elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Vergleich verschiedener Verkapselungsmethoden zur Immobilisierung von Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(Ingenieurwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Dipl.-Ing. Christian Schwinger
geb. am: 18.11.1969, in Halle/S.

Halle (Saale), 06.02.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006492
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006492]

elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Vergleich verschiedener Verkapselungsmethoden zur Immobilisierung von Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(Ingenieurwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Dipl.-Ing. Christian Schwinger
geb. am: 18.11.1969, in Halle/S.

Gutachterinnen/Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Jörg Kreßler
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Karl-Friedrich Arndt (Technische Universität Dresden)
3. Prof. Dr.-Ing. habil. Martin Sommerfeld

Halle (Saale), 06.02.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006492
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006492]

Danksagung

Prof. Dr. Jörg Kreßler danke ich für die Bereitstellung des Themas und für die mir gewährte Freiheit, dieses zu bearbeiten. Bedanken möchte ich mich zusätzlich für die Übernahme des Erstgutachtens der vorliegenden Arbeit.

Dank gebührt auch den an dieser interdisziplinären Arbeit beteiligten Partnern der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität, speziell Herrn PD Dr. Nikolai Rainov und Frau Dipl.-Biochem. Sandra Koch, sowohl für die umfangreiche Unterstützung bei der Zellaufbereitung und Zellkultivierung, als auch für die Überlassung und Nutzung des Neuroonkologischen Labors.

Im Besonderen gilt mein Dank dem Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität. In Person möchte Dr. Albrecht Klemenz hervorheben, der maßgebend an dem Erfolg der Messungen der elasto-mechanischen Eigenschaften an Mikrokapseln mittels SAM beteiligt war.
Dr. Kay Raum möchte ich in diesem Zusammenhang für die Überlassung und die umfangreiche Einweisung in die Auswertungssoftware „newMLA“ und für die konstruktive Diskussion der Ergebnisse danken.
Dipl.-Phys. Georg Dietrich danke ich für die Unterstützung bei der Dichtebestimmung der Na-Alginat-Lösungen.

Für die freundliche Übernahme der Co-Referate danke ich Prof. Dr. Karl-Friedrich Arndt und Prof. Dr. Martin Sommerfeld.

Prof. Dr. Goerg H. Michler und seinem Arbeitskreis danke ich, insbesondere Dr. Werner Lebeck und Dipl.-Phys. Sven Henning, für die flexible Überlassung des Bildverarbeitungssystems zur der Ermittlung der Mikrokapselgrössen.
Frau Carola Martin danke ich für die Unterstützung bei der Aufnahme der Messwerte, besonders hervorzuheben war hierbei die Exaktheit der Ergebnisse.

Bei Prof. Dr. Rainer Schnabel möchte ich mich für die Bereitstellung des Rheometers bedanken. Dipl.-Ing. Hans-Georg. Lenk möchte ich für die Einweisung am CSL 100 danken.

Herrn Dipl.-Ing. Udo Weißgüttel danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung des Modells zur Vorhersage von Tropfengrößen bei der AirJet-Methode.

Die Einweisung in die Oberflächenspannungsmessung wurde freundlicherweise von Dr. Zofia Funke übernommen. Für die Unterstützung bei der Aufnahme der Messwerte sei Frau Elvira Börner gedankt.

Der Firma geniaLab möchte ich für die freie Bereitstellung des JetCutters und für die in Halle durchgeführten und erfolgreichen Experimente mittels JetCutter-Methode danken. Insbesondere gilt mein Dank Dr.-Ing. Ulrich Jahnz und Dr.-Ing. Peter Wittlich.

Für das konstruktive Arbeitsklima sei noch mal dem gesamten Arbeitskreis des Prof. Dr. Jörg Kreßler gedankt: Dr. Zofia Funke, Dr. Henning Kausche, Dr. Karsten Busse, Dr. Jürgen Vogel, Dr. Tammo Menke, M. Phil. Hazrat Hussain, Dipl.-Ing. Bistra Borisova, Dipl.-Ing. Dörte Scharnowski, Dipl.-Ing. Matthias Rähme, Frau Yvonne Möbius, Frau Claudia Hochbach, Frau Elvira Börner und Frau Karin Müller sowie Dr. Ahcène Tabet.

Insbesondere meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung des Studiums und der dauerhaften Unterstützung während der Promotion.

Meiner Frau Doreen möchte ich für ihre die Geduld, Selbstlosigkeit und Toleranz während der Promotionszeit danken.

Publikationen

Ch. Schwinger, J. Kressler, S. Koch, N.G. Rainov, A. Klemenz: „Strategies for Encapsulation of Living Cells with Polymeric Systems - Microencapsulation“, Proc. ACS, PMSE, 84, 894, **2001**.

Ch. Schwinger, S. Koch, U. Jahnz, P. Wittlich, N.G. Rainov, J. Kressler: „High-throughput encapsulation of murine fibroblasts in alginate using the JetCutter technology“, J. Microencapsulation, 19, 3, 273, **2002**.

Raum, K., Brandt, J., Gudziol, S., Klemenz, A., Smitmans, L., Schwinger, C., and Jenderka, K. V., „Quantitative scanning acoustic microscopy: methods and applications in medicine“, Fortschritte der Akustik: Plenarvorträge und Fachbeiträge der 28. Deutschen Jahrestagung für Akustik DAGA 2002, Bochum, 673, **2002**.

Schwinger, C., Klemenz, A., Raum, K., Kressler, J., „Comparison of Different Encapsulation Strategies for Living Cells and Mechanical Characterization of Microspheres by Scanning Acoustic Microscopy“, Zeitschrift Landesbauforschung Völkerode, Sonderausgabe Nr. 241, 51-57, **2002**.

Klemenz, A., Schwinger, Chr., Brandt, J., Koch, B., Kressler, J., “Investigation of elasto-mechanical properties of alginate by ultrasound methods", in: Maev, R (Ed.): Acoustical Imaging Vol 26, Kluwer Academic/Plenum, New York, 223, **2002**.

A. Klemenz, Ch. Schwinger, J. Brandt, J. Kressler, “Investigation of elasto-mechanical properties of alginate microcapsules by scanning acoustic microscopy“, J. Biom. Mat. Res., Part A, 65A, 2, 237, **2003**.

Klemenz, A., Brandt, J., Raum, K., Haberland, E. J., Gudziol, S., Schwinger, C., Smitmans, L., and Leicht, S., „Ultraschall-Rastermikroskopie zur Untersuchung biologischer Gewebe“, 19. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, **2002**.

Koch, S., Schwinger, C., Heinzen, C., Kressler, J., Rainov, N. R., ”Alginate encapsulation of genetically engineered mammalien cells: comparison of production devices methods and microcapsule characteristics”, J. Microencapsulation, 20, 3, 303, **2003**.

Poster

C. Schwinger, S. Koch, N. Rainov, A. Klemenz und J. Kressler, „Verkapselungsstrategien für lebende Zellen mit polymeren System“, Postere M 17, Vortragstagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Maßgeschneiderte Polymere, Merseburg, **2000**.

C. Schwinger, A.Tabet, S. Koch, N. Rainov, J. Kressler, „Verkapselung von lebenden Zellen mit Polymeren“, Tagung Polymerwerkstoffe 2000, Halle/S., **2000**.

Klemenz, A., Brandt, J., Raum, K., Haberland, E. J., Gudziol, S., Schwinger, C., Smitmans, L., and Leicht, S., „Ultraschall-Rastermikroskopie zur Untersuchung biologischer Gewebe“, 19. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, **2002**.

Präsentationen

Ch. Schwinger, „Verkapselungsstrategien für lebende Zellen mit polymeren Systemen“, Arbeitsgruppenseminar des Arbeitskreises Prof. Dr. Klemm, Friedrich-Schiller-Universität Jena, auf Einladung von Frau Dr. Vera Haack und Dr. Thomas Heinze, Siegmundsburg, **2000**.

Ch. Schwinger, J. Kreßler, S. Koch, N. Rainov, A. Klemenz, „Verkapselung lebender Zellen für die Gentherapie“, Symposium Medical Engineering, Hochschule Anhalt (FH), Köthen, **2000.**

Ch. Schwinger, J. Kressler, S. Koch, N.G. Rainov, A. Klemenz: „Strategies for Encapsulation of Living Cells with Polymeric Systems - Microencapsulation“, 125. ACS Meeting, San Diego, **2001**.

Ch. Schwinger, A. Klemenz, K. Raum, S. Koch, N. Rainov, J. Kressler, “Comparison of Different Encapsulation Strategies for Living Cells”, COST 840 Workschop, FAL Braunschweig, **2001**.

Raum, K., Brandt, J., Gudziol, S., Klemenz, A., Smitmans, L., Schwinger, C., and Jenderka, K. V., „Quantitative scanning acoustic microscopy: methods and applications in medicine“, Fortschritte der Akustik: Plenarvorträge und Fachbeiträge der 28. Deutschen Jahrestagung für Akustik DAGA 2002, Bochum, **2002**.

A. Klemenz, Chr. Schwinger, J. Brand, B. Koch, J. Kressler, „Investigation of Elasto-Mechanical Properties of Alginate by Ultrasound Methods, Windsor, **2002**.

Abkürzungen und Symbole

$\dot{V}_{N_2}$	Stickstoffvolumenstrom
$\dot{\gamma}$	Schergeschwindigkeit
c_{H_2O}	Schallgeschwindigkeit in Wasser
Z_{H_2O}	Akustische Impedanz des Wassers
ρ_{H_2O}	Dichte von Wasser
γ	Oberflächenspannung
Δw	Produkt aus $\Delta\rho$ und g (dient zur Verringerung von Veränderlichen)
(w/v)	Angabe über die Mischungsform
$\dot{V}_1$, $\dot{V}_2$	Volumenstrom
A	Fläche
a	Kapillarkonstante bzw. Laplacesche Konstante
Abb.	Abbildung
a_i	Korrekturfaktor des Linearverstärkers
Al_2O_3	Aluminium-3-oxid
Alg	Alginat
AO	Acredine Orange
APA	Alginat-Poly-$_L$-Lysin-Alginat Komplex
a_T	Tropfenkonstante
Ba^{2+}	Barium-Ionen
BD	Becton Dickinson
BHK	Zelllinie (Baby Hamster Kidney)
C_{11}	Akustische Steifigkeit
Ca^{2+}	Calcium-Ion
$CaCl_2$	Calciumchlorid
c_l	Schallgeschwindigkeit in longitudinaler Richtung
CMC	Carboxymethylcellulose
$c_{Na\text{-}Alginat}$	Konzentration von Na-Alginat in der Lösung
CO_2	Kohlendioxid
CS	Cellulosesulfate
c_w	Widerstandsbeiwert
D	Diffusionskoeffizient
d	Durchmesser
d*	Durchmesser des Abrißquerschnitts
d_{ai}	Innendurchmesser der Kapillare a
d_{ca}	Außendurchmesser der Kapillare c
d_D	Durchmesser der Düse bzw. Strahldurchmesser
DMEM	Dulbecco´s modified eagle´s medium (Zellkulturmedium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure

d_p	Kugeldurchmesser
d_T	Tropfendurchmesser
E	Elastizitätsmodul
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidium Bromide
f	Frequenz
f	Korrekturfaktor
Fe^{3+}	Eisen-3-Ionen
F_g	Gewichtskraft des Tropfens
F_{GW}	Grauwertfaktor der Probe
F_o	Oberflächenkraft
F_{RF}	Verstärkungsfaktor der Probe
F_w	Widerstandskraft der koaxialen Gasströmung auf den Tropfen
g	Gravitationskonstante
G	Gage (medizinisches Größenmaß für Kanülen)
GHz	Gigahertz
Gl.	Gleichung
GLI328	Zelllinie (Fibroblasten)
GLT	Gesellschaft für Löttechnik
GMP	Good Manufacturing Practice
GW_{PMMA}	Grauwert von PMMA
GW_{Probe}	Grauwert der Probe
H	Gesamthöhe des geschnittenen Segmentes
h	Höhe des Zylinders
h	Stunde
HV	High viscosity
IEM	Inotech Encapsulator Medical
J	Fluss
J3T	Zelllinie (Canine Glioma Cells)
K	Kelvin
k	Faktor
Kap.	Kapitel
KG	Kommanditgesellschaft
k_N	Dimensionslose empirische Konstante
LV	Low viscosity
m	Masse
MC	Methylcellulose
MHz	Megahertz
MLA	Multi-Layer-Analyse
MLT	Masse-Länge-Zeit
MOPS	(3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid)
MV	Medium viscosity

n	Drehzahl
N_2	Stickstoff
Na	Natrium
O_2	Sauerstoff
Oh	Ohnesorgezahl
p_0	Intensität des abgegebenen Schallimpulses
$p_1 - p_4$	Parameter
Pa	Pascal
PLL	Poly-$_L$-lysin
PMMA	Polymethylmethakrylat
p_r	Intensität des Schallimpulses nach Reflexion
PTFE	Polytetrafluorethylen
R	Reflexionsfaktor
r	Außenradius der Kapillare
Re	Reynoldszahl
Re_p	Reynoldszahl (Kugel)
R_T	Raumtemperatur
RV	Retrovirale Vektoren
RV-VPC	Retrovirale Verpackungszellen
s	Sekunde
s.d.	Standardabweichung
SAM	Scanning Acoustic Microscopy (akustische Rastermikroskopie)
SEC	Sulfoethylcellulose
SiO_2	Siliziumdioxid
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TiO_2	Titandioxid
t_p	Laufzeit des Schallimpulses
V	Volumen
v	Geschwindigkeit
V_d	Tropfenvolumen
v_d	Strömungsgeschwindigkeit der dispersen Phase
v_k	Strömungsgeschwindigkeit der kontinuierlichen Phase
V_{PMMA}	Verstärkereingangsspannung bei PMMA
V_{Probe}	Verstärkereingangsspannung bei der Probe
z	Anzahl der verwendeten Drähte
Z	Akustische Impedanz
z	Fokustiefe
Z_P	Akustische Impedanz der Probe
Δm	Diffundierende Masse
Δt	Zeitraum
ρ	Dichte

Φ	Korrekturfaktor
Φ_c	Kapillarkorrekturfaktor
ω	Öffnungswinkel
$\Pi_V, \Pi_d, \Pi_\eta, \Pi_\rho$	Dimensionslose Kennzahlen
γ_d	Ober- bzw. Grenzflächenspannung der dispersen Phase
η	Dynamische Viskosität
η_d	Dynamische Viskosität der dispersen Phase
η_k	Dynamische Viskosität der kontinuierlichen Phase
η_0	Nullscherviskosität
λ	Wellenlänge
ν	Kinematische Viskosität
ν_d	Kinematische Viskosität der dispersen Phase
ρ_d	Dichte der dispersen Phase
ρ_k	Dichte der kontinuierlichen Phase
τ	Schubspannung
υ	Poisson-Zahl

1 Einleitung *1*

2 Anwendung mikroverkapselter Zellen *2*

2.1 Einsatzbereiche **2**

2.2 Eigenschaftsbild der Mikrokapseln **3**

2.2.1 Anforderungen *in vitro* 3

2.2.2 Anforderungen *in vivo* 4

3 Ziel und Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit *5*

4 Theoretische Betrachtungen und Stand der Literatur *7*

4.1 Einfluss der Kapselgrößen auf biologische Systeme **7**

4.1.1 Einfluss auf die Immunabwehr 7

4.1.2 Einfluss auf immobilisierte Zellen 7

4.2 Wasserlösliche Polymere zur Zellverkapselung **9**

4.2.1 Wasserlösliche Polymere allgemein 9

4.2.2 Na-Alginat 10

4.2.2.1 Ionotrope Gelbildung 11

4.2.2.2 Biokompatibilität von Na-Alginat 12

4.2.3 Komplexierung mittels Poly-$_L$-lysin 12

4.3 Bildung sphärischer Partikel aus Polymerlösungen **13**

4.3.1 Tropfenbildende Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln im Überblick 13

4.3.2 Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln 15

4.3.2.1 AirJet-Verfahren 15

4.3.2.2 JetCutter-Verfahren 18

4.3.2.3 Vibrations-Verfahren 21

4.4 Mechanische Stabilität von Mikrokapseln **23**

4.4.1 Untersuchungsmethoden 23

4.4.2 Akustische Rastermikroskopie (SAM) 23

4.4.2.1 Grundlagen des Verfahrens 23

4.4.2.2 Elasto-mechanische Eigenschaften 25

4.4.2.2.1 Akustische Impedanz 26

4.4.2.2.2 Multi-Layer-Analyse 27

5 Experimentelles *29*

5.1 Herstellung und Charakterisierung von Na-Alginat-Lösungen **29**

5.1.1 Herstellung von Na-Alginat-Lösungen 29

5.1.2 Viskositätsmessung von Na-Alginat-Lösungen 30

5.1.3 Dichtemessung von Na-Alginat-Lösungen 33

5.1.4 Oberflächenspannung von Na-Alginat-Lösungen 34

5.2 Herstellung von Alginatkapseln nach dem AirJet-Verfahren **35**

5.2.1 Vorversuche 36

5.2.2 Variation der Kapselgrößen 38

5.2.2.1 Einfluss des Volumenstroms $\dot{V}_{N_2}$ 38

5.2.2.2 Einfluss des Kapillaraußendurchmessers d_{ca} 40

5.2.2.3 Kapselherstellung bei eingestellter Viskosität 42

5.3 Modell der langsamen Tropfenbildung mit Air-Jet **44**

5.3.1 Kräftegleichgewicht 45

5.3.1.1 Gewichtskraft F_g 45

5.3.1.2 Oberflächenkraft F_0 45

5.3.1.2.1 Tropfeneinschnürung ohne koaxiale Gasströmung 46

5.3.1.2.2 Tropfeneinschnürung mit koaxialer Gasströmung 47

5.3.1.3 Strömungswiderstand F_w 47

5.3.1.3.1 Strömungswiderstand einer Kugel 47

5.3.1.3.2 Strömungswiderstand des an der Kanüle hängenden Tropfens 49

5.3.2 Dimensionsanalyse 50

5.3.2.1 Dimensionsmatrix 50

5.3.2.2 Ermittlung der Kennzahlmatrix 51

5.3.3 Langsame Tropfenbildung ohne Koaxialströmung 53

5.3.4 Modell für schnelle (NEWTON'sche) Tropfenumströmung mit Koaxialströmung 56

5.3.5 Nicht-NEWTON´sche Tropfenumströmung mit Koaxialströmung 59

5.3.6 Messwerte 59

5.4 Unterschiedliche Verkapselungsverfahren zur Immobilisierung von Zellen **61**

5.4.1 Pre-Prozess zur Verkapselung von Zellen 61

5.4.1.1 Zelllinien und Zellkultivierung 62

5.4.1.2 Herstellung von Zellsuspensionen 62

5.4.2 Prozess der Verkapselung von Zellen 63
5.4.2.1 Verkapselungsprozess mit dem AirJet-Verfahren 63
5.4.2.2 Verkapselungsprozess mit dem JetCutter-Verfahren 64
5.4.2.3 Verkapselungsprozess mit dem Vibrations-Verfahren 66
5.4.3 Post-Prozess der Verkapselung von Zellen 67
5.4.4 Vergleich der verschiedenen Verkapselungsmethoden 69
5.4.4.1 Vergleich anhand des Zellwachstums 69
5.4.4.1.1 AirJet- und Vibrations-Verfahren 69
5.4.4.1.2 JetCutter-Verfahren 70
5.4.4.1.3 Nachweis der Lebensfähigkeit immobilisierter Zellen 71
5.4.4.2 Vergleich anhand verfahrenstechnischer Betrachtungen 71
5.4.4.2.1 Einsetzbare Viskositätsbereiche 72
5.4.4.2.2 Einschätzung der praktischen Einsetzbarkeit der Verfahren 75
5.4.4.2.3 „Scale Up“ der Verfahren 75

5.5 Charakterisierung elasto-mechanischer Eigenschaften von Mikrokapseln 77
5.5.1 Bestimmung der akustischen Impedanz mittels Bulk Methode 77
5.5.1.1 Präparation der Probekörper 77
5.5.1.2 Dichte vernetzter Alginatprobekörper 78
5.5.1.3 Schallgeschwindigkeit in Alginatprobekörpern 79
5.5.2 Charakterisierung mittels akustischer Rastermikroskopie 80
5.5.2.1 Kalibrierung des SAM 2000 81
5.5.2.2 Akustische Impedanz von Mikrokapseln aus Na-Alginat 82
5.5.2.3 Akustische Steifigkeit von Mikrokapseln aus Na-Alginat 87

6 Zusammenfassung 90

7 Summary 92

8 Weiterführende Arbeiten 94

9 Anhang 95

10 Lebenslauf 110

11 Literatur 111

1 Einleitung

Kugelförmige Partikel im Größenbereich zwischen 1 µm und 1000 µm (auch bis zu 5000 µm) werden als Mikrokapseln, Mikrokugeln, Mikroperlen, Granules oder auch Microbeads bezeichnet, deren Matrix meist auf einen polymeren Ursprung zurückzuführen ist[1, 2].

Das Potential der Mikroverkapselung, Matrixeinschluss oder Membraneinschluss, liegt in der Immobilisierung von Wirkstoffen (Pulverkatalysatoren[3], Kolloide, Metallkomplexe[4], Enzyme, Farbstoffe) für technische Anwendungen, oder auch im Einschluss von Bakterien[5], Hefen und Zellen[6] für gezielte Wirkstoffproduktion im biotechnologischen Maßstab.

Auf dem Gebiet der Pharmazie konnten bereits auf der Grundlage von Mikrokapseln, gefüllt mit entsprechenden pharmazeutischen Wirkstoffen[7-23], sogenannte Drug-Release-Systeme, Drug-Delivery-Systeme oder auch Depotpräparate entwickelt werden, mit denen es gelungen ist, die Freisetzung von Medikamenten über einen längeren Zeitraum steuern zu können. Als Vorteil kann hierbei nicht nur die gleichmäßige und kontrollierte Abgabe angesehen werden, sondern zusätzlich die örtliche Erhöhung der Konzentration der entsprechenden Therapeutika und die damit gesunkene Belastung des Gesamtorganismus, was sich in der Einschränkung von Nebenwirkungen, z. B. im Verdauungstrakt, äußert.

Ein weiteres Potential solcher Verkapselungssysteme liegt im immunoprotektiven Einschluss von Zellen [24, 25], Bakterien[26, 27] und Viren, die in der Lage sind, Wirkstoffe *in vitro* bzw. *in vivo* zu produzieren, welche in biomedizinischen bzw. therapeutischen Applikationen, sowohl im veterinären[28] als auch im humanen Bereich[29] Anwendung finden.

Unter Betrachtung wirtschaftlicher Aspekte lassen sich nur schwer Daten über Umsatzzahlen von Mikrokapselsystemen, bezogen auf den Weltmarkt, ermitteln. Jedoch können auf Wachstumsmärkten derzeit Umsätze von fünf Milliarden Dollar jährlich, mit einer Wachstumsrate von fünf bis sieben Prozent pro Jahr erreicht werden. Als Wachstumsmärkte werden die kontrollierte Freigabe von Wirkstoffen bei Medikamenten und Futtermitteln, neu entwickelte Klebe- und Befestigungsmittel, als auch der Markt der mikroverkapselten Kunststoffadditive angesehen[30].

Eine weitere Erhöhung des Jahresumsatzes ließe sich auf dem Gebiet der Humanmedizin mit dem Einsatz verkapselter Zellen, Bakterien und Viren und der damit verbundenen kontinuierlichen Produktion von Therapeutika durch lebende Organismen erzielen.

Für die Anwendung von zellverkapselnden Microbeads in der Medizin sind aufwendige und oft bürokratische Zulassungsverfahren notwendig und derzeit ist keine Anwendung im humanen Bereich klinisch zugelassen. Die Gründe sind einerseits auf die Zurückhaltung der phar-

mazeutischen Industrie zurückzuführen, vor allem wegen der hohen finanziellen Aufwendungen in der Zellzucht und Zellkultivierung und der logistischen und fristgerechten Bereitstellung solcher Systeme. Andererseits entspricht die unzureichende Biokompatibilität der verwendeten Implantatmaterialien, und eine ausreichende mechanische Stabilität bzw. Langzeitstabilität des Matrix- bzw. des Membranmaterials nicht den Vorstellungen der Pharmaindustrie und somit ist das unternehmerische Risiko für einen Einsatz im humanen Bereich für die Unternehmen nicht abschätzbar.

2 Anwendung mikroverkapselter Zellen

2.1 Einsatzbereiche

Der Hauptteil des potentiellen Einsatzbereiches zellverkapselnder Systeme liegt zum einen in der Bereitstellung von Enzymen[31] oder Hormonen, die durch Unterfunktionen oder Ausfall der jeweiligen Drüse nicht zur Verfügung gestellt werden können, und zum anderen in der gezielten Beeinflussung genetisch veränderter Zellen in Tumoren durch den Einsatz retroviraler Vektoren (RV), die durch retrovirale Verpackungszellen (RV-VPC) innerhalb von Mikrokapseln produziert werden können, und somit ein erhebliches Potential für die Gentherapie[32, 33] aufweisen.
Bei der Kompensation von Drüsenunterfunktionen durch verkapselte Zellen bildet der Diabetes mellitus, d. h. die Unterfunktion der Insulin produzierenden B-Zellen in den Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse[34-59], das Kernfeld der enzymbildenden Mikroverkapselung.
Weiterhin sind Gegenstand der derzeitigen Forschungsbemühungen auf dem Gebiet der Mikroverkapselung:

- die Immobilisierung von Schild- und Schildnebendrüsenzellen[60],
- die Immobilisierung von Leberzellen[61-66] zur Versorgung mit entsprechenden Hormonen oder Enzymen oder
- der Einschluss von Spermazellen[67-69] und Tumorzellen[24] zur erweiterten Konservierung.

Einen weiteren Schwerpunkt der gegenwärtigen Entwicklung auf dem Gebiet der Mikroverkapselung stellt die Gentherapie[70-87] dar.
Hierbei werden Zelllinien, meist Myoblasten[88] oder Fibroblasten[89], genetisch so verändert, daß sie befähigt sind, Hormone oder Enzyme zu produzieren, die mit ihrer eigentlichen Herkunft nicht in direkter Verbindung stehen. Diese Zellen können auto-, allo- oder xenogenen Ursprunges sein.
Eine zweite Möglichkeit der Gentherapie liegt in der gezielten Manipulation von Zellen, die befähigt werden, retrovirale Vektoren (RV) zu verpacken. Diese RV's sind in der Lage, genetische Veränderungen der DNA, z. B. im Gewebe von Tumoren, zu detektieren und diese Defekte durch gesunde DNA-Sequenzen auszutauschen. Somit wird eine Gesundung des Gewebes ohne operativen Einsatz oder weitere medikamentöse Behandlung durch Chemotherapeutika oder radioaktive Bestrahlung mit den jeweiligen, relativ hohen, Nebenwirkungen möglich.
Dies kann beispielsweise durch Injektion von immunoprotektiv verkapselten Zellen erfolgen, die in die zum Tumor führende Arterie eingespritzt werden. Da der Durchblutungsfaktor in Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe deutlich höher ist, werden sich die Mikrokapseln vorrangig in den Gefäßen des Tumors ansammeln und diese zum Teil verschließen. Dies stellt zusätzlich einen Vorteil dar, da hierdurch der Metabolismus innerhalb des Tumors gehemmt wird, was sich positiv auf eine verminderte Größenzunahme auswirken kann.
Diese Anwendung von Mikrokapseln stellt speziell für die Behandlung von Gehirntumoren ein erhebliches Potential dar, welche eine Erweiterung der Möglichkeiten in der allgemeinen Krebstherapie und insbesondere in der Neurochirurgie bieten könnte, da dort der operative Eingriff meist mit der Beeinflussung von sensiblen Bereichen des Gehirns bzw. des Nervengewebes verbunden ist und hierdurch Bereiche zugänglich werden, die bisher nicht oder nur unzureichend versorgt werden konnten.

2.2 Eigenschaftsbild der Mikrokapseln

2.2.1 Anforderungen *in vitro*

Um die Überlebensfähigkeit mikroverkapselter Zellen zu garantieren, lassen sich generelle Aussagen bezüglich der erforderlichen *in vitro* Eigenschaften zellverkapselnder Systeme polymeren Ursprungs treffen. Zellverkapselnde Materialen müssen einen hohen Grad an Biokompatibilität, d. h. keine Toxizität gegenüber den zu verkapselnden Zellen aufweisen, sich

im pH-neutralen Bereich mit geringer Belastung der Zellen, z. B. durch Scherbeanspruchung, verarbeiten lassen. Weiter ist zu garantieren, daß der Metabolismus der Zellen, z.B. Nährstoffe und Stoffwechselendprodukte, die Freisetzung der durch die Zellen produzierten Stoffe, z. B. Genprodukte, durch Diffusion, schematisch dargestellt in Abb. 2.1, durch die Permeabilität der sich bildenden Kapselmembran oder Kapselmatrix nicht oder nur gering beeinflusst wird.

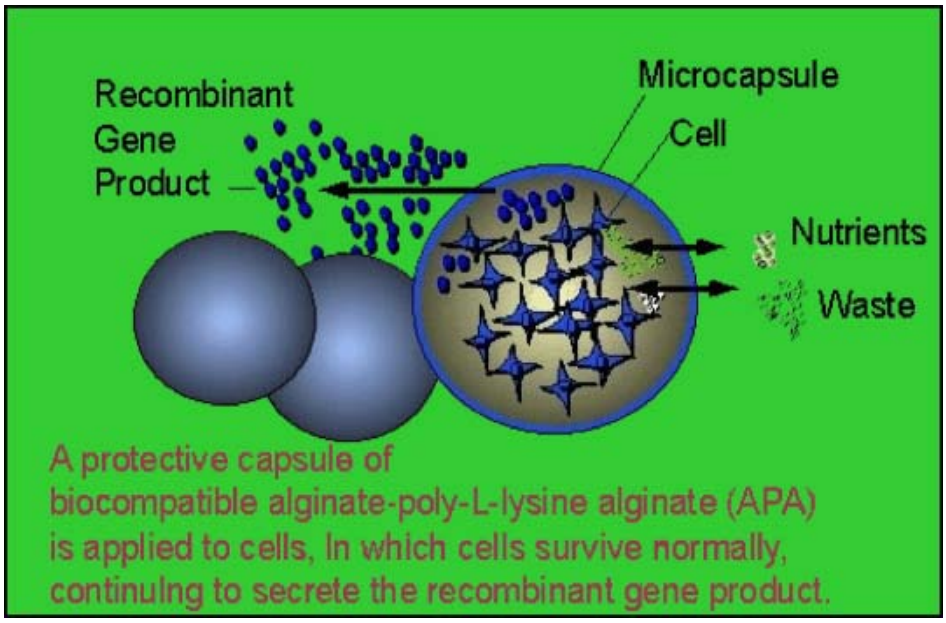


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Diffusionsprozesse[90]

2.2.2 Anforderungen *in vivo*

Zusätzlich zu den genannten *in vitro* Eigenschaften kommen für *in vivo* Anwendungen weitere Anforderungen an die Eigenschaften der Mikrokapseln hinzu, um die entsprechenden therapeutischen Wirkungen erzielen zu können. Hierzu gehört die immunoprotektive Auslegung der Mikrokapsel, d. h. die Membran bzw. Matrix entsprechend permeabel zu gestalten, daß die körpereigenen Bestandteile der zellulären Abwehr diese nicht passieren können, wie in Abb. 2.2 dargestellt, wobei die bereits in Kap 2.2.1 erwähnten Aussagen bezüglich der Permeabilität zusätzlich gültig bleiben.

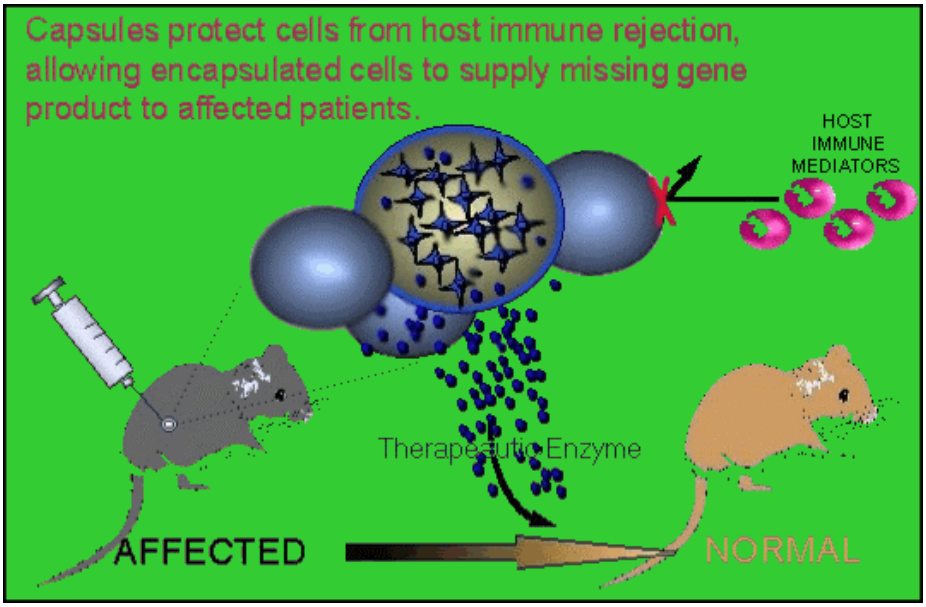


Abb. 2.2: Immunoprotektion der Zellen (schematisch)[90]

Weiterhin ist eine entsprechende Applikation solcher Systeme nur möglich, wenn das eingebrachte Kapselmaterial eine entsprechend hohe Biokompatibilität zu dem umgebenden Gewebe aufweist, damit beispielsweise Fibrillenbildung oder mitogene Prozesse und damit Abstoßung der Microbeads verhindert werden können.

Wie bereits im Abschnitt 2.1 aufgezeigt, sollen Mikrokapseln in den Blutkreislauf injiziert werden können. Hierfür ist eine entsprechende Größe bzw. Größenverteilung der Kapseln erforderlich, um bei der Durchführung des Injektionsprozesses ein Verstopfen der Injektionskanüle zu vermeiden und zum anderen zu gewährleisten, daß nur Blutgefäße mit definiertem Durchmesser von den Kapseln verschlossen werden und hierdurch ein Verschluss größerer Arterien, mit drohender Thrombose, verhindert werden kann. Die Kapseln müssen zusätzlich eine ausreichende mechanische Stabilität haben.

