

# 1 Elektroporation

## 1.1 Porenbildung in den Membranen biologischer Zellen

Unter Elektroporation versteht man entsprechend einer Modellvorstellung die Bildung von Poren in der Zellmembran einer biologischen Zelle unter dem Einfluss eines elektrischen Felds über der Zellmembran. Durch die Poren können dann Substanzen in die Zelle hineingeschleust werden, oder aus der Zelle extrahiert werden. Zur Feldapplikation wird eine Zelle oder das zu behandelnde biologische Gewebe üblicherweise in einer elektrisch leitfähigen Flüssigkeit (beispielsweise Wasser oder Saft) suspendiert. Die Flüssigkeit stellt den elektrischen Kontakt zu Elektroden her, die zur Feldapplikation dienen. Die Zellmembran besteht aus einer Doppelschicht aus Phospholipid-Molekülen [LIPO-95]. Ein Phospholipid-Molekül besteht aus einem hydrophilen Kopfteil und lipophilen Kettensträngen. In der Doppelschicht der Zellmembran sind die hydrophilen Kopfgruppen zum Zelläußeren und Zellinnern hin orientiert, während die lipophilen Teile das im Innern der Zellmembran liegen. Die Zellmembran besitzt eine Dicke von etwa 5...8 nm [PIZZ-08, FLI-10].

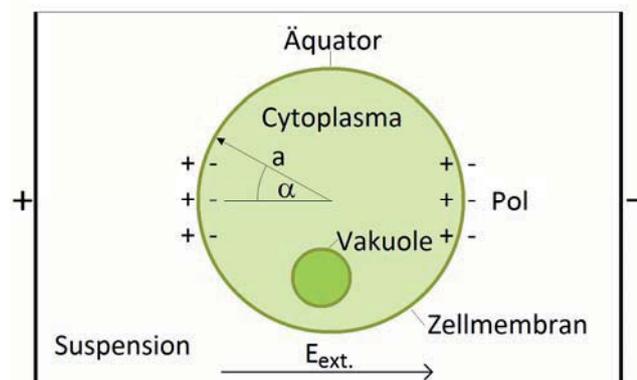


Bild 1: Ladung über der Zellmembran einer kugelförmigen Zelle mit Vakuole.

Elektrisch kann sie als Kondensator mit einer flächenabhängigen Kapazität von  $0,5 \dots 2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  [PAUL-63, MAU-62] und einem flächenabhängigen Parallelwiderstand von etwa  $3000 \Omega \cdot \text{cm}^2$  [GREN-66] betrachtet werden. Sie ist also vergleichsweise hochohmig. Nach dem Anlegen eines elektrischen Felds kommt es zu einem Aufladen der Zellmembran im Bereich der in Feldrichtung orientierten Pole der Zelle. Dabei fließt in den Flüssigkeiten zunächst ein Ladestrom als Ionenbewegung in Feldrichtung. Die

Ionen lagern sich an der hochohmigen Zellmembran an und verstärken so das lokale Feld über der Zellmembran. Gleichzeitig bauen die angelagerten Ionen im Zellinnern ein elektrisches Feld auf, das dem äußeren Feld entgegengerichtet ist. Mit zunehmender Membranaufladung nimmt das elektrische Feld im Zellinneren ab, bis das Zellinnere feldfrei und der Aufladevorgang beendet ist. Nun ist das elektrische Feld über der Zellmembran wesentlich größer als das ursprünglich von außen angelegte elektrische Feld. Es kommt also zu einer Feldverstärkung über der Zellmembran abhängig vom Verhältnis der Längenausdehnung der Zelle in Feldrichtung zur Membrandicke.

Bild 1 stellt stark vereinfacht eine kugelförmige Zelle in einer leitfähigen Suspension dar. Die Leitfähigkeit des Cytoplasmas im Zellinnern sei  $\kappa_i$ , die der umgebenden Flüssigkeit  $\kappa_a$ . Eine solche Anordnung lässt sich als dielektrische Hohlkugel in einem elektrischen Feld modellieren. Mit der Vereinfachung, dass die Leitfähigkeit der Zellmembran klein gegenüber den Leitfähigkeiten von Cytoplasma und umgebender Flüssigkeit ist, lässt sich die zeit- und winkelabhängige Aufladung der Membran im Laplace-Bereich wie folgt darstellen:

$$U_M(s) = 1,5 \cdot a \cdot \cos(\alpha) \cdot \frac{1}{1 + \tau \cdot s} \cdot E_0(s) \text{ mit } \tau = a \cdot c \cdot \left( \frac{1}{\kappa_i} + \frac{1}{2\kappa_a} \right) \quad (\text{Gl. 1})$$

Für die Aufladephase zu Beginn eines langen Rechteckimpulses, der sich hier vereinfacht als Sprungfunktion  $E(s) = E_0 \frac{1}{s}$  darstellen lässt, erhält man

$$U_M(s) = 1,5 \cdot a \cdot E_0 \cdot \cos(\alpha) \cdot \frac{1}{s(1 + \tau \cdot s)} \quad \text{bzw.} \quad (\text{Gl. 2})$$

$$u_M(t) = 1,5 \cdot a \cdot E_0 \cdot \cos(\alpha) \cdot \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad (\text{Gl. 3})$$

Die Feldverstärkung, d.h. der Faktor, um den die Feldstärke  $E_M$  über der Membran der Dicke  $d$  gegenüber der angelegten Feldstärke  $E_0$  überhöht ist, beträgt bei vollständiger Aufladung

$$\varepsilon_V = \frac{E_M}{E_0} = \frac{1,5 \cdot a \cdot \cos(\alpha)}{d} \quad (\text{Gl. 4})$$

[ZIM-82]. Der Verstärkungsfaktor  $\varepsilon_V$  wächst proportional zum Zelldurchmesser  $a$ . Bei einer größeren Zelle genügt also schon eine kleinere externe Feldstärke, um eine bestimmte Membranspannung zu erzielen als bei einer kleineren Zelle. Bei einer realen Zelle, die auch eine längliche Form aufweisen kann, ist der Verstärkungsfaktor bei einer Felddausrichtung in Richtung der Längsachse am größten.

