–7462.

[14] K.D. Mertz, G. Weisheit, K. Schilling, G.H. Lüers: *Electrotransfer of primary neural cultures: a simple method for direct gene transfer in vitro*, Histochemistry and Cell Biology, vol. 118, 2002, s. 501–506.

[15] J. Gehl: *Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research*, Acta Physiologica Scandinavica, vol. 177, 2003, s. 437–447.

[16] J. Saczko, M. Nowak, N. Skolucka, J. Kulbacka, M. Kotulska: *The effects of the electro-photodynamic in vitro treatment on human lung adenocarcinoma cells*, Bioelectrochemistry, vol. 79, 2010, s. 90–94.

[17] A. Sieroń, S. Kwiatek: *Twenty years of experience with PDD and PDT in Poland – Review*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, vol. 6, 2009, s. 73–78.

[18] J.C. Weaver, T.E. Vaughan, Y. Chizmadzhev: *Theory of electrical creation of aqueous pathways across skin transport barriers*, Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 35, 1999, s. 21–39.

[19] S.B. Dev, D.P. Rabussay, G. Widera, G.A. Hofmann: *Medical Applications of Electroporation*, IEEE Transactions On Plasma Science, vol. 28(1), 2000, s. 206–223.

[20] M. Kambe, D. Arita, H. Kikuchi, T. Funato, F. Tezuka, M. Gamo, Y. Murakawa, R. Kanamuru: *Enhancement of the Efficacy of Anticancer Drugs with Electroporation: Successful Electrochemiotherapy against Gastric Cancer Cells Lins in Vivo I in Vitro*, Biomedicine & Pharmacotherapy, vol. 60, 2006, s. 458–462.

[21] A.R. Denet, R. Vanbever, V. Preat: *Skin electroporation for transdermal and topical delivery*, Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 56, 2004, s. 659– 674.

[22] A.K. Banga, S. Bose, T.K. Ghosh: *Iontophoresis and electroporation: comparisons and contrasts*, 1999, International Journal of Pharmaceutics, vol. 179, 1999, s. 1–19.

[23] Z. Jia, Z. Guoqiang, L. Ying, T. Fengping, D. Fuxin: *TRANSDERMAL Delivery of Piroxicam by Surfactant Mediated Electroporation*, Tsinghua Science and Technology, vol. 10(5), 2005, s. 542–547.

[24] K. Mori, T. Hasegawa, S. Sato, K. Sugibayashi: *Effect of electric field on the enhanced skin permeation of drugs by electroporation*, Journal of Controlled Release, vol. 90, 2003, s. 171–179.

[25] Q. Hu, W. Liang, J. Bao, Q. Ping: *Enhanced transdermal delivery of tetracaine by electroporation*, International Journal of Pharmaceutics, vol. 202, 2002, s. 121–124.

[26] D.C. Bloom, P.M. Goldfarb: *The role of intratumour therapy with electroporation and bleomycin in the management of dvanced squamous cell carcinoma of the head and neck*, European Journal of Surgical Oncology, vol. 31, 2005, s. 1029–1035.

[27] M. Marty, G. Sersa, J.R. Garbay, J. Gehl, CH.G. Collins, M. Snoj, V. Billard, P.F. Geertsen, J.O. Larkin, D. Miklavcic, I. Pavlovic, S.M. Paulin-kosir, M. Cemazar, N. Morsli, D.M. Soden, Z. Rudolf, C. Robert, G.C. O'Sullivan, L.M. Mir: *Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study*, The European Journal of Cancer Supplements, vol. 4, 2006, s. 3–13.

[28] L.M. Mir, S. Orlowski: *Mechanisms of electrochemotherapy*, Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 35, 1999, s. 107–118.

[29] V. Todorovic, G. Sersa, K. Flisar, M. Cemazar: *Enhanced cytotoxicity of bleomycin and cisplatin after electroporation in murine colorectal carcinoma cells*, Radiology and Oncology, vol. 43(4), 2009, s. 264–273.

[30] P. Quaglino, C. Mortera, S. Osella-abate, M. Barberis, M. Illengo, M. Rissone, P. Savoia, M.G. Bernengo: *Electro-chemotherapy with Intravenous Bleomycin in the Local Treatment of Skin Melanoma Metastases*, Annals of Surgical Oncology, vol. 15(8), 2008, s. 2215–2222.

[31] T.W. Wong, Ch.H. Chen, Ch.Ch. Huang, Ch.D. Lin, S.W. Hui: *Painless electroporation with a new needle-free microelectrode array to enhance transdermal drug delivery*, Journal of Controlled Release, vol. 110, 2006, s. 557–565.