3 Ziel und Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Herstellung und quantitative Charakterisierung von Mikrokapseln aus Na-Alginat mit einer spezifischen Größenverteilung von 100 bis 350 µm. Hierfür sollen verschiedene tropfenbildende Herstellungsverfahren auf ihre Anwendbarkeit, bezüglich Monodispersität oder Verteilungsbreite der zu erzielenden Kapselgrößen, und deren Beeinflussung durch die zur Verfügung stehenden Verarbeitungsparameter charakterisiert werden.

Kernfeld der Untersuchungen für die Herstellung der Microbeads soll das AirJet-Verfahren bilden. Durch Variation der Kapillardurchmesser, der Volumenströme innerhalb der Zwei-

stoffdüse und durch den Einsatz geeigneter Viskositäten der verwendeten Na-Alginat-Lösungen soll Einfluss auf die Kapselgrößen bzw. Größenverteilungen genommen und mit Technologien, die deutlich höheren technischen Aufwand aufweisen, z. B. Vibrations-Verfahren und JetCutter-Verfahren, verglichen werden.

Hierbei wurde zusätzlich die generelle Eignung des JetCutter-Verfahrens zur Immobilisierung von tierischen Zellen durch Mikroverkapselung an APA-Kapseln evaluiert und die Überlebensfähigkeit der immobilsierten Zellen mit den Ergebnissen der alternativen Verkapselungsmethoden verglichen.

Weiter soll die mechanische Stabilität von Membranen oder Matrizes durch Untersuchungen mittels rasterakustischer Mikroskopie, auch Scanning Acoustic Microscopy (SAM) genannt, charakterisiert und Aussagen über die Eignung des Verfahrens zur Bestimmung der elastomechanischen Eigenschaften an Mikrokapseln getroffen werden.

4 Theoretische Betrachtungen und Stand der Literatur

4.1 Einfluss der Kapselgrößen auf biologische Systeme

4.1.1 Einfluss auf die Immunabwehr

Im Bereich zellverkapselnder Systeme ist die Größe der Microbeads nicht nur für die Möglichkeit der Applikation durch Injektion ein nicht zu vernachlässigender Faktor. Untersuchungen zeigten, daß die Größe der Mikrokapseln[91-93] einen entscheidenden Einfluss zur Verminderung der Immunabwehr bei der Implantation, z. B. in der epidermalen Fettschicht von Ratten[93, 94] in Form von Bindegewebsbildung zwischen Mikrokapsel und umgebenden Gewebe, aufweist. Durch die Verringerung des Kapseldurchmessers von 1247 auf 326 µm konnte Fibrose, bei nahezu identischem Implantationsvolumen der Kapseln, bei Erhöhung der zu implantierenden Kapselzahl, signifikant verringert und somit die Biokompatibilität der Mikrokapseln entscheidend verbessert werden[93].

4.1.2 Einfluss auf immobilisierte Zellen

Für die Immobilisierung von Zellen in Mikrokapseln ergeben sich ebenfalls deutliche Vorteile[95] durch den Einsatz von Microbeads mit einer Größe unterhalb von 350 µm. So konnte für Mikrokapseln dieses Durchmessers z. B. eine erhöhte Freisetzung von Insulin[96] und eine verbesserte Versorgung mit Sauerstoff[97] nachgewiesen werden, was auf den Einfluss von Diffusionsprozessen zurückzuführen ist. Andererseits sinkt die Freisetzung von Insulin bei Kapseln mit einem größeren Durchmesser von 650 µm, gekoppelt an das daraus resultierende ineffizientere Oberflächen-Volumen-Verhältnis. Dadurch kann von einer nicht ausreichenden Versorgung der Zellen mit den für den Metabolismus notwendigen Faktoren ausgegangen werden, die für die Produktion von Insulin bzw. für das Überleben der Zellen notwendig sind.
Andererseits kann die niedrigere Freigabe von Insulin bei Mikrokapseln mit 650 µm, bei gleicher Produktionsmenge von Insulin nach Stimulation mit Glukose, auf die dann kleinere intrakapsuläre Konzentration von Insulin zurückgeführt werden. Diese müsste um einen Faktor von ca. 8 höher, im Vergleich zu Kapseln mit einem Durchmesser von 350 µm, sein, damit die Diffusionsrate aufgrund des Konzentrationsunterschiedes äquivalent bleibt[96].

Generell verhält sich die Diffusionsrate für Stoffe, die die Kapselmembran oder Kapselmatrix passieren können:

a) direkt proportional zur dritten Potenz des halben Kapseldurchmessers des Volumens der Kapseln[96],
b) direkt proportional zur Oberfläche der Kapsel sowie
c) umgekehrt proportional zum Diffusionsabstand.

Allgemein lässt sich der Fluss J durch das 1. Ficksches Gesetz, siehe Gl. 4.1

$$J = \frac{\Delta m}{\Delta t} = -D \cdot A \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x} \qquad \textbf{Gl. 4.1}$$

mit,

Δm	-	diffundierende Masse,
Δt	-	Zeitraum,
D	-	Diffusionskoeffizient,
A	-	Fläche,
$\frac{\Delta c}{\Delta x}$	-	Konzentrationsgradient,

darstellen.

Hierbei stellt der Konzentrationsgradient $\frac{\Delta c}{\Delta x}$ der einzelnen für den Metabolismus der Zellen benötigten Stoffe, bzw. aller in der Lösung befindlichen Stoffe, die treibende Kraft dar[98].

4.2 Wasserlösliche Polymere zur Zellverkapselung

4.2.1 Wasserlösliche Polymere allgemein

Für die Immobilisierung von Zellen, durch Matrix- oder Membraneinschluss, steht eine Vielzahl von wasserlöslichen Polymeren zur Verfügung. Hierbei können diese nach Herkunft, in natürliche und synthetische Polymere, unterteilt werden. Eine weitere Unterteilung ist dem Ladungszustand der Polymere zuzuordnen, so können diese als Polykationen, als Polyanionen oder neutral vorliegen.

In der Literatur existiert eine Vielzahl von Artikeln zum Material-Screening[99-106], die Auskunft über die Eignung von wasserlöslichen Polymeren zur erfolgreichen Verkapselung von Zellen, in Form verschiedener Auswahlkriterien und Zusammenhänge, geben.

Ein hervorzuhebendes Protokoll für eine denkbare Standardisierung eines solchen Evaluierungsverfahrens ist in Abb. 4.1 aufgezeigt.

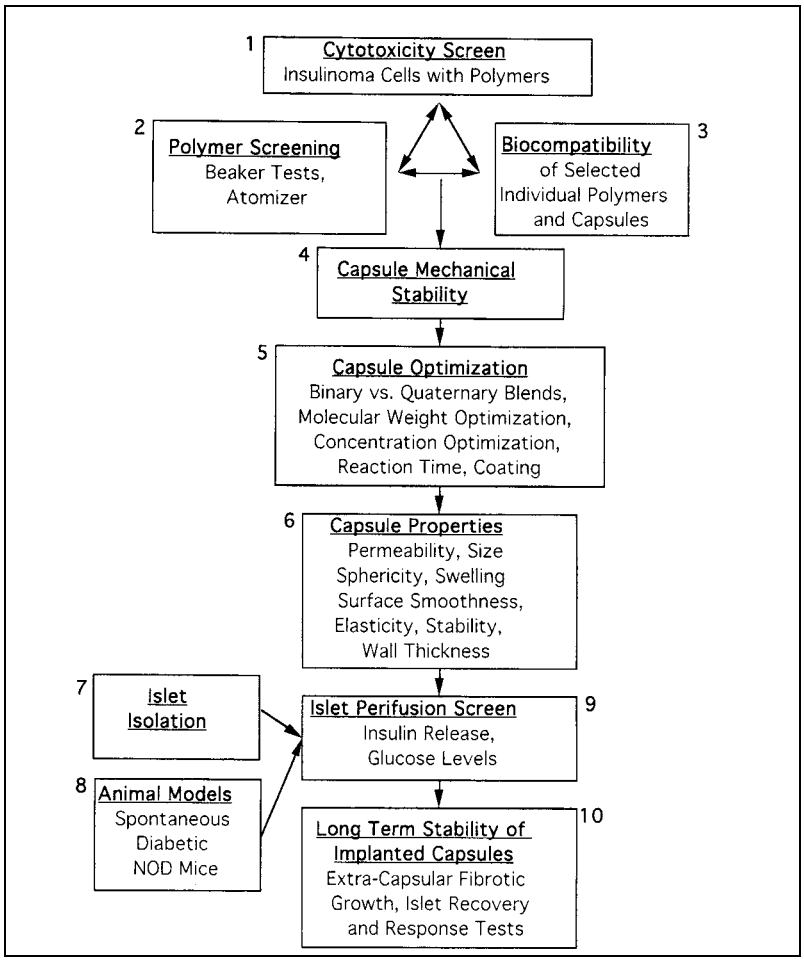


Abb. 4.1: Screenig-Protokoll zur Eignung von wasserlöslichen Polymeren zur Immobilisierung von Zellen [103]

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich ein Polyelektrolyt-System, bestehend aus Na-Alginat (Polyanion) und Poly-$_L$-lysin (Polykation), zur Immobilisierung von Zellen verwendet, an dem weiterführend Zusammenhänge zur Bildung von Mikrokapseln aus Na-Alginat (Matrixeinschluss) bzw. zur Bildung von Komplexen aus den genannten Polyelektrolyten (Membraneinschluss), betrachtet werden sollen.

4.2.2 Na-Alginat

Systeme unter Nutzung von Na-Alginat, einem anionischen Polysaccharid gewonnen aus Braunalgen, bestehend aus dem Natriumsalz der Alginsäuren, D-Mannuronsäure und L-Guluronsäure, dargestellt in Abb. 4.2.a, bilden eines der größten Anwendungsgebiete, sowohl des Matrix- als auch des Membraneinschlusses, im Bereich der Mikroverkapselungen[107]. Na-Alginate werden im Handel, z. B. in Chemikalienkatalogen, meist in drei Klassen angeboten, die nach ihren Viskositäten in wässriger Lösung in LV (low viscosity), MV (medium viscosity) und HV (high viscosity) unterteilt werden.

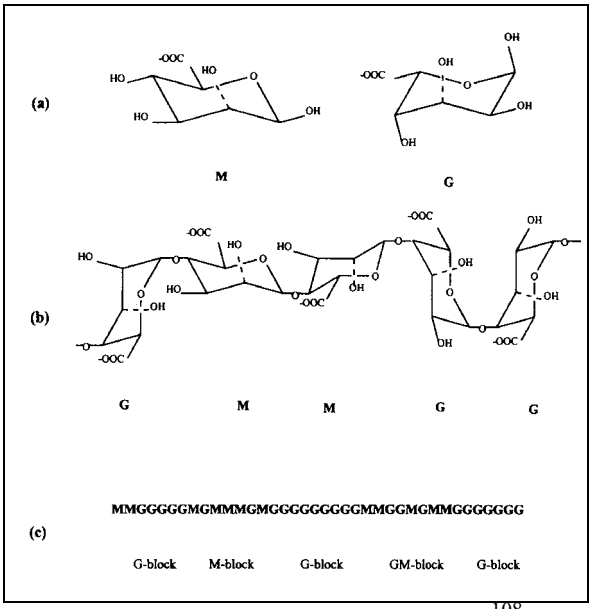


Abb. 4.2: Stukturen des Na-Alginat[108]
a) D-Manuronsäure (M) und L-Guluronsäure (G)
b) Ausschnitt aus einer Sequenz eines Makromoleküls
c) Möchgliche Sequenzverteilung im Makromolekül

Diese Einteilung eignet sich lediglich für eine Vorauswahl des anzuwendenden Verfahrens zur Tropfenbildung aus Na-Alginat-Lösungen. Eine Auskunft über die Zusammensetzung, dem Verhältnis aus D-Manuron- und L-Guluronsäure, ist dieser Einteilung nicht zu entnehmen. Eine mögliche Zusammensetzung ist in Abb. 4.2.b und c schematisch dargestellt.

4.2.2.1 Ionotrope Gelbildung

Eine der bedeutendsten Methoden der Herstellung von Mikrokapseln aus Na-Alginat ist die ionotrope Gelbildung, dargestellt in Abb. 4.3, durch di- bzw. multivalente Kationen, wie z. B. Metallionen des Calciums (Ca^{2+}), des Bariums (Ba^{2+}) oder des Eisens (Fe^{3+}). Hierbei wird ein Tropfen aus Na-Alginat-Lösung z. B. in eine $CaCl_2$-Lösung eingebracht, wobei zunächst eine dünne, ionendurchlässige Membran aus Ca-Alginat gebildet wird. Durch weitere Diffussion von Ca^{2+}-Ionen in den noch flüssigen Kern aus Na-Alginat entsteht letztlich eine von außen nach innen vollständig durchgelierte Matrix aus Ca-Alginat. Die Gelierung wird hierbei im hohen Maße von der Wechselwirkung des Guluronsäure-Anteils des Na-Alginates mit den Ca^{2+}-Ionen beeinflusst[109], was sich in der mechanischen Stabilität des Alginates äußert. Ein vor dem Gelierungsprozeß in die Na-Alginat-Lösung gebrachtes Material, z. B. Zellen oder Pharmazeutika, wäre demnach durch Matrixeinschluss immobilisiert.

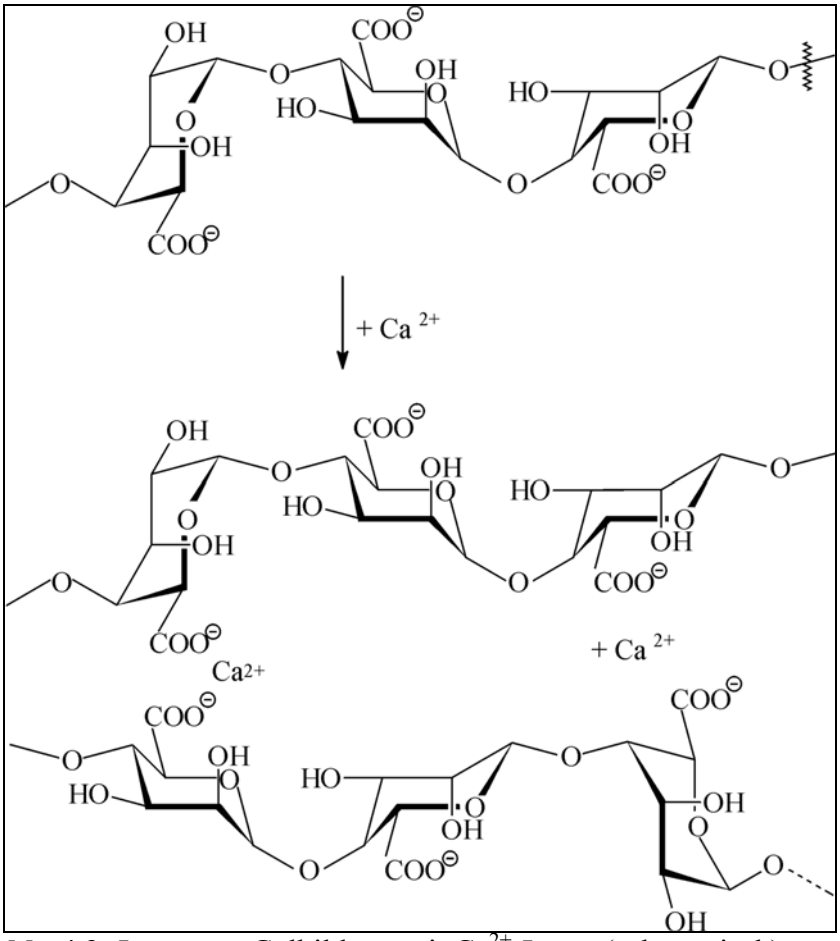


Abb. 4.3: Ionotrope Gelbildung mit Ca^{2+}-Ionen (schematisch)

Der Gelierungsprozess kann aber auch in umgekehrter Richtung, von innen nach außen geführt werden. Beispielsweise kann $CaCl_2$ in einer den Ca^{2+}-Ionen autarken Polyanion-Lösung,

z. B. Methylzellulose oder Carboxymethylzellulose, gelöst und in eine Na-Alginat-Lösung eingetropft werden. Letztendlich erhält man nach entsprechenden Waschschritten eine Kapsel aus Ca-Alginat mit einem flüssigen Kern aus Methylzellulose oder Carboxymethylzellulose.

4.2.2.2 Biokompatibilität von Na-Alginat

In der Literatur werden unterschiedliche Auffassungen zur Biokompatibilität aufgezeigt. Hierbei werden einerseits Zusammenhänge bezogen auf die chemische Zusammensetzung diskutiert. Dementsprechend lassen sich bezüglich der Verträglichkeit der implantierbaren Na-Alginat gegensätzliche Standpunkte aufzeigen, bei denen sowohl ein höherer D-Mannuronsäure-Anteil[109, 110] bzw. ein höherer L-Guluronsäure-Anteil[111-113]bevorzugt wird. Andererseits werden Kontaminationen in Na-Alginaten, z. B. Fettsäuren, Proteine, Phispholipide, Polyphenole, Endotoxine, usw., für mitogene Prozesse, z. B Fibrose, verantwortlich gemacht[109]. Durch aufwendige Aufreinigung[114, 115] kommerziell erhältlicher Na-Alginate und einer nachfolgenden Überprüfung durch entsprechende klinische Anwendung, konnte eine deutliche Verbesserung der Biokompatibilität nachgewiesen werden [116]

4.2.3 Komplexierung mittels Poly-$_L$-lysin

Nicht nur durch ionotrope Gelbildung lassen sich Na-Alginate zur Immobilisierung einsetzen. Eine weitere Möglichkeit bietet das Membraneinschlussverfahren. Hierbei wird der Schritt der ionotropen Gelbildung lediglich unter der Betrachtung der Formgebung der Mikrokapseln genutzt, die anschließend mit einem der D-Manuronsäure entgegengesetzt geladenen Polykation, Poly-$_L$-lysin (PLL), beschichtet wird.
Dieser Schritt, die Bildung eines Polyelektrolytkomplexes aus dem Salz der Manuronsäure und Poly-$_L$-lysin, ist unter der Betrachtung der Immunoprotektion von Zellen der entscheidendste, da das Molekulargewicht des sich in wässriger Lösung befindlichen PLL´s entscheidenden Einfluss auf den Cut-Off der sich bildenden Membran, bezüglich der zur Diffusion fähigen Molekülgrößen, hat[117-119]. Hierbei konnten ebenfalls Auswirkungen in der Wechselwirkung zwischen der Zusammensetzung des Na-Alginates und Poly-$_L$-lysin, in Hinblick auf die Biokompatibilität, der Mikrokapseln nachgewiesen werden[120].

4.3 Bildung sphärischer Partikel aus Polymerlösungen

4.3.1 Tropfenbildende Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln im Überblick

Der Bildung sphärischer Partikel aus polymeren Lösungen liegt die Tropfenbildung aus einer axialsymmetrischen Strömung von Fluiden mit der Dynamik freier Oberflächen zu Grunde, die nicht nur für den Bereich der Mikroverkapselung von Interesse ist, sondern die Grundlage ganzer Industriezweige und verfahrenstechnischer Forschung bildet. In der Literatur lässt sich ein ausführlicher geschichtlicher Abriss[121] über das Studium der Tropfenbildung hervorheben, der bis auf die erste wissenschaftliche Darstellung in einem Buch über die Bewegung von Flüssigkeiten durch Mariotte im Jahr 1686 zurückreicht.

Maßgeblich für die Herstellung von monodispersen Microbeads bzw. Mikrokapseln mit eng verteilten Größen ist, neben den Stoffgrößen Viskosität ν_d (kinematische), Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannung γ_d und Dichte ρ_d , die Austrittsgeschwindigkeit v_d des Fluids im Bereich des Abtropfens und Zertropfens. In Abhängigkeit von v_d lassen sich entsprechende Ausbildungsformen einer ausströmenden Flüssigkeit aus einer Düse in einem Diagramm der dimensionslosen Ohnesorgezahl Oh über der Reynoldszahl Re, Abb. 4.4, darstellen[122]. Durch doppelt logarithmische Auftragung wurden die Bereichsgrenzen, die Potenzgesetzen folgen, entsprechend linearisiert abgebildet.

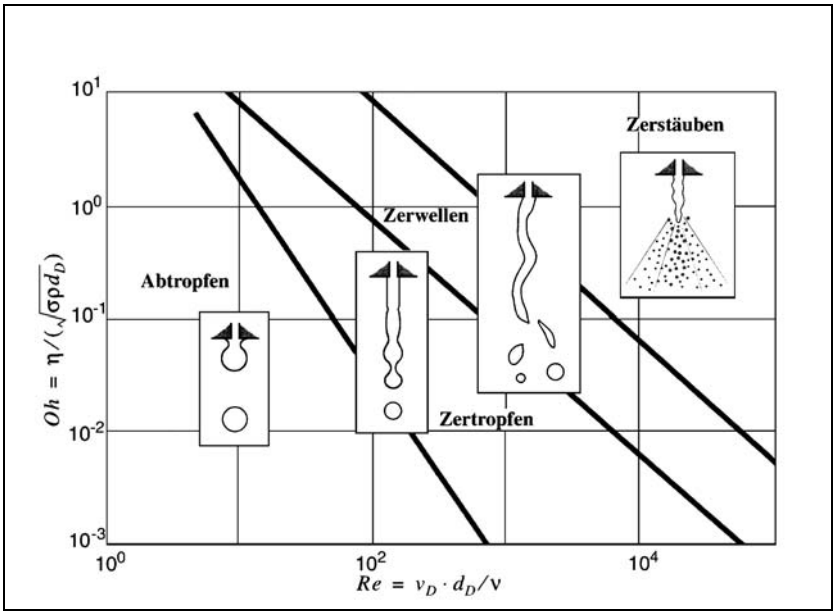


Abb. 4.4: Ausbildungsformen einer aus einer Düse austretenden Flüssigkeit[122, 123]

Zur Herstellung von Mikrokapseln steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Neben dem Spray Coating und der Sprühtrocknung ist es möglich, tropfenbildende Verfahren zur Produktion von Microbeads zu nutzen. Eine Übersicht ist in Tab. 4.1 illustriert.

Tab. 4.1: Methoden zur Herstellung von Mikrokapseln[124]

	Code	**Name**	**Example**
Encapsulation technology	1	Spray coating	Cells/islets contact a mist containing a polymer solution with additives
	2	Droplet generation by inverse-emulsion polymerisation	Sterically stabilized water-in oil process. Can involve internal gelation of alginate with calcium liberated from fine powders of calcium salts that are activated by acid
	3	Droplet generation using a spray dryer	Rotating spray dryer with 103 nozzles
	4	Droplet formation by extrusion with liquid followed by a coating	Asymmetric membrane formation by co-extrusion of a polymer solution into an insoluble liquid that extracts the solvent and precipitates the polymer
	5	Droplet formation by extrusion with gas followed by a coating	Air-stripping with piezoelectric control
	6	Droplet generation with a spinning disk	Polymer solution is propelled from a rotating disk where it is atomized and travels 1-2 meters prior to collection
	7	Droplet generation by mechanical cutting of jet	Rotating wire cuts steam(s) of a pressurized polymer cell suspension
	8	Droplet generation with rotating nozzle ring	Droplets are propelled from the needle tips through the rotation of the nozzle ring
	9	Droplet generation using a vibrating nozzle	Rayleigh instabilities causes jet fragmentation into droplets. Size is depend on vibration frequency
	10	Droplet formation by extrusion under electrostatic force	Electrostatic potential applied between needle an collecting solution creates an electrostatic force that pulls the droplet off the needle tip
	11	Droplet formation by extrusion through membrane pores	Extrusion of aqueous polymer solution through stainless steel or glass membranes of uniform pore size into an organic solvent to form an inverse-emulsion with controlled droplet diameters

In dieser Arbeit wurden drei tropfenbildende Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln, das AirJet-Verfahren, das Vibrations-Verfahren und das JetCutter-Verfahren, auf deren Taug-

lichkeit zur Immobilisierung von Zellen, unter Berücksichtigung der geforderten Größen bzw. Größenverteilung der Mikrokapseln und der Überlebensfähigkeit der Zellen, untersucht.

4.3.2 Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln

4.3.2.1 AirJet-Verfahren

Das AirJet-Verfahren, auch AirStripping-Verfahren genannt, ist eine Methode zur Kapselherstellung, mit dem sich Zellen erfolgreich immobilisieren lassen[125, 126]. Im Vergleich zu den anderen beiden verwendeten Methoden zur Produktion von Mikrokapseln, kommt dieses dieses mit einem niedrigem technischen Aufwand aus.
In Abb. 4.5 ist das Prinzip des AirJet-Verfahrens schematisch dargestellt.

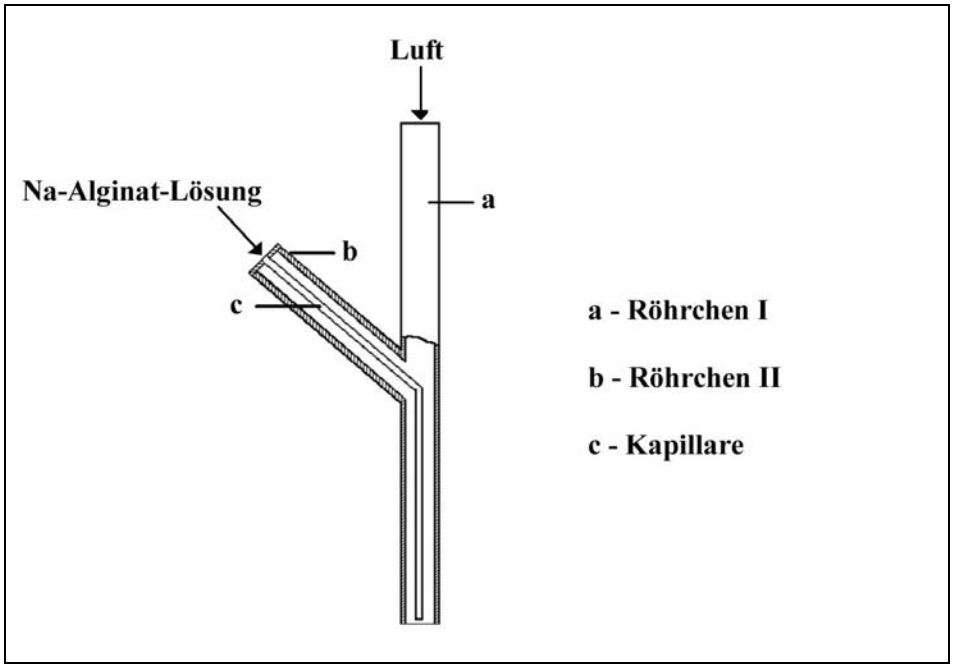


Abb. 4.5: Prinzipskizze des AirJet-Verfahrens

Das Röhrchen a durchströmt ein Gasvolumenstrom $\dot{V}_1$, z. B. O_2, N_2, CO_2 oder Luft, der den am Ende der Kapillare c hängenden Flüssigkeitstropfen, hervorgerufen durch einen Volumenstrom an Flüssigkeit $\dot{V}_2$, abreißt. Die Kapillare wird hierbei durch das Röhrchen a und b zentriert und endet 2 mm vor dem Austritt des Röhrchens a.
Durch Variation des Volumenstroms $\dot{V}_1$ und des Außendurchmessers d_{ca} der Kapillare c, bei gegebenen Innendurchmesser d_{ai} des Röhrchens a und Volumenstrom $\dot{V}_2$, lässt sich die Größe

der Tropfen und damit die Größe der sich bildenden Mikrokapseln einstellen. Die hierbei unter laminaren Flüssigkeitsstrom, im Bereich des Abtropfens, dargestellt in Abb. 4.4, kleinstmöglichen, im monodispersen Bereich liegenden Tropfen, besitzen den Außendurchmesser d_{ca} der Kapillare c[127, 128]. Eine Beeinflussung der entstehenden Kapselgrößen durch die Variation des Volumenstromes $\dot{V}_2$ der Na-Alginatlösungen konnte nicht nachgewiesen werden[125].
Für die Bestimmung der entstehenden Tropfengrößen lässt sich nachfolgende Modellvorstellung aufzeigen[128].
Unter rein gravimetrischen Verhältnissen, d. h. ohne den Gasstrom $\dot{V}_2$, lässt sich im Moment des Ablösens eines Tropfens vom Ende einer Kapillare c die Masse m des Tropfens wie folgt ermitteln,

$$m \cdot g = \pi \cdot d_{ca} \cdot \gamma_d \qquad \textbf{Gl. 4.2}$$

γ_d – Oberflächenspannung der dispersen Phase (z. B. Na-AlginatLösung)
g – Gravitationskonstante
m – Masse.

Vor dem Moment des Ablösens, d. h. zum Zeitpunkt der beginnenden Instabilität des Tropfens, kommt es zu einer Einschnürung und ein Massenteil des hängenden Tropfens wird nach dem Freiwerden zur Kapillare c zurückgezogen. Dieser Vorgang wird durch einen Formfaktor ϕ berücksichtigt. Durch Einsetzen dieses Formfaktors in Gl. 4.2 ergibt sich Gl. 4.3 [129].

$$m \cdot g = \pi \cdot d_{ca} \cdot \gamma_d \cdot \phi^3 \qquad \textbf{Gl. 4.3}$$

Durch

$$m = \frac{\pi}{6} \cdot {d_T}^3 \rho_d \qquad \textbf{Gl. 4.4}$$

mit,

$$m = V \cdot g \qquad \textbf{Gl. 4.5}$$

und

$$V = \frac{\pi}{6} d_T^{\,3} \qquad \textbf{Gl. 4.6}$$

ergibt sich durch Einsetzen von Gl. 4.4, Gl. 4.5 und Gl. 4.6 in Gl. 4.3

$$\frac{\pi}{6} d_T^{\,3} \rho_d \cdot g = \pi \cdot d_{ca} \cdot \gamma_d \cdot \phi^3 \qquad \textbf{Gl. 4.7}$$

Unter der Bedingung, daß die entstehenden Tropfen mit dem Durchmesser d_T den Kapillaraußendurchmesser d_{ca} nicht unterschreiten, kann der Tropfendurchmesser bei angelegtem Volumenstrom des Gases (kontinuierliche Phase) $\dot{V}_2$ durch Erweiterung der Gl. 4.7 mit dem Term der Widerstandskraft, die durch die Viskosität der kontinuierlichen Phase η_k hervorgerufenen wird[130], beschrieben werden. Dies wird unter der Kenntnis der Strömungsgeschwindigkeit der kontinuierlichen Phase v_k und dem Term der Dissipation der kinetischen Energie, mit der Dichte der kontinuierlichen Phase ρ_k [131], in der Gl. 4.8 berücksichtigt.

$$3 \cdot \pi \cdot \eta_k \cdot v_k \cdot d_T + 0{,}055 \cdot \pi \cdot \rho_k \cdot v_k^2 \cdot d_T^{\,2} + \frac{\pi}{6} \cdot d_T^{\,3} \cdot (\rho_d - \rho_k) \cdot g = \pi \cdot d_{ca} \cdot \gamma_d \cdot \phi^3 \qquad \textbf{Gl. 4.8}$$

Unter der Voraussetzung, daß erstens der Tropfendurchmesser den Durchmesser der Kapillare nicht unterschreitet, der freiwerdende Tropfen sphärisch ist, das Vorhandensein der Kapillare keine Störung der Widerstandskraft des rückströmenden Flüssigkeitsanteils hat und zweitens die durch den Tropfen benetzte Fläche der Kapillare klein gegenüber dem Kapillardurchmesser ist und der Kapillardurchmesser geringen Einfluss auf die Tropfengröße hat, vereinfacht sich Gl. 4.8 zu Gl. 4.9.

$$18 \cdot \eta_k \cdot v_k \cdot d_T + 0{,}33 \cdot \rho_k \cdot v_k^2 \cdot d_T^{\,2} + \cdot d_T^{\,3} \cdot (\rho_d - \rho_k) \cdot g = 6 \cdot d_{ca} \cdot \gamma_d \cdot \phi^3 \qquad \textbf{Gl. 4.9}$$

Für ϕ konnte unter Verwendung der Daten von [129] eine Korrelation unter Beachtung des Verhältnisses von $d_T/d_e < 1{,}3$ ermittelt werden[128].

$$\phi = 0{,}813 \cdot \left(\frac{d_T}{d_{ca}} \right)^{0,3} \qquad \textbf{Gl. 4.10}$$

Bei Strömungsgeschwindigkeiten zwischen 10 und 50 m/s gilt nach Poncelet[128], daß die Größe der Dissipation an kinetischer Energie signifikant größer ist als die Beiträge der durch die Viskosität der kontinuierliche Phase η_k hervorgerufenen Widerstandskraft und der Gravitationskraft. Damit lässt sich Gl. 4.9 zu Gl. 4.11 reduzieren.

$$0{,}33 \cdot \rho_k \cdot v_k^2 \cdot {d_T}^2 = 6 \cdot d_{ca} \cdot \gamma \cdot \phi^3 \qquad \textbf{Gl. 4.11}$$

Durch Umstellung der Gl. 4.11 berechnet sich der Tropfendurchmesser d durch Gl. 4.12.

$$d_T = \sqrt{\frac{6 \cdot d_{ca} \cdot \gamma \cdot \phi^3}{0{,}33 \cdot \rho_k \cdot v_k^2}} \qquad \textbf{Gl. 4.12}$$

4.3.2.2 JetCutter-Verfahren

Eine weitere Möglichkeit der Herstellung von sphärischen Partikeln bietet das JetCutter Verfahren[132]. Mit dieser Methode ist es möglich, auch höherviskose Fluide zu verarbeiten und dabei enge Größenverteilungen, bei einer Partikelgrösse < 1 mm, mit hohen Durchsätzen zu erzeugen. Mit diesem Verfahren konnten beispielsweise Metallkatalysatoren[3], Pilzsporen[133], pflanzliche Zellen immobilisiert werden. Eine Prinzipskizze des JetCutter-Verfahrens zeigt Abb. 4.6.