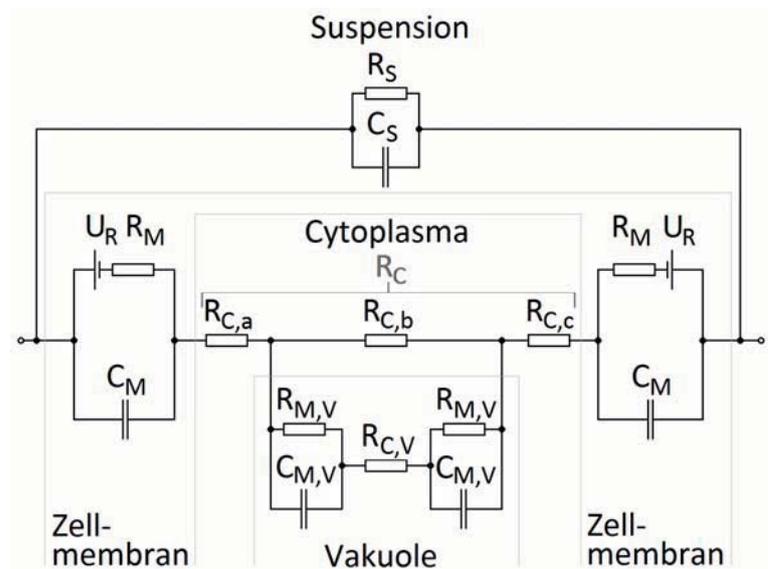
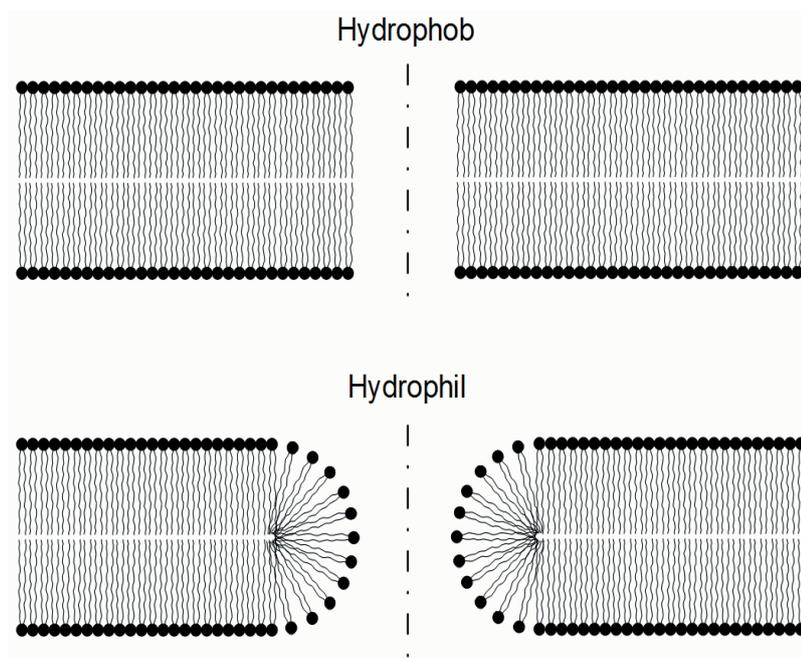


Bild 2: Elektrisches Ersatzschaltbild einer suspendierten Zelle.

Bild 2 zeigt das elektrische Ersatzschaltbild einer suspendierten Zelle wie in Bild 1 dargestellt. Die Kapazität der aufgeladenen Zellmembran im Bereich der Pole wird durch die Kapazitäten  $C_M$  dargestellt.  $R_M$  stellt als Parallelwiderstand die Leitfähigkeit der Membran in diesem Bereich dar. Eine Pflanzenzelle besitzt ein Ruhepotential über der Zellmembran von etwa  $-150$  mV aufgrund eines von der Zelle getriebenen Ionentransports durch die Membran [COST-65]. Für diesen aktiven Ionenaustausch sind Ionenkanäle in der Zellmembran zuständig. Im Ersatzschaltbild ist das Ruhepotential durch die Spannungsquellen  $U_R$  dargestellt. Bei pflanzlichen Zellen sind die Zellinhaltsstoffe wie beispielsweise Zucker oder Pigmente, die extrahiert werden sollen, häufig im Zellinnern in Vakuolen gespeichert. In Bild 1 ist so eine Vakuole dargestellt. Zur Extraktion müssen neben den Zellmembranen auch die Membranen der Vakuolen geöffnet werden. Daher ist der Widerstand des Cytoplasmas im Zellinnern  $R_C$  entsprechend der Lage der Vakuole aufgeteilt. Das Ersatzschaltbild der Vakuole ähnelt mit ihrer Membrankapazität  $C_{M,V}$ , dem Parallelwiderstand  $R_{M,V}$  und dem Zytoplasma im Vakuoleninnern  $R_{C,V}$  dem Ersatzschaltbild der Zelle. Über der Vakuole liegt entsprechend ihrer Größe ein Teil des Spannungsabfalls über

dem Zytoplasma an, im Ersatzschaltbild als  $R_{C,b}$  dargestellt. Anders als die Aufladung der äußeren Zellmembran weist das Ersatzschaltbild zur Aufladung der inneren Membran Hochpassverhalten auf. Sobald der Ladestrom der äußeren Membran abgeklungen ist, wird auch die innere Vakuolenmembran nicht mehr weiter aufgeladen und entlädt sich anschließend wieder über den Parallelwiderstand  $R_{C,b}$ .



*Bild 3: Hydrophobe und hydrophile Pore in der Bilipid-Doppelschicht (Modellvorstellung).*

Abhängig von der Spannung über der Zellmembran wird die Zellmembran permeabel. Entsprechend einer Modellvorstellung bilden sich Poren in der Zellmembran. Dazu rücken entsprechend diesem Modell die Moleküle der Zellmembran auseinander und es drehen sich dabei die Kopfgruppen der die sich bildende Pore umrandenden Moleküle zum Poreninnern hin ein, damit das System bezüglich der sogenannten freien Energie einen energie-minimalen Zustand einnimmt [WEA-96, NEU-99]. Die Pore stellt einen elektrisch leitfähigen Kanal zwischen beiden Seiten der Membran dar.

Die Feldstärke über der Membran kann mit dem feldstärke-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff ANNIN-6 sichtbar gemacht werden. Die Moleküle des Farbstoffs lagern sich in die Zellmembran ein. Der Farbstoff wird mit einem kurzen Laserlichtimpuls angeregt und gibt anschließend das Fluoreszenzlicht mit einem Zeitverzug von wenigen Nanosekunden wieder ab. Dabei ist die Wellenlänge der Fluoreszenzantwort von der Feldstärke über dem Molekül und damit der Membran abhängig. Mittels eines Farbfilters

kann die Wellenlängenänderung als Helligkeitsänderung unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden [FREY-06]. Bild 4 zeigt die Feldstärkeverteilung an der Zellmembran eines BY2-Protoplasten als Helligkeitsunterschied vor und während der gepulsten Feldstärkeapplikation. Da bei der Protoplastierung der Zelle die stabilisierende Zellwand entfernt wurde, besitzt der suspendierte Protoplast eine kugelige Form und die Aufladung der Zellmembran lässt sich mit Gl. 1 beschreiben. Die Membranaufladung aufgrund der äußeren Feldstärke  $E_0$  überlagert sich dem Ruhepotential. In den Bereichen gleichsinniger Überlagerung wird im Zuge der Membranaufladung die zur Porenbildung notwendige Membranspannung eher erreicht als in Bereichen gegensinniger Überlagerung. Da die Membran bei lokaler gegensinniger Überlagerung erst entladen und dann mit umgekehrter Polarität wieder aufgeladen werden muss, kommt es in diesen Bereichen bei der Applizierung eines Rechteckimpulses erst bei höherer applizierter Feldstärke zu einer Porenbildung [FLI-10a, FLI-10b]. Bei den Versuchen wurde eine Sättigung der Membranspannung beobachtet, die sich mit der Porenbildung erklären lässt. Die Poren stellen eine vergleichsweise niederohmige elektrische Verbindung durch die Membran dar, die eine weitere Aufladung der Membran verhindern.