[32] X. Zhao, M. Zhang, R. Yang: *Control of pore radius regulation for electroporation-based drug delivery*, Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation, vol. 15, 2010, s. 400–1407.

[33] R. Vanbever, V. Preat: *In vivo efficacy and safety of skin electroporation*, Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 35, 1999, s. 77–88.

[34] M. Kandušer, M. Fošnarič, M. Šentjurc, V. Kralj-Iglič, H. Hägerstrand, A. Iglič, D. Miklavčič: *Effect of surfactant polyoxyethylene glycol (C12E8) on electroporation of cell line DC3F*, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, vol. 214, 2003, s. 205–217.

[35] L. Tung, G.S. Troiano, V. Sharma, R.M. Raphael, K.J. Stebe: *Changes in Electroporation Thresholds of Lipid membranes Surfactants and Peptides*, Annals of the New York Academy of Scinces, vol. 888, 1999, s. 249–265.

[36] V. Sharma, K. Stebe, J.C. Murphy, L. Tung: *Poloxamer 188 Decreases Susceptibility of Artificial Lipid Membranes to Electroporation*, Biophysical Journal, vol. 71, 1996, s. 3229–3241.

[37] S. Koronkiewicz, K. Bryl: *Cholesterol-induced variations in fluctuations of the pores in bilayer lipid membrane*, Cellular & Molecular Biology Letters, vol. 4, 1999, s. 567–582.