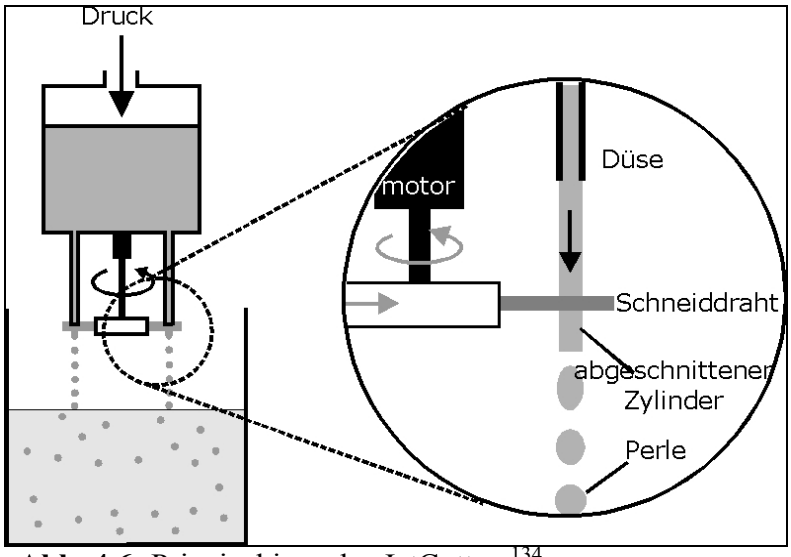


Abb. 4.6: Prinzipskizze des JetCutters[134]

Das Prinzip der Tropfenbildung beruht bei diesem Verfahren auf dem mechanischen Heraustrennen von Flüssigkeitszylindern eines aus einer Düse heraustretenden fluiden Vollstrahls. Der Trennprozess erfolgt hierbei durch ein rotierendes, mit Drähten bestücktes Werkzeug. Aus den Zylindern bilden sich, getrieben durch die Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannung des Fluids über eine entsprechende Fallstrecke, sphärische Partikel aus.
Nachteilig, im Vergleich zum AirJet-Verfahren und Vibrations-Verfahren, ist ein systembedingter Betriebsverlust der sich aus dem Schnitt- und Spritzverlust, dargestellt in Abb. 4.7 a[134], zusammensetzt. Durch Neigung des Schneidwekzeuges zum fluiden Vollstrahl lässt sich dieser jedoch durch die geeignete Wahl des Neigungswinkels α auf den Spritzverlust, illustriert in Abb. 4.7 b[134], reduzieren.

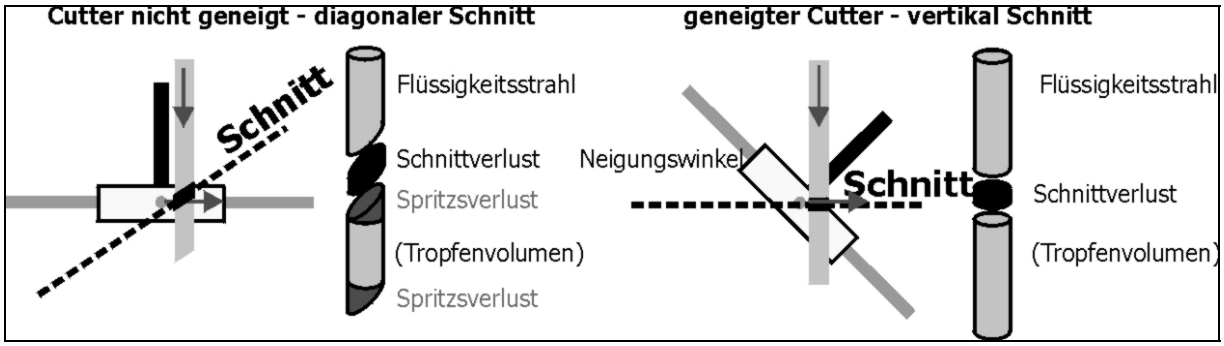


Abb. 4.7 a: Betriebsverlust resultierend aus Schnitt- und Spritzverlust bei diagonalem Schnitt[134]

b: Betriebsverlust reduziert auf Schnittverlust bei vertikalem Schnitt durch Neigung des Cutters[134]

Für den Fall des vertikalen Schnittes mit optimalem Neigungswinkel, lässt sich aus dem Tropfenvolumen V_T der Durchmesser des Tropfens wie nachfolgend aufgezeigt berechnen[3]:

$$V_T = V_{Zylinder} - V_{Verlust} \qquad \textbf{Gl. 4.13}$$

mit,

$$V_{Zylinder} = \frac{\pi}{4} \cdot d^2 \cdot H \qquad \textbf{Gl. 4.14}$$

mit,

$$H = h + d_{Draht} = \frac{V_{Fluid}}{n \cdot z} \qquad \textbf{Gl. 4.15}$$

und

$$V_{Verlust} = \frac{\pi}{4} \cdot d^2 \cdot d_{Draht} \qquad \textbf{Gl. 4.16}$$

ergibt durch Einsetzen der Gl. 4.14, Gl. 4.15 und Gl. 4.16 in Gl. 4.13

$$V_T = \frac{\pi}{4} \cdot d^2 \cdot \left(\frac{V_{Fluid}}{n \cdot z} - d_{Draht} \right) = \frac{\pi}{6} \cdot d_T^3 \qquad \textbf{Gl. 4.17}$$

Durch Umstellen der Gl. 4.17 kann nun der Tropfendurchmesser d_T nach Gl. 4.18

$$d_T = \sqrt[3]{\frac{3}{2} \cdot d^2 \cdot \left(\frac{V_{Fluid}}{n \cdot z} - d_{Draht} \right)} \qquad \textbf{Gl. 4.18}$$

berechnet werden.

Eine Übersicht der verwendeten Fluide, zum Einschluss verschiedenster Materialen, ist der Tab. 4.2 zu entnehmen.

Tab. 4.2: Verwendete Fluide und immobilisierte Materialien [135]

• **Verwendbare Fluide**	• **Verkapselte Materialien**
• Alginat	• Pharmazeutika, tierische Zellen[136], Pflanzenschutzmittel
• Pektinat	• Vitamine, Aminosäuren
• Chitosan	• Aromen
• Gelatine	• Bakterien, Pilze, Enzyme
• Cellulosederivate (MC, CMC, SEC, CS)	• Farbstoffe
• Wachse	• Pigmente (A-Kohle, TiO_2)
• Polymerschmelzen	• Magnetit
• Anorganische Sole (Al_2O_3, SiO_2)	• Metallkatalysatoren

4.3.2.3 Vibrations-Verfahren

Das zum Vergleich zur AirJet- und JetCutter-Methode verwendete Vibrations-Verfahren beruht auf dem Prinzip der Übertragung einer Störung, in Form von Vibration mit entsprechender Frequenz, auf einen durch eine Düse austretenden laminaren Flüssigkeitsstrahl.
Das auf die Versuche durch Lord Rayleigh[137] zurückzuführende Prinzip der Charakterisierung des Stabilitätsverhaltens eines zylindrischen, nicht zähen Flüssigkeitsstrahls belegt, daß ein Flüssigkeitszylinder zerfällt, wenn die Wellenlänge λ einer rotationssymmetrischen Schwingung größer wird, als der Umfang des ungestörten Strahls.
Für den Zerfall eines zähen bzw. viskosen Flüssigkeitsstrahles, in Tropfen einheitlicher Größe, kann durch Gl. 4.19 die optimale Wellenlänge[138] λ_{opt} ermittelt werden, bei der jedoch die kontinuierliche Phase und nicht-NEWTONsche Fluide unberücksichtigt bleiben.

$$\lambda_{opt} = \sqrt{2}\pi d_D \left(1 + \sqrt{\frac{9\eta_d^2}{\gamma_d \rho_d d_D}}\right)^{\frac{1}{2}} \qquad \textbf{Gl. 4.19}$$

Für die rechnerische Bestimmung eines Tropfendurchmessers[127] mit disperser Phase (z. B. Lösungen aus Na-Alginat oder Na-Alginat-Zellen-Lösung) und Luft als kontinuierlicher Phase und der aus beiden Phasen resultierenden Grenz- bzw. Oberflächenspannung γ_D als treibende Kraft zur Tropfenbildung geht man wie folgt vor:
Der Tropfendurchmesser wird bestimmt durch Volumenstrom und Anregungsfrequenz der dispersen Phase, wobei die Länge des Flüssigkeitszylinders der Wellenlänge entspricht, die zur Ausbildung eines Tropfens führt.
Nach [123] lässt sich durch Massenbilanzierung der Tropfendurchmesser d_T nach Gleichung Gl. 4.20 berechnen. Aus

$$d_T = \sqrt[3]{\frac{6\dot{V}_d}{\pi f}} \qquad \textbf{Gl. 4.20}$$

mit der Frequenz ,

$$f = \frac{v_d}{\lambda_{opt}} \qquad \textbf{Gl. 4.21}$$

folgt

$$d_T = \sqrt[3]{\frac{3}{2} d_D^2 \lambda_{opt}} \qquad \textbf{Gl. 4.22}$$

wobei λ_{opt} in Gl. 4.19 dargestellt ist.

Der Tropfendurchmesser ist nach Gl. 4.22 nur abhängig von den Stoffgrößen η_d, γ_d ,ρ_d und dem Strahldurchmesser d_D (entspricht dem Düsendurchmesser) der dispersen Phase.

Eine schematische Darstellung einer möglichen Anordnung des Vibration-Verfahrens ist in Abb. 4.8 abgebildet.

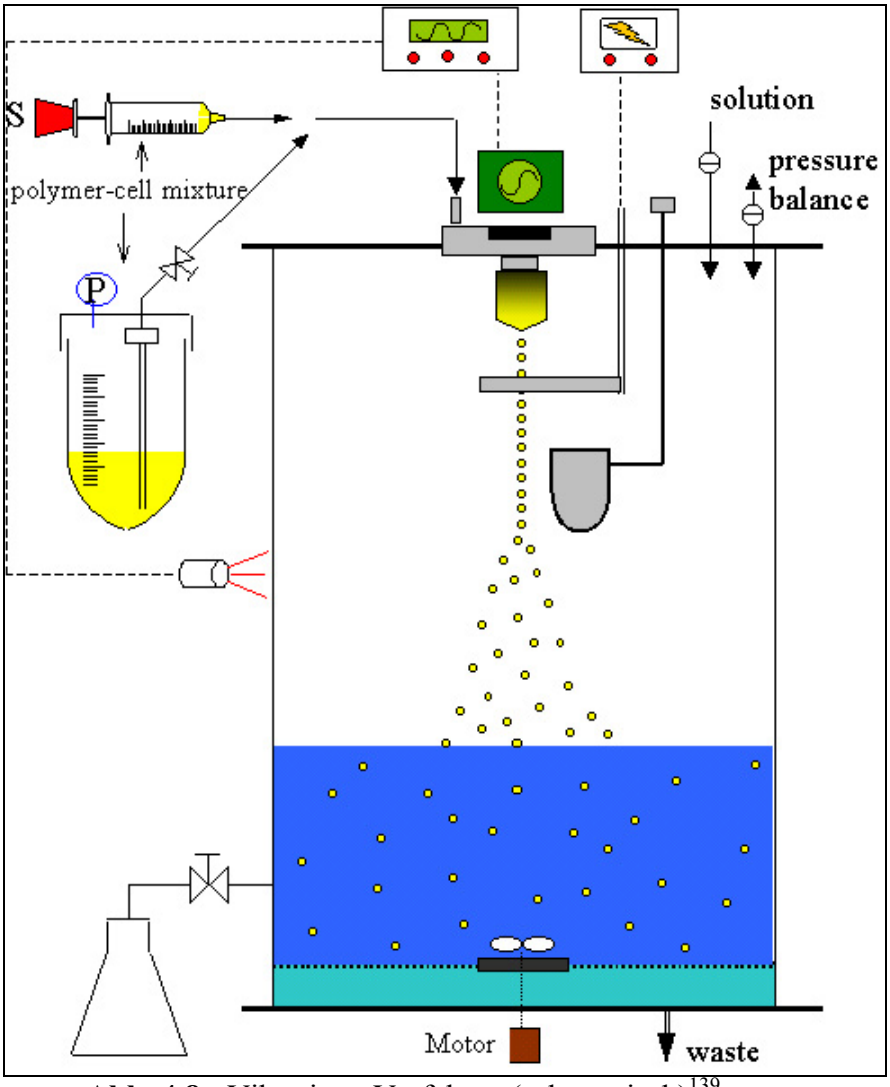


Abb. 4.8: Vibrations-Verfahren (schematisch)[139]

4.4 Mechanische Stabilität von Mikrokapseln

Um den Injektionsprozess in den menschlichen Körper zu überstehen, müssen die Mikrokapseln eine entsprechende Stabilität gegenüber mechanischen Einflüssen, z. B. Scherkräften und Druckkräften innerhalb der Injektionskanüle, aufweisen. In der Literatur lassen sich nur schwer vergleichbare Aussagen bezüglich der mechanischen Stabilität der hergestellten Mikrokapseln finden.

4.4.1 Untersuchungsmethoden

Mikrokapseln polyelektrolytischen Ursprungs können mit einer modifizierten Variante des Druckversuches[140], [141] untersucht werden. Da jedoch nicht wie üblich auf eine Ausgangsfläche A_0 zurückgegriffen werden kann, wird bei der Evaluierung der Druckstabilität von Mikrokapseln entweder auf einen bestimmten Verformungsgrad[3] oder auf die maximale Kraft bis zum Bruch[142-147] der Mikrokapsel zurückgegriffen. Weitere Methoden nutzen fluoreszierende Substanzen und deren Freisetzung nach Bruch der Kapsel, in Folge mechanischer Belastung[148] oder die Änderung der dielektrischen Konstante in Folge der Alterung der Mikrokapseln[149].
Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung der mechanischen Stabilität von Mikrokapseln, bezüglich der Beeinflussung durch Scherkräfte, bieten rheologische Messverfahren, z. B. mit einem Kegel-Platte System[150].

In dieser Arbeit sollen die elasto-mechanischen Eigenschaften an Microbeads [151, 152] mit Hilfe der Scanning Acoustic Microscopy (SAM), einem zerstörungsfreien Messverfahren, untersucht werden.

4.4.2 Akustische Rastermikroskopie (SAM)

4.4.2.1 Grundlagen des Verfahrens

Eine Möglichkeit zur quantitativen Charakterisierung elasto-mechanischer Eigenschaften von Materialien bietet die akustische Rastermikroskopie oder auch Scanning Acoustic Mikrosko-

py (SAM)[153-156]. In Abhängigkeit von der verwendeten Ultraschallfrequenz liegt das räumliche Auflösungsvermögen im mikroskopischen oder mesoskopischen Bereich.
Akustische Mikroskope verwenden häufig das Reflexionsverfahren, bei dem ein Schallimpuls der Intensität p_0 mit einer Saphirlinse auf die Oberfläche der Probe fokussiert wird und die von der Probenoberfläche reflektierten Signale mit der Intensität p_r zur Auswertung genutzt werden. Ein möglicher Versuchsaufbau ist in Abb. 4.9 aufgezeigt. Durch einen Scan in x-/y-Richtung (sogenannter. C-Scan) entsteht ein zweidimensionales Bild der Probenoberfläche.

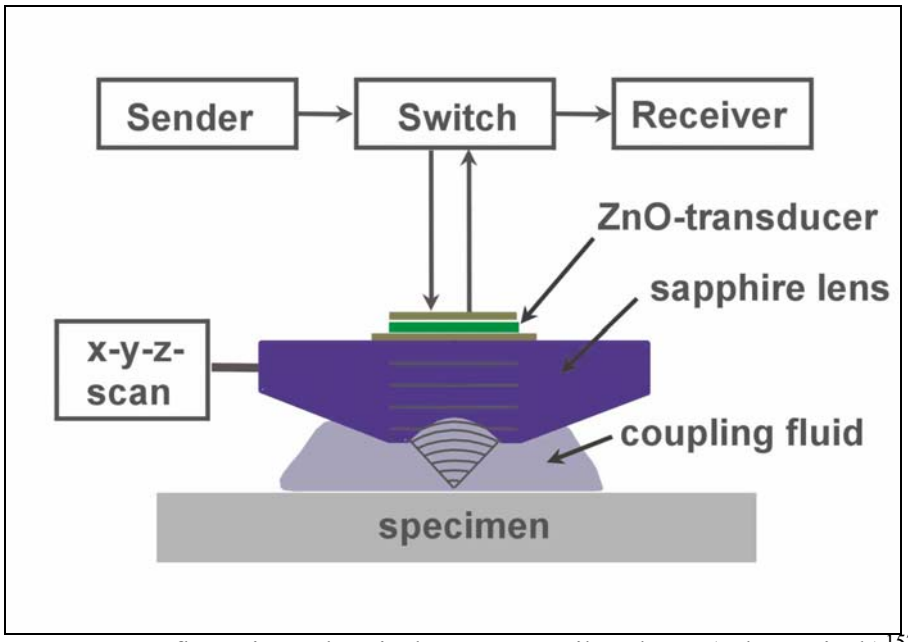


Abb. 4.9: Aufbau eines akustischen Rastermikroskops (schematisch)[157]

Zur Herstellung einer akustischen Kopplung ist zwischen Linse und Probekörper ein Kopplungsmedium aufzubringen. Üblicherweise wird hierbei Wasser verwendet, dessen Dämpfungsfaktor relativ klein ist und dessen akustische Impedanz Z_{H_2O}, dargestellt in Gl. 4.23,

$$Z_{H_2O} = \rho_{H_2O} \cdot c_{H_2O} \qquad \textbf{Gl. 4.23}$$

mit

ρ_{H_2O} - Dichte des Wassers,

c_{H_2O} - Schallgeschwindigkeit in Wasser,

temperaturabhängig sehr gut bekannt ist.

Über den in Gl. 4.24 aufgeführten Reflexionsfaktor R kann unter der Voraussetzung, daß sich die Probe im Fokus befindet und der Schallimpuls senkrecht zur Probenoberfläche eingestrahlt wird, die akustische Impedanz der Probe Z_P berechnet werden.

$$R = \frac{p_r}{p_0} = \frac{Z_P - Z_{H_2O}}{Z_P + Z_{H_2O}} \qquad \textbf{Gl. 4.24}$$

Der zur Verfügung stehende Frequenzbereich des verwendeten akustischen Mikroskops erstreckt sich von wenigen MHz bis hin zu 2 GHz, wobei das räumliche Auflösungsvermögen und die Eindringtiefe frequenzabhängig sind. Mit Wasser als Kopplungsmedium und einer Sendefrequenz von 10 MHz beträgt die Eindringtiefe einige cm. Hingegen ist bei einer Frequenz von 2 GHz aufgrund der mit der Frequenz zunehmenden Dämpfung des Schalls nur noch eine Eindringtiefe von ca. 1 µm vorhanden. Bei dieser Frequenz beträgt das räumliche Auflösungsvermögen dann weniger als 1 µm und ist damit vergleichbar mit dem des Lichtmikroskops.

4.4.2.2 Elasto-mechanische Eigenschaften

Unter der Voraussetzung der Verwendung isotroper Festkörper lässt sich der Zusammenhang zwischen Schallgeschwindigkeit und den elasto-mechanischen Eigenschaften wie folgt formulieren:

akustische Impedanz Z

$$Z = \rho c_1 \qquad \textbf{Gl. 4.25}$$

Steifigkeit C_{11}

$$C_{11} = \rho c_1^2 \qquad \textbf{Gl. 4.26}$$

Elastizitätsmodul E

$$E = \rho c_1^2 \frac{(1+\upsilon)(1-2\upsilon)}{(1-\upsilon)} \qquad \textbf{Gl. 4.27}$$

Hierbei ist c_l die Schallgeschwindigkeit in longitudinaler Richtung, ρ die Dichte und υ die Poisson-Zahl der Probe.

4.4.2.2.1 Akustische Impedanz

Da die akustische Impedanz Z ein experimentell relativ einfach zugänglicher Parameter ist, wird sich bei den Messungen elastischer Eigenschaften mittels SAM auf eine Frequenz um 1 GHz konzentriert. Für die direkte Bestimmung von Z muss für die verwendete Frequenz durch entsprechende Kalibrierung eine Impedanznormale ermittelt werden, da beispielsweise bei Kunststoffen auf Grund von auftretenden Dispersion der Schallwellen im Kunststoff die gemessenen Impedanzen frequenzabhängig sind. Dies muss verständlicherweise auch beim Kopplungsmedium Wasser berücksichtigt werden. Untersuchungen haben gezeigt, daß Wasser bis 2 GHz keine Dispersion der Schallwellen aufweist[158].

Messungen der akustischen Impedanz sind sowohl bei Materialen auf dem Gebiet der klassischen Werkstoffcharakterisierung[159], z. B. Sichtbarmachung von Identifizierungsnummern[160], als auch bei biologischen Materialien[161] wie Knochen[162-167], Zähnen[168, 169], lebenden Zellen[170-172] und Bakterien[173] bekannt.

Beispiele von hochauflösenden Bildern, anhand von Images der akustischen Impedanz, sind in Abb. 4.10 a und b dargestellt. Die Messungen erfolgen in superfluidem Helium als Kopplungsmedium bei einer Temperatur von 0,2 K.

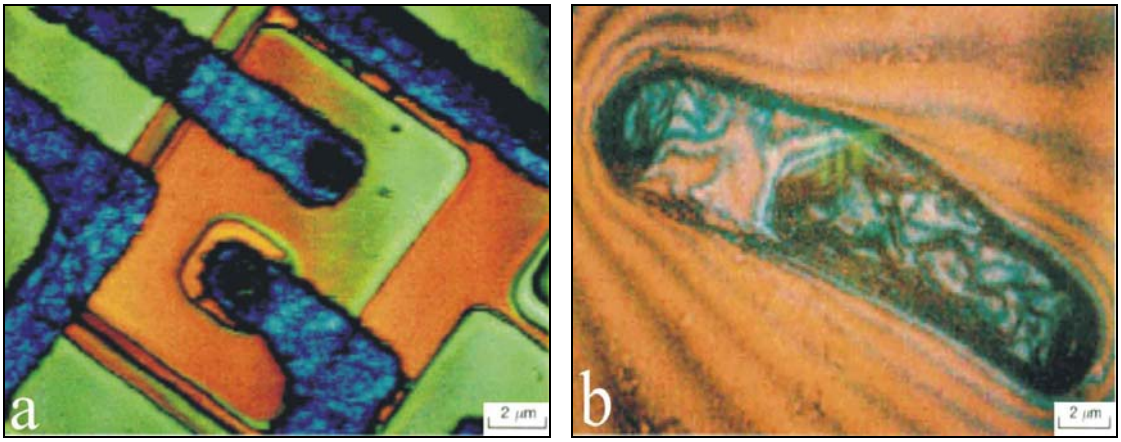


Abb. 4.10: Hochauflösende SAM Images[173],
a) bipolarer Transistor auf einer integrierten Siliziumschaltung (f = 4,5 GHz),
b) Myxobakterium (f = 8 GHz)

4.4.2.2.2 Multi-Layer-Analyse

Die quantitative Bestimmung der Impedanz erfordert einerseits, daß sich die Probe im Fokus der akustischen Linse befindet, und andererseits beim x/y-Scan eine exakte Parallelität der Probenoberfläche und der Scanebene. Die einzuhaltende Toleranz sollte hierbei einen Betrag von 0,05 µm nicht überschreiten. Jedoch ist, bedingt durch die zur Verfügung stehenden Präparationsverfahren, eine Neigung der Probenfläche nicht zu vermeiden. Beispielsweise können Gefügebestandteile eines Werkstoffes auf Grund unterschiedlicher Härte bei der Präparation der Oberfläche unterschiedlich herausgearbeitet werden. Dies führt zu einer entsprechenden Ausbildung eines Oberflächenreliefs, mit unterschiedlichen Abständen zur scannenden Linse des SAM, so daß sich nie alle Oberflächenpunkte gleichzeitig im Fokus befinden können.

Hierfür ist es hilfreich, zur Erzeugung eines Bildes eine Folge von C-Scans mit stufenweiser Veränderung des z-Abstandes durchzuführen. Hieraus lassen sich 2D und 3D Bilder von der Topographie der Probe, auf Grundlage quantitativer Analyse der akustischen Impedanz, erzeugen. Die Methode wird in der Literatur unter dem Bergriff Multi-Layer-Analyse (MLA)[166] geführt. Hierbei ist die maximale Scantiefe in z-Richtung von der Fokustiefe der verwendeten Linse abhängig.

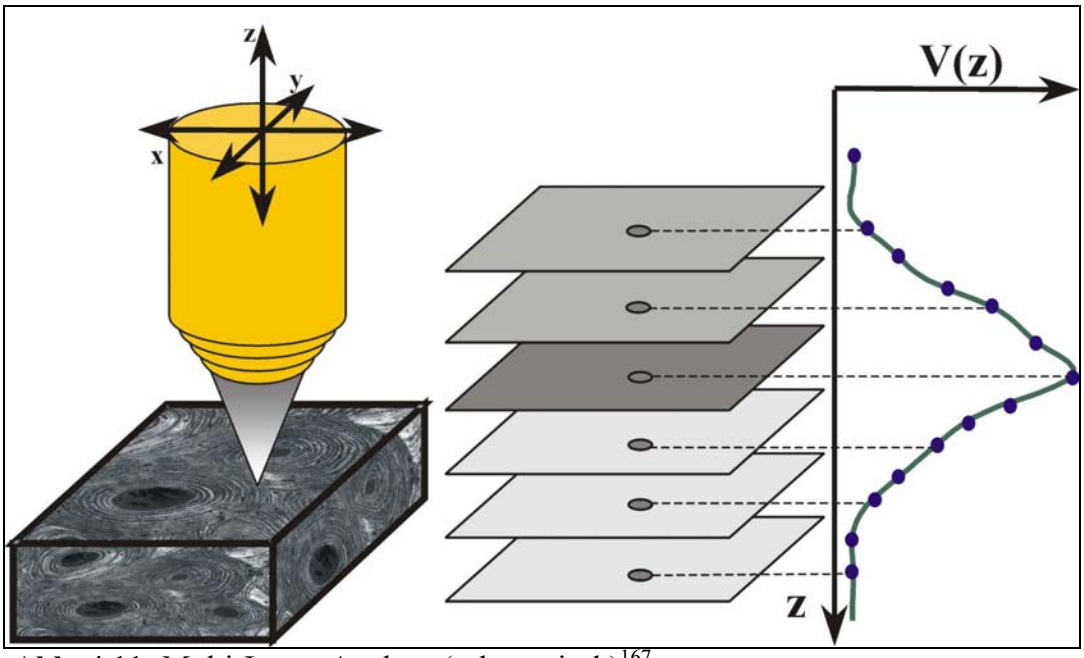


Abb. 4.11: Multi-Layer-Analyse (schematisch)[167]

Wie in der Abb. 4.11 schematisch dargestellt, wird bei der MLA mit einer positiven Defokussierung aller Bereiche der Probe begonnen (dargestellt in den mittelgrauen Schichten in der Bildmitte) und endet mit einer negativen Defokussierung des zu untersuchenden Bereiches der Probe (hellgraue Schichten). Anhand der gewonnen Daten, lässt sich aus den Punkten jeder einzelnen Schicht das z-Profil eines Bildpunktes extrahieren (rechte Bildhälfte).
Aus diesem ist es möglich, in Abhängigkeit vom z-Abstand (Fokustiefe) die maximale Amplitude V(z) (dunkelgraue Schicht) abzuleiten. In einem „Maximum Image“ können die maximalen Amplituden aller Scanpunkte zusammengefasst werden, d. h., auf diesem Bild befinden sich alle Oberflächenstrukturen im Fokus. Dieses bildet die Basis für die quantitative Bestimmung der akustischen Impedanz.

5 Experimentelles

5.1 Herstellung und Charakterisierung von Na-Alginat-Lösungen

5.1.1 Herstellung von Na-Alginat-Lösungen

Die in dieser Arbeit untersuchten Natrium-Alginate (Na-Alginate), aufgeführt in Tab. 5.1, wurden in zweifach deionisierten und steril gefilterten Wasser, Filter 0,2 µm unter Rühren mit einem Magnetrührer, über einen Zeitraum von mindestens 24 h gelöst.

Tab. 5.1: Untersuchte Na-Alginate

Na-Alginate		
Typ	Katalog-Nr.	Lieferant
Acros	17777-2500	Acros
Inotech	E 1105	Inotech
Sigma 1	A 2128	Sigma
Sigma 2	A 2033	Sigma
Sigma 3	A 2158	Sigma
Fluka	71238	Fluka

Der verwendete Konzentrationsbereich der Lösungen lag hierbei zwischen 1,0 und 2,0 % (w/v). Sie wurden zur Messung der Viskosität stets frisch angesetzt, um Alterungserscheinungen, hervorgerufen durch biologischen Abbau des Na-Alginates verbunden mit undefinierten Viskositäten der Na-Alginat-Lösungen, auszuschließen.

5.1.2 Viskositätsmessung von Na-Alginat-Lösungen

Zur Bestimmung der Werte der Nullscherviskosität η_0 wurde zunächst die dynamische Viskosität η, bei einer Temperatur von 20 °C, ermittelt. Verwendung fand das Rotationsviskosimeter CLS 100 der Firma Carri-Med (TA Instruments, Alzenau) mit einem Kegel-Platte-System mit zugehöriger Flüssigkeitsfalle. Die geometrischen Daten sind in Tab. 5.2 aufgeführt.

Tab. 5.2: Geometrie des Kegels

Parameter des Kegels	
Durchmesser [mm]	60
Winkel [°]	2
Rate-Faktor	28,6
Stress-Faktor	0,0177
Spalt (zur Platte) [µm]	57

Die Messung der Viskosität η beruht auf der Messung des Drehmomentes, das aufgebracht werden muss, um die Drehzahl des Rotors (Kegel) gegen den Widerstand der Na-Alginat-Lösung aufrecht zu erhalten. Aus dem ermittelten Drehmoment wird die Schubspannung τ errechnet. Aus dem Quotienten von Schubspannung τ und Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ lässt sich die dynamische Viskosität nach Gl. 5.1 und Gl. 5.2 berechnen.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \qquad \textbf{Gl. 5.1}$$

mit,

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = \frac{dv}{dy} \qquad \textbf{Gl. 5.2}$$

Polymere, insbesondere Polymerlösungen, können sich durch unterschiedliches rheologisches Verhalten auszeichnen. Mit steigender Schergeschwindigkeit kann die dynamische Viskosität einerseits mit einer Erhöhung (dilatantes Verhalten) verbunden sein, konstant bleiben (NEWTONsches Verhalten) oder anderseits mit Erniedrigung (strukturviskoses Verhalten) verbunden sein. Auch zeitliche Aspekte der Einwirkung der Schergeschwindigkeit können Einfluss auf die dynamische Viskosität haben. Hierbei wird in rheopexes Verhalten und thixotropes Verhalten unterschieden.

Die Messungen zur Bestimmung der dynamischen Viskosität der Na-Alginat-Lösungen wurden mit einer Schergeschwindigkeit von 1 bis 700 s^{-1} durchgeführt, wobei stets frisch angesetzte Lösungen vermessen wurden. Hierbei wurde das Meßsystem auf 20 °C temperiert.

Es konnte bei allen Na-Alginat-Lösungen ein strukturviskoses Verhalten, gekennzeichnet durch den Abfall der dynamischen Viskosität bei Zunahme der Schergeschwindigkeit, nachgewiesen werden. Weiterhin wurde weder ein rheopexes noch thixotropes Verhalten festgestellt.

Im Anhang unter A I sind am Beispiel der Konzentrationsreihe des Na-Alginates vom Typ Acros die Graphen der Messungen im Konzentrationsbereich von 1,00 – 2,00 % (w/v), mit einer Schrittweite von 0,25 % (w/v), dargestellt.

Für den Vergleich der Fließeigenschaften der unterschiedlichen Na-Alginat-Lösungen und Konzentrationen wurde die Nullscherviskosität η_0, d. h. die Viskosität bei einer Schergeschwindigkeit von null s^{-1}, durch Extrapolation der dynamischen Viskosität η ermittelt. Die Werte sind in der Abb. 5.1 a und b graphisch dargestellt.

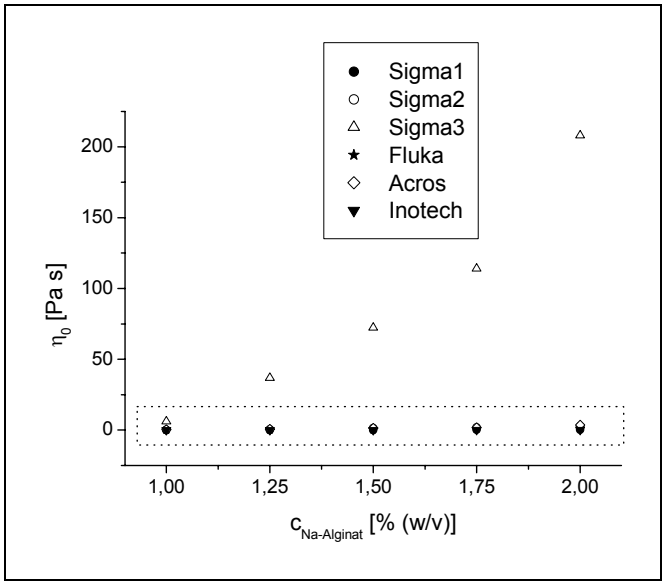


Abb. 5.1 a: Viskositäten der Konzentrationsreihen der Na-Alginat-Lösungen aus Tab. **5.1**, T = 20 °C, markierter Bereich siehe Abb. 5.1 b

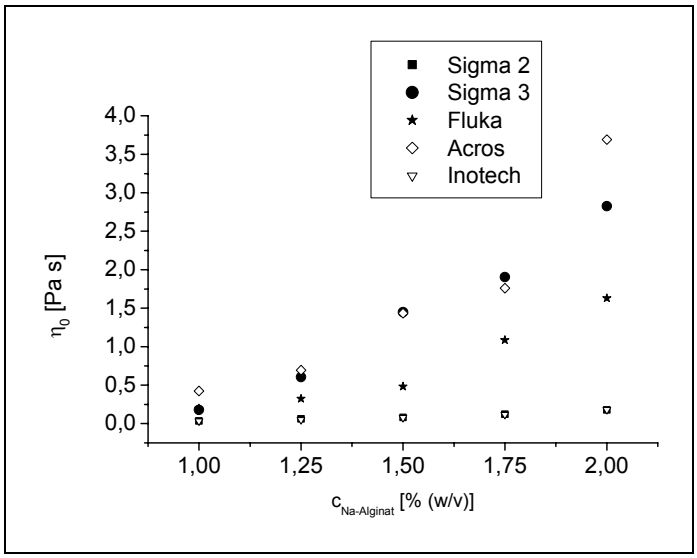


Abb. 5.1 b: Markierter Bereich aus Abb. 5.1 a dargestellt mit geänderter Skalierung, T = 20 °C

In Tab. 5.3 sind die einzelnen Werte für die ermittelten Viskositäten η_0 der einzelnen Na-Alginat-Lösungen aufgeführt.