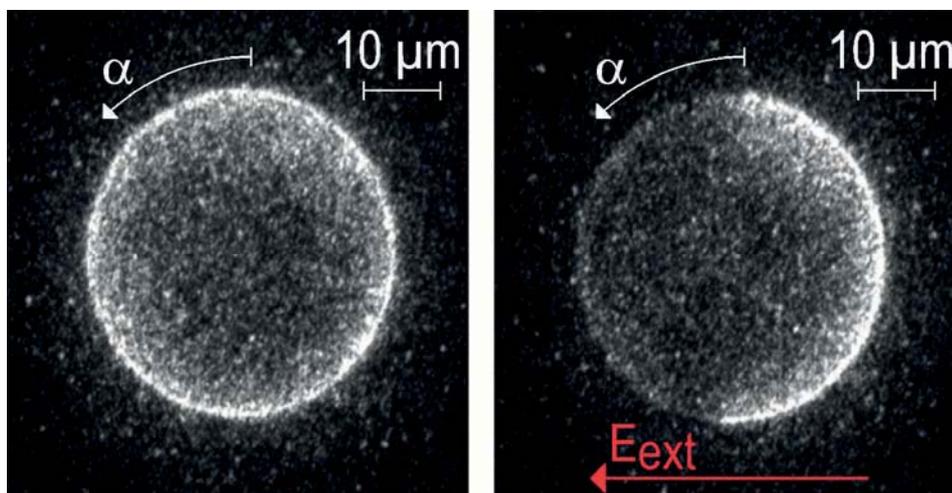


Bild 4: BY2-Protoplast (Tabak) vor und während der Applikation eines elektrischen Feldes [FLI-10a, SAC-10b].

Bei nur geringer Energieapplikation schließen sich die Poren nach der Feldapplikation wieder. So konnte beispielsweise die Zellmembran eines BY2-Protoplasten bei einer Feldstärke von 0,6 kV/cm sechsmal in Folge bei einer Pulslänge von 1  $\mu$ s bis zur Sättigungsgrenze der Transmembranspannung aufgeladen werden. Die Pausenzeit zwischen den Pulsen betrug 2 s [BERG-12]. In der Literatur wird die zur Porenbildung nötige Trans-

membranspannung zwischen etwa 0,5 V und etwa 1 V angegeben [WEA-96, NEU-99]. Jedoch wurde auch beobachtet, dass bei kleinerer Transmembranspannung eine gewisse Permeabilisierung der Membran stattfindet [LEB-05b, KRA-07, FLI-10].

Wird nach dem Öffnen der Poren genügend Energie appliziert, kommt es zu einer irreversiblen Porenöffnung. Während die reversible Porenbildung beispielsweise in der Medizintechnik für eine lokal begrenzte Medikamenteneinschleusung angewandt wird, lassen sich durch die irreversible Elektroporation mit anschließender Extraktion Inhaltsstoffe aus den Zellen gewinnen [HAB-12]. Eine weitere Energieapplikation über die zur irreversiblen Porenöffnung erforderliche Energie hinaus bewirkt lediglich eine zusätzliche Erwärmung des Materials. Daher wird das elektrische Feld zur Porenöffnung gepulst angelegt.

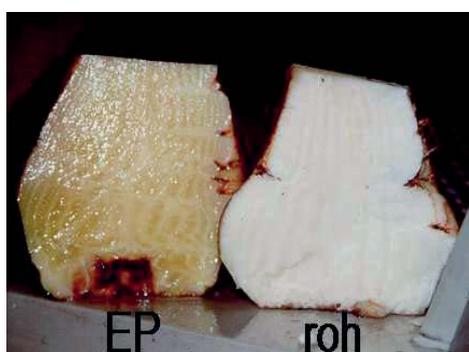
Die Vorgänge, die bei der Permeabilisierung der Membran ablaufen, sind noch nicht vollständig wissenschaftlich geklärt. Neben dem Modell der Porenbildung existieren andere Erklärungsmodelle wie beispielsweise ein mechanisches Aufbrechen der Membran aufgrund elektrostatischer Kräfte [CHEN-07] oder nanoskalige Risse in der Membran [PLI-07]. Auch wurden Poren noch nicht direkt unter dem Mikroskop beobachtet, sondern nur ihre Auswirkungen. Aus diesem Grund wird die Gültigkeit des Modells zur Porenbildung derzeit noch diskutiert und in den Diskussionen wird angeregt, statt von Porenbildung nur von einer Permeabilisierung der Membran zu sprechen [BFE-12]. Daher soll im Folgenden der Beschreibung der Effekte der Elektroporation gegenüber der noch unvollständigen wissenschaftlichen Beschreibung der Vorzug gegeben werden, zumal sich die Auslegung von Elektroporationsanlagen derzeit auf experimentelle Ergebnisse stützt. Der Begriff "Elektroporation" wird in dieser Arbeit jedoch beibehalten.