[38] S. Raffy, J. Teissié: *Control of Lipid Membrane Stability by Cholesterol Content*, Biophysical Journal, vol. 76,1999, s. 2072–2080.
[39] Ch. Karolis, H.G.L. Coster, T.C. Chilcott, K.D. Barrow: *Differential effects of cholesterol and oxidised-cholesterol in egg lecithin bilayers*, Biochimica et BiophysicaActa, vol. 1368, 1998, s. 247–255.
[40] Z.A. Levine, Y.H. Wu, M.J. Ziegler, D.P. Tielman, P.T. Vernier: *Electroporation Sensitivity of Oxidized Phospholipid Bilayers*, Biophysical Journal, vol. 93(3), 2009, s. 41a–41a.
[41] P.T. Vernier, Z.A. Levine, Y.H. Wu, V. Joubert, M.J. Ziegler, L.M. Mir, D.P. Tielman: *Electroporating Fields Target Oxidatively Demaged Areas in the Cell Membrane*, PLoS ONE, vol. 4(11), 2009, s: e7966.
[42] P.T. Vernier: *Inhomogeneities in Phospholipid Bilayers and Susceptibility to Electropermeabilization*, 6th International Workshops on Biological Effects of Electromagnetic Fields; 2010.
[43] M. Maccarrone, N. Rosato, A.F. Agrò: *Electroporation enhances cell membrane peroxidation and luminescence*, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 206(1), 1995, s.238–245.
[44] H.L. Smith, M.C. Howland, A.W. Szmodis, Q. Li, L.L. Daemen, A.N. Parikh, J. Majewski: *Early Stages of Oxidative Stress-Induced Membrane Permeabilization: A Neutron Reflectometry Study*, Journal of the American Chemical Society, vol. 131(10), 2009, s. 3631–3638.
[45] R. Benz, F. Beckers, U. Zimmermann: *Reversible Electrical Breakdown of Lipid Bilayer Membranes: A Charge-Pulse Relaxation Study*, Journal of Membrane Biology, vol. 48, 1979, s. 181–204.
[46] E. Niki, Y. Yoshida, Y. Saito, N. Noguchi: *Lipid peroxidation: mechanism, inhibition, and biological effects*, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 338, 2005, s. 668–676.
[47] J.J. Garcia, R.J. Reiter, M. Karbownik, J.R. Cavalo, G.G. Ortiz, D.X. Tan, E. Martinez-Ballarin, D. Acuna-Castroviejo: *N-acetylserotonin suppresses hepatic microsomal membrane rigidity associated with lipid peroxidation*, European Journal of Pharmacology, vol. 428, 2001, s. 169–348.
[48] A.A. Farooqui, L.A. Horrocks: *Lipid peroxides in the free radical pathophysiology of brain disease*, Cellular and Molecular Neurobiology, vol. 18, 1998, s. 599–608.
[49] R.C. Bruch, W.S. Thayer: *Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes*, Biochimica et Biophysica Acta, vol. 733, 1983, s. 216–222.
[50] G.E. Dobretsov, T.A. Borschevskaya, V.A. Petrov, Y.U. Vladimirov: *The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation*, FEBS Letters, vol. 84, 1977, s. 125–128.
[51] C. Richter: *Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes*, Chemistry and Physics of Lipids Journal, vol. 44, 1987, s. 175–189.
[52] M.L. Wratten, G. Vanginkel, A.A. Vantveld, A. Bekker, E.E. Vanfaassen, A. Sevanian: *Structural and dynamic effects of oxidatively modified phospholipids in unsaturated lipid membranes*, Biochemistry, vol. 31, 1992, s. 10901–10907.
[53] W. Leyko, D. Ertel, G. Bartosz: *Effect of hyperthermia and lipid peroxidation on the erythrocyte membrane structure*, International Journal of Radiational Biology, vol. 59, 1991, s. 1185–1193.
[54] R.P. Mason, M.F. Walter, P.E. Mason: *Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis*, Free Radical Biology & Medicine, vol. 23(3), 1997, s. 419–425.
[55] J. Wong-Ekkabut, Z. Xu, W. Triampo, I.M. Tang, D.P. Tielman: *Effect of Lipid peroxidation on the Properties of Lipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study*, Biophysical Journal, vol. 93, 2007, s. 4225–4236.
[56] L. Beranova, L. Cwiklik, P. Jurkiewicz, M. Hof, P. Jungwirth: *Oxidation Changes Physical Properties of Phospholipid Bilayers: Fluorescence Spectroscopy and Molecular Simulations*, Langmuir, vol. 26(9), 2010, s. 6140–6144.
[57] F.M. Megli, L. Russo: *Different oxidized phospholipid molecules unequally affect bilayer packing*, Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1778, 2008, s. 143–152.
[58] G.O. Fruhwirth, A. Loidl, A. Hermetter: *Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease*, Biochimica & Biophysica Acta, vol. 1772, 2007, s. 718–736.
[59] J. Kulbacka, J. Saczko, A. Chwiłkowska: *Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek*, Polski Merkuriusz Lekarski, vol. XXVII157, 2009, s. 44–47.
[60] P.M. Abuja, R. Albertini: *Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins*, Clinica Chimica Acta, vol. 306, 2001, s. 1–17.
[61] G. Bartosz: *Druga Twarz Tlenu*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
[62] N. Leitinger: *Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis*, Current Opinion in Lipidology, vol. 14, 2003, s. 421–430.
[63] K.J. Sanderson, A.M. Van Rij, Ch.R. Wade, W.H.F. Sutherland: *Lipid peroxidation of circulating low density lipoproteins with age, smoking and in peripheral vascular disease*, Atherosclerosis, vol. 118, 1995, s. 45–51.
[64] M. Gago-Dominguez, J.E. Castelao, M.C. Pike, A. Sevanian, R.W. Haile: *Role of Lipid Peroxidation in the Epidemiology and Prevention of Breast Cancer*, Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, vol. 14, 2005, s. 2829–2839.
[65] R.P. Singh, S. Sharad, S. Kapur: *Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants*, Journal of Indian Academy of Clinical Medicine, vol. 5(3), 2004, s. 218–25.
[66] W.R. Markesbery: *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's Disease*, Free Radical Biology & Medicine, vol. 23(1), 1997, s. 134–147.
[67] K.N. Prasad, W.C. Cole, B. Kumar: *Multiple Antioxidants in the Prevention and Treatment of Parkinson's Disease*, Journal of the American College of Nutrition, vol. 18(5), 1999, s. 413–423.
[68] P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien, W.C. Wescott: *Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solutions*, Journal of Physical Chemistry, vol. 67, 1963, s. 534–535.
[69] S. Kalinowski, Z. Figaszewski: *A four-electrode potentiostat-galvanostat for studies of bilayer lipid membranes*, Measurement Science and Technology, vol. 6, 1995, s. 1050–1055.
[70] S. Kalinowski: *Elektrochemia membran lipidowych Od błon komórkowych do sensorów*, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2004.