Tab. 5.3: Viskositätswerte η_0 der gemessenen Na-Alginat-Lösungen bei 20 °C

$c_{Na\text{-}Alginat}$	η_0 [Pa·s]					
% [(w/v)]	Sigma 1	Sigma 2	Sigma 3	Fluka	Acros	Inotech
1,00	6,1450	0,1778	0,0330	0,1941	0,4255	0,0328
1,25	36,8400	0,6037	0,0604	0,3242	0,6938	0,0516
1,50	72,3800	1,4490	0,0793	0,4818	1,4340	0,0766
1,75	114,0000	1,9040	0,1220	1,0860	1,7590	0,1179
2,00	208,0000	2,8250	0,1778	1,6300	3,6920	0,1817

Es ist eine deutliche Zunahme der Viskosität bei Erhöhung der Konzentration des Na-Alginates in der Lösung innerhalb einer Konzentrationsreihe zu verzeichnen. Vergleicht man die Konzentrationsreihen untereinander, so ist festzustellen, daß erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Na-Alginat-Typen bestehen. Diese können einerseits auf unterschiedliche Molekulargewichte bzw. Molekulargewichtsverteilungen zurückgeführt werden und andererseits auf die mengenmäßige Verteilung der Blöcke an Guluron-Säure und Manuron-Säure. So ist bekannt, daß mit steigendem Guluron-Säure-Anteil im Na-Alginat, bei gleichbleibendem

Molekulargewicht, ebenfalls ein Anstieg der Nullscherviskosität oder auch der dynamischen Viskosität zu verzeichnen ist[174]. So kann beispielsweise nicht davon ausgegangen werden, daß das Na-Alginat Sigma 3 und Na-Alginat Inotech (Verhältnis Guluron-Säure zu Manuron-Säure, 70 : 30) die gleiche Zusammensetzung aufweisen, obwohl die Werte der Nullscherviskositäten in allen vergleichbaren Konzentrationsverhältnissen der Konzentrationsreihen nahezu deckungsgleich sind.

5.1.3 Dichtemessung von Na-Alginat-Lösungen

Zur Messung der Dichte wurde ein Chempro/Paar Densimeter DMA 60 mit der Messzelle DMA 602 der Anton Paar KG, Österreich, basierend auf der Bestimmung der Eigenfrequenz eines zur Schwingung angeregten U-Rohrs eingesetzt. Für die Bestimmung der Dichtewerte in Tab. 5.4 kamen Na-Alginat-Lösungen der bereits in Kap. 5.1.1 genannten Na-Alginat-Typen und Na-Alginat-Konzentrationen zum Einsatz. Es ist zu erkennen, daß sich die Dichte mit Erhöhung der Konzentration des Na-Alginates erwartungsgemäß nur geringfügig ändert.

Tab. 5.4: Dichtewerte der Na-Alginat-Lösungen bei 20 °C

$c_{Na\text{-}Alginat}$	Dichte $\rho_{Na\text{-}Alginat}$ [g/cm^3]					
% [(w/v)]	Sigma 1	Sigma 2	Sigma 3	Fluka	Acros	Inotech
1,00	1,004552	1,0047	1,0045	1,0045	1,0043	1,0043
1,25	1,0055	1,0055	1,0053	1,0059	1,0056	1,0055
1,50	1,0071	1,0071	1,0071	1,0072	1,0073	1,0072
1,75	1,0086	1,0086	1,0086	1,0092	1,008156	1,0081
2,00	1,0099	1,0098	1,0098	1,0109	1,0096	1,0096

5.1.4 Oberflächenspannung von Na-Alginat-Lösungen

Zur Charakterisierung der Oberflächenspannung von Na-Alginat-Lösungen wurde die Plattenmethode verwendet. Als Messapparatur wurde ein Tensiometer DCAT 11 der Firma Dataphysics GmbH, Filderstadt, eingesetzt.

Zur Bestimmung der Oberflächenspannung wurden die einzelnen Na-Alginat-Typen in zweifach destilliertem und steril gefiltertem Wasser über einen Zeitraum von mindestens 24 h gelöst[175, 176]. Um den biologischen Abbau durch Mikroorganismen und die damit verbundene Verfälschung der Messwerte zu vermeiden, wurden die Na-Alginat-Lösungen sofort vermessen, bzw. die nicht verwendeten Na-Alginat-Lösungen bei einer Temperatur von 4 °C gelagert. In der Tab. 5.5 sind die gemessenen Werte der Oberflächenspannung der einzelnen Na-Alginate, Konzentrationsbereich 0,01 – 2,0 % (w/v), zusammengefasst. Auf Grund mangelndem Probenmaterials musste auf die Messung des Na-Alginat vom Typ Acros verzichtet werden.

Tab. 5.5: Oberflächenspannungswerte $\gamma_{Na\text{-}Alginat}$ der Na-Alginat-Lösungen bei T = 20 °C

$c_{Na\text{-}Alginat}$ % [(w/v)]	$\gamma_{Na\text{-}Alginat}$ [mN/m]				
	Sigma 1	Sigma 2	Sigma 3	Fluka	Inotech
0,01	70,15	61,85	61,19	-	59,01
0,02	68,45	60,18	58,52	-	62,44
0,03	63,76	61,51	52,47	71,80	63,86
0,05	54,55	57,42	49,81	68,85	59,41
0,07	53,41	57,93	48,79	54,90	55,08
0,25	50,01	52,17	50,49	48,43	56,70
0,50	52,51	53,00	50,45	49,64	50,02
0,75	54,26	51,33	51,80	53,69	49,63
1,00	56,38	59,80	54,51	50,14	45,34
1,25	54,32	56,13	52,43	51,99	47,49
1,50	52,06	55,52	53,72	51,33	47,76
1,75	50,65	53,67	54,32	50,65	47,43
2,00	49,36	57,66	52,03	49,97	46,45

Den Diagrammen, im Anhang unter A II und der Tab. 5.5, ist zu entnehmen, daß kleine Mengen an Na-Alginat, bis etwa 0,25 % (w/v), zu einem starken Abfall der Oberflächenspan-

nung führen, während eine weitere Erhöhung der Konzentration an Na-Alginat in der Lösung zu keinem weiteren Abfall der Oberflächenspannung führt. Somit kann Na-Alginat in wässriger Lösung ein tensidischer Charakter, mit Ausbildung einer pseudo-CMC[176], bescheinigt werden.

5.2 Herstellung von Alginatkapseln nach dem AirJet-Verfahren

Gegenstand der Untersuchungen war die Evaluierung der Einflüsse der Stoffgrößen bzw. Verarbeitungsparameter auf die Bildung einheitlicher Kapselgrößen bzw. auf eine entsprechend enge Größenverteilung der Mikrokapseln.

Da sich die Oberflächenspannungen der Na-Alginat-Lösungen in dem verwendeten Konzentrationsbereich von 1,0 bis 2,0 % (w/v) nicht wesentlich voneinander unterscheiden, vergleiche Kapitel 5.1.4, und die Dichte ebenfalls nur gering beeinflusst wird[127, 123], stellt die Viskosität η_0 der Na-Alginat-Lösungen die limitierende Stoffgröße für die Verarbeitung der Lösungen dar.

Zur Beeinflussung der Mikrokapselgrößen können, wie in Kapitel 4.3.2.1 beschrieben, der Volumenstrom $\dot{V}_l$ des Gases und der Außendurchmesser d_{ca} der Kapillare c als variable Faktoren angesehen werden. Die in Tab. 5.6 aufgeführten Kapillaren C1 - C4 der Firma Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ und C5 - C7 der Gesellschaft für Löttechnik (GLT), Pforzheim, wurden bezüglich des Außendurchmessers d_{ca} und des Innendurchmessers d_{ci} mit einem Mikroskop Leica, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, vermessen, deren Werte der Tab. 5.6 entnommen werden können.

In Anlehnung an die von London u. a.[125] beschriebene Apparatur fand ein Verkapselungsröhrchen gemäß der Abb. 4.5 mit einem Innendurchmesser a von d_{ai} = 5,0 mm Verwendung, welches, unter Berücksichtigung der zu verkapselnden Zellen und der damit verbundenen Notwendigkeit zur Sterilisation durch Autoklavieren, aus Edelstahl (V4A) gefertigt wurde.

Im Gegensatz zu London u. a.[125] sollte die Verkapselungsapparatur mit Stickstoff N_2 betrieben werden.

Tab. 5.6: Maße der verwendeten Kapillaren

Maße der Kapillaren				
Bezeich-nung	Außendurch-messer d_{ca} [mm]	Wandstärke [mm]	Innendurch-messer d_{ci}[mm]	Länge l_c [mm]
C1	1,2 (18 G*)	0,14	0,92	100*
C2	0,9 (20 G*)	0,14	0,62	100*
C3	0,7 (22 G*)	0,11	0,48	100*
C4	0,55 (24 G*)	0,1	0,35	100*
C5	0,5	0,1	0,3	100*
C6	0,4	0,09	0,22	100*
C7	0,3	0,06	0,18	100*
* Herstellerangabe				

5.2.1 Vorversuche

Für entsprechende Vorversuche wurde wie von London et al.[125] ebenfalls eine Na-Alginat-Lösung von 1,5 % (w/v) des Typs Sigma 3 (A 2158) herangezogen. Im Gegensatz zu London u. a.[125] konnten mit dieser Na-Alginat-Lösung keine Tropfen bzw. Kapseln hergestellt werden, da die Nullscherviskosität dieser Lösung von $\eta_0 = 72{,}3800$ Pa·s mit den zur Verfügung stehenden Spritzenpumpen, Perfusor Secura FT B. Braun Melsungen AG und KD Scientific, Model 100, Philadelphia, PA nicht durch die in Abb. 5.6 aufgeführten Kapillare C1 gefördert werden konnte.

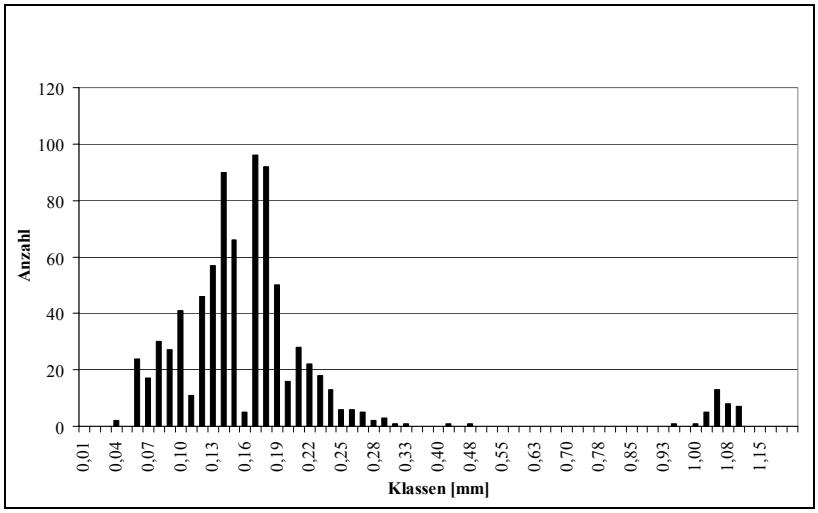
Auf Grund der zu hohen Nullscherviskosität der Na-Alginat-Lösung vom Typ Sigma 3 wurde auf Grundlage der in Kap 5.1.2 ermittelten Ergebnisse bei der Wahl des Na-Alginates für weitere Vorversuche auf den bei dieser Konzentration im Mittelfeld der Viskosität liegenden Typ Acros, mit einer Nullscherviskosität $\eta_0 = 1{,}4340$ Pa·s bei einer Konzentration von 1,5 % (w/v) des Na-Alginates, zurückgegriffen. Wie in allen anderen nachfolgenden Versuchen wurde das Na-Alginat mit einem Volumenstrom $\dot{V}_{Alg} = 10\ ml/h$ dem Verkapselungsröhrchen über die Kapillare c mittels oben genannter Spritzenpumpe von KD Scientific Model 100 zugeführt.

Der zu wählende Volumenstrom an Stickstoff von $\dot{V}_{N_2} = 4{,}250\ m^3/h$ wurde aus den Versuchen von London u. a.[125], der mit einem Volumenstrom an Sauerstoff

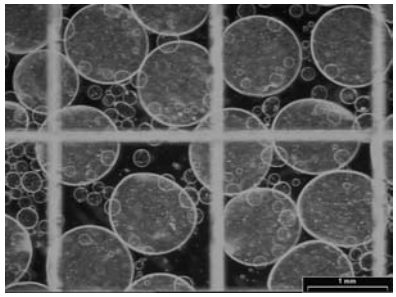
$\dot{V}_{O_2}$ = 3,5 l/h = 0,21 m³/h arbeitete, abgeleitet und unter Berücksichtigung der geforderten Kapselgröße, vergleiche Kap. 3, über die Reynoldszahl Re, wie im Anhang unter A III dargestellt, berechnet. Die für die Gase O_2 und N_2 zugehörigen Werte für die Dichte und Viskosität (dynamische) wurden der Literatur[177] für 20 °C entnommen. Der Geltungsbereich für die über die Reynoldszahl ermittelten Strömungsgeschwindigkeiten entspricht denen der ungestörten Strömung der Gase durch einen Ringspalt.

Wie bei allen nachfolgenden Versuchen wurde der Volumenstrom des Gases über ein für Stickstoff kalibriertes Rotameter, PD 08 (für R_T = 20 °C), Funke Medien GmbH, Radebeul, über eine am Messgerät angebrachte Regelungseinheit eingestellt.

Die resultierenden Kapselgrößen sind in der Häufigkeitsverteilung in Abb. 5.2 dargestellt.



a)



b)

Abb. 5.2: a) Kapselgrößen bei Verwendung der AirJet-Methode unter Nutzung des Na-Alginates vom Typ Acros, c_{Alg} = 1,5 % (w/v), der Kapillare C1 und $\dot{V}_{N_2}$ = 4250 l/h

b) Lichtmikroskopische Aufnahme, Maßstab 1mm

Wie dem Histogramm zu entnehmen ist, handelt es sich im Gegensatz zu London et al.[125] um eine bimodale Verteilung in den Bereichen 0,04 - 0,33 mm und 0,94 - 1,10 mm. Unter Betrachtung der getroffenen Aussage, daß die Größen der Mikrokapseln bei Unterschreitung des Außendurchmessers d_{ca} der Kapillare c nicht zu einheitlichen Kapselgrößen führen[127, 128], kann der Größenbereich von 0,04 - 0,33 mm auf Sekundärtropfenbildung zurückgeführt werden, die entsprechend breit verteilt ist. Sekundärtropfen sind auf die Ausbildung von Filamenten zurückzuführen, die während des Abrissvorgangs des primären Tropfens entstehen.

Die zu bestimmende Häufigkeitsverteilung der entstandenen Mikrokapseln wurde, wie bei allen nachfolgenden Versuchen, über Bildanalyseverfahren ausgewertet. Zur Aufnahme und Digitalisierung der Bilder stand ein Inversmikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Oberkochen, Germany) mit einer an einem PC angeschlossenen Videokamera und entsprechender Hardware, WinTV32-Karte (Hauppauge Computer Works, Mönchengladbach, Germany), zur Verfügung.
Anschließend wurden die auf den Bildern festgehaltenen Mikrokapseln in eine Bildverarbeitungssoftware „anaLysis“ eingelesen, entsprechend dem im Bild vorhandenen Raster von 2 mm kalibriert und der Kreisumfang der Mikrokapseln ermittelt. Hierbei wurden die Werte von mindestens 200 Mikrokapseln von mindestens 10 Einzelbildern jedes einzelnen Versuches in einer Excel-Tabelle zusammengefasst und aus dem Kreisumfang der Durchmesser der Kapseln berechnet. Für eine Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Microbeads in einem Histogramm wurden diese in entsprechende Größenklassen eingeteilt und deren Häufigkeit bestimmt.

5.2.2 Variation der Kapselgrößen

Da es Ziel dieser Arbeit ist, Kapseln im geforderten Größenbereich von 0,1 - 0,35 mm monomodal verteilt herzustellen, wird im Folgenden der Einfluss,

- des verwendeten Stickstoffstroms $\dot{V}_{N_2}$,
- des Kapillaraußendurchmessers d_{ca} und
- des Alginat-Typs

auf die Bildung von Mikrokapseln untersucht. Hierbei soll zusätzlich die Bildung von Sekundärtropfen beeinflusst werden, mit dem Ziel, diese in der Ausbildung zu unterdrücken bzw. stark einzuschränken.

5.2.2.1 Einfluss des Volumenstroms $\dot{V}_{N_2}$

Für die Untersuchung des Einflusses des Volumenstromes wurde die Kapillare C2 mit einem Außendurchmesser d_{ca} = 0,9 mm und als zu verwendende Volumenströme $\dot{V}_{N_2}$ wurden 2500, 3250 und 4000 l/h gewählt. Als Na-Alginat wurde wie im Vorversuch, vergleiche Kap. 5.2.1,

der Typ Acros mit einer Konzentration von 1,5% (w/v) und einer Viskosität von η_0 = 1,43 Pa·s gewählt. Ebenfalls wie beim Vorversuch entstanden bimodale Größenverteilungen der Mikrokapseln.

In der Abb. 5.3 sind die Primärgrößen dargestellt. Dieser ist zu entnehmen, daß mit steigendem Volumenstrom $\dot{V}_{N_2}$ die Größe der entstehenden Mikrokapseln abnimmt. Hierfür wurden, wie bereits im Kap. 5.2.1 beschreiben, die Größenverteilungen der primären Mikrokapseln der Einzelversuche ermittelt und mittels Gauß-Funktion gefittet um das Maximum jeder einzelnen Verteilung bestimmt.

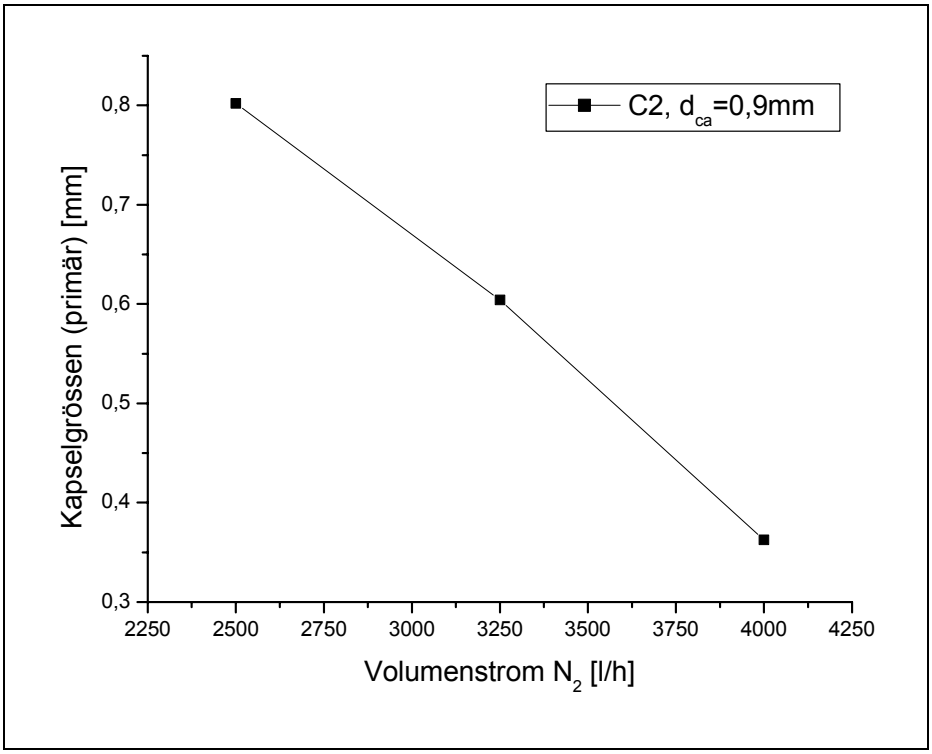


Abb. 5.3: Primäre Kapselgrößen in Abhängigkeit von $\dot{V}_{N_2}$

Im Anhang A IV sind die zugehörigen Histogramme der Größenverteilungen aufgezeigt. Ihnen ist zu entnehmen, daß der Anteil an Sekundärkapseln im Bereich von 0,04 – 0,2 mm mit steigendem Stickstoffvolumenstrom stark zunimmt.

Bezüglich der zu erzielenden Kapselgrößen von 0,1 – 0,35 mm zur Immobilisierung von Zellen, kann diese Verteilungsbreite mit den verwendeten Parametern nicht erreicht werden.

5.2.2.2 Einfluss des Kapillaraußendurchmessers d_{ca}

Um das in Kap. 3 formulierte Ziel, die Herstellung von Mikrokapseln mit dem geforderten Größenbereich, zu erreichen, wurden im Folgenden die Kapillaraußendurchmesser d_{ca} variiert.

Hierfür standen die Kapillaren C2 - C7, vergleiche Tab. 5.6, mit einem Außendurchmesser d_{ca} von 0,9 – 0,3 mm zur Verfügung. Weiter wurden als veränderliche Größe, wie in Kap. 5.2.2.1 die Volumenströme $\dot{V}_{N_2}$ von 2500, 3250 und 4000 l/h zur Einflussnahme auf die entstehenden Tropfengrößen festgelegt. Hierbei wurde gleichfalls eine Na-Alginat-Lösung vom Typ Acros mit einer Konzentration von 1,5 % (w/v) und einer Viskosität η_0 = 1,43 Pa·s verwendet.

Die Ergebnisse aus dem Bildanalyseverfahren und der ermittelten Größenverteilungen sind zusammengefasst in der Abb. 5.4 dargestellt.

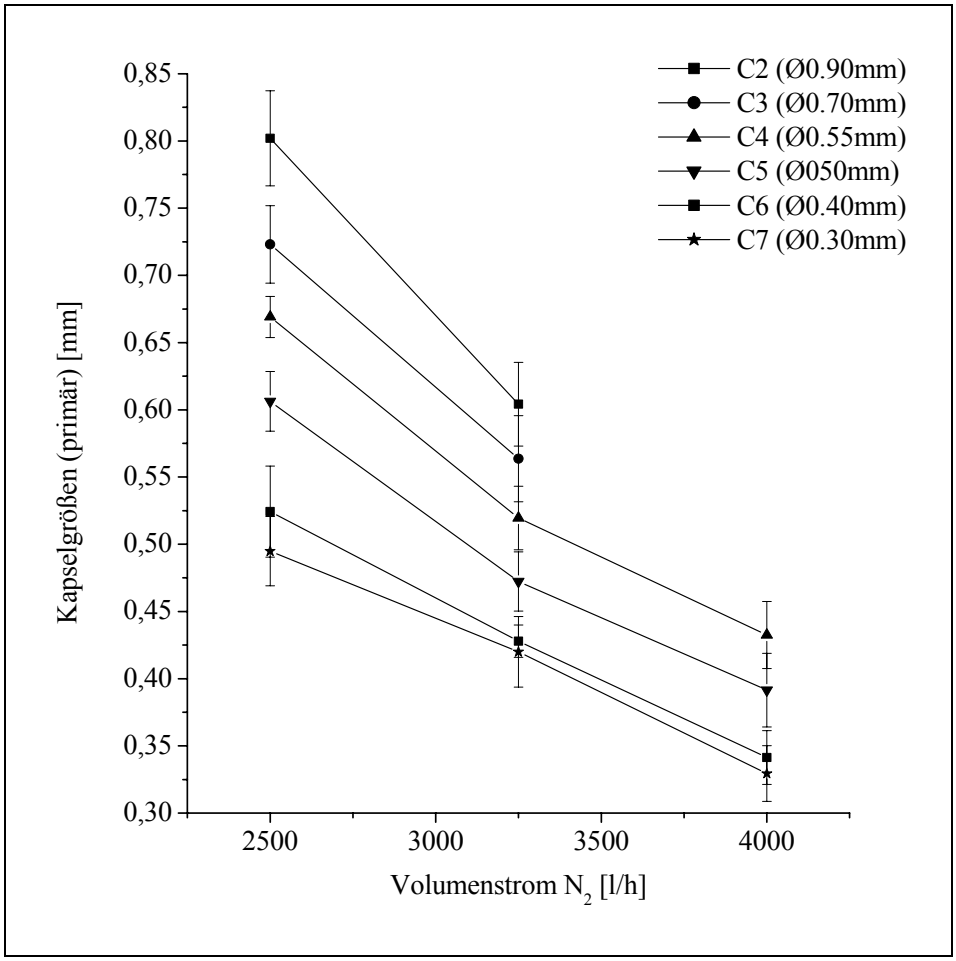


Abb. 5.4: Kapselgrößen bei Verwendung der AirJet-Methode in Abhängigkeit von d_{ca} und $\dot{V}_{N_2}$ unter Nutzung des Na-Alginates vom Typ Acros, c_{Alg} = 1,5 % (w/v)

Den einzelnen Graphen ist zu entnehmen, daß sich die Primärgrößen der sich bildenden Mikrokapseln zusätzlich zu der in Kap. 5.2.2.1 getroffenen Aussage, daß mit steigendem Volumenstrom der Durchmesser der Primärkapseln sinkt, über die Dimension des Außendurchmessers d_{ca} beeinflussen lassen. Die ermittelten Werte zeigen deutlich, daß mit abnehmendem d_{ca} die Größe der entstandenen Microbeads sinkt.

Wie bei den Versuchen in Kap. 5.2.2.1 entstanden bei der Vertropfung der Na-Alginat-Lösung des Typs Acros mit einer Konzentration von 1,5 % (w/v) Sekundärkapseln, wie am Beispiel der Kapillare C3 im Anhang A V aufgezeigt.

Als Ursache für die Bildung von Sekundärtropfen ist die Unterschreitung des Kapillaraußendurchmessers d_{ca} anzusehen. Unter Betrachtung der in Kap. 4.3.2.1 getroffenen Aussage, daß der kleinstmögliche, zu erzielende Durchmesser der Mikrokapseln oberhalb von d_{ca} liegt, um Kapseln einheitlicher Größe herzustellen[127, 128], ist bei den Kapillaren C2 und C3 diese Voraussetzung nicht erfüllt, da die gebildeten Kapseln bereits bei einem Volumenstrom von 2500 l/h unterhalb des Kapillaraußendurchmessers d_{ca} liegen.

Hingegen wird bei den Kapillaren C4 - C7 dieses Kriterium in Abhängigkeit des Volumenstroms $\dot{V}_{N_2}$ zum Teil erfüllt, vergleiche Abb. 5.4. Jedoch konnte die Ausbildung von Sekundärkapseln nicht vermieden werden.

Mikrokapseln, die mit der Kapillare C7 und einem Volumenstrom von 4750 l/h hergestellt wurden, eignen sich in Bezug auf die in Kap. 3 geforderten Größenverteilungen der Mikrokapseln von 0,1 – 0,35 mm nur bedingt für die Immobilisierung von Zellen und deren späteren Transplantation.

Die Ursache für die eingeschränkte Verwendung liegt in der Ausbildung von Sekundärkapseln unterhalb von 0,1 mm, dargestellt in Abb. 5.5. Diese Kapseln könnten durch geeignete Separationsverfahren, z. B. geeignete Siebe, abgetrennt werden.

Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, daß dies einen weiteren Arbeitsschritt beim Verkapselungsprozess darstellen würde, der eine zusätzliche Belastung der zu immobilisierenden Zellen darstellt, was zu einer eingeschränkten Vitalität, bis hin zum Absterben der Zellen, führen kann.

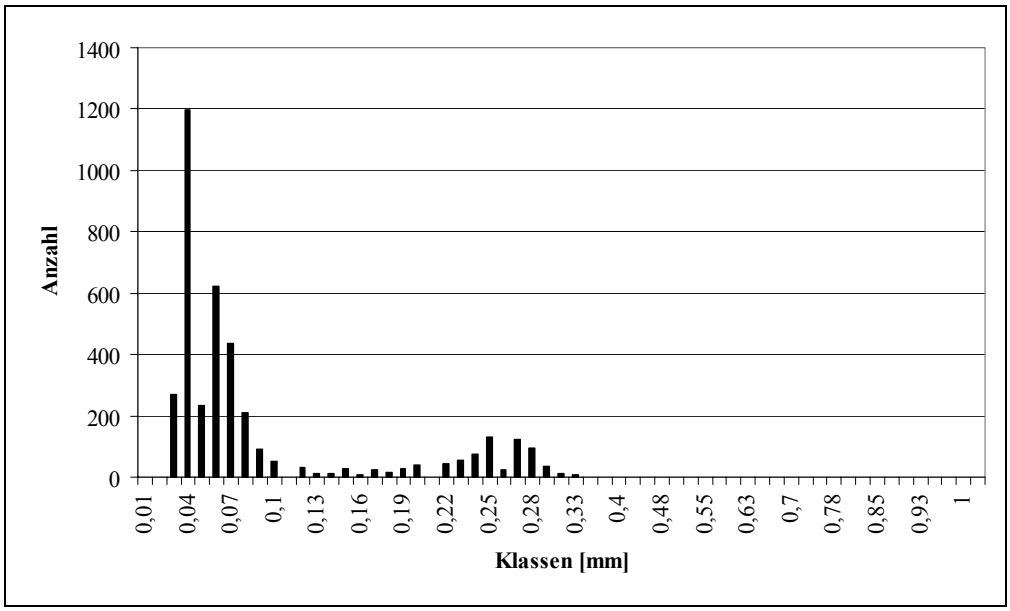


Abb. 5.5: Kapselgrößen bei Verwendung der AirJet-Methode unter Nutzung des Na-Alginates vom Typ Acros 1,5 % (w/v), der Kapillare C7 und $\dot{V}_{N_2}$ = 4750 l/h

5.2.2.3 Kapselherstellung bei eingestellter Viskosität

In den nachfolgenden Untersuchungen soll durch den Einsatz des Na-Alginat-Typs Fluka 1,5 % (w/v), mit einer Viskosität von η_0 = 0,4818 Pa·s, der Bildung von Sekundärtropfen entgegen gewirkt werden.

Hierbei wurden die Versuche auf die Kapillare C6 und C7 eingegrenzt, da sich bei den vorangegangenen Untersuchungen mit diesen Kapillaren Mikrokapseln nahe am gewünschten Größenbereich herstellen ließen.

Aus der Abb. 5.6, der Tab. 5.7 und den Abbildungen im Anhang unter A VI ist zu erkennen, daß die Viskosität der Na-Alginat-Lösungen, eine nicht zu vernachlässigende Größe darstellt. Es ist aus den gezeigten Abbildungen und den zugehörigen Größenverteilungen zu entnehmen, daß im Vergleich zu den Untersuchungen im Kap. 5.2.2.2, bei geeigneter Wahl der Viskosität von η_0 = 0,4818 Pa·s des verwendeten Na-Alginates, Mikrokapseln mit sehr enger, bis nahezu monodisperser Verteilung hergestellt werden konnten.

Die in Kap. 4.3.2.1 getroffene Aussage, daß die kleinstmöglichen zu erzielenden Tropfengrößen mit monodisperser Verteilung im Durchmesser denen des Außendurchmessers d_{ca} der Kapillare entsprechen, konnte bestätigt werden.

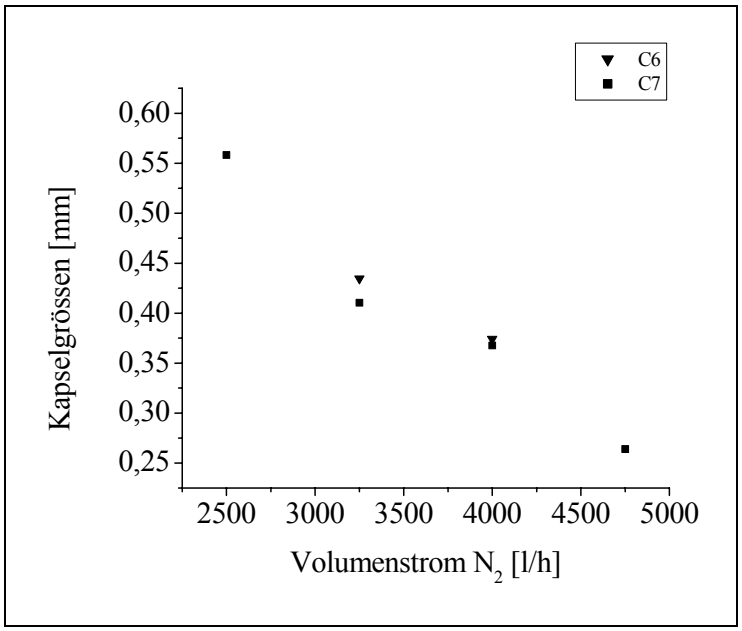


Abb. 5.6: Kapselgrößen in Abhängigkeit von d_{ca} und $\dot{V}_{N_2}$ bei Verwendung der AirJet-Methode unter Nutzung der Kapillaren C6 und C7

Betrachtet man die Größenverteilung bei der Verwendung der Kapillare C7 mit einem Volumenstrom von $\dot{V}_{N_2}$ = 4750 l/h im Anhang unter A VI, so ist zu erkennen, daß der Durchmesser der Mikrokapseln unterhalb des Kapillaraußendurchmessers d_{ca} von 0,3 mm liegt und dies zur Bildung erster Sekundärtropfen führt.