## 1.2 Phänomenologische Beschreibung der Elektroporation

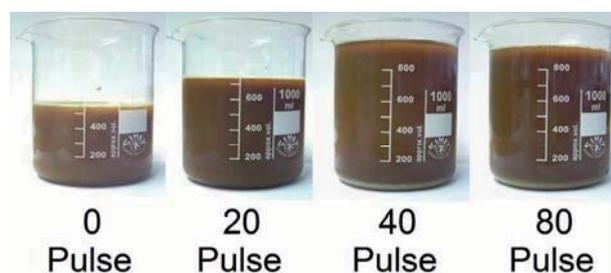
### 1.2.1 Extraktion von Inhaltsstoffen

Der Effekt der Elektroporation kann im makroskopischen Bereich durch die Extraktion von Inhaltsstoffen aus dem Gewebe nachgewiesen werden. So tritt Zellsaft durch die aufgeschlossene Membran bereits aufgrund des inneren Drucks der Zellen (Turgor) in das umgebende Gewebe aus. Bild 5 zeigt eine rohe und eine durch Elektroporation aufgeschlossene Zucker-

rübenhälfte. Deutlich ist zu erkennen, wie sich auf der Schnittoberfläche durch den austretenden Saft Tropfen bilden. Aufgrund der irreversiblen Permeabilisierung der Membran verbessert sich die Abpressbarkeit des Materials. Bild 6 zeigt im Vergleich den Saftertrag von jungen Maispflanzen bei Versuchen zur Trocknung von Pflanzenmaterial für unbehandeltes und elektroporiertes Material beim Abpressen in einer Stempelpresse. Bei diesem Beispiel steigt der Saftertrag in Abhängigkeit von der Pulsanzahl und damit der applizierten Energie bis zu einer Pulsanzahl von 40 Pulsen auf etwa das Doppelte des Ertrags beim Rohmaterial an. Eine weitere Erhöhung der zugeführten Energie bewirkt keine weitere Steigerung des Saftertrags, was zeigt, dass das Material vollständig aufgeschlossen ist.



*Bild 5: Elektroporierte (EP) und rohe Zuckerrübenhälfte im Vergleich [SCHU-02].*



*Bild 6: Saftertrag nach dem Pressen von Gras in Abhängigkeit von der Anzahl der applizierten Pulse [SAC-10b].*

In einem wässrigen Extraktionsprozess verbessert die irreversible Permeabilisierung der Membran den Materialtransport durch Diffusion innerhalb des aufgeschlossenen Gewebes. Bild 7 und Bild 8 zeigen den Extraktionsverlauf von Farb- und Gerbstoffen aus Rotweirmaische in den Most im Zuge der Weinbereitung. Dargestellt sind die Varianten A-„ohne Aufschluss“, B-„Aufschluss durch mechanische Belastung beim Pumpen“ und C - „Elektroporation“. Für den Versuch wurde Maische bei Raumtemperatur zur Extraktion gelagert und im Abstand von 15 Minuten Mostproben entnommen. Die Farbstoffanalyse erfolgte durch Messung des Extinktionskoeffizienten beim Durchleuchten einer Strecke von 1 cm als Summe der Einzelextinktionen bei 420, 520 und 620 nm. Die Bestimmung des Gerbstoffgehalts erfolgte als Folin-Ciocalteu-Index entsprechend ECC Nr. 2676/90, Anhang 41. [ECC-90]. Deutlich ist die verbesserte Extraktion aufgrund der Elektroporation zu erkennen.

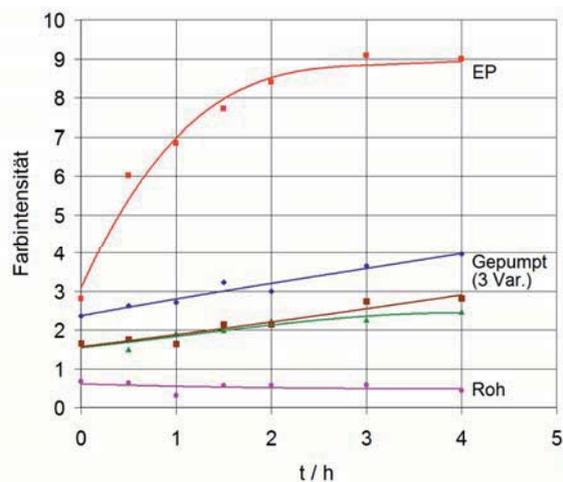


Bild 7: Farbänderung im Verlauf der Extraktion [SAC-12d].

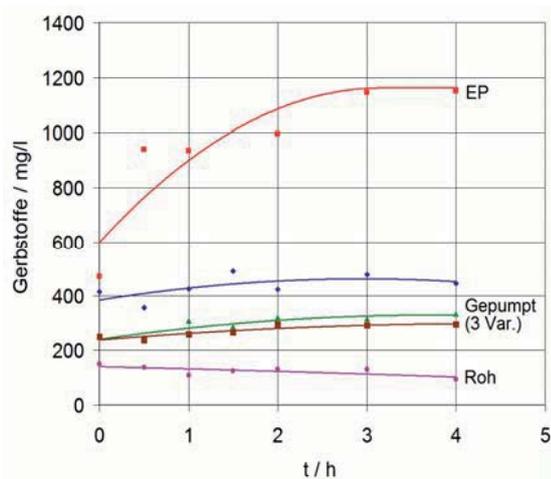


Bild 8: Extraktionsverlauf von Gerbstoffen [SAC-12d].

## 1.2.2 Impedanzänderung

### 1.2.2.1 Messung im Zeitbereich

Der für eine Zelle beschriebene Membranaufladeprozess mit anschließender Permeabilisierung lässt sich auch messtechnisch an Gewebeproben nachweisen. Knorr, Angersbach et al. beschreiben solche Messungen an Kartoffelgewebe [ANG-00, KNO-01]. Für Versuche an Zuckerrüben-gewebe wurden kleine kreisförmige Zuckerrübenscheiben mit einer Dicke von etwa 1 mm und einem Durchmesser von 1 cm mit einer rechteckförmigen Spannung beaufschlagt und der Strom durch die Probe gemessen [SAC-06, SAC-10d]. Jede Probe wurde zunächst mit einer kleinen Rechteckspannung beaufschlagt, die noch nicht zur Permeabilisierung führt, dem so genannten Vorpuls. Anschließend wurden ein oder mehrere Hauptpulse mit höherer Feldstärke appliziert. Bild 9 zeigt die Ströme durch das Gewebe bei der Aufschaltung von langen Rechteckimpulsen mit Feldstärken von  $\hat{E} = 1 \text{ kV/cm}$ ,  $2 \text{ kV/cm}$  und  $3 \text{ kV/cm}$  (rechts) sowie die zugehörigen Vorpulse (links).

Bei der kleinen applizierten Feldstärke der Vorpulse zeigt der Strom durch die Probe einen exponentiell abklingenden Stromverlauf. Er entspricht dem Aufladestrom der Kapazitäten der Zellmembranen. Dabei ist der Maximalwert des Stroms durch die Leitfähigkeit des Zytoplasmas begrenzt.

Bei höherer applizierter Feldstärke geht der abklingende Aufladestromimpuls in ein aufklingendes Verhalten des Stroms über. Die Stromzunahme gegenüber dem abklingenden Membranaufladestrom entspricht dem Strom-

fluss durch die sich öffnende Zellmembran. Mit steigender Feldstärke beginnt die Membranöffnung schon nach kürzerer Zeit, da die Schwelle der Transmembranspannung für den Einsatz der Permeabilisierung schneller erreicht wird.