[71] R.G. Ashcroft, K.R. Thulborn, J.R. Smith, H.G. Coster, W.H. Sawyer: *Perturbations to lipid bilayers by spectroscopic probes as determined by dielectric measurements*, Biochimica et BiophysicaActa, vol. 602(2), 1980, s. 299–308.
[72] S. Kalinowski, G. Ibron, K. Bryl, Z. Figaszewski: *Chronopotentiometric studies of electroporation of bilayer lipid membranes*, Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1369, 1998, s. 204–212.
[73] P. Kramar, D. Miklavcic, M. Kotulska, A.M. Lebar: *Voltage- and Current-Clamp Methods for Determination of Planar Lipid Bilayer Properties*, Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, vol. 11, 2010, s. 29–69.
[74] M. Naumowicz, A.Z. Figaszewski: *Chronopotentiometric technique as a Method for Electrical Characterization of Bilayer Lipid Membranes*, Journal of membrane Biology, vol. 240, 2011, s. 47–53.
[75] S. Koronkiewicz, S. Kalinowski, K. Bryl: *Changes of structural and dynamic properties of model lipid membranes induced by α-tocoferol: implication to the membrane stabilization under external electric field*, Biochimica et BiophysicaActa, vol. 1510, 2001, s. 300–306.
[76] S. Koronkiewicz, S. Kalinowski, K. Bryl: *Programmable chronopotentiometry as a tool for the study of electroporation and resealing of pores in bilayer lipid membranes*, Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1561, 2002, s. 222–229.
[77] S. Kalinowski, Z. Figaszewski: *A four-electrode system for measurement of bilayer lipid membrane capacitance*, Measurement Science and technology, vol. 6, 1995, s. 1043–1049.
[78] A.A. Christy, P.K. Egeberg, *Quantitative determination of saturated and unsaturated fatty acids in edible oils by infrared spectroscopy and chemometrics*, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, vol. 82, 2006, s. 130–136.
[79] G. Déléris, C. Petibois: *Application of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring*, Vibrational Spectroscopy, vol. 32, 2003, s. 129–136.
[80] J. Dubois, F.R. van de Voort, J. Sedman, A.A. Ismail, H.R. Ramaswamy: *Quantitative Fourier Transform Infrared Analysis for Aniside Value and Aldehydes in Thermally Stressed Oils*, JOCS, vol. 73(6), 1996, s. 787–794.
[81] M.D. Guillén, N. Cabo: *Characterization of Edible oils and Lard by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Relationships between Composition and Frequency of Concrete bands in the Fingerprint Region*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 74(10), 1997, s. 1281–1286.
[82] M.D. Guillén, N. Cabo: *Infrared Spectroscopy in the Study of Edible oils and Fats*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 75, 1997, s.1–11.
[83] M.D. Guillén, N. Cabo: *Relationships between the Composition of Edible Oils and Lard and ration of the Absorbance of Specific Bands of their Fourier Transform Infrared Spectra. Role of Some Bands of the Fingerprint Region*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 46, 1998, s. 1799–1793.
[84] M.D. Guillén, N. Cabo: *Usefulness of the Frequency Data of the Fourier Transform Infrared Spectra to Evaluate the degree of Oxidation of Edible Oils*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 47, 1999, s. 709–719.
[85] M.D. Guillén, N. Cabo: *Some of the most significant changes in the Fourier transform infrared spectra of edible oils under oxidative conditions*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 80, 2000, s. 2028–2036.
[86] M.D. Guillén, N. Cabo: *Fourier Transform Infrared Spectra Data Versus peroxide and Aniside Values to determine Oxidative Stability of Edible oils*, Food Chemistry, vol. 77, 2002, s. 503–510.
[87] M.D. Guillén, N. Cabo, M.L. Ibargoitia, A. Ruiz: *Study of both Sunflower Oil and Its Headspace throughout the Oxidation Process. Occurrence in the headspace of Toxic Oxygenated Aldehydes*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 53(4), 2005, s. 1093–1101.
[88] M.D. Guillén, A. Ruiz: *High resolution ^{1}H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats*, Trends in Food Science & Technology, vol. 12, 2001, s. 328–338.
[89] M.D. Guillén, E. Giocoechea, *Formation of oxygenated α,β-unsaturated aldehydes and other toxic compounds in sunflower oil oxidation at room temperature in closed receptacles*, Food Chemistry, vol. 111, 2008, s.157–16.
[90] M.D. Guillén, E. Giocoechea: *Oxidation of corn oil at room temperature: Primary and secondary oxidation products and determination of their concentration in the oil liquid matrix from ^{1}H nuclear magnetic resonance data*, Food Chemistry, vol. 116, 2009, s. 183–192.
[91] M. Hernández-Martinez, T. Gallardo-Velázquez, G. Osorio-Revilla: *Rapid characterization and identification of fatty acids in margarines using horizontal attenuate total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (HATR-FTIR)*, European Food Research and Technology, vol. 231, 2010, s. 321–329.
[92] J.V. Kadamne, V.P. Jain, M. Saleh, A. Proctor: *Measurements of Conjugated Linoleic Acid (CLA) in CLA-Rich Soy oil by Attenuated Total reflectance-Fourier transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)*, Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol. 57, 2009, s. 10483–10488.
[93] J. Kiwi, V. Nadtochenko: *New Evidence for TiO_2Photocatalysis during Bilayer lipid Peroxidation*, Journal of Physical Chemistry B, vol. 108, 2004, s. 17675–17684.
[94] M.C.M. Moreno, D.M. Olivares, F.J.A. López, J.V.G. Adelantado, F.B. Reig: *Determination of unsaturation grade and trans isomers generated during thermal oxidation of edible oils and fats by FTIR*, Journal of Molecular Structure, vol. 482, 1999, s. 551–556.
[95] M.C.M. Moreno, D.M. Olivares, F.J.A. López, J.V.G. Adelantado, F.B. Reig: *Analytical evaluation of polyunsaturated fatty acids degradation during thermal oxidation of edible oils by Fourier transform infrared spectroscopy*, Talanta, vol. 50, 1999, s. 269–275.
[96] B. Muik, B. Lendl, A. Molina-Diaz, M. Valcarcel, M.J. Ayora-Cañada: *Two-dimentional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy*, Analytica Chimica Acta, vol. 593, 2007, s. 54–67.
[97] C. Petibois, G. Déléris: *Oxidative stress effects on erythrocytes determined by FT-IR spectrometry*, Analyst, vol. 129, 2004, s. 912–916.
[98] C. Petibois, G. Déléris: *FT-IR Spectrometry Analysis of Plasma Fatty Acyl Moieties Selective mobilization during Endurance exercise*, Biopolymers, vol. 77, 2005, s. 345–353.