Tab. 5.7: Kapselgrössen bei Kapillaren C6 und C7 in Abhängigkeit von $\dot{V}_{N_2}$, hergestellt mit der AirJet-Methode

$\dot{V}_{N_2}$ **[l/h]**	**Größen mit Kapillare C6 [mm]**	**Größen mit Kapillare C7 [mm]**
2500	-	0,559
3250	0,435	0,410
4000	0,375	0,367
4750	-	0,264 (primär)

5.3 Modell der langsamen Tropfenbildung mit Air-Jet

Da das Einsetzen der in Kap. 5.2.2.3 ermittelten Mikrokapselgrößen in das von Poncelet erstellte Modell[128] nicht zur Übereinstimmung führte, vergleiche Kap. 5.3.6, soll mittels Dimensionsanalyse eine verbesserte Beschreibung der Zusammenhänge bei der Ausbildung von Flüssigkeitstropfen mittels AirJet-Verfahren formuliert werden. In der Abb. 5.7 sind die für die Dimensionsanalyse maßgeblichen Größen und die Ausbildung eines Tropfen dargestellt.

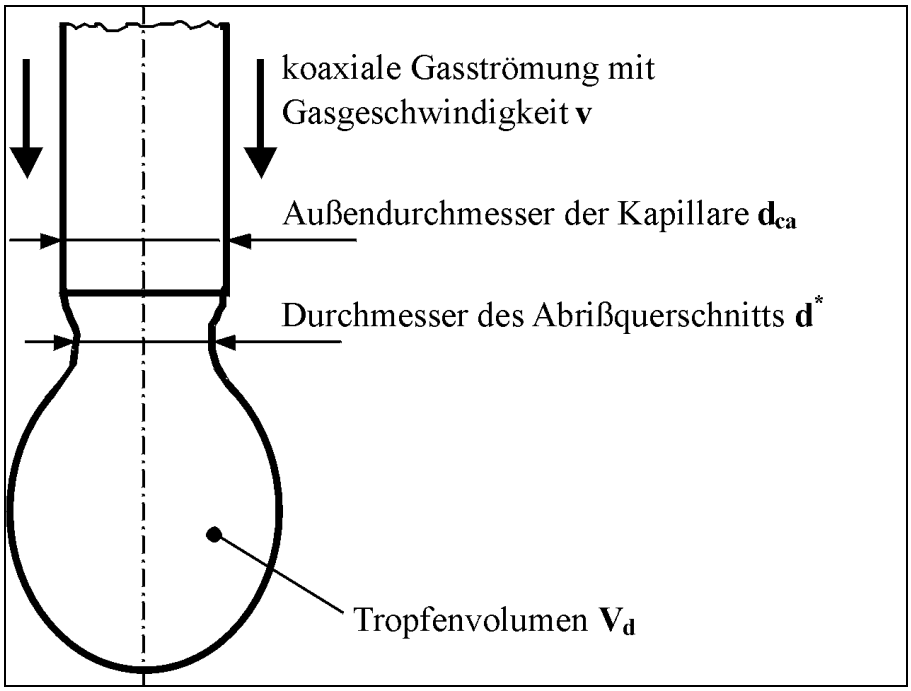


Abb. 5.7: Ausbildung des Tropfens (schematisch)

Zur Erstellung des Modells werden folgende Annahmen getroffen.
Die Tropfenbildung wird quasistatisch betrachtet (langsame Tropfenbildung):

- der Impuls der aus der Kapillare strömenden Flüssigkeit kann vernachlässigt werden,
- die Zähigkeit der dispersen Phase (z.B. Na-Alginat-Lösung) hat keinen Einfluss.

Weiter wird folgendes vorausgesetzt:

- es bilden sich einzelne Primärtropfen,
- es entstehen keine Sekundärtropfen.

5.3.1 Kräftegleichgewicht

Das Kräftegleichgewicht lässt sich, wie in der nachfolgenden Gleichung dargestellt, beschreiben.

$$F_g + F_w - F_o = 0 \qquad \textbf{Gl. 5.3}$$

mit: F_g - Gewichtskraft des Tropfens
F_w - Widerstandskraft der koaxialen Gasströmung auf den Tropfen
F_o - Oberflächenkraft des Tropfens in vertikaler Richtung an der schwächsten Stelle

5.3.1.1 Gewichtskraft F_g

Die Gewichtkraft F_g lässt sich aus dem Tropfenvolumen V_d, der Dichtedifferenz $\Delta\rho$ und der Gravitationskonstante g, wie nachfolgend dargestellt, berechnen.

$$F_g = V_d \cdot \Delta\rho \cdot g \qquad \textbf{Gl. 5.4}$$

mit,

$$\Delta\rho = \rho_d - \rho_k \qquad \textbf{Gl. 5.5}$$

5.3.1.2 Oberflächenkraft F_0

Für die Bestimmung der Oberflächenkraft, resultierend aus der Oberflächenspannung γ und dem Abrißdurchmesser d^*, lässt sich folgender Zusammenhang formulieren.

$$F_o = \pi \cdot d^* \cdot \gamma \qquad \textbf{Gl. 5.6}$$

Die Tropfeneinschnürung und somit d^* ist neben den Stoffeigenschaften abhängig von:

- dem Außendurchmesser der Kapillare d_{ca}
- dem Tropfenvolumen V_d und
- der Gasströmung.

5.3.1.2.1 Tropfeneinschnürung ohne koaxiale Gasströmung

Die Einschnürung bei der Tropfenbildung ohne koaxiale Gasströmung wurde experimentell bereits umfassend untersucht. Sie geht mittels eines Korrekturfaktors $f\left(\frac{r}{a}\right)$ bzw. $\Phi\left(\frac{r}{V_d^{1/3}}\right)$ in die Berechnung des Tropfenvolumens ein[129]

$$r = \frac{d_{ca}}{2} \qquad \textbf{Gl. 5.7}$$

Wobei r der Außenradius der Kapillare ist.

Die Konstante a ist die Kapillarkonstante bzw. Laplacesche Konstante

$$a = \sqrt{\frac{2 \cdot \gamma}{\Delta\rho \cdot g}} \qquad \textbf{Gl. 5.8}$$

Für die Oberflächenkraft ergibt sich:

$$F_o = \pi \cdot d_{ca} \cdot f\left(\frac{r}{a}\right) \cdot \gamma \qquad \textbf{Gl. 5.9}$$

5.3.1.2.2 Tropfeneinschnürung mit koaxialer Gasströmung

Die Gasströmung beeinflusst die Einschnürung anders als das Gewicht des Tropfens, deshalb kann der bekannte Korrekturfaktor f bzw. Φ hier nicht verwendet werden. Die Gasströmung wirkt über den Strömungswiderstand auf die Oberfläche des Tropfens und zwar ungleichmäßig. Dagegen wirkt die Schwerkraft gleichmäßig auf das Volumen des Tropfens. Die Einschnürung ist nicht bekannt.

Für kleine Tropfenvolumen geht der Korrekturfaktor f gegen eins, d. h. die Einschnürung geht gegen null.

Für diesen Fall gilt näherungsweise:

$$F_o = \pi \cdot d_{ca} \cdot \gamma \qquad \textbf{Gl. 5.10}$$

Diese Gleichung wird für die Oberflächenkraft verwendet, wodurch das Modell besonders für große Tropfen das Tropfenvolumen zu groß vorhersagt.

5.3.1.3 Strömungswiderstand F_w

5.3.1.3.1 Strömungswiderstand einer Kugel[178]

Die Umströmung der Kugel wird vom Widerstandsbeiwert c_w in Abhängigkeit von der Reynoldszahl Re_p charakterisiert, wobei die Strömung vor der Kugel ungestört sein muss.

$$Re_P = \frac{v \cdot d_P \cdot \rho_k}{\eta_k} \qquad \textbf{Gl. 5.11}$$

d_p - Kugeldurchmesser

Der Strömungswiderstand berechnet sich nach,

$$F_w = c_w(Re_p) \cdot \frac{\pi}{8} \cdot d_p^2 \cdot \rho_k \cdot v^2 \qquad \textbf{Gl. 5.12}$$

Der Widerstandsbeiwert der Kugel c_w ist bekannt,

- für $Re_p \leq 0{,}5$: (STOKES-Bereich)

Das Strömungsfeld auf der Vorderseite (Luv) und auf der Rückseite ist gleich. Der Widerstand ergibt sich etwa zu 1/3 aus den Trägheitskräften und zu 2/3 aus dem Reibungswiderstand[178].

$$c_w = \frac{24}{Re_p} \qquad \textbf{Gl. 5.13}$$

- für $0{,}5 < Re_p \leq 10^3$: (Übergangsbereich)

Bei etwa $Re_p = 1$ löst sich die Strömung von der Kugeloberfläche ab. Mit zunehmender Reynoldszahl verlagert sich der Ablösepunkt stromaufwärts und es baut sich eine Wirbelschleppe hinter der Kugel auf. Der Einfluss der Trägheitskräfte nimmt entsprechend zu.

- für $10^3 < Re_p \leq 2{,}5 \cdot 10^5$: (NEWTON-Bereich)

$$c_w = 0{,}44 \qquad \textbf{Gl. 5.14}$$

Das Strömungsfeld ändert sich in diesem Bereich nur unwesentlich. Auf der Kugelvorderseite wird die Kugel laminar umströmt. Auf der Rückseite liegt eine turbulente Nachlaufströmung vor. Der Strömungswiderstand wird hauptsächlich durch die Trägheitskräfte verursacht.

5.3.1.3.2 Strömungswiderstand des an der Kanüle hängenden Tropfens

Die Anströmung des Tropfens wird durch die Kanüle gestört. Dadurch entfällt der Staudruck und der Reibungswiderstand auf der Vorderseite des Tropfens. Die Strömungsverhältnisse auf der Rückseite werden sich ähnlich der Kugelumströmung aufbauen.

Für den STOKES-Bereich und den Übergangsbereich lässt sich der Strömungswiderstand des Tropfens nicht aus dem Kugelwiderstand ableiten.

$$c_w = f(v, V_d, d_{ca}, \rho_k, \eta_k) \qquad \textbf{Gl. 5.15}$$

und

$$F_w = f(v, V_d, d_{ca}, \rho_k, \eta_k) \qquad \textbf{Gl. 5.16}$$

Für den NEWTON-Bereich wird der Strömungswiderstand der Kugel hauptsächlich durch die Trägheitskräfte verursacht. Die Wirbelschleppe, die den Hauptanteil der Trägheitskräfte bildet, dürfte sich bei der Umströmung des hängenden Tropfens ähnlich ausbilden wie bei der Kugelumströmung. Deshalb wird angenommen, daß der Widerstandsbeiwert wie bei der Kugelumströmung konstant ist.

$$c_w = \text{konst.} \qquad \textbf{Gl. 5.17}$$

Damit ergibt sich für die Widerstandskraft,

$$F_w = k_N \cdot V_d^{2/3} \cdot \rho_k \cdot v^2 \qquad \textbf{Gl. 5.18}$$

k_N - dimensionslose empirische Konstante

5.3.2 Dimensionsanalyse

Die Dimensionsanalyse dient der Verringerung der veränderlichen physikalischen Größen. Durch die Berechnung von Kennzahlen wird das Problem dimensionslos dargestellt. Es gibt unendlich viele Kennzahlsätze für ein Problem, wovon die günstigsten gefunden werden müssen.
Nach dem Kräftegleichgewicht, Kapitel 5.3.1, ist die langsame Tropfenbildung nach der Air-Jet-Methode von folgenden physikalischen Größen abhängig.

$$V_d = f(d_{ca}, v, \rho_k, \eta_k, \gamma, \Delta\rho, g) \qquad \textbf{Gl. 5.19}$$

Die Größen $\Delta\rho$ und g kommen nur in der Gleichung für die Gewichtskraft und dort als Produkt vor. Sie werden zur Verringerung der Veränderlichen durch eine Größe ersetzt:

$$\Delta w = \Delta\rho \cdot g\,. \qquad \textbf{Gl. 5.20}$$

Dadurch ergibt sich für das Tropfenvolumen:

$$V_d = f(d_{ca}, v, \rho_k, \eta_k, \gamma, \Delta w)\,. \qquad \textbf{Gl. 5.21}$$

5.3.2.1 Dimensionsmatrix

Die folgende Dimensionsmatrix gibt für das MLT-System die Dimensionen der Veränderlichen für die Masse, die Länge und die Zeit (Time) wieder.

	V_d	d_{ca}	v	η_k	ρ_k	γ	Δw
M in kg	0	0	0	1	1	1	1
L in m	3	1	1	-1	-3	0	-2
T in s	0	0	-1	-1	0	-2	-2

Gl. 5.22

5.3.2.2 Ermittlung der Kennzahlmatrix

Die Anzahl der Kennzahlen ergibt sich durch Subtraktion der Spaltenzahl der Dimensionsmatrix und dem Rang der Matrix.
Der Rang der Dimensionsmatrix ist 3, da eine 3-reihige Unterdeterminante ungleich 0 ist:

$$\begin{vmatrix} 0 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & -1 \\ 0 & -1 & -1 \end{vmatrix} = -1 \neq 0 \qquad \textbf{Gl. 5.23}$$

Die Dimensionsmatrix, Gl. 5.22, hat 7 Spalten (Veränderliche), somit werden 4 Kennzahlen zur Beschreibung des Problems benötigt.

Die Berechnung der Kennzahlmatrix wird am Beispiel der Zeile Π_1 erläutert. Die ersten 4 Spalten (4 = Anzahl der Kennzahlen) werden wie unten ersichtlich vorgegeben. Zur Ermittlung der letzten 3 Spalten muss je Kennzahl ein lineares Gleichungssystem mit 3 Gleichungen gelöst werden, das sich aus der Dimensionsmatrix ergibt.
Lineares Gleichungssystem für Π_1 :

	ρ_k	γ	Δw	V_d
M	1	1	1	0
L	-3	0	-2	**-3**
T	0	-2	-2	0

Gl. 5.24

Die Lösung des Gleichungssystems lautet:

ρ_k	γ	Δw
0	-3/2	3/2

Gl. 5.25

Die Zeilen der Kennzahlmatrix lassen sich analog berechnen.

Kennzahlmatrix:

	V_d	d_{ca}	v	η_k	ρ_k	γ	Δw
Π_V	3	0	0	0	0	-3/2	3/2
Π_d	0	1	0	0	0	-1/2	1/2
Π_ρ	0	0	1	0	1/2	-1/4	-1/4
Π_η	0	0	0	1	-1/2	-3/4	1/4

Gl. 5.26

Aus der Kennzahlmatrix ergeben sich die folgenden dimensionslosen Kennzahlen:

- Π_v zur Beschreibung des Tropfenvolumens

$$\Pi_V = \frac{V_d}{a_T^3}$$ **Gl. 5.27**

mit,

$$a_T = \sqrt{\frac{\pi \cdot \gamma}{\Delta\rho \cdot g}}$$ **Gl. 5.28**

bzw.,

$$a_T = a \cdot \sqrt{\frac{\pi}{2}}$$ **Gl. 5.29**

a – Kapillarkonstante, a_T - Tropfenkonstante

- Π_d zur Beschreibung des Einflusses des Kapillardurchmessers

$$\Pi_d = \frac{d_{ca}}{a_T}$$ **Gl. 5.30**

- Π_ρ zur Beschreibung des Einflusses der Trägheitskräfte

$$\Pi_\rho = \frac{a_T}{\gamma} \cdot \rho_k \cdot v^2 \qquad \textbf{Gl. 5.31}$$

- Π_η zur Beschreibung des Einflusses der Trägheitskräfte und der Viskositätskräfte

$$\Pi_\eta = \frac{\eta_k^2}{\rho_k \cdot \gamma \cdot a_T} \qquad \textbf{Gl. 5.32}$$

Die Kennzahl Π_η sollte für eine schleichende Umströmung durch

$$\Pi_\eta^* = \sqrt{\Pi_\rho \cdot \Pi_\eta} \qquad \textbf{Gl. 5.33}$$

ersetzt werden, woraus

$$\Pi_\eta^* = \frac{\eta_k}{\gamma} \cdot v \qquad \textbf{Gl. 5.34}$$

folgt.

5.3.3 Langsame Tropfenbildung ohne Koaxialströmung

Die Kennzahlen Π_V (Gl. 5.27) und Π_d (Gl. 5.30) beschreiben die langsame Tropfenbildung ohne Koaxialströmung. Für das einfache Kräftegleichgewicht ohne eine Tropfeneinschürung, bei dem der Abrissdurchmesser gleich dem Kapillardurchmesser ist, ergibt sich $\Pi_d = \Pi_V$. Messungen der Tropfenbildung ergeben in der Darstellung $\Pi_d(\Pi_V)$ für beliebige Stoffe und Kapillargrößen ein und dieselbe Kurve. In der Literatur wird meist der Korrekturfaktor[129]

$$f\left(\frac{r}{a}\right), \qquad \Phi\left(\frac{r}{V_d^{1/3}}\right) \qquad \text{bzw.} \qquad \frac{r}{a}\left(\frac{r}{V_d^{1/3}}\right)$$

verwendet[179].

Dieser Korrekturfaktor ist eine dimensionslose Kennzahl, die sich aus Π_V und Π_d berechnen lässt.

$$f \text{ bzw. } \Phi = \frac{\Pi_V}{\Pi_d} \qquad \textbf{Gl. 5.35}$$

Die Verwendung der eineindeutigen Funktion $\Pi_d(\Pi_V)$ hat gegenüber den anderen Kennzahlkombinationen den Vorteil, daß sowohl V_d als auch d_{ca} nur in jeweils einer Kennzahl vorkommen. Deshalb kann sowohl $d_{ca}(V_d)$ als auch $V_d(d_{ca})$ einfach (ohne Iteration) ermittelt werden. Falls die Oberflächenspannung gesucht ist, sollte besser $\Phi\left(\frac{r}{V_d^{1/3}}\right)$ bzw. $\frac{\Pi_V}{\Pi_d}\left(\frac{\Pi_d}{\Pi_V^{1/3}}\right)$ verwendet werden.

In Abb. 5.8 sind einige Messwerte[129, 179] und eine empirische Approximationsgleichung für $\Pi_d(\Pi_V)$ dargestellt.
Die Gleichung liefert eine gute Approximation für den gesamten durch Messungen abgedeckten Bereich ($0{,}041 \le \Pi_V \le 2{,}182$).

$$\Pi_d = \Pi_V + \frac{p_1 - p_2 \cdot \Pi_V}{p_1 - \Pi_V} \cdot \left[1 - \exp\left[-(p_3 \cdot \Pi_V)^{p_4}\right]\right] \qquad \textbf{Gl. 5.36}$$

mit,

$$p_1 = 2{,}235 \quad p_2 = 0{,}9915 \quad p_3 = 1{,}048 \quad p_4 = 1{,}866$$

Auch die nicht durch Messwerte abgedeckten Bereiche ergeben sinnvolle Approximationswerte. Geht die Kennzahl Π_V und damit das Tropfenvolumen gegen null, nähert sich die Approximationsgleichung der Geraden $\Pi_d = \Pi_V$ (Kräftegleichgewicht ohne Tropfeneinschnürung). Dies bedeutet, daß die Einschnürung für kleine Tropfen verschwindet, und somit mit der Realität übereinstimmt. Die Approximationsgleichung hat die Polstelle $c_1 = 2{,}235$, bei

der Π_d unendlich wird. Das Tropfenvolumen ist demnach durch $\Pi_{V\,max} = 2{,}235$ nach oben beschränkt. Anders ausgedrückt, bei Annäherung an $\Pi_{V\,max}$ bleibt der Abrissdurchmesser konstant, obwohl der Kapillardurchmesser beliebig vergrößert wird. Veranschaulicht kann formuliert werden, daß von einer benetzten waagerechten unendlichen Fläche Tropfen mit der maximalen Größe $\Pi_{V\,max}$ fallen. Zur genauen Ermittlung der Polstelle sind noch gezielte Messungen erforderlich, wodurch sich die Parameter p_1 und p_2 verändern würden.

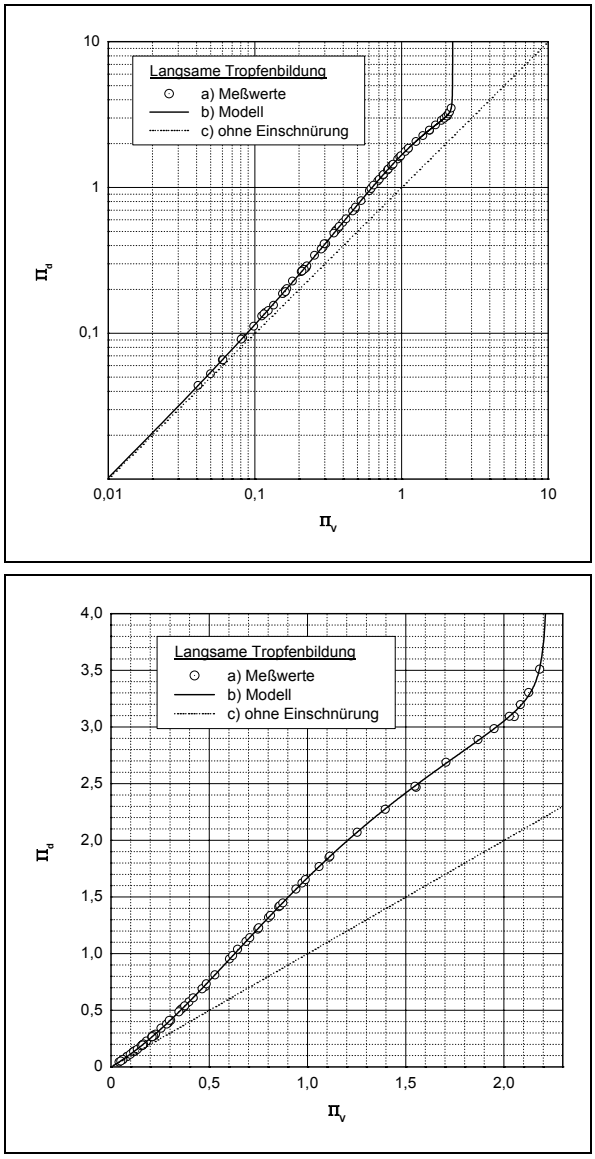


Abb. 5.8: Langsame Tropfenbildung ohne koaxiale Gasströmung
a) Messwerte nach HARKINS, BROWN[129]und WILKINSON[179] für unterschiedliche Stoffe und Kapillargrößen
b) Modell nach Gl. 5.36
c) einfaches Kräftegleichgewicht ohne Tropfeneinschnürung, mit d_{ca} als Abrissdurchmesser ($\Pi_d = \Pi_V$)

5.3.4 Modell für schnelle (NEWTON'sche) Tropfenumströmung mit Koaxialströmung

Voraussetzung für die Modellierung der Oberflächenkraft nach Kap. 5.3 sind kleine Tropfen, bei denen die Einschnürung vernachlässigbar ist. Da das Ziel der Air-Jet-Methode in der Erzeugung kleiner Tropfen besteht, wird diese Voraussetzung meist erfüllt sein. Eine grobe Abschätzung des daraus resultierenden systematischen Fehlers ist mittels des Modells ohne Koaxialströmung möglich. Wobei nicht berücksichtigt wird, daß die Tropfenform und damit die Tropfeneinschnürung von der koaxialen Gasströmung anders beeinflusst wird als vom Tropfengewicht. Der relative Fehler der Ermittlung von Π_d berechnet sich dann wie folgt.

$$\text{Fehler} = \frac{\Pi_d^* - \Pi_d}{\Pi_d} \qquad \textbf{Gl. 5.37}$$

mit,

$$\Pi_d^* = \Pi_V \qquad \textbf{Gl. 5.38}$$

und Π_d nach Gl. 5.36

Eine Abschätzung des relativen Fehlers durch die Vernachlässigung der gewichtsbedingten Tropfeneinschnürung ist nachfolgend dargestellt.

$$\text{Fehler} < \begin{cases} -1\% & \text{für}: \Pi_V < 4 \cdot 10^{-3} \\ -5\% & \text{für}: \Pi_V < 0{,}03 \\ -10\% & \text{für}: \Pi_V < 0{,}07 \end{cases}$$

Das Kräftegleichgewicht nach Gl. 5.3 ergibt

$$V_d \cdot \Delta\rho \cdot g + k_N \cdot V_d^{2/3} \cdot \rho_k \cdot v^2 - \pi \cdot d_{ca} \cdot \gamma = 0 \qquad \textbf{Gl. 5.39}$$

bzw.

$$d_{ca} \cdot \left(\frac{\Delta\rho \cdot g}{\pi \cdot \gamma} \right)^{1/2} = V_d \cdot \left(\frac{\Delta\rho \cdot g}{\pi \cdot \gamma} \right)^{3/2} + k \cdot V_d^{2/3} \cdot \left(\frac{\Delta\rho \cdot g}{\pi \cdot \gamma^3} \right)^{1/2} \cdot \rho_k \cdot v^2 \qquad \textbf{Gl. 5.40}$$

mit,

$$k = \frac{k_N}{\pi} \qquad \textbf{Gl. 5.41}$$

oder unter Verwendung der Kennzahlen nach Kap. 5.3.2.2.

$$\Pi_d = \Pi_V + k \cdot \Pi_V^{2/3} \cdot \Pi_\rho \qquad \textbf{Gl. 5.42}$$

Dies ist das dimensionslose Modell für die Tropfenbildung mit einer koaxialen Gasströmung, bei der die Trägheitseffekte entscheidend sind und die Zähigkeitseffekte vernachlässigbar. Die Konstante k muss experimentell ermittelt werden. Die in Kap. 5.3.6 dargestellten Messwerte ergeben

$$k = \frac{1}{27} \qquad \textbf{Gl. 5.43}$$

und damit

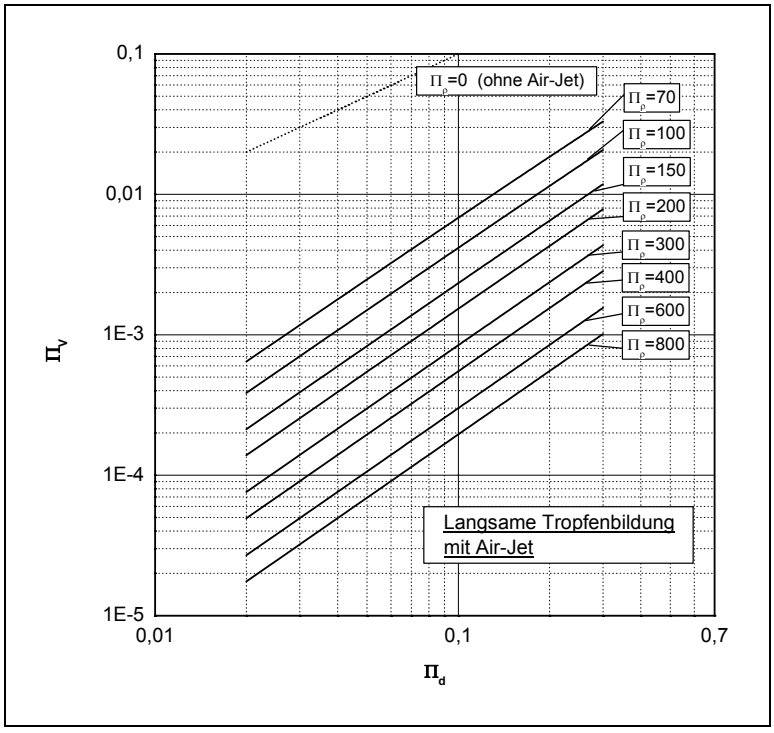
$$\Pi_d = \Pi_V + \frac{1}{27} \cdot \Pi_V^{2/3} \cdot \Pi_\rho \qquad \textbf{Gl. 5.44}$$

Das Modell gilt für beliebige Stoffe und Kapillardurchmesser und für Gasgeschwindigkeiten, die eine NEWTON´sche Umströmung des Tropfens ergeben. Die Grundvoraussetzung für die Gültigkeit des Modells ist die langsame Einzeltropfenbildung, bei der keine Sekundärtropfen entstehen, was entscheidend von der Viskosität des Tropfens abhängig ist.

Die Kennzahlen sind wie folgt von d_{ca}, V_d und v abhängig

$\Pi_d(d_{ca})$, $\Pi_V(V_d)$ und $\Pi_\rho(v)$.

Abb. 5.9 zeigt das Modell nach Gl. 5.44 zur Ermittlung des Tropfenvolumens in unterschiedlichen Darstellungen.



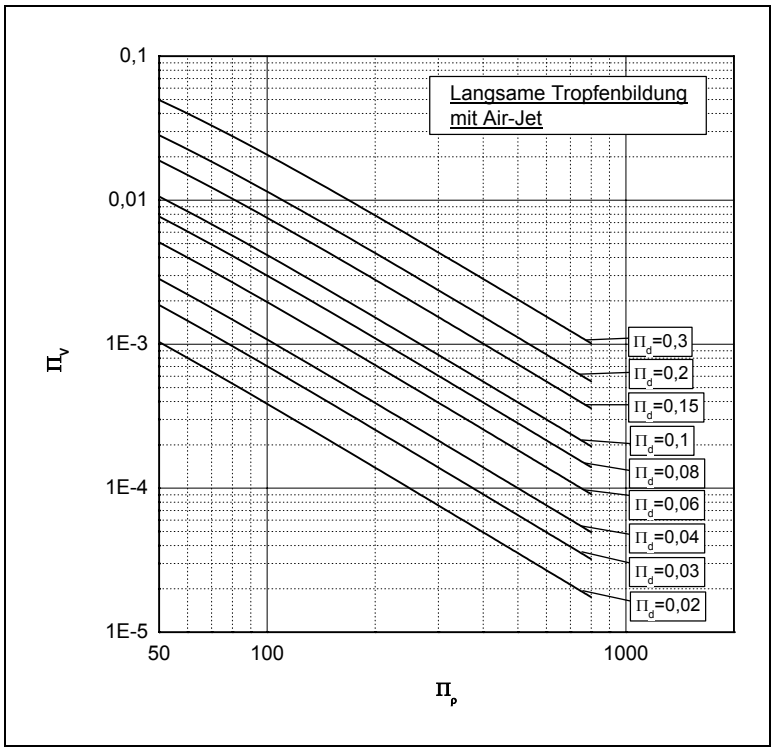


Abb. 5.9: Modellierte Werte für Π_V in Abhängigkeit von, Π_d bzw. Π_ρ der langsamen Tropfenbildung

5.3.5 Nicht-NEWTON´sche Tropfenumströmung mit Koaxialströmung

Falls die Zähigkeitskräfte der koaxialen Gasströmung einen signifikanten Einfluss auf die Tropfenbildung haben, ist das Modell nach Kap. 5.3.3 nicht gültig. Für den Übergangsbereich nach Kap. 5.3.1.3.2 ist der komplette Kennzahlsatz aus 4 Kennzahlen zur Beschreibung der Tropfenbildung erforderlich $\Pi_V(\Pi_d, \Pi_\rho, \Pi_\eta)$.

Für eine schleichende Tropfenumströmung, bei der die Trägheitskräfte vernachlässigbar sind, kann vermutet werden, daß die Kennzahl Π_ρ keinen Einfluss auf die Tropfenbildung hat. Das Tropfenvolumen berechnet sich dann aus $\Pi_V(\Pi_d, \Pi_\eta^*)$.

5.3.6 Messwerte

Zur Modellierung wurden nur Messwerte genutzt, bei denen eine langsame Einzeltopfenbildung erfolgte. Die Bildung von Sekundärtropfen führt zu einer erheblichen Verkleinerung der Tropfengröße, die nicht Gegenstand des Modells ist. Die Anzahl der Messwerte ist durch diese Einschränkung recht klein.

Die Messwerte wurden zunächst mit dem Modell nach PONCELET[128] ausgewertet. Das Tropfenvolumen wird durch folgendes Gleichungssystem berechnet.

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot d_T^3 \qquad d_T - \text{Tropfendurchmesser} \qquad \text{nach } \mathbf{Gl.\ 4.6}$$

$$\frac{d_T}{\Phi^{1,5}} = \left(\frac{18 \cdot d_{ca} \cdot \gamma}{\rho_k} \right)^{1/2} \cdot v_k^{-1} \qquad \text{nach } \mathbf{Gl.\ 4.9}$$

mit:

$$\Phi = \Phi_C \cdot \left(\frac{d_T}{d_{ca}} \right)^{0,3} \qquad \text{und } \Phi_C = 0{,}813 \qquad \text{nach } \mathbf{Gl.\ 4.10}$$

Das Gleichungssystem aus Gl. 4.6, Gl. 4.9 und Gl. 4.10 zur Bestimmung des Tropfendurchmessers lässt sich zusammenfassen und es lässt sich unter Verwendung der dimensionslosen Kennzahlen für Π_V durch nachfolgenden Zusammenhang formulieren.

$$\Pi_V = 255{,}18 \cdot \left(\frac{\Pi_d}{\Pi_\rho^{10}} \right)^{3/11} \qquad \textbf{Gl. 5.45}$$

Wie aus der Abb. 5.10 ersichtlich ist, stimmt das Modell nicht mit den Messwerten überein.

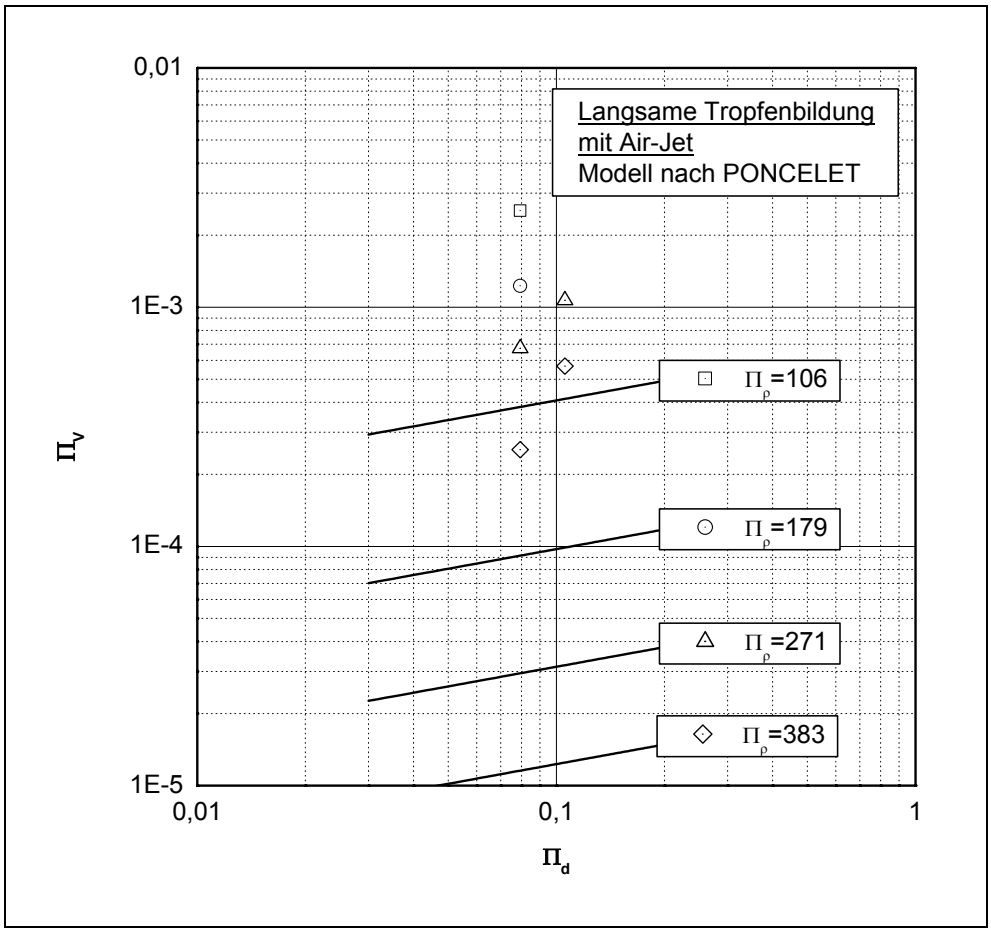


Abb. 5.10: Messwerte nach Tab. 5.7 im Vergleich mit dem Modell nach PONCELET[128]

Das Modell nach Gl. 5.44 erzielt mit einem empirischen Modellparameter eine recht gute Wiedergabe der Messwerte, wie in Abb. 5.11 zu erkennen ist. Die signifikante Abweichung für $\Pi_\rho = 383$ dürfte an einer beginnenden Sekundärtropfenbildung liegen, die deutlich an der Tropfengrößenverteilung erkennbar ist.

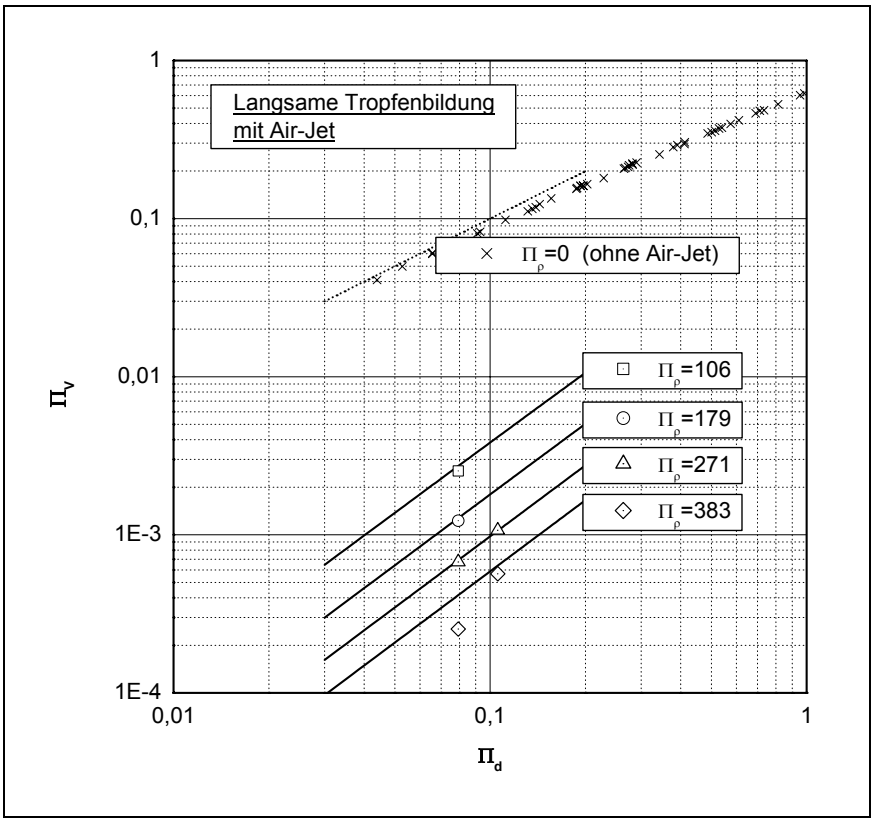


Abb. 5.11: Vergleich der Messwerte Tab. 5.7 mit dem Modell nach Gl. 5.44
Messwerte für $\Pi_\rho = 0$ nach[129, 179]

5.4 Unterschiedliche Verkapselungsverfahren zur Immobilisierung von Zellen

Für die Behandlung von Gehirntumoren sollten genetisch manipulierte Zellen, z. B. Fibroblasten oder Tumorzellen in Mikrokapseln, die aus einer APA-Membran bestehen, immunoprotektiv eingelagert werden, die retrovirale Vektoren zur Behandlung von Gendefekten innerhalb der DNA der Tumorzellen zur Verfügung stellen. Diese sollen wie bereits beschrieben dem Tumor durch Injektion über eine 18 G Kanüle über den Blutkreislauf zugeführt werden.

5.4.1 Pre-Prozess zur Verkapselung von Zellen

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, d. h. es wurde, wenn nicht anders beschrieben, unter einer sterilen Laminar Flow Box der Klasse 2 gearbeitet. Die verwendeten Lösungen und die mit den Lösungen in direktem Kontakt stehenden Bauteile und Gerätschaften der jeweiligen Verkapselungsapparatur wurden durch Autoklavieren steri-

lisiert. Bei temperatursensiblen Stofflösungen konnte die Sterilität durch Filtration durch einen sterilen Filter mit 0,22 µm (Merck Eurolab GmbH, Dresden) gewährleistet werden.

5.4.1.1 Zelllinien und Zellkultivierung

Zur Beurteilung der unterschiedlichen Verkapselungsmethoden für die Eignung zur Verkapselung von lebenden tierischen Zellen standen Fibroblasten von Mäusen der Zelllinie GLI328[32] (PA317)[180], BHK[181] (Baby Hamster Kidney) Fibroblasten[33] und die Zelllinie J3T[182] (Canine Glioma Cells) zur Verfügung[183-185]. Diese wurden in einem Nährmedium bestehend aus DMEM versetzt mit,

- 1 g/l Glukose/Glutamine (Biochrom KG, Berlin),
- 10 % donor calf serum (CS, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe), bei BHK und J3T mit fetal calf serum (FCS, Biochrom KG, Berlin) an Stelle von CS und
- 1 % Penicillin/streptomycin (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe),

in einem Brutkasten bei 37 °C, mit 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 %-iger CO_2 Atmosphäre, gelagert bzw. auf Petrischalen (Biochrom KG, Berlin) mit einem Durchmesser von 10 cm vermehrt.

5.4.1.2 Herstellung von Zellsuspensionen

Zur Suspendierung der einzelnen Zelllinien in Na-Alginat-Lösungen wurden die Monolayer der Zellen mit Hilfe einer Trypsine-EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen) von den Böden der Petrischalen gelöst, mit Phosphat gepufferter Saline (PBS, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) gewaschen und anschließend zu Zellpellets zentrifugiert. Diese Zellpellets wurden entsprechend in die für die einzelnen Verkapselungsmethoden geeigneten Na-Alginat-Lösungen des Typs Fluka 71238 im Volumenverhältnis 1:6 resuspendiert. Die resultierende Zellsuspensionen wurden vor der Verkapselungsprozedur durch ein 40 µm Sieb gefiltert, um ein Verstopfen der verwendeten Kapillare bzw. Düse durch größere Zellverbunde zu vermeiden.

5.4.2 Prozess der Verkapselung von Zellen

Nachfolgend ist der Verkapselungsprozess von lebenden Zellen mit unterschiedlichen Verkapselungsverfahren dargestellt. Dabei sollte insbesondere die Überlebensfähigkeit der Zellen bei den verschiedenen Beanspruchungen durch die Verkapselungsverfahren untersucht werden.
Unabhängig vom Immobilisierungsverfahren wurden die aus den verschiedenen Herstellungsverfahren resultierenden Tropfen in einer 100 mM $CaCl_2$-Lösung, versetzt mit 10 mM MOPS-Puffer, vernetzt. Die Vernetzerlösung wurde, wenn nicht anders beschrieben, in einem 250 ml Becherglas mittels Magnetrührer langsam, bei einer Umdrehungszahl von 200 U/min, gerührt.

5.4.2.1 Verkapselungsprozess mit dem AirJet-Verfahren

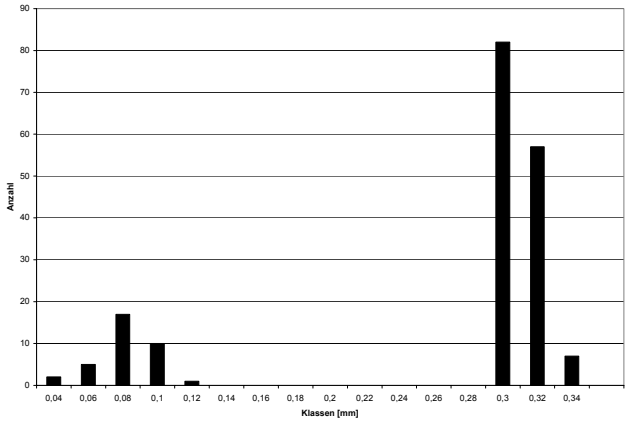
Mit der in Kap. 4.3.2.1 beschriebenen AirJet-Methode konnten die unter Kap. 5.4.1.1 aufgeführten Zelltypen immobilisiert werden.
Nachfolgend ist die Verkapselung der Zelllinie J3T dargestellt, bei der 2 ml einer Zellsuspension aus 1 x 10^7 Zellen/ml einer 1,5 %-igen (w/v) Na-Alginat-Lösung des Typs Fluka 71238 hergestellt wurden.
Um zu dem in der Aufgabenstellung geforderten Durchmesser der Mikrokapseln von 300 µm zu gelangen, wurde die Einstellung der AirJet-Apparatur wie in Tab. 5.8, unter Berücksichtigung der im Kap. 5.2.2 ermittelten Parameter der Apparatur, gewählt.

Tab. 5.8: Parameter der AirJet Apparatur

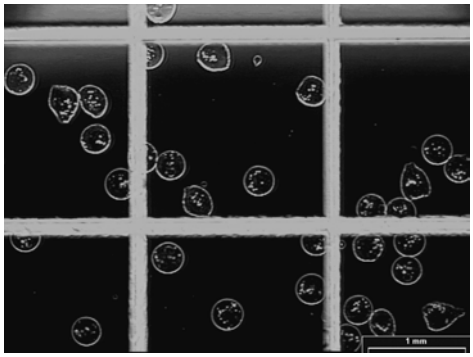
Kapillare C7	Ø 300 µm (außen)
Konzentration/Viskosität der Na-Alginat-Lösung	1,5 % (w/v) / 0,4818 Pa·s
Volumenstrom Na-Alginat -Lösung	10 ml/h
Volumenstrom N_2	4750 l/h

Aus der ermittelten Größenverteilung, dargestellt in Abb. 5.12 a, lässt sich am Beispiel von J3T Zellen deutlich zeigen, daß das AirJet-Verfahren bezüglich der zu erzielenden Größenverteilung geeignet ist, tierische Zellen innerhalb der gewünschten Verteilungsbreite von 100 – 350 µm zu verkapseln.

Entsprechend der geforderten Größen der Mikrokapseln ließ sich jedoch die Ausbildung einer bimodalen Verteilung, mit Sekundärtropfen unterhalb des Größenbereiches von 100 µm nicht vermeiden, jedoch stark einschränken. Diese Sekundärkapseln lassen sich durch den Einsatz von geeigneten Filtern bzw. Sieben, z. B. Siebgewebe 105 µm, separieren.



a)



b)

Abb. 5.12a: Größenverteilung der Microbeads mit immobilisierten J3T Zellen, AirJet-Methode, Na-Alginat Typ Fluka 1,5 % (w/v)
b: Lichtmikroskopische Aufnahme der Kapseln mit den J3T Zellen nach 15 min, Maßstab 1 mm

5.4.2.2 Verkapselungsprozess mit dem JetCutter-Verfahren

Wie in Kap. 3 dargestellt, soll das JetCutter-Verfahren auf seine generelle Eignung zur Immobilisierung von tierischen Zellen untersucht werden.

Für die Verkapselung von GLI328 Zellen mit dem JetCutter-Verfahren wurde eine Zellsuspension aus 2 x 10^6 Zellen und 8 ml einer Na-Alginat-Lösung, 1,5 % (w/v) des Typs Fluka 71238 hergestellt, die anschließend auf ein finales Volumen von 50 ml Na-Alginat-Lösung gegeben wurde.

Diese wurde aus einem Druckbehälter (Eigenentwicklung) mit Stickstoff unter einem Druck von 0,75 bar über eine PTFE-Leitung durch eine Saphirdüse (laser-drilled) mit einem Durchmesser von 200 µm extrudiert und der Suspensionsstrahl durch das Schneidwerkzeug in entsprechende Segmente geteilt. Die resultierenden Tropfen wurden dem Vernetzungsbad, siehe Kap 5.4.2, zugeführt.

Die zugehörigen Parametereinstellungen des JetCutters während des Tropfenbildungsprozesses mit GLI328 Zellen sind in Tab. 5.9 aufgeführt.

Tab. 5.9: Parameter des JetCutters

Düsendurchmesser	200 µm
Drehzahl	6500 U/min
Konzentration / Viskosität der Na-Alginat-Lösung	1,5 % (w/v) / η_0 = 0,4818 Pa·s
Schneidwerkzeug	48 Drähte (Ø 50 µm)
Volumenstrom der Na-Alginatlösung	492 ml/h
Fallhöhe der Tropfen	50 cm

Wie aus der Größenverteilung in Abb. 5.13 zu entnehmen ist, handelt es sich im Vergleich zum AirJet-Verfahren beim Verkapselungsprozess mittels JetCutter um eine monomodale Verteilung.

Es ist zu erkennen, daß mehr als 87 % der entstandenen Mikrokapseln innerhalb des in der Aufgabenstellung geforderten Größenbereiches liegen. Die oberhalb von 350 µm liegenden Mikrokapseln sind auf Koaleszens zurückzuführen, die aufgrund von Kollisionen während des Fluges der Na-Alginat-Tropfen entstanden sind. Resultierend ergibt sich beispielweise bei der Fusion zweier Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 325 µm, eine mit dem doppelten Volumen und einem Durchmesser von nahezu 400 µm Durchmesser.

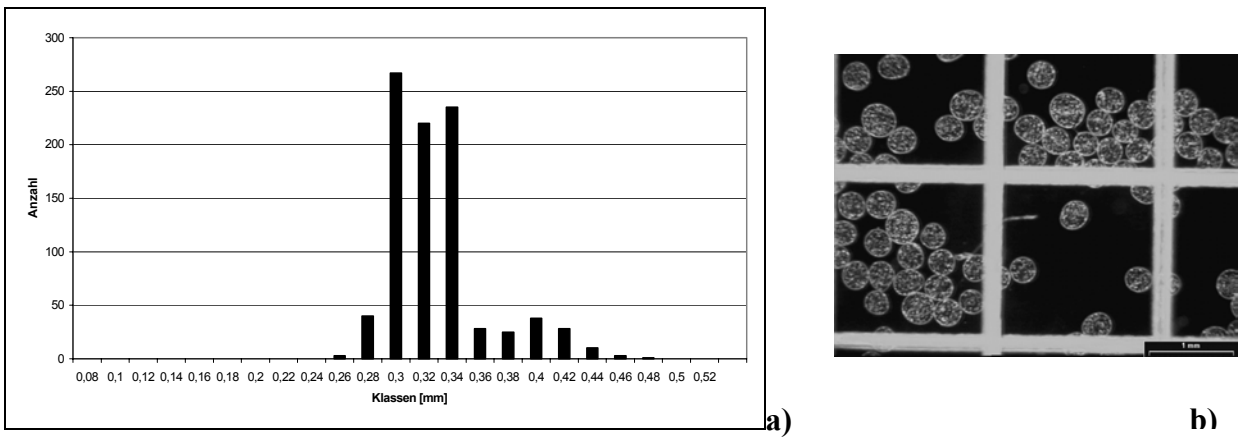


Abb. 5.13 a: Grössenverteilung der Microbeads mit GLI328 Zellen, JetCutter-Verfahren, Na-Alginat Typ Fluka 1,5 % (w/v),
b: Lichtmikroskopische Aufnahme der Kapseln mit GLI328 Zellen nach 15 min, Maßstab 1 mm

5.4.2.3 Verkapselungsprozess mit dem Vibrations-Verfahren

Für die Verkapselung der in Kap. 5.4.1.1 beschriebenen Zelltypen wurden 20 ml einer Zellsuspension, mit einer Zellkonzentration von 1 x 10^7 Zellen/ml Na-Alginat-Lösung, vertropft, wobei, wie bei den vorangegangenen Immobilisierungsverfahren, mit dem Na-Alginat vom Typ Fluka 71238 gearbeitet wurde. Hierbei musste unter Berücksichtigung einer mit diesem Verfahren zu verarbeitenden Na-Alginat-Lösung, eine niedrigere Viskosität von η_0 = 0,1941 Pa·s (entspricht einer Konzentration von 1,0 % (w/v)), eingestellt werden.

Die gewählten Einstellungen zur Verkapselung von z. B. BHK Zellen des von der Inotech AG (Dottikon, Schweiz) vertriebenen Gerätes IEM-40 (Inotech Encapsulator Medical-40) sind in Tab. 5.10 aufgeführt.
Im Gegensatz zur AirJet-Methode und JetCutter-Methode wurde das Gerät speziell für die Verkapselung von pharmazeutischen Produkten oder zur Immobilisierung von Zellen unter GMP (Good Manufacturing Practice) entwickelt.
Zu den Vorteilen zählt im Vergleich der zuvor aufgeführten Verkapselungsverfahren, daß die Apparatur auf Grund eines vollständig geschlossenen und autoklavierbaren Reaktionsbehälters auch außerhalb einer Laminar Flow Box für die Immobilisierung von Zellen unter sterilen Bedingungen nutzbar ist.
Daraus ergab sich, daß die Handhabbarkeit eines solchen mit dem IEM-40 durchgeführten Immobilisierungsversuches, bezogen auf die beengten Platzverhältnisse innerhalb der Flow Box, deutlich verbessert wurde und die Verkapselungsapparatur für den angeführten Versuch auch außerhalb zum Einsatz kam.

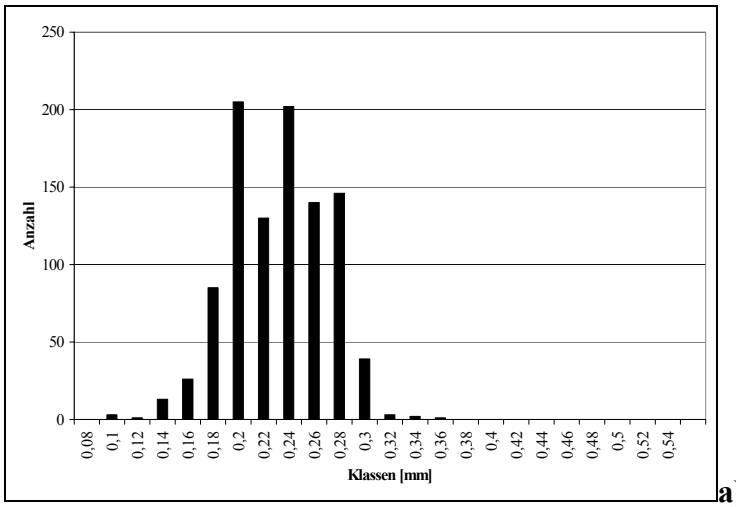
Tab. 5.10: Parameter des IEM-40

Düse	Ø 120 µm
Konzentration / Viskosität der Na-Alginat-Lösung	1,0 % (w/v) / η_0 = 0,1941 Pa·s
Volumenstrom Na-Alginat-Lösung	240 ml/h
Anregungsfrequenz der Düse	3000 Hz

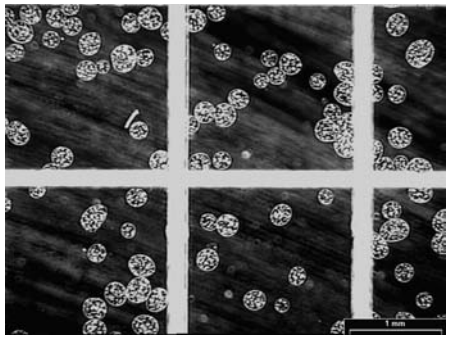
Zusätzlich war es möglich, den entstehenden Tropfenstrahl durch eine Ringelektrode, beaufschlagt mit einem elektrischen Feld von 1,7 kV, zu führen, über die die einzelnen Tropfen elektrisch geladen wurden. Dadurch war es bei hohen Zertropfungsfrequenzen möglich, die

Tropfenkette, aufgrund des gleichartigen Ladungszustandes jedes einzelnen Tropfens, aufzufächern.
Der Vorteil dieser Zusatzausstattung liegt in einer flächenförmigen Auftreffzone der Tropfen. Dadurch konnten die Kollision und die damit verbundenen Koaleszens der Tropfen zu größeren Teilchen zwischen Düse und Vernetzungsbad, vermieden bzw. sehr stark eingeschränkt werden.

Wie beim JetCutter-Verfahren entstand beim Vibrations-Verfahren zur Immobilisierung von BHK Zellen ebenfalls eine monomodale Größenverteilung, dargestellt in Abb. 5.14 a. Die hergestellten Mikrokapseln entsprachen dem geforderten Größenbereich (siehe Kap. 3), wobei sich alle gebildeten Microbeads innerhalb des Bereiches von 100 – 350 µm befanden.
Im Vergleich zum AirJet- und JetCutter-Verfahren ist es dadurch möglich, beim Vibrations-Verfahren auf zusätzliche Separationsschritte, wie z. B. Filtration oder Siebung, zu verzichten.



a)



b

Abb. 5.14a: Größenverteilung der Microbeads mit immobilisierten BHK Zellen, Vibrations-Methode, Na-Alginat Typ Fluka 1,0 % (w/v)
b: Lichtmikroskopische Aufnahme der Kapseln mit den BHK Zellen nach 15 min, Maßstab 1 mm

5.4.3 Post-Prozess der Verkapselung von Zellen

Nach jedem einzelnen der unter Kap. 5.4.2 aufgeführten Immobilisierungsprozesse wurden die Alginatkapseln durch Sieben von der $CaCl_2$-Vernetzungslösung getrennt, wobei eine maximale Verweilzeit der Mikrokapseln von 15 min nicht überschritten wurde.

Anschließend wurden die Microbeads zur Beschichtung einem standardisierten Alginat-Poly-$_L$-Lysin-Alginat (APA) Protokoll[24] unterzogen. Im Unterschied zu Lim und Sun[24] wurden die zellimmobilisierenden Mikrokapseln in eine 0,1 % (w/v) Poly-$_L$-Lysin (PLL) Lösung überführt, die nach 10 min dekantiert wurde. Danach wurden die Kapseln mit einer Zellpufferlösung, bestehend aus wässriger 10 mM MOPS- Lösung, zweimalig gewaschen, die überstehende MOPS-Lösung dekantiert und zur Beschichtung mit einer äußeren Alginatschicht in 0,03 % (w/v) Na-Alginat-Lösung für 10 min überführt und nach Ablauf der Zeit der Überstand abgesaugt und ebenfalls mit 10 mM MOPS- Lösung gewaschen.
Zur Ausbildung der semipermeablen APA-Membran ließ sich nach Dekantieren des überstehenden MOPS-Puffers der Alginatkern mit 50 mM trisodium-Citrate Puffer innerhalb von 30 min auflösen. Nach einem erneuten Waschschritt mit MOPS-Puffer wurden die APA-Mikokapseln in 75 cm^2 Zellkulturflaschen (Biochrom KG) überführt. Die Aufrechterhaltung des Metabolismus der immobilisierten Zellen wurde durch Zugabe von Nährmedium gesichert, welches wöchentlich erneuert wurde.

5.4.4 Vergleich der verschiedenen Verkapselungsmethoden

5.4.4.1 Vergleich anhand des Zellwachstums

5.4.4.1.1 AirJet- und Vibrations-Verfahren

Nach dem Verkapselungsprozess der Zellen konnte bei allen verwendeten Verkapselungsverfahren das Überleben der Zellen anhand von spontan einsetzender Bildung von Zellverbunden innerhalb eines Zeitraumes von 24 h, Abb. 5.15a, nachgewiesen werden.

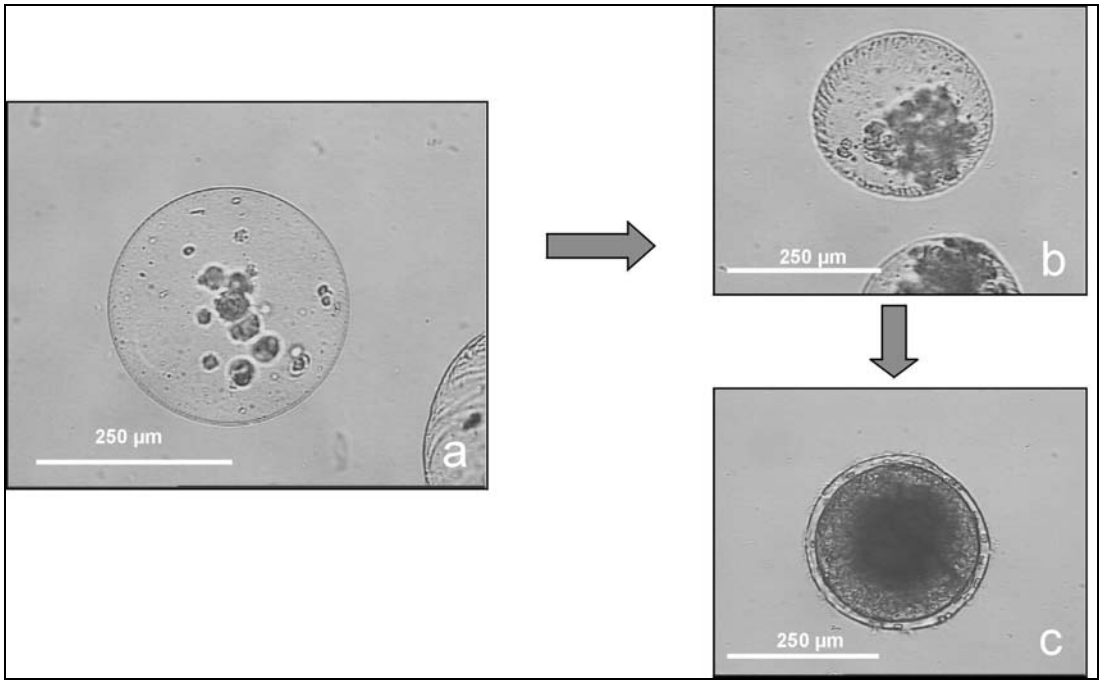


Abb. 5.15: Immobilisierte J3T-Zellen in APA-Mikrokapseln, hergestellt mit dem Vibrations-Verfahren a) nach 1 Tag, b) nach 7 Tagen, c) nach 30 Tagen

Bezüglich des Zellwachstums konnte beim AirJet- und Vibrations-Verfahren, bei einer Zellkonzentration von $1x10^7$ Zellen pro ml Na-Alginat, bereits nach 7 Tagen eine Vermehrung der Zellen innerhalb der Microbeads festgestellt werden, die auf entsprechende Vitalität der Zellen schließen lässt. Nach 30 Tagen waren die Mikrokapseln schließlich durch die immobilisierten Zellen komplett ausgefüllt.

Bezüglich des Zellwachstums ließen sich keine Unterschiede zwischen dem AirJet- und dem Vibrations-Verfahren aufzeigen.

5.4.4.1.2 JetCutter-Verfahren

Beim JetCutter-Verfahren konnte ebenfalls der Erhalt der Vitalität der Zellen, anhand der Bildung von Zellverbunden, analog Abb. 5.15 a, nachgewiesen werden.

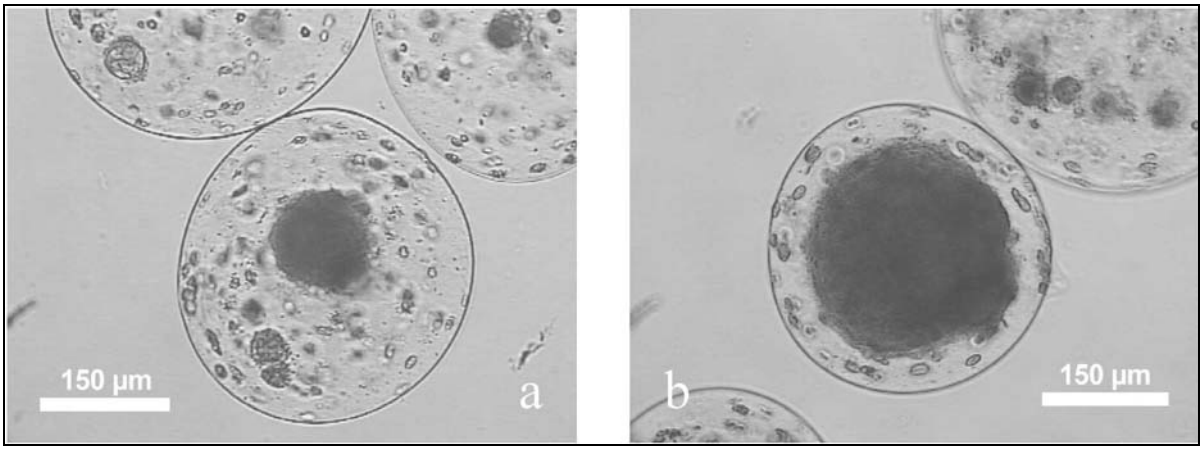


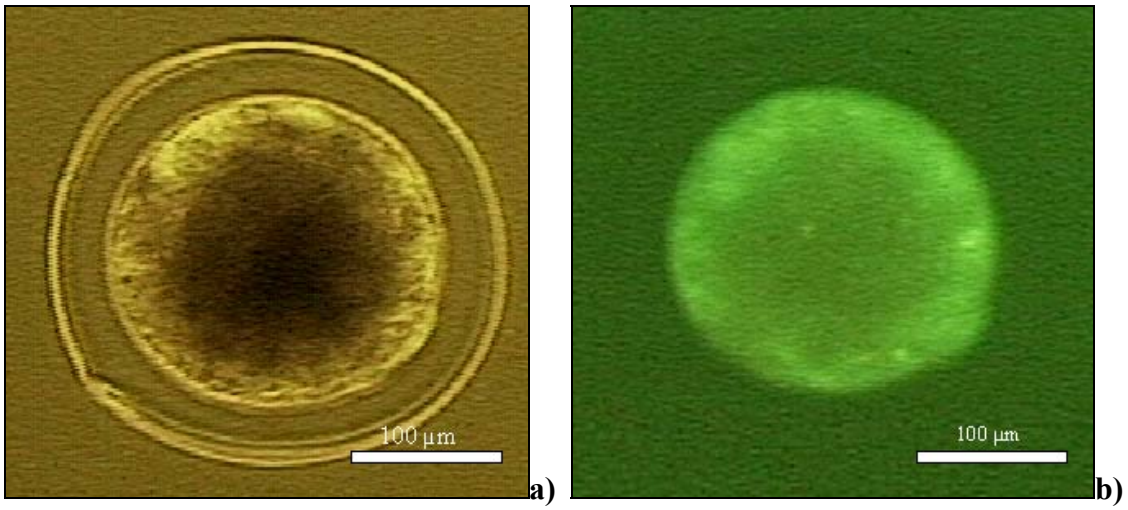
Abb. 5.16: Immobilisierte GLI328 Zellen in APA-Mikrokapseln, hergestellt mit dem JetCutter-Verfahren,
a) nach 30 Tagen,
b) nach 40 Tagen

Zwar ist Abb. 5.16 a und Abb. 5.16 b, im Vergleich zum Zeitraum der Vermehrung der Zellen beim AirJet- und Vibrations-Verfahren, ein verzögertes Zellwachstum zu entnehmen. Jedoch liegt die Ursache für ein unterschiedliches Zellwachstum in der deutlich niedrigeren Zellkonzentration, resultierend aus ungleicher Zellbeladung innerhalb der hergestellten Kapseln und damit nicht identischen Ausgangsbedingungen für den Vergleich des Zellwachstum der verwendeten Immobilisierungsverfahren.
Grundsätzlich ist diese Beobachtung nicht auf die Einschränkung der Vitalität bzw. Schädigung der Zellen durch den Verkapselungsprozess, beispielsweise durch zu hohe Beanspruchung der Zellen beim Passieren der Düse oder dem Schneidprozess des Strahles, der verwendeten Zellsuspension zurückzuführen.

Weiterführende Betrachtungen, z. B. Aussagen zum Freisetzungsverhalten von retroviralen Vektoren (RV), Aussagen zur Immunoprotektion oder dem Verhalten der in Ratten implantierten, zellimmobilisierenden Mikrokapseln und der damit verbundenen therapeutischen Eignung, sind nicht Gegenstand dieser Arbeit, hier wird auf die entsprechende Literatur verwiesen[183, 186].

5.4.4.1.3 Nachweis der Lebensfähigkeit immobilisierter Zellen

Für den Nachweis der Vitalität dienten Mikrokapseln, in den Zellen über einen Zeitraum von 12 Wochen immobilisiert waren. Diese *in vitro* gelagerten zellimmobilisierenden Mikrokapseln wurden mit einer Lösung aus Acredine Orange (AO) und Ethidium Bromide (EtBr), im Mischungsverhältnis 1 : 3, über einen Zeitraum von drei Minuten versetzt, um mittels Fluoreszensmikroskopie die Lebensfähigkeit der Zellen charakterisieren zu können. Augenmerk für die Vitalität der Zellen ist hierbei die Einfärbung der DNA der immobilisierten Zellen durch Anbindung von AO, welche sich in einen gelbgrünen Farbton äußert.
Wie der Abb. 5.17b zu entnehmen ist, kann von einer ausgezeichneten Überlebensfähigkeit der Zellen ausgegangen werden. Durch den den gleichmäßigen Farbverlauf, ist bei der Größe der Mikrokapseln von ca. 260 µm, nicht von davon auszugehen, daß nekrotischen Bereiche vorliegen.



a) **b)**

Abb. 5.17: Nachweis der Zellvitalität mikroverkapselter Zellen (nach 12 Wochen),
a) Lichtmikroskopische Aufnahme einer Mikrokapsel,
b) Fluoreszierende Darstellung der DNA durch Anbindung an AO

5.4.4.2 Vergleich anhand verfahrenstechnischer Betrachtungen

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, eigenen sich die in dieser Arbeit untersuchten Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln, AirJet-, JetCutter- und Vibrations-Verfahren, zur Immobilisierung von Zellen, ohne daß Einschränkungen bezüglich der Vitalität und des Wachstums der Zellen erkennbar waren.
Hingegen lassen sich unter verfahrenstechnischen Betrachtungen deutliche Unterschiede, ausgehend von den in Kap. 2.2 aufgeführten Eigenschaften, der für die einzelnen Immobilisie-

rungsverfahren von Zellen unter Berücksichtigung der zu erzielenden Größe der Mikrokapseln von 100 - 350 µm aufzeigen.

5.4.4.2.1 Einsetzbare Viskositätsbereiche

Ausgehend davon, daß die mechanische Stabilität der zu bildenden Mikrokapseln bei Zunahme der Konzentration von Na-Alginat an der Lösung mit gleichzeitigem Zuwachs der Viskosität ebenfalls ansteigt[3], können dem JetCutter-Verfahren deutliche Vorteile, gegenüber dem AirJet- und Vibrations-Verfahren zugesprochen werden. Diese Vorteile lassen sich auf den eigentlichen Tropfenbildungsprozess, der im Gegensatz zu den beiden anderen Verfahren auf dem mechanischen Heraustrennen von Flüssigkeitszylindern beruht, verbunden mit einem nachteiligen Betriebsverlust, zurückführen. Demnach lässt sich dem JetCutter-Verfahren ein Viskositätsbereich oberhalb einer Viskosität η_0 = 0,4 Pa·s zuordnen, bei dem das AirJet-Verfahren unter Einschränkungen und das Vibrations-Verfahren nicht mehr, hinsichtlich der anzustrebenden Microbeadgrößen, zu verwenden sind. Unter Betrachtung der Beanspruchung der Zellen beim Verkapselungsprozess muss jedoch bei steigender Viskosität mit einer zunehmenden Belastung der zu verkapselnden Zellen durch Scherkräfte innerhalb der Düse und einer damit verbundenen Herabsetzung der Vitalität bis hin zum Absterben der Zellen gerechnet werden.
Alternativ ließ sich bei niedrigeren Viskositäten das AirJet-Verfahren für den Immobilisationsprozess, innerhalb eines Viskositätsbereiches η_0 von 0,18 bis 0,50 Pa·s einsetzen. Hierbei musste jedoch am oberen Bereich der einzusetzenden Viskosität, in Abhängigkeit der verwendeten Kapillardurchmesser, mit einem entsprechend niedrigen Volumenstrom von 10 ml/h der Na-Alginat-Lösung bzw. Zellsuspension gearbeitet werden. Im Vergleich zum JetCutter-Verfahren ergab sich hierbei ein deutlich niedrigerer Durchsatz von nur 2 % bezogen auf den Volumenstrom der verwendeten Zellsuspension, womit der Einsatzbereich des AirJet-Verfahrens eher der Herstellung von Kleinstmengen an zellimmobilisierenden Mikrokapseln, beispielsweise bei der Behandlung eines einzelnen Individuums, zuzuordnen ist.
An der unteren Grenze des Viskositätsbereiches muss bei der AirJet-Methode die Auftreffgeschwindigkeit der Tropfen auf der Oberfläche der $CaCl_2$-Lösung, hervorgerufen durch die Strömungsgeschwindigkeit des Stickstoffstroms und der damit verbundenen Beschleunigung der Tropfen nach dem Abreißen von der Kapillare, berücksichtigt werden. Eine zu hohe Eintauchgeschwindigkeit der Tropfen führt zur unförmigen Ausbildung der Partikel, die auf

Grund der hohen Vernetzungsgeschwindigkeit der Na-Alginat-Lösung durch Ca^{2+}-Ionen nicht reversibel ist und somit fixiert wird. Ein typisches Erscheinungsbild, unabhängig vom verwendeten Alginattyp, jedoch mit vergleichbarer Viskosität, ist in Abb. 5.18 dargestellt.

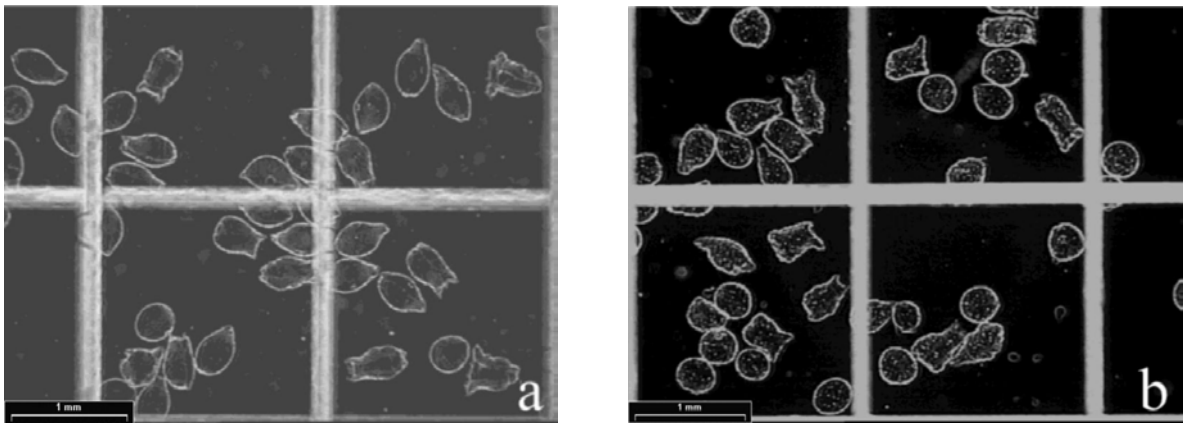


Abb. 5.18: Deformierte Mikrokapseln auf Grund zu niedriger Viskosität, $\dot{V}_{N_2}$ = 4750 l/h, Kapillare C7, hergestellt mit dem AirJet-Verfahren,

a) Mikrokapseln aus Na-Alginat vom Typ Inotech, mit η_0 = 0,1817 Pa·s (2,0 % (w/v)) (Maßstab 1mm)

b) Mikrokapseln aus Na-Alginat vom Typ Fluka, mit η_0 = 0,1941 Pa·s (1,0 % (w/v)) (Maßstab 1mm)

Eine Möglichkeit der Verbesserung für das Eintauchverhalten der Tropfen und einer möglichen Erweiterung des einsetzbaren Viskositätsbereiches, könnte die Herabsetzung der Oberflächenspannung der $CaCl_2$-Lösung durch den Einsatz von Tensiden sein. Hierbei muss jedoch ein negativer Einfluss des verwendeten Tensids gegenüber den zu verkapselnden Zellen, im Hinblick auf deren Vitalität, durch Verwendung geeigneter Tenside, z. B. anionischer oder nichtionischer Tenside, vermieden werden. Eine zusätzliche Verbesserung der erzielten Kapselgrößen, bezüglich einer monomodalen Verteilung mit schmalerer Verteilungsbreite, ließe sich ebenfalls mit dem damit verbundenen Einsatz niedrigviskoserer Na-Alginat-Lösungen bzw. Zellsuspensionen erzielen.

Beim Vibrations-Verfahren lassen sich hingegen unter der Berücksichtigung der zu erzielenden Microbeadgrößen von 100 – 350 µm, bedingt durch die Kopplung an Fluide, die nah am NEWTON'schen Verhalten liegen müssen, nur niedrigviskose Na-Alginat-Lösungen bzw. Zellsuspensionen, mit einer Viskosität η_o von 0,03 – 0,20 Pa·s verarbeiten. Hierbei ist an der oberen Grenze des Viskositätsbereiches eine deutliche Zunahme der Verteilungsbreite der Mikrokapseln zu verzeichnen. Zurückzuführen ist dies auf eine offensichtliche Einschränkung

der zu übertragenden Störung in Form der Überlagerung des Fluidstrahls mit der ihm auferlegten Frequenz.

Eine Verbesserung bezüglich der Verteilungsbreite der Mikrokapseln ließe sich durch den Einsatz von Na-Alginat-Lösungen mit niedrigerer Viskosität, wie in Abb. 5.19 dargestellt, erzielen. Hierbei muss aber eine zu erwartende Abnahme der mechanischen Stabilität der Mikrokapseln berücksichtigt werden.

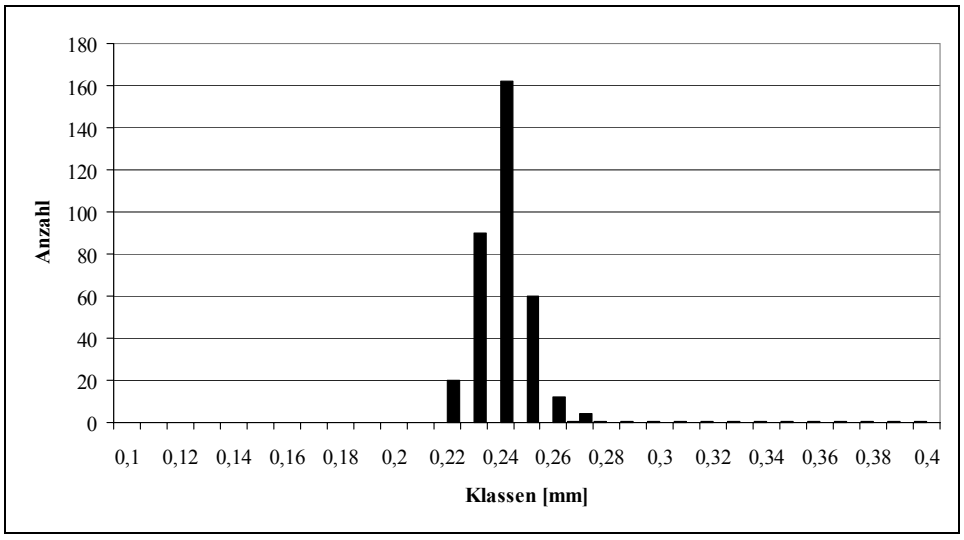


Abb. 5.19: Verteilungsbreite der Mikrokapseln bei Verwendung des Vibrations-Verfahrens und einer Na-Alginat-Lösung des Typs Inotech, η_0= 0,0766 Pa·s, Düse = 120 µm, F = 3500 Hz, $\dot{V}_{Alg}$ = 240 ml/h

Eine Darstellung des jeweiligen Viskositätsbereiches der einzelnen zellimmobilisierenden Mikroverkapselungsverfahren ist in der Abb. 5.20 noch einmal zusammenfassend dargestellt.

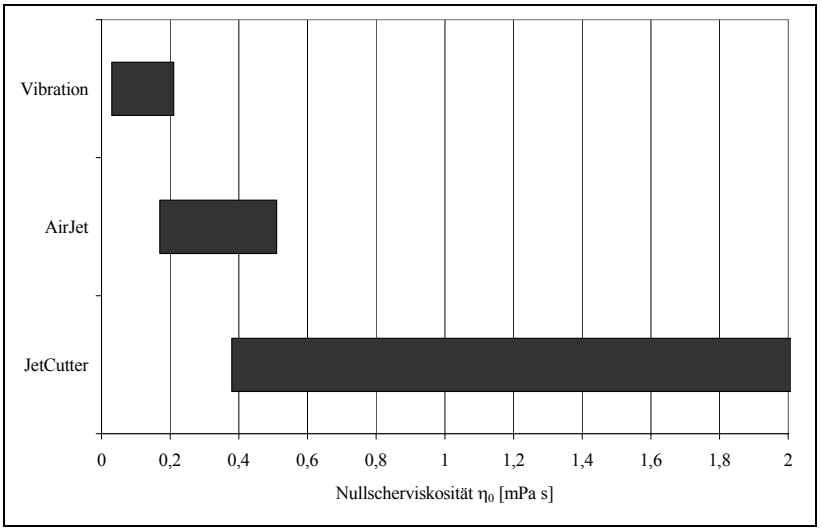


Abb. 5.20: Viskositätsbereiche der verwendeten Immobilisierungsverfahren

5.4.4.2.2 Einschätzung der praktischen Einsetzbarkeit der Verfahren

Wie bereits beim AirJet-Verfahren erwähnt, lassen sich bezüglich der produzierten Menge an Mikrokapseln entsprechende Einsatzgebiete aufzeigen. Unter Betrachtung der Nutzung einer einzelnen Düse beim JetCutter- und Vibrations-Verfahren bzw. der Nutzung einer einzelnen Kapillare beim AirJet-Verfahren und des jeweiligen der Immobilisierungsmethode zuzuordnenden Viskositätsbereiches, lassen sich nachfolgende Aussagen treffen.
Für den Einsatz bei kleinen Probenmengen von maximal 2 ml, z. B. für klinische Studien an und mit mikroverkapselten Zellen mit begrenzter Verfügbarkeit, z. B. autogenen Ursprungs, oder die Immobilisierung von Zellen mit eingeschränktem Wachstum, z. B. genmodifizierte Zellen zur Produktion retroviraler Vektoren, ist das AirJet-Verfahren die zu bevorzugende Variante. Dafür sprechen beispielsweise das zügige Anfahrverhalten, verbunden mit der schnellen Produktion an Mikrokapseln mit der gewünschten Größe, bei sehr niedrigem Verlustvolumen und gegenüber den anderen beiden Verfahren den niedrigsten Investitionsausgaben bei dieser Apparatur zur Immobilisierung von Zellen durch Mikroverkapselung.
Für eine großtechnische Produktion zellimmobilisierender Mikrokapseln, im Hinblick auf ein breites Einsatzgebiet mit Zellsystemen allo- oder xenogenen Ursprungs, die entsprechend schnell zu vermehren sind, ist das Vibrations-Verfahren mit einem Durchsatz von 240 ml/h oder das JetCutter-Verfahren mit bis nahezu 500 ml/h zu bevorzugen.

5.4.4.2.3 „Scale Up“ der Verfahren

Generell ist bei allen drei verwendeten Verfahren ein „Scale Up“ bei der Herstellung von Mikrokapseln, durch Erhöhung der eingesetzten Anzahl an Düsen bzw. Kapillaren, unter Berücksichtigung des zu verwendenden Viskositätsbereiches, möglich.
Beispielsweise lassen sich beim Vibrations-Verfahren in einer Platte mit einem Durchmesser von 12 cm 17 Düsen unterbringen, bei denen jedoch im Vergleich zum IEM-40 die Vibrationen direkt auf die Na-Alginat-Lösung bzw. Zellsuspension übertragen wird. Hierbei ergibt sich für das Vibrations-Verfahren, unter Betrachtung der durch jede einzelne Düse hervorgebrachten Na-Alginat-Tropfen bzw. Zellsuspensionstropfen und der daraus resultierenden Kapselgrößen mit enger Verteilungsbreite, der deutlichste Vorteile gegenüber dem JetCutter-Verfahren. Bei letzterem können unter Berücksichtigung eines optimalen Schnittwinkels nur zwei gegenüberlegende Düsen auf der geneigten Schnittebene zu vergleichbaren Größen der

Microbeads führen. Dennoch ist eine Prozessführung mit mehr als zwei Düsen beim JetCutter bei denen unter den Verhältnissen des Diagonalschnittes (JetCutter nicht geneigt) identische Schnittverhältnisse zwischen Düse und Schneidwerkzeug vorliegen, möglich. Nachteil ist hierbei ein deutlich erhöhter Betriebsverlust, der sich aus dem Schnitt- und Spritzverlust zusammensetzt.

5.5 Charakterisierung elasto-mechanischer Eigenschaften von Mikrokapseln

Für die Charakterisierung der elasto-mechanischen Eigenschaften ist die akustische Impedanz ein geeigneter Parameter, da diese von der Dichte und der Schallgeschwindigkeit im Medium abhängt, wobei insbesondere letztere stark von elastischen Eigenschaften abhängt.
Während durch die Scanning Acoustic Microskopy SAM die akustische Impedanz Z direkt ermittelt werden kann, vergleiche Kap. 4.4.2, ist es auch möglich, diese auf indirektem Wege, unter Bestimmung der in Gl. 4.25 aufgeführten Größen, zu ermitteln. Über geeignete Messverfahren lassen sich die Dichte ρ, z. B. durch das Auftriebsverfahren, und die Schallgeschwindigkeit c, z. B. durch die Laufzeitanalyse einer Schallwelle innerhalb eines Probekörpers, bestimmen und daraus die akustische Impedanz Z berechnen.

5.5.1 Bestimmung der akustischen Impedanz mittels Bulk Methode

Dieses Verfahren ist bei entsprechend hoher Genauigkeit bei der Bestimmung von Dichte und Schallgeschwindigkeit, für die Ermittlung von Z geeignet und sollte gemäß Gl. 4.25 zu identischen Werten im Vergleich zur Untersuchung mittels SAM führen.

5.5.1.1 Präparation der Probekörper

Die für die Ermittlung der Dichte ρ und Schallgeschwindigkeit c benötigten Probekörper wurden mit Hilfe von Zellkulturtestplatten (Wellplatten 24-fach, Firma TPP, Schweiz) hergestellt. Hierbei wurden die Kavitäten mit Na-Alginat-Lösungen des Typs Fluka gefüllt und langsam in eine Kristallisationsschale mit $CaCl_2$-Lösung, 1,5 % (w/v), getaucht. Nach 30 Sekunden wurden die Zellkulturtestplatten mit dem zugehörigen Deckel versehen. Nach 24 Stunden konnten die zylindrischen Probekörper entnommen und in frische $CaCl_2$-Lösung, 1,5 % (w/v), zur Lagerung überführt werden. Die für die Messreihe verwendeten Na-Alginat-Lösungen wiesen Konzentrationen von 0,1, 1,25, 1,5, 1,75 und 2,0 % (w/v) auf und entsprachen somit den Anforderungen für eine Verarbeitung mit den zur Verfügung stehenden Immobilisierungsverfahren.

5.5.1.2 Dichte vernetzter Alginatprobekörper

Zur Ermittlung der Dichte von Probekörpern aus vernetztem Alginat wurde die Auftriebsmethode eingesetzt. Hierfür fand eine Analysenwaage (Sartorius, Typ BP 121S) Verwendung, die über einen Aufsatz für die Dichtebestimmung mittels Auftriebsmethode verfügte.
Als Auftriebsmedium diente zweifach deionisiertes und sterilgefiltertes Wasser, dessen Dichte analog der Dichtemessung von Na-Alginat-Lösungen in Kap. 5.1.3 bestimmt bzw. überprüft wurde. Um Änderungen der Dichte während der Messungen zu vermeiden, wurden die zylindrischen Probekörper 2 Stunden und anschließend 12 Stunden in zweifach deionisierten und sterilgefilterten Wasser gelagert.
Die ermittelten Werte sind in Abb. 5.21 dargestellt. Der Einfluss der Temperatur von 23 °C während der Messung wurde bei der Berechnung entsprechend berücksichtigt. Zur Ermittlung der Dichtewerte wurden sechs Probezylinder jedes einzelnen Konzentrationsschrittes analysiert und die Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen von ± 0,0003 g/cm^3, berechnet.

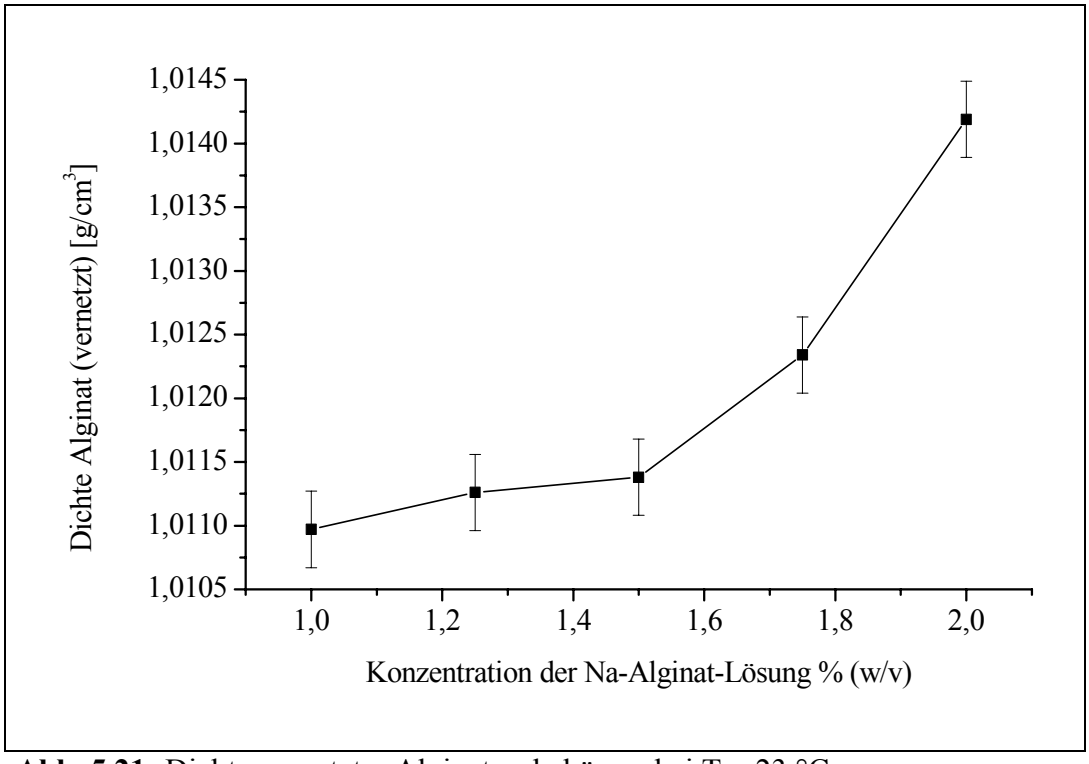


Abb. 5.21: Dichte vernetzter Alginatprobekörper bei T = 23 °C

5.5.1.3 Schallgeschwindigkeit in Alginatprobekörpern

Die Bestimmung der longitudinalen Schallgeschwindigkeit in den Alginatprobekörpern erfolgte mit einer Puls-Echo-Methode, schematisch dargestellt in Abb. 5.22.

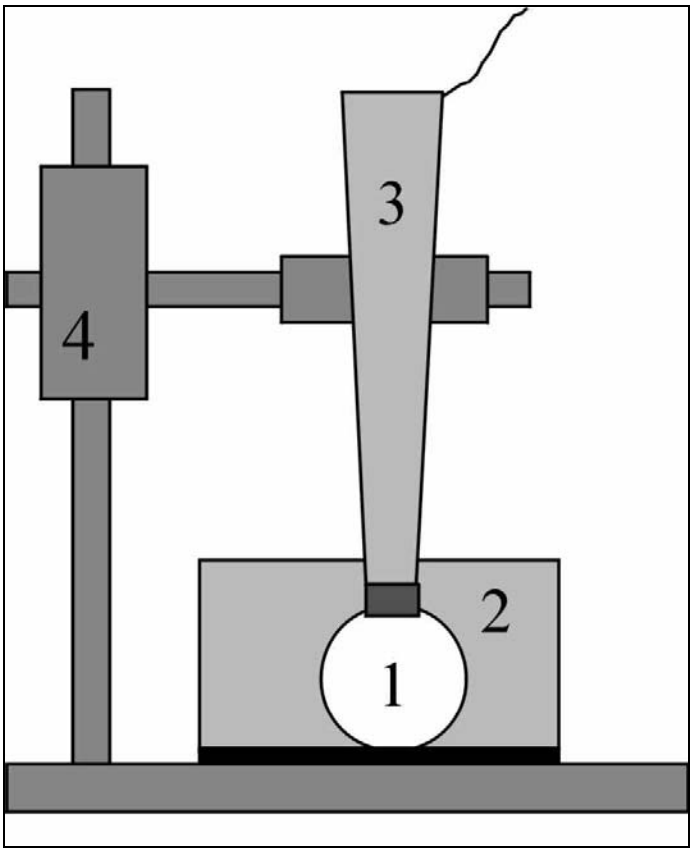


Abb. 5.22: Schema zur Bestimmung der Schallgeschwindigkeit, 1: Probekörper, 2: Wassertank, 3: Ultraschallwandler, 4: z-Verschiebung

Zur Analyse der longitudinalen Schallgeschwindigkeit dienten sechs Probezylinder aus vernetztem Alginat pro Konzentrationsschritt, die an je drei Stellen vermessen wurden.
Die Probekörper aus Alginat wurden auf einen - sich in einem mit zweifach deionisiertem Wasser gefüllten Tank befindlichen - planen und polierten Edelstahlreflektor gelegt und mit dem Ultraschallwandler, Durchmesser 5 mm, gehalten.
Für die Bestimmung der longitudinalen Schallgeschwindigkeit wurde dieser Haltepunkt als Nullpunkt gesetzt und die Laufzeit t_{p1} eines Schallimpulses ($f = 6$ MHz) zwischen Wandler und Reflektor ermittelt. Hierfür fand ein Digitaloszilloskop LeCroy 9430 Anwendung.
Für die Bestimmung der Schallgeschwindigkeit nach Gl. 5.46 wurde der Schallwandler um einen z-Wert von 25 µm verstellt, um die Laufzeit t_{p2} zu ermitteln. Bei kleinen Änderungen

von z ist davon auszugehen, daß eine elastische Deformation des Probekörpers aus vernetztem Alginat vorliegt und keine signifikante Änderung der Dichte zu verzeichnen ist.

$$c = \frac{2z}{t_{p1} - t_{p2}} \qquad \textbf{Gl. 5.46}$$

Die aus der Bulk Methode ermittelten Werte der Dichte ρ_{Alg}, der Schallgeschwindigkeit c (nach Gl. 5.46) der Probekörper aus Alginat, in Abhängigkeit von der Konzentration der verwendeten Na-Alginat-Lösung zur Herstellung der Alginatprobekörper, ist zusammenfassend der Tab. 5.11 zu entnehmen.
Zusätzlich ist es anhand von ρ_{Alg} und c_{Alg}, der Gl. 4.25 und Gl. 4.26, vergleiche Kap. 4.4.2.2, möglich, die akustische Impedanz Z und die akustische Steifigkeit C_{11} der Alginatprobekörper zu berechnen.
Diese Werte können ebenfalls der Tab. 5.11 entnommen werden.

Tab. 5.11: Ermittelte Größen aus der Bulkmethode

Na-Alginat c_{Alg} [%(w/v)]	**Dichte** ρ_{Alg} [g/cm³]	**Schallgeschwindigkeit** c_{Alg} [m/s]	**Akustische Impedanz Z** [Mrayl]	**Akustische Steifigkeit** C_{11} [GPa]
1,0	1,0110	1,4916	1,5080	2,2493
1,25	1,0113	1,4978	1,5147	2,2688
1,5	1,0114	1,5006	1,5080	2,2775
1,75	1,0123	1,5094	1,5280	2,3063
2,0	1,0142	1,5284	1,5501	2,3692

5.5.2 Charakterisierung mittels akustischer Rastermikroskopie

Wie bereits in Kapitel 3 und 4.4 aufgeführt, soll die Eignung der akustischen Rastermikroskopie oder auch Scanning Acoustic Microskopy (SAM) zur Charakterisierung elastomechanischer Eigenschaften betrachtet werden. Für die durchzuführenden Untersuchungen stand ein akustisches Rastermikroskop SAM 2000 (Kraemer Scientific Instruments, Herborn) zur Verfügung, das bei allen durchgeführten Messungen mit einer Frequenz von 0,9 GHz,

einer Breitbandlinse (0,8 – 1,3 GHz, Öffnungswinkel ω = 100°, Fokustiefe z = 40 µm), im burst mode betrieben wurde. Als Kopplungsmedium fand deionisiertes und entgastes Wasser, wegen seiner bekannten akustischen Impedanz, z. B. Z_{H_2O} = 1,480 Mrayl (bei 20 °C)[155], Verwendung.

5.5.2.1 Kalibrierung des SAM 2000

Für die quantitative Bestimmung der akustischen Impedanz muss das SAM entsprechend kalibriert werden. Für die Kalibrierung standen für den hohen Impedanzbereich Zylinder mit polierten planparallelen Deckflächen aus PMMA und Polycarbonat zur Verfügung. Zur Abdeckung des Bereiches mit niedriger akustischer Impedanz konnten Probenzylinder mit der bekannten akustischen Impedanz, vergleiche Kap. 5.5.1, aus 2,0 % (w/v) Na-Alginat des Typs Fluka verwendet werden. Zusätzlich konnten für die Kalibrierung Probekörper, gewonnen aus einer erstarrten wässrigen Agarose-Lösung 2 % (w/v), Carl Roth GmbH + Co, Artikel - Nr. 6352.2, mit einer akustischen Impedanz von 1,38 Mrayl genutzt werden. Die daraus resultierende Funktion zur Berechnung der akustischen Impedanz ergibt sich aus dem Fitten der einzelnen Kalibrierungspunkte der einzelnen oben benannten Proben, die einer Funktion exponentieller Abnahme zweiter Ordnung entspricht, diese ist in Abb. 5.23 graphisch dargestellt.

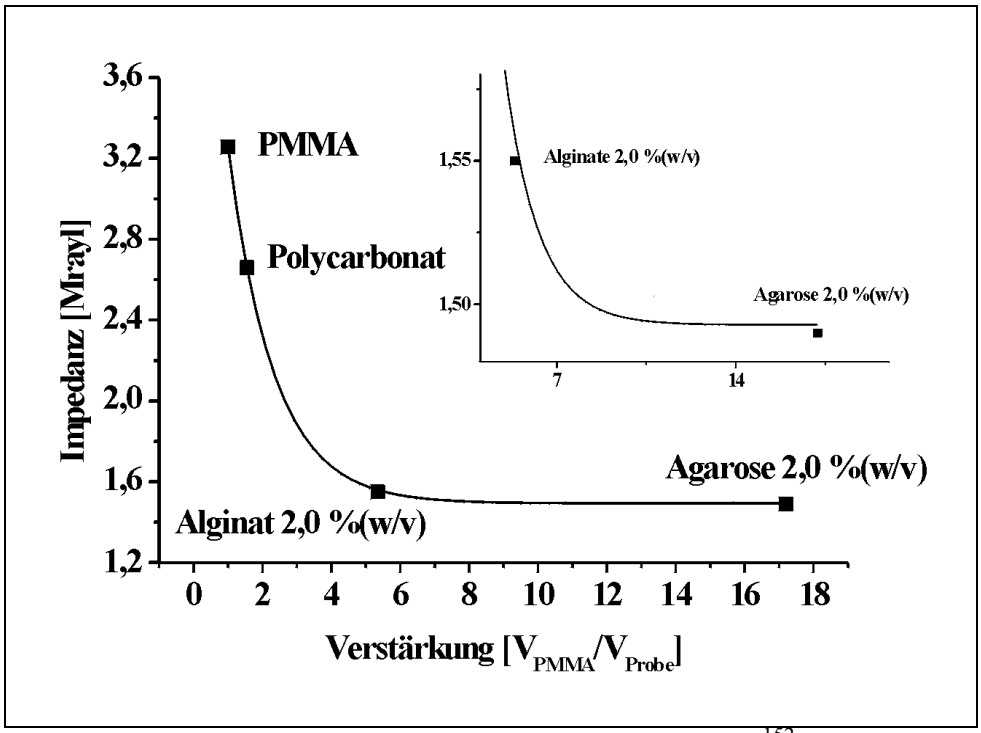


Abb. 5.23: Graphische Darstellung der Kalibrierung des SAM[152]

Die mathematische Formulierung der Fitfunktion zur Berechnung der akustischen Impedanz Z mit PMMA als Referenzprobe ist in Gl. 5.47 aufgeführt.

$$Z = 1{,}50242 + 4{,}43749 \cdot e^{\frac{X_2}{1{,}19838}} - 1{,}26912 \cdot e^{-\frac{X_2}{0{,}5}} \qquad \textbf{Gl. 5.47}$$

Aus Gl. 5.48 lässt sich X_2 aus dem Produkt des Grauwertfaktor der Probe F_{GW}, bezogen auf PMMA und dem Verstärkungsfaktor der Probe F_{RF}, bezogen auf den Verstärkungsfaktor von PMMA, ermitteln.

$$X_2 = F_{GW} \cdot F_{RF} \qquad \textbf{Gl. 5.48}$$

Für F_{GW} lässt sich nachfolgender Zusammenhang, dargestellt in Gl. 5.49,

$$F_{GW} = a_i \cdot (GW_{PMMA} - GW_{Probe}) \qquad \textbf{Gl. 5.49}$$

mit,

$$a_i = 1{,}00445 \qquad \textbf{Gl. 5.50}$$

formulieren.

5.5.2.2 Akustische Impedanz von Mikrokapseln aus Na-Alginat

Zur Bestimmung der akustischen Impedanz wurde Na-Alginat des Typs Fluka gewählt. Grundlage für diese Entscheidung lag in der erfolgreichen Immobilisierung von Zellen mit den im Kap. 5.4.2 verwendeten Verkapselungsverfahren, die mit diesem Na-Alginat Typ durchgeführt wurden und dem damit verbundenen Interesse der Charakterisierung der elasto-mechanischen Eigenschaften dieses Na-Alginates.
Für die SAM Untersuchungen wurden Na-Alginat-Lösungen mit den Konzentrationen 1,0 - 2,0 % (w/v) und mit einer Schrittweite der Konzentration von 0,25 % (w/v) stets frisch hergestellt und mit dem AirJet-Verfahren vertropft. Für die Herstellung von Mikrokapseln

wurde die Kapillare C7 und ein Volumenstrom an Stickstoff $\dot{V}_{N_2}$ = 4000 l/h genutzt. Die dabei erzielten Größen der Mikrokapseln, in Verbindung mit den genannten Herstellungsparametern, war äquivalent zu der in Tab. 5.7 aufgeführten Größe.

Für die Untersuchungen mittels SAM muss der Ultraschallimpuls senkrecht auf das fixierte Probenmaterial fallen. Um die Mikrokapseln in ausreichender Form gegenüber der durch die x-y-Scan-Bewegung der Linse hervorgerufenen Strömung des Kopplungsmediums zu sichern, wurden die Microbeads mittels Unterdruck gehalten. Der Unterdruck von 0,2 bar wurde über eine 0,1 mm große Bohrung innerhalb einer 2,0 mm starken Platte aus PMMA, die in einer Küvette fixiert wurde, auferlegt. Als Dichtmittel zwischen Platte und Küvette, Abb. 5.24, wurde Hochvakuumfett verwendet. Zusätzlich wurden die Untersuchungen bei konstanter Raumtemperatur von RT = 25 °C durchgeführt.

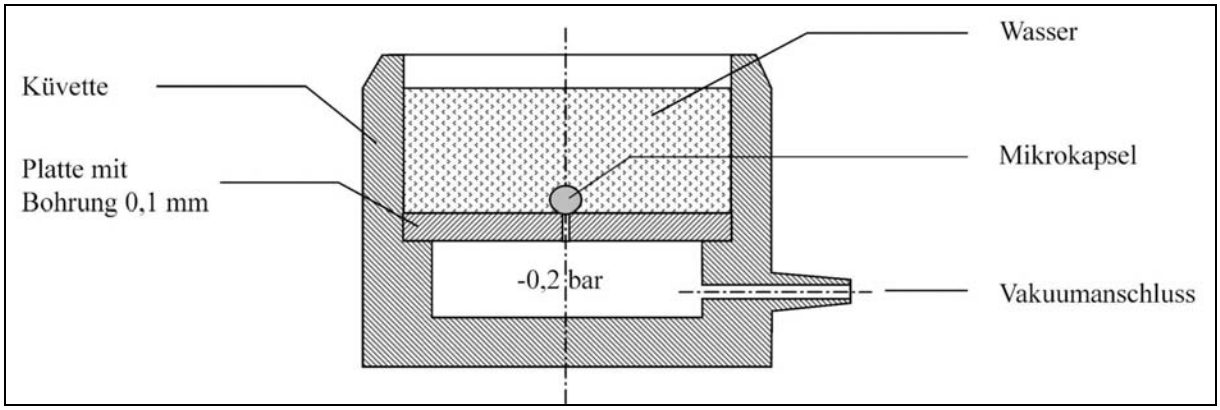


Abb. 5.24: Vakuumküvette für SAM Untersuchungen, schematisch

Zur Bestimmung der akustischen Impedanz wurde die Multi-Layer-Analysis MLA, beschrieben in Kap. 4.4.2.2.2, und das akustische Rastermikroskop SAM 2000, wie in Kap. 5.5.2 aufgezeigt, genutzt. Entsprechend der maximalen Fokustiefe z von 40 µm und einer Schrittweite von 1 µm konnte aus den daraus resultieren 40 Einzelschichten eine „2D Maximum Abbildung“, Abb. 5.25, extrahiert werden.

Aus dieser „2D Maximum Abbildung“ ist zu erkennen, daß sich bei der Vernetzung von Na-Alginat vom Typ Fluka keine ideale glatte Oberfläche ausbildet. Entsprechend den zu entnehmenden Vertiefungen und Erhebungen ist der Mikrokapsel eine hohe Oberflächenrauhigkeit zuzuordnen.

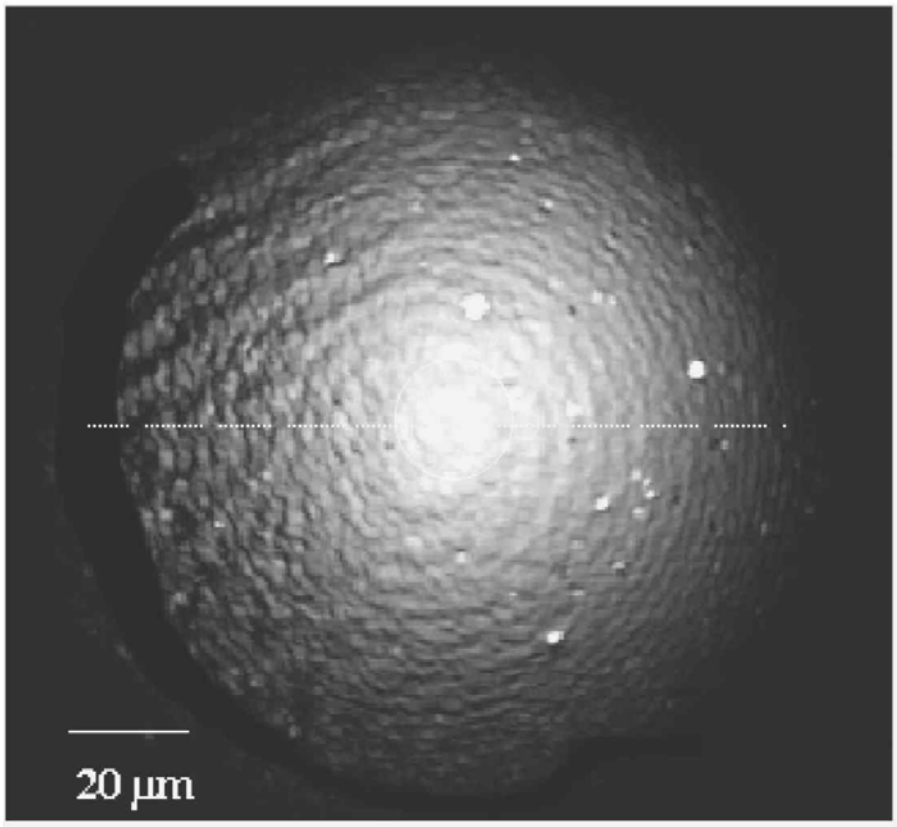


Abb. 5.25: „2D Maximum Abbildung“ des Pols einer Mikrokapsel aus Na-Alginat vom Typ Fluka, 1,5 % (w/v)

Weiter ist zu erkennen, daß mit zunehmender Fokustiefe, ausgehend vom Pol der Kapsel (heller Bereich), die Reflexion der Signale zur Linse bis zum Rauschlevel abnimmt. Lokale Änderungen des Graulevels stellen Inhomogenitäten dar, wogegen die stark hervortretenden hellen Punkte auf anhaftende Gasblasen hindeuten. Die sich ausbildenden konzentrischen Ringe sind auf die einzelnen z-Inkremente der MLA zurückzuführen.

Zusätzlich ließ sich mit Hilfe der MLA das topographische Profil der Mikrokapsel erzeugen. In Abb. 5.26 ist das Topographieprofil, entlang der gepunkteten Linie in Abb. 5.25, dargestellt.

Aus dem Topographieprofil lassen sich einerseits die Dimensionen des untersuchten Bereiches, z. B. z-Inkrement vom Pol bis zur Grundlinie des gescannten Bereiches von 15 µm, ableiten. Andererseits ist die bereits erwähnte Oberflächenrauhigkeit der untersuchten Mikrokapsel deutlich zu erkennen.

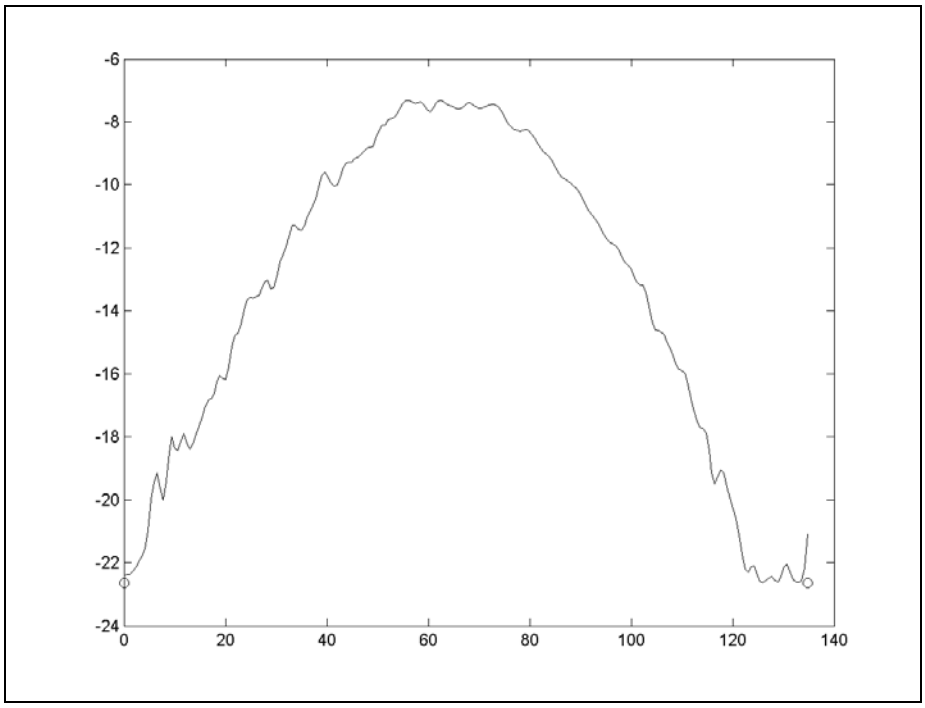


Abb. 5.26: Topographisches Profil des Poles der Mikrokapsel aus Abb. 5.25, Skalieung in µm

Weiter lässt sich aus den gewonnenen Daten der einzelnen erzeugten Layer mittels der MLA eine „3D Maximum Abbildung“ der Mikrokapseln, dargestellt in Abb. 5.27, extrahieren.

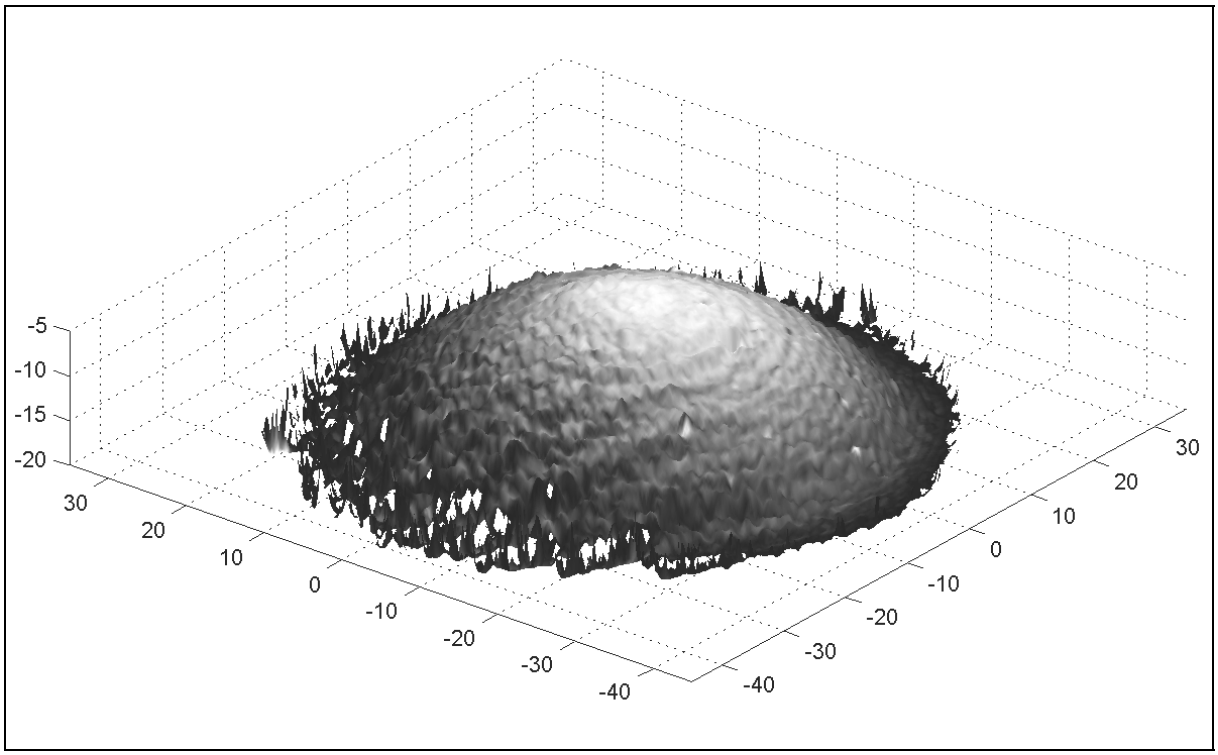


Abb. 5.27: „3D Maximum Abbildung“ des Pols einer Mikrokapsel aus Na-Alginat, Typ Fluka 1,5 % (w/v), Skalieung in µm

Unter Verwendung des „3D Maximum Abbildung“ lässt sich bezüglich der räumlichen Betrachtung der Mikrokapseloberfläche, eine aussagekräftigere Topographieanalyse im Vergleich zum „2D Maximum Abbildung“ durchführen. Ein weiterer Vorteil ist hierfür eine mögliche Analyse des Objektes aus verschiedenen Betrachtungswinkeln.
In der Abb. 5.28 sind die mittels SAM ermittelten Werte der akustischen Impedanz des zu untersuchenden und bereits aufgeführten Konzentrationsbereiches dargestellt. Es ist bei Anstieg der Konzentration an Na-Alginat in der Ausgangslösung eine Zunahme der akustischen Impedanz Z zu verzeichnen.

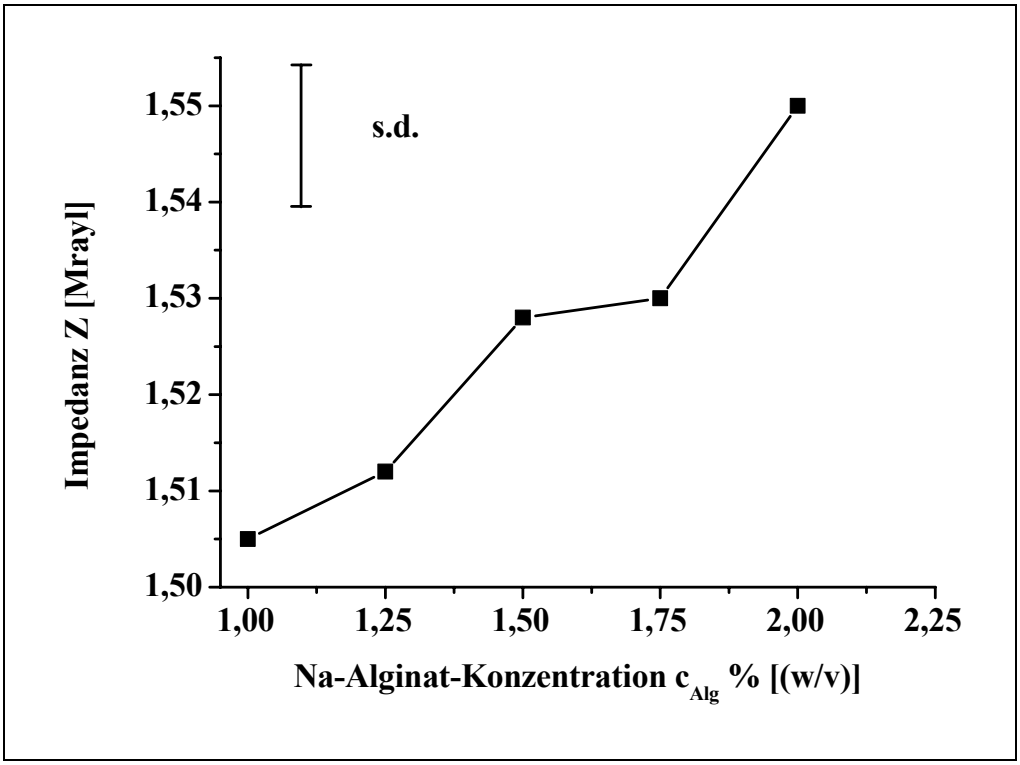


Abb. 5.28: Akustische Impedanz Z in Abhängigkeit der Konzentration an Na-Alginat des Typs Fluka, ermittelt mit SAM

Vergleicht man die ermittelten Werte der „Bulk Methode“ aus Tab. 5.11 mit den Werten, die durch die akustische Rastermikroskopie ermittelt wurden, Abb. 5.28, so kann von einer guten Übereinstimmung der akustischen Impedanzen in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration an Na-Alginat ausgegangen werden.

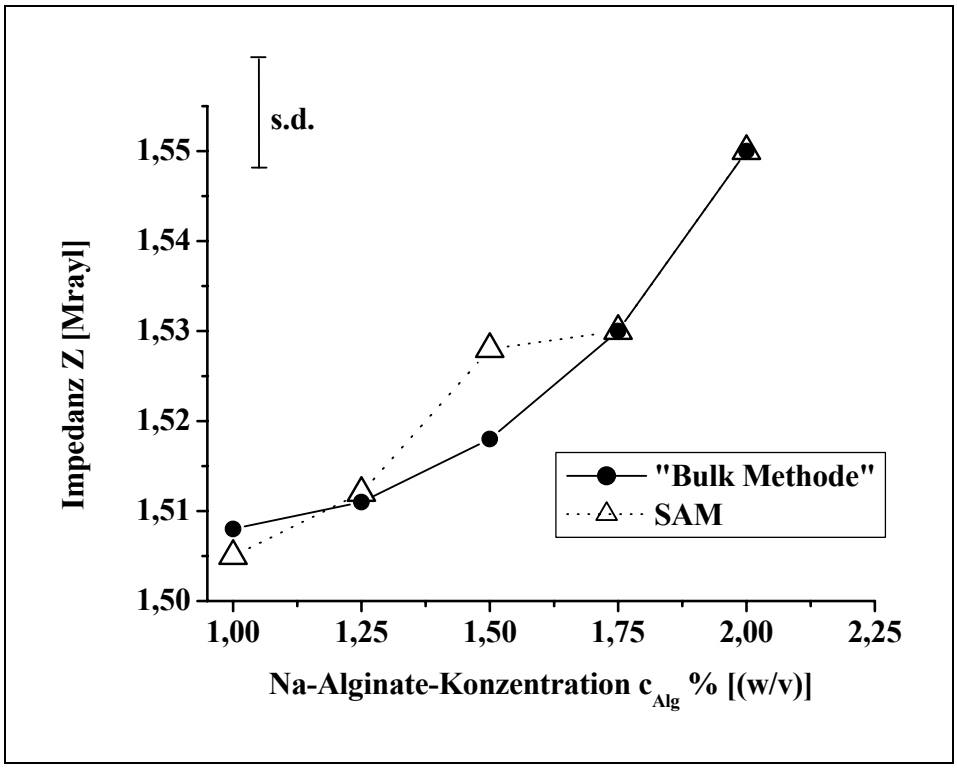


Abb. 5.29: Vergleich der akustischen Impedanzen aus „Bulk Methode“ und SAM

Auf Grundlage der guten Übereinstimmung der ermittelten Werte aus „Bulk Methode“ und SAM lässt sich der akustischen Rastermikroskopie eine generelle Eignung zur quantitativen Charakterisierung elasto-mechanischer Eigenschaften bescheinigen.

5.5.2.3 Akustische Steifigkeit von Mikrokapseln aus Na-Alginat

Auf Grund der guten Übereinstimmung der beiden verwendeten Methoden, Bulk Methode und Scanning Acoustic Microscopy SAM, lässt sich die akustische Steifigkeit der Mikrokapseln aus vernetztem Na-Alginat der unterschiedlichen Konzentrationen, vergleiche Gl. 4.26 in Kap. 4.4.2.2, berechnen. Hierfür wurden die Werte der Dichte und Schallgeschwindigkeit aus Tab. 5.11, ermittelt mit der „Bulk Methode“, herangezogen und in Abb. 5.30 graphisch dargestellt.

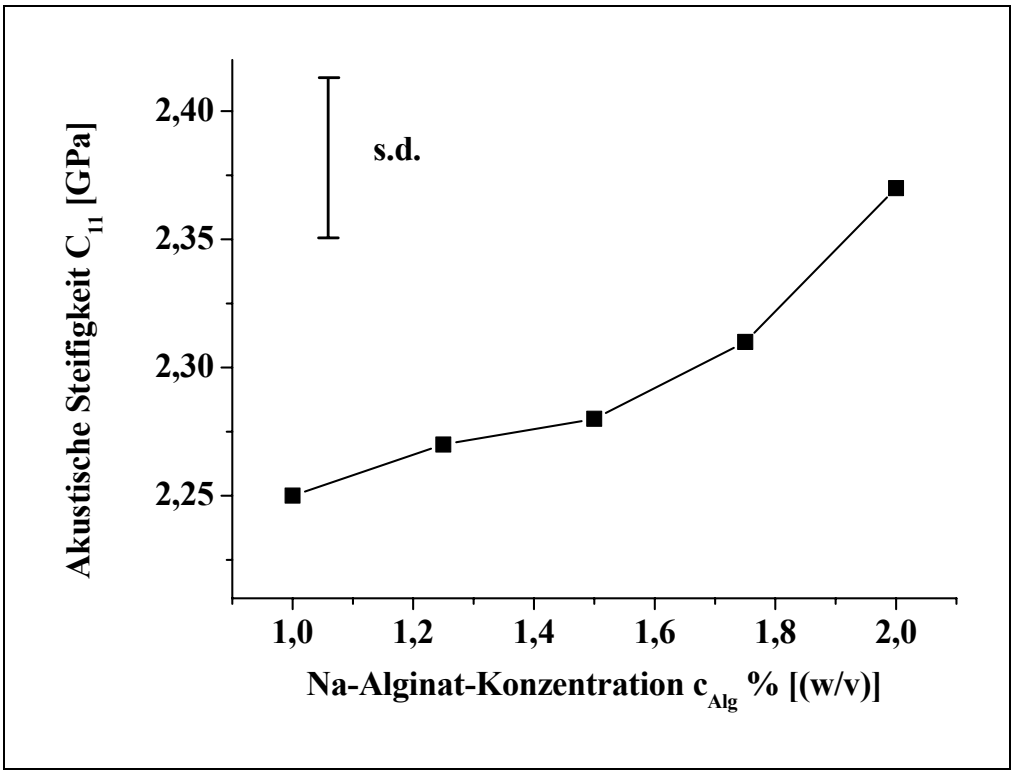


Abb. 5.30: Akustische Steifigkeit in Abhängigkeit von der Konzentration an Na-Alginat vom Typ Fluka, ermittelt mit der „Bulk – Methode“

Der Abb. 5.30 ist zu entnehmen, daß mit steigender Konzentration die akustische Steifigkeit C_{11} ebenfalls ansteigt.

Wie bereits dargelegt, eignet sich die SAM zur Untersuchung elasto-mechanischer Eigenschaften von Mikrokapseln aus Na-Alginat. Gegenüber der zweidimensionalen Betrachtung der zu untersuchenden Objekte bei der Lichtmikroskopie, lassen sich bei der SAM, bei entsprechender Auswertung der Daten, 3D-Abbildung des untersuchten Objektbereiches auf Grundlage der akustischen Impedanz der Probenoberfläche darstellen. Somit können Bilderzeugung und die quantitative Bestimmung materialspezifischer Eigenschaften zeitgleich genutzt werden.

Für die quantitative Charakterisierung von Mikrokapseln, biologischem Gewebe und pflanzlicher bzw. tierischer Zellen stellt die SAM eine alternative Untersuchungsmethode dar. Vorteile liegen in der zerstörungsfreien Untersuchung des Materials, was gerade bei Langzeitstudien von Vorteil gegenüber nicht zerstörungsfreien Untersuchungsmethoden ist, da ein und das selbe Probenmuster für die Charakterisierung über ein längeren Zeitraum verwendet werden kann.

Unter Kenntnis weiterer materialspezifischer Kennwerte, z. B. der Poisson-Zahl υ, des Probematerials ließe sich die SAM auch zur qualitativen Bestimmung von Materialkennwerten, beispielsweise zur Ermittlung des E-Moduls, vergleiche Gl. 4.27 in Kap. 4.4.2.2, nutzen.

Für eine Verifizierung ermittelter qualitativer Werkstoffkennwerte, sollten jedoch Vergleichsmessungen, mit den aus der klassischen mechanischen Werkstoffprüfung bekannten Verfahren, z. B. dem Druckversuch, herangezogen werden.

6 Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit im Fokus stehenden Ziele umfassten einerseits die Nutzung verschiedener tropfenbildender Verkapselungsverfahren zur Herstellung von zellimmobilisierenden Mikrokapseln. Hierfür standen tierische Zellen der Linien GLI328[180], BHK[181] und J3T[182] zur Verfügung. Für den Einsatz in der Gentherapie zur Behandlung von Gehirntumoren und der damit verbundenen Zuführung der Kapseln über den Blutkreislauf stand der geforderte Größenbereich mit einer zu erzielenden Verteilungsbreite der Microbeads von 100 – 350 µm im Mittelpunkt der experimentellen Untersuchungen, bei denen als Polymer Na-Alginat bzw. das Polymersystem APA (Alginate-Poly-$_L$-lysin-Alginat) Verwendung fand.

Hierbei lag das Hauptaugenmerk für die Partikelherstellung auf dem AirJet-Verfahren, bei dem der Einfluss der Variation entsprechender Verarbeitungsparameter bzw. Stoffparameter zu charakterisieren war. Durch geeignete Wahl des Kapillardurchmessers d_{ca}, des Stickstoffvolumenstroms $\dot{V}_{N_2}$ und der Nullscherviskosität η_0 der verwendeten Na-Alginat-Lösung konnte die gewünschte Größe, z. B. bei der Verwendung von d_{ca}= 0,3mm (Kapillare C7), einem $\dot{V}_{N_2}$ = 4750 l/h und einer η_0= 0,4818 mPa·s, der Mikrokapseln von 0,264 mm erreicht werden.

Auf Grund der Bestätigung der durch Poncelet[128] getroffenen These, daß die Einstellung des Volumenstroms an N_2 an der Apparatur so zu wählen ist, daß der resultierende Durchmesser des Tropfens $\geq d_{ca}$ der Kapillare c ist und sich somit Tropfen gleicher Grösse ohne die Bildung von Sekundärtropfen bilden, ließ sich ein Modell zur langsamen Tropfenbildung mittels AirJet-Verfahren formulieren. Durch die Übereinstimmung des Modells mit den erzielten Kapselgrößen und der dimensionslosen Betrachtung lässt sich das Modell auf andere Stoffsysteme übertragen und für die Vorhersage von Tropfengrößen mit den zugehörigen Parametereinstellungen des AirJet-Verfahrens nutzen.

Die etablierten Immobilisierungsverfahren, das AirJet-Verfahren und das Vibrations-Verfahren, wurden zusätzlich mit einem weiteren tropfenbildenden Verfahren, dem JetCutter-Verfahren, dessen Eignung zur Immobilisierung von tierischen Zellen bisher nicht evaluiert wurde, verglichen. Die erzielte Größenverteilung der Mikrokapseln lag hierbei hauptsächlich innerhalb der geforderten Verteilungsbreite. Zusätzlich zur Charakterisierung der Größe der Mikrokapseln wurde auch die Übererlebensfähigkeit der immobilisierten Zellen in APA-Mikrokapseln über einen Zeitraum von zwölf Wochen betrachtet. Dem JetCutter-Verfahren kann eine generelle Eignung zur Immobilisierung von tierischen Zellen zugesprochen werden, da sich keine signifikanten Unterschiede in der Überlebensfähigkeit der immobilisierten Zel-

len, ermittelt durch Fluoreszensmikroskopie mit Hilfe einer Lösung von Acredine Orange und Ethidium Bromide, im Vergleich zum AirJet- und Vibrationsverfahren erkennen ließen.
Andererseits stand die Charakterisierung der elasto-mechanischen Eigenschaften von Mikrokapseln, hergestellt aus Na-Alginat, im Interesse der durchgeführten Untersuchungen. Hierbei konnte als charakteristische Größe die akustische Impedanz Z mittels Scanning-Acoustic-Microscopy (SAM), im Hochfrequenzbereich von 900 GHz, quantitativ bestimmt und mit der aus der niederfrequenten Bulk Methode (5MHz) verglichen werden. Hierbei konnte ein Anstieg der akustischen Impedanz Z von 1,505 Mrayl auf 1,55 Mrayl bei gleichzeitiger Erhöhung der Konzentration von Na-Alginat verzeichnet werden. Der SAM ist nach entsprechender Kalibrierung, auf Grundlage der sehr guten Übereinstimmung der Ergebnisse mit den ermittelten Werten der Bulk Methode, eine generelle Nutzbarkeit zur quantitativen Bestimmung von elasto-mechanischen Eigenschaften an Mikrokapseln aus Na-Alginat zu attestieren.
Allgemein betrachtet ließe sich unter der Voraussetzung, daß die Poisson Zahl des zu untersuchenden Probenmaterials bekannt ist, die SAM zur qualitativen Bestimmung des E-Moduls nutzen, was in Hinblick auf nachfolgende Untersuchung der mechanischen Eigenschaften, z. B. an APA-Mikrokapseln, genutzt werden könnte. Hierdurch ließen sich beispielsweise alterungsbedingte Veränderungen der Kapselmatrix oder auch der Kapselmembran sowohl quantitativ als auch qualitativ durch das zerstörungsfreie Charakterisierungsverfahren bestimmen.

7 Summary

The primary goal of this thesis is the application and improvement of different droplet forming encapsulation processes by using the mammalian cells from the cell line GLI328[180], BHK[181] and J3T[182]. Until now the application of cell immobilizing microbeads has been prevalent in a wide range of applications e.g. for gene therapy and treatment of brain tumor. Several requirements in terms of bead injection have been studied by different research groups. Within the scope of this work, the major goal was to realize a defined size distribution of microcapsules in the range of 100 to 350 µm. In order to accomplish the required particle size distribution, a number of experimental set-ups have been carried out. The experiments were performed by using Na-alginate and the polymeric complex Alginate-Poly-$_L$-Lysine-Alginate APA as well.

The main part of the experimental work was focused on droplet formation using the "AirJet" method. This method was investigated by evaluating the influence of processing parameters and by material property variation. A desired particle size with the Air-Jet method using a solution of Na-alginate was produced by adjusting practical parameters as nitrogen flow $\dot{V}_{N2}$ and zero shear viscosity η_0. Specifically, a microbead diameter of 0.264 mm required the following apparatus/system settings: $\dot{V}_{N2}$ = 4750 L/h and η_0 = 0.4818 mPas.

In agreement with the results of Poncelet[128] who predicate that the adjustable volume flow of nitrogen must be large enough in order to produce drops with the resulting diameter larger than the capillary diameter d_{ca}, in order to avoid secondary drop generation. A mathematical/theoretical model for drop formation has been developed. The mathematical model has been evaluated and it is in a good agreement witch the experimental results. The model use done by the use of non-dimensional considerations, which allow a prediction of particle sizes with the associated practical AirJet-system parameters ($\dot{V}_{N2}$, d_{ca}) independent to the applied materials.

The sophisticated immobilization systems AirJet-method and Vibration-method have been compared with an additional drop producing method, the "JetCutter" method. The applicability of the JetCutter method for mammalian cell immobilization has not been evaluated before. The achieved microcapsule size distribution by using the above methods was essentially within the required parameters. Additionally to the characterization experiments on the microcapsules, viability tests on immobilized cells made by APA-microcapsules over a period of twelve weeks has been done using the JetCutter-method. A general acceptability for the

immobilization of the mammalian cells can be assigned to the JetCutter-method. It has been proven by comparing the experimental result from viability tests done at all three presented capsule manufacturing methods using fluorescence microscopy with a solution of Acredine Orange and Ethidium Bromide.

Another major goal of this work was the elasto-mechanical characterization of microcbeads made by Na-alginate. In this context the characteristic value of acoustic impedance Z using Scanning Acoustic Microscopy SAM in a high frequency range of 900 GHz was measured and compared with results of the bulk method in a low frequency range of 5 MHz. The acoustic impedance Z increased from 1.505 to 1.55 Mrayl by the increase of the concentration of Na-Alginate amount. The general ability for quantifying elasto-mechanical properties on microcapsules made by Na-Alginate using SAM and confirmed with the basic assumption of calibration and by comparing the results with those from the bulk method. Generally speaking, if the Poisson number of the material of interest is known, the SAM can be applied for quantifying the E-modul. This should be considered for further investigation of mechanical properties on microcapsules. That also allows qualitative and quantitative non-destructive characterization of aging effects of the capsule matrix or capsule membranes.

8 Weiterführende Arbeiten

Wie bereits im Kap. 5.3.3 aufgeführt, kommt es bei der Modellierung der langsamen Tropfenbildung ohne Koaxialströmung zur Ausbildung einer Polstelle. Für die genaue Bestimmung sollten weiterführende Messungen mit Hilfe von größeren Kapillaren bzw. Röhrchen durchgeführt werden, um das maximale Tropfenvolumen bzw. den maximal möglichen Tropfendurchmesser zu bestimmen.

Für eine weitere Bestätigung des Modells, unter Einsatz der schnellen Tropfenumströmung mittels Koaxialströmung, sollten ebenfalls noch zusätzliche Messwerte mit unterschiedlichen Kapillardurchmessern d_{ca} und unterschiedlichen Volumenströmen an Stickstoff $\dot{V}_{N_2}$ vorgenommen werden, um die bereits ermittelten Werte zu untermauern.

Im Hinblick auf die Immobilisierung von Zellen bzw. Zellsystemen ist eine definierte Partikelgrösse gewährleistet. Somit lassen sich perspektivisch unterschiedliche Zellinien und Zellen humanen Ursprungs mit Hilfe der AirJet-Methode, unter Berücksichtigung der physiologischen Anforderungen der Zellen, verkapseln. Neben der Immobilisierung von Zellen zur Behandlung von Gendefekten stehen hierbei vor allem die Verkapselung von Leberzellen, Knorpelzellen und langerhansche Inselzellen, zur Behandlung von Organdefekten, Organunterfunktionen bzw. Organersatz, im Vordergrund.

Bei den Untersuchungen mittels SAM ist eine Charakterisierung der sich ausbildenden APA-Membran von hohem Interesse. Eine quantitative Bestimmung der elasto-mechanischen Eigenschaften bei entsprechender Variation der Beschichtungsparameter, z. B. Beschichtungsdauer, Zusammensetzung der Beschichtungslösungen, M_w der Beschichtungsmaterialien, usw., ließe sich mittels rasterakustischer Mikroskopie aufzeigen. Hierfür sprechen bereits erste durchgeführte Experimente mit vielversprechenden Ergebnissen, die jedoch nicht im Mittelpunkt der durchgeführten