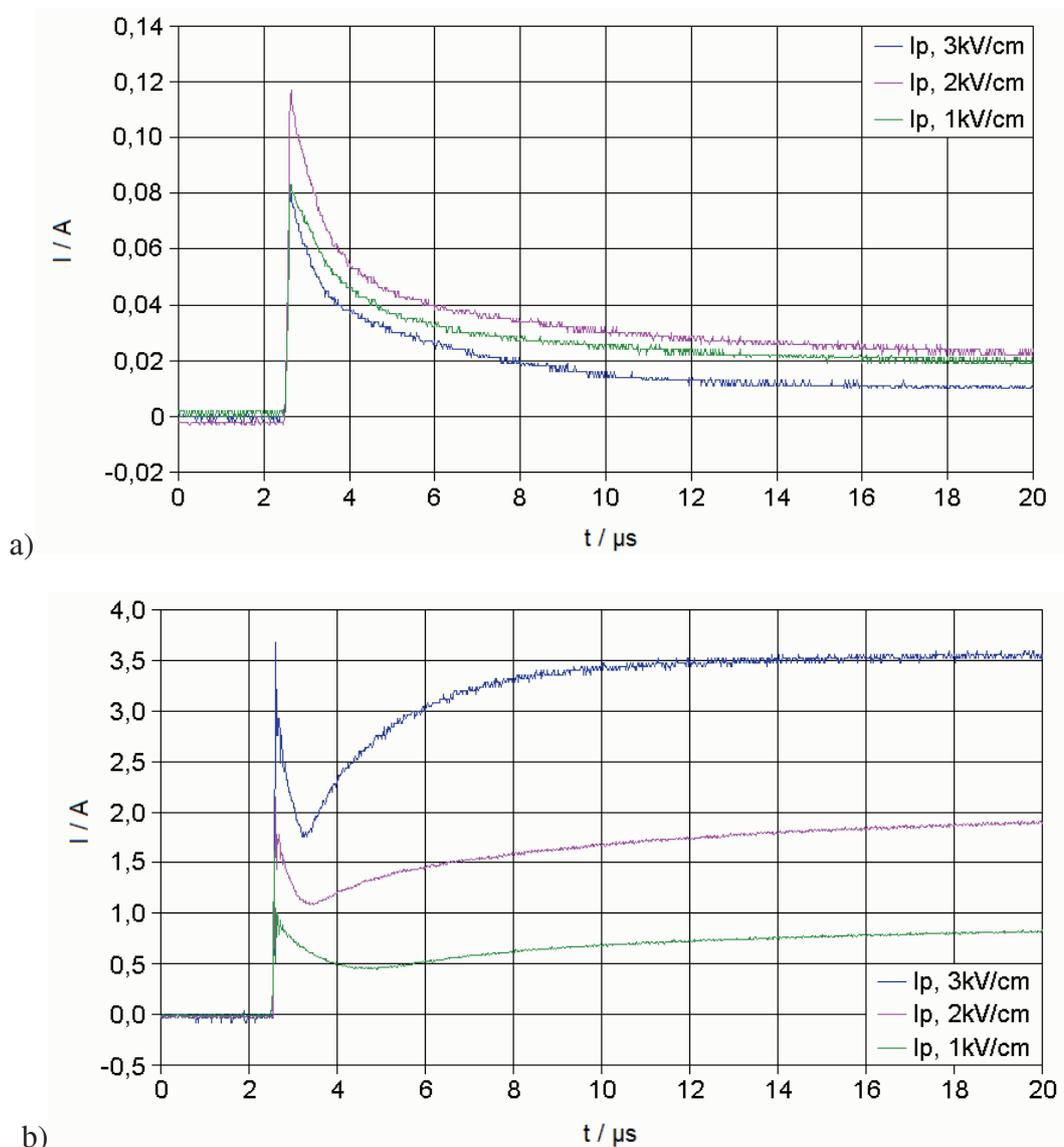


Bild 9: Stromverläufe an 1 mm dünnen Scheiben Zuckerrüben-gewebe (Durchmesser 10 mm) bei der Beaufschlagung mit (a) jeweils einem Vorpuls geringer Feldstärke und (b) einem Hauptpuls mit einer Feldstärke von  $\hat{E}=1$  kV/cm, 2 kV/cm und 3 kV/cm. [SAC-10d]

Bei den verwendeten Pulsparametern wird das Gewebe mit einem einzigen Puls nicht dauerhaft vollständig geöffnet. Bild 10 zeigt die Spannungs- und Stromverläufe von 15 aufeinander folgenden Pulsen. Beim Stromverlauf des ersten Pulses ist das lokale Minimum nach dem kapazitiven Ladestrom deutlich ausgeprägt. Bei wiederholter Pulsapplikation wird der Kurvenver-

lauf mit zunehmendem Aufschlussgrad des Gewebes flacher und nähert sich einem rechteckförmigen Verlauf an.

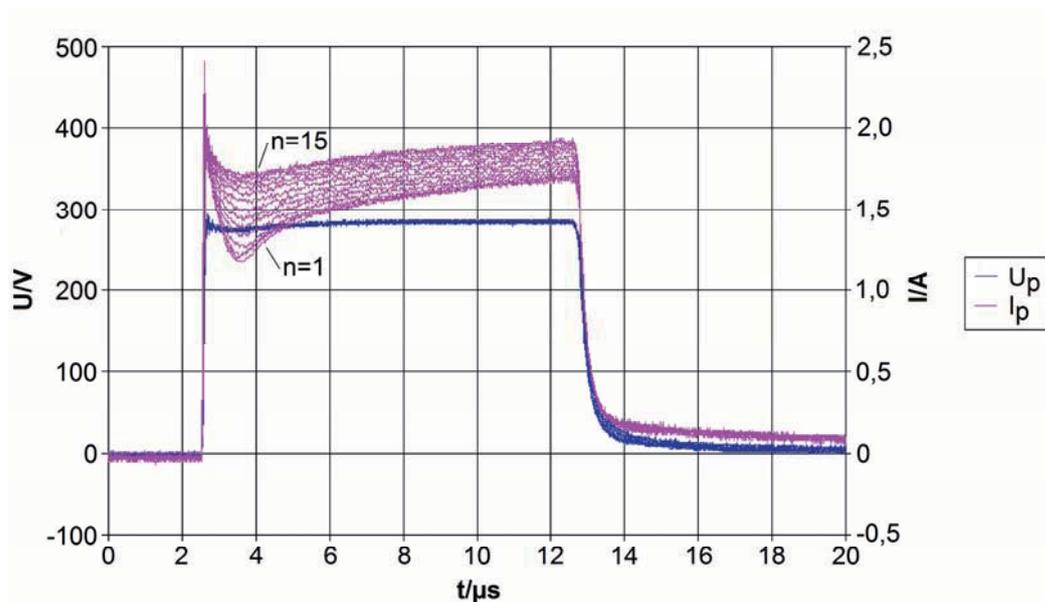


Bild 10: Spannungs- und Stromverläufe an einer 1 mm dünnen Scheibe Zuckerrüben-gewebe (Durchmesser 10 mm) bei der Beaufschlagung mit 15 Rechteckpulsen bei einer Feldstärke von  $\hat{E} = 2,8 \text{ kV/cm}$  [SAC-10d].

### 1.2.2.2 Messung im Frequenzbereich

Die Änderung der elektrischen Impedanz eines Gewebes aufgrund der Permeabilisierung den Zellmembranen lässt sich mittels Impedanzspektroskopie darstellen. Dazu wird an das Gewebe eine kleine Wechselspannung variabler Frequenz angelegt, und der komplexe Wechselstrom durch die Probe nach Betrag und Phase frequenzabhängig registriert [KNO-98]. Alternativ kann an das Gewebe ein rechteckförmiger Spannungsimpuls angelegt werden und sowohl dieser Spannungsimpuls als auch der Verlauf des Stroms durch die Probe mittels Fouriertransformation in den Frequenzbereich überführt werden, um den komplexen Impedanzverlauf zu bestimmen [PLI-00]. Der Vorteil dieser Zeitbereichsmethode liegt darin, dass man den komplexen Impedanzverlauf vergleichsweise schnell aus einer einzigen Messung erhält. Da das Gewebe im Allgemeinen ein nicht-lineares Verhalten aufweist, darf jedoch nur mit ausreichend kleinen Messspannungen gearbeitet werden, bei denen das Gewebe sich näherungsweise linear verhält.

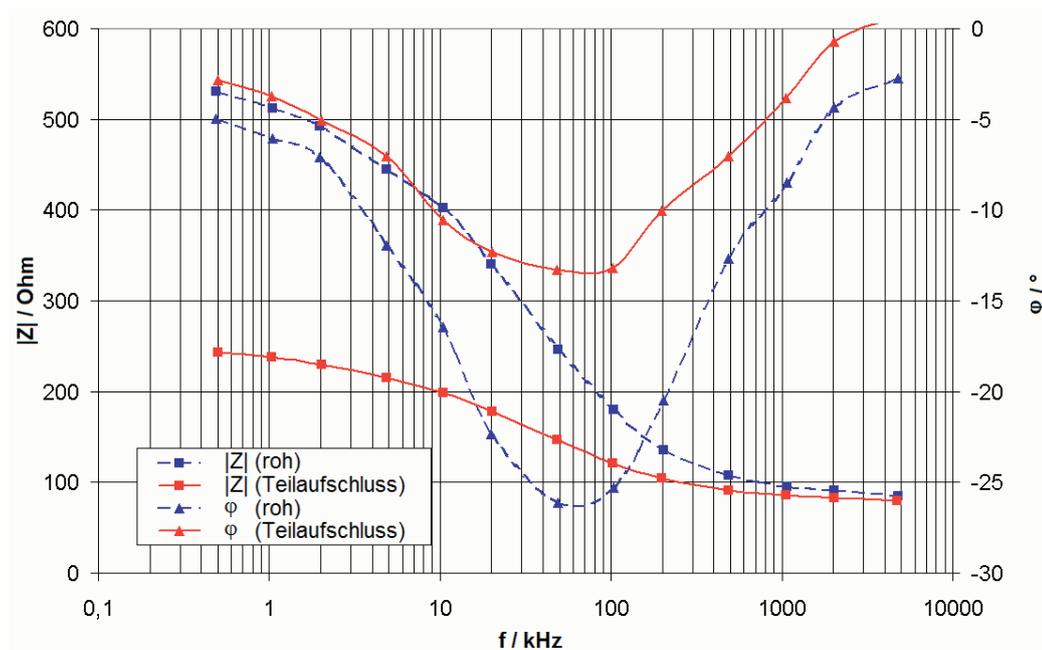


Bild 11: Verlauf der komplexen Impedanz für einen rohen und einen durch Elektroporation teilaufgeschlossenen Zuckerrübenwürfel mit 5 cm Kantenlänge [SAC-08a].

Bild 11 zeigt den Frequenzverlauf des Betrag und der Phase der komplexen Impedanz eines würfelförmigen Zuckerrübenstücks im rohen und durch Elektroporation teilweise aufgeschlossenem Zustand [SACK-08a]. Für die Messung wurde eine Wechselspannung veränderlicher Frequenz von ca.  $\hat{U} = 3 \text{ V}$  an die Probe angelegt und der Strom nach Betrag und Phase gemessen [SACK-12d, SACK-09c]. Im tiefen Frequenzbereich sperren die Zellmembranen beim rohen Gewebe den Stromfluss. Der gemessene Strom fließt am Zellinnern vorbei, beispielsweise durch Saftkanäle im Gewebe. Im oberen Frequenzbereich sind die Zellmembranen aufgrund ihrer Kapazität für den Wechselstrom durchlässig, so dass nahezu die gesamte Querschnittsfläche der Gewebeprobe für den Stromfluss zur Verfügung steht. Der Strom wird begrenzt durch die Leitfähigkeit des Zytoplasmas. In beiden Frequenzbereichen ist die Phasenverschiebung zwischen Messspannung und -strom nahezu Null, d.h. das Gewebe wirkt als ohmscher Widerstand. Im Übergangsbereich dazwischen tritt eine messbare Phasenverschiebung auf. Mit zunehmendem Aufschlussgrad des Gewebes gehen sowohl die Phasenverschiebung bei mittleren Frequenzen als auch der Betrag der Impedanz bei niedrigen Frequenzen zurück. Das Maximum der Phasenverschiebung liegt für rohe Zuckerrübenstücke bei einer Frequenz von etwa 50 kHz. Es wandert mit zunehmendem Aufschluss zu höheren Frequenzen.

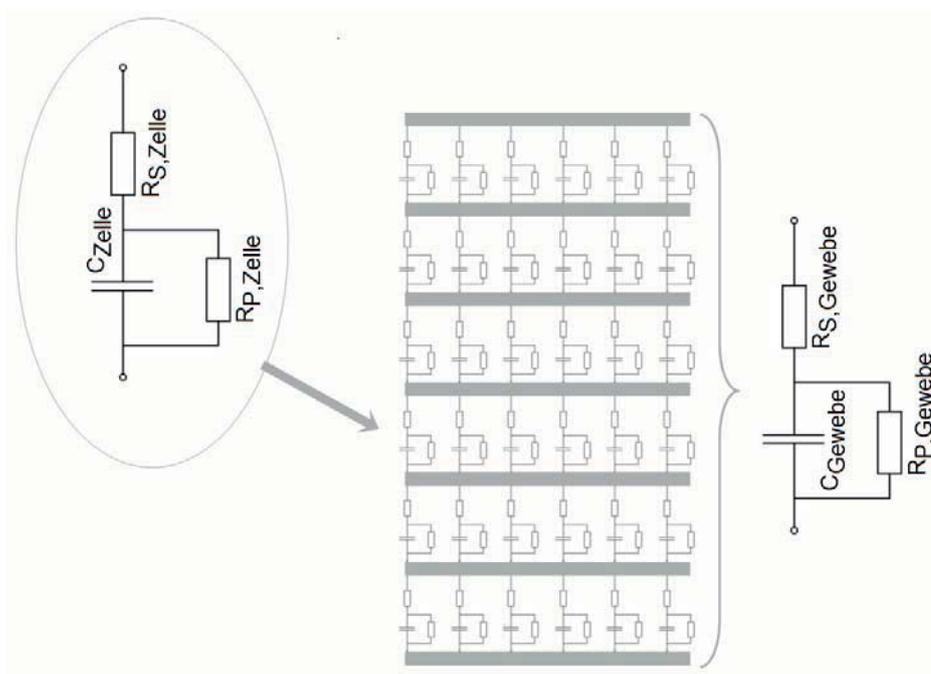


Bild 12: Zusammenhang der vereinfachten Ersatzschaltbilder von Zelle und Gewebe [SAC-08a].

Das beschriebene Verhalten zeigen prinzipiell auch die Membranen der Vakuolen, die beim Parenchymgewebe (Speichergewebe der Zuckerrüben) einen Großteil jeder Zelle ausfüllen. Angersbach et al. haben für verschiedene Gewebearten durch die Anpassung der Parameter eines elektrischen Ersatzschaltbilds einer Zelle ähnlich Bild 2 bei Berücksichtigung der Zell- und Vakuolenmembranen für den Betrag der komplexen Impedanz eine gute Übereinstimmung zwischen gemessenen und nach dem Ersatzschaltbild errechneten Werten erzielt [ANG99].

Bei einer Impedanzspektroskopie einer Gewebeprobe sind die Parameter, die das Ersatzschaltbild einer Zelle charakterisieren, der Messung nicht direkt zugänglich. Das Gewebe lässt sich jedoch vereinfacht als eine kombinierte elektrische Serien- und Parallelschaltung einzelner Zellen auffassen. Bild 12 zeigt vereinfacht den Übergang vom Ersatzschaltbild einer Zelle zum Ersatzschaltbild des Gewebes. Zur Vereinfachung wurden Strukturen im Zellinnern wie beispielsweise Vakuolen sowie die durch Ionenkanäle aufrecht erhaltene Transmembrananspannung vernachlässigt. Das Verhalten der Zellmembranen, die in Bild 2 einzeln als Parallelschaltung aus einer Kapazität  $C_M$  und einem Widerstand  $R_M$  dargestellt sind, wurde zusammenfassend als  $C_{Zelle}$  und  $R_{P,Zelle}$ , dargestellt und der Widerstand des Cytoplasmas als Serienwiderstand  $R_{S,Zelle}$  anfügt. Durch die entsprechende Kombination der Ersatzschaltbilder einer Einzelzelle erhält man das

Ersatzschaltbild des Gewebes. Geht man davon aus, dass alle Ersatzschaltbilder der Einzelzellen die gleichen Werte aufweisen, lässt sich das Ersatzschaltbild des Gewebes zu einem Ersatzschaltbild aus den Elementen  $C_{\text{Gewebe}}$ ,  $R_{P,\text{Gewebe}}$  und  $R_{S,\text{Gewebe}}$  zusammenfassen, die der Impedanzmessung zugänglich sind. Diese Impedanzmesswerte sind abhängig von der Geometrie der Probe. Sie lassen sich aber über die Geometrie des Messvolumens mit den Werten des Ersatzschaltbilds der Zelle verknüpfen. Für ein quaderförmiges, abgeschlossenes Messvolumen der Länge  $l$  und Querschnittsfläche  $A$  mit homogenem Feld gilt

$$C_{\text{Gewebe}} = C_{\text{Zelle}} \cdot \frac{a \cdot b}{c} = C_{\text{Zelle}} \cdot \frac{A}{l} \quad (\text{Gl. 5})$$

$$G_{P,\text{Gewebe}} = \frac{1}{R_{P,\text{Gewebe}}} = \frac{1}{R_{P,\text{Zelle}}} \cdot \frac{a \cdot b}{c} = \frac{1}{R_{P,\text{Zelle}}} \cdot \frac{A}{l} \quad (\text{Gl. 6})$$

$$R_{S,\text{Gewebe}} = R_{S,\text{Zelle}} \cdot \frac{c}{a \cdot b} = R_{S,\text{Zelle}} \cdot \frac{l}{A} \quad (\text{Gl. 7})$$

Dabei bezeichnen  $a$  und  $b$  die Anzahl der Zellen im Messvolumen in den beiden Richtungen einer Ebene gemäß Bild 12 und  $c$  die Anzahl der in Serie geschalteten Ebenen. Für eine große Anzahl an Zellen kann die vom Strom durchflossene Querschnittsfläche  $A$  durch

$$A = a \cdot b \cdot A_{\text{Zelle}} \quad (\text{Gl. 8})$$

und die Länge des Messvolumens  $l$  durch

$$l = c \cdot l_{\text{Zelle}} \quad (\text{Gl. 9})$$

auf die Abmessungen einer Zelle zurückgeführt werden, wobei die Zelle vereinfachend als quaderförmig mit der Länge  $l_{\text{Zelle}}$  und der stromdurchflossenen Querschnittsfläche  $A_{\text{Zelle}}$  angenommen wird. Mit diesen Annahmen gilt für die komplexe Impedanz des Gewebes:

$$\begin{aligned} Z_{\text{Gewebe}}(s) &= R_{S,\text{Gewebe}} + \frac{1}{sC_{\text{Gewebe}} + \frac{1}{R_{P,\text{Gewebe}}}} = \frac{l}{A} \cdot \left( R_{S,\text{Zelle}} + \frac{1}{sC_{\text{Zelle}} + \frac{1}{R_{P,\text{Zelle}}}} \right) = \\ &= \frac{l}{A} \cdot Z_{\text{Zelle}}(s) \end{aligned} \quad (\text{Gl. 10})$$

Somit lässt sich der komplexe Impedanzverlauf einer Probe geometrieunabhängig als frequenzabhängiger Verlauf des spezifischen Widerstands  $\rho$

$$\rho(\omega) = |\underline{Z}(j\omega)| \cdot \frac{A}{l} \quad (\text{Gl. 11})$$

und der Phasenverschiebung zwischen Messspannung und -strom  $\phi_{ui}$

$$\phi_{ui} = \arg(\underline{Z}(j\omega)) \quad (\text{Gl. 12})$$

darstellen.

Üblich ist auch die Angabe des komplexen Admittanzverlaufs mit der Leitfähigkeit  $\kappa$  der Probe

$$\kappa(\omega) = \frac{1}{\rho(\omega)} \quad (\text{Gl. 13})$$

sowie der Phasenverschiebung zwischen Messstrom und -spannung  $\phi_{iu}$

$$\phi_{iu} = \arg\left(\frac{1}{\underline{Z}(j\omega)}\right) = -\arg(\underline{Z}(j\omega)) \quad (\text{Gl. 14})$$

### 1.2.2.3 Bestimmung des Aufschlussgrads von Gewebe

Die durch Elektroporation bewirkte Änderung der komplexen Impedanz des Zellgewebes kann für eine Messung des Aufschlussgrads genutzt werden. Dies kann auf zweierlei Weise geschehen.

Angersbach et al. [ANG-99] beschreiben ein Verfahren, bei dem die Leitfähigkeit des Gewebes vor und nach dem Aufschluss jeweils bei einer niedrigen Frequenz  $f_u$  und einer hohen Frequenz  $f_o$  gemessen werden und der Grad des Gewebeaufschlusses wie folgt bestimmt wird:

$$p_0 = \frac{\frac{\kappa_{o,roh}}{\kappa_o} \cdot \kappa_u - \kappa_{u,roh}}{\kappa_{o,roh} - \kappa_{u,roh}} \quad (\text{Gl. 15})$$

Dabei ist  $\kappa_{u,roh}$  und  $\kappa_{o,roh}$  die vor dem Aufschluss am rohen Gewebe gemessenen Leitfähigkeiten bei unterer und oberer Messfrequenz sowie  $\kappa_u$  und  $\kappa_o$  die entsprechenden Leitfähigkeiten am aufgeschlossenen Gewebe. Der Wertebereich des Aufschlussgrads liegt zwischen 0 für rohes Gewebe und 1 für vollständig aufgeschlossenes Gewebe.

Diese Messung wertet im Prinzip die aufschlussbedingte Änderung der Leitfähigkeit bei tiefen Frequenzen aus. Die relative Änderung der Leitfähigkeit kann dargestellt werden als

$$\Delta \kappa_{rel} = \frac{\kappa_o - \kappa_u}{\kappa_u} = \frac{\kappa_o}{\kappa_u} - 1. \quad (Gl. 16)$$

$\Delta \kappa_{rel}$  ist Null bei vollständigem Aufschluss und maximal für rohes Gewebe.

Der Messung liegt die Idee zu Grunde, dass die Abnahme der Widerstände  $R_M$  parallel zu den Zellmembranen aufgrund der Permeabilisierung als Abnahme des Ersatzwiderstands  $R_{P,Gewebe}$  im Ersatzschaltbild für das Gewebe messbar ist. Die Widerstände  $R_{S,Gewebe}$  und  $R_{P,Gewebe}$  lassen sich aus dem Impedanzverlauf nach Gl. 17 und Gl. 18 bestimmen.

$$R_{S,Gewebe} = \left. \frac{u}{|i|} \right|_{f=f_o} \quad (Gl. 17)$$

$$R_{P,Gewebe} = \left. \frac{u}{|i|} \right|_{f=f_u} - R_{S,Gewebe} \quad (Gl. 18)$$

Dabei nutzt man aus, dass für hohe Frequenzen der Widerstand  $R_{P,Gewebe}$  über die parallele Kapazität der Zellmembran kurzgeschlossen ist, so dass nur der Widerstand  $R_{S,Gewebe}$  wirksam ist. Bei tiefen Frequenzen wirkt die Serienschaltung  $R_{S,Gewebe} + R_{P,Gewebe}$ . Entsprechend werden die beiden Messfrequenzen  $f_u$  und  $f_o$  aus den beiden Frequenzbereichen unterhalb und oberhalb der Impedanzänderung gewählt, in denen der Betrag der Impedanz nahezu konstant und die Phasenverschiebung vernachlässigbar gering sind. Eine Abnahme von  $R_{P,Gewebe}$  auf  $0 \Omega$  entspricht dem vollständigen Aufschluss. Findet kein Aufschluss statt, bleibt  $R_{P,Gewebe}$  unverändert.

Mit dem Parallel- und Serienwiderstand des Gewebes lässt sich der Gewebeaufschlussgrad  $p_0$  darstellen zu

$$p_0 = \frac{1 - \frac{R_P}{R_{P,roh}}}{1 + \frac{R_P}{R_S}}. \quad (Gl. 19)$$

Dies entspricht einer vereinfachten Darstellung gemäß

$$p_0 = \frac{\kappa_u - \kappa_{u,roh}}{\kappa_{o,roh} - \kappa_{u,roh}}. \quad (Gl. 20)$$

In Gl. 20 ist der Term  $\frac{\kappa_{o,roh}}{\kappa_o}$  nicht enthalten. Er berücksichtigt eine Änderung der Leitfähigkeit zwischen den Messungen am rohen und behandelten Material, beispielsweise durch eine Temperaturänderung.

Messungen an verschiedenen Pflanzengeweben zeigten, dass das Maximum der Phasenverschiebung abhängig von der Gewebeart in einem Intervall von ca. 10 kHz bis einigen 100 kHz zu finden ist. Die Diagramme in Bild 11 und Bild 13a)-d) zeigen die spezifischen komplexen Impedanz- bzw. Admittanzverläufe für Zuckerrüben, Apfel, Karotten, Kartoffeln und Weinbeerenmaische. Für die Messungen an Apfel- Karotten- und Kartoffelgewebe wurden angefeuchtete Elektroden direkt mit dem Probenstück kontaktiert. Die ganzen Weinbeeren wurden zur Messung in Wasser eingelegt.

Wie Messungen zeigten, ist auch die Größe der Phasenverschiebung bei mittlerer Frequenz ein Maß für den Aufschlussgrad. Der Aufschlussgrad kann daher aus der Phasenverschiebung gemäß Gl. 21 abgeleitet werden.

$$\varphi_{\max} = \text{Maximum}(|\arg(\underline{\kappa})|) \Big|_{f_u}^{f_o} \quad (Gl. 21)$$

Eine Messung der Phasenverschiebung am Maximum oder zumindest in seiner Nähe hat den Vorteil einer höheren Messempfindlichkeit gegenüber einer Messung bei einer anderen Frequenz.