[99] C. Petibois, G. Déléris: *Erythrocyte Adaptation to Oxidative Stress in Endurance Training*, Archives of Medical Research, vol. 36, 2005, s. 524–531.
[100] F.R. van de Voort, A.A. Ismail, J. Sedman, G. Emo: *Monitoring the Oxidation of Edible Oils by Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Journal of the American Oil Chemists' Society, vol. 71(3), 1994, s. 243–253.
[101] N. Vlachos, Y. Skopelitis, M. Psaroudaki, V. Konstantinidou, A. Chatzilazarou, E. Tegou: *Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils*, Analytica Chimica Acta, vol. 573-574, 2006, s. 459–465.
[102] H. Yang, J. Irudayaraj: *Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-raman spectroscopy*, Food Chemistry, vol. 93, 2005, s. 25–32.
[103] S. Boyatzis, E. Ioakimoglou, P. Argitis: *UV Exposure and Temperature Effects on Curing mechanisms in Thin Linseed Oil Films: Spectroscopic and Chromatographic Studies*, Journal of Applied Polimer Science, vol. 84, 2002, s. 936–949.
[104] M. Carini, R. Maffeifacino, G. Aldini, M.T. Calloni: *The protection of polyunsaturated fatty acids in micellar systems against UVB-iducedphotooxidation by procyanidis from Vitisvinifera L., and the protective synergy with vitamin E*, International Journal of Cosmetic Science, vol. 20, 1998, s. 203–215.
[105] G. Dobson: *Spectroscopy and spectrometry of lipids – Part 1*, European Journal of Lipid Science and Technology, vol. 103, 2001, s. 815–840.
[106] H. Yang, J. Irudayaraj: *Cpomparison of Near-Infrared, Fourier Transform-Infrared, and Fourier transform-Raman methods for determinating olive pomace Oil Aduleration in Extra Virgin Olive Oil*, JAOCS, vol. 78(9), 2001, s. 889–895.
[107] S.F. Hamed, M.A. Allan: *Application of FTIR Spectroscopy in the Determination of Antioxidant Efficiency in Sunflower Oil*, Journal of Applied Sciences Research, vol. 2(1), 2006, s. 27–33.
[108] C. Petibois, G. Déléris: *Evidence that erythrocytes are highly susceptible to exercise oxidative stress: FT-IR spectrometric studies at the molecular level*, Cell Biology International, vol. 29, 2005, s. 709–716.
[109] P. Bonnafous, M.C. Vernhes, J. Teissie, B. Gabriel: *The generation of reactive-oxygen species associated with long-lasting pulse-induced electropermeabilization of mammalian cells is based on a non-destructive alteration of the plasma membrane*, Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, vol. 1461,1999, s. 123–134.
[110] B. Gabriel, J. Teissie: *Generation of reactive-oxygen species induced by electropermeabilization of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability*, European Journal of Biochemistry, vol. 223, 1994, s. 25–33.
[111] Y. Zhou, Ch.K. Berry, P.A. Storer, R.M. Raphael: *Peroxidation of Polyunsaturated phospholipid-choline lipids during electroformation*, Biomaterials, vol. 28, 2007, s. 1298–1306.

otrzymano / submitted: 29.03.2017
zaakceptowano / accepted: 13.09.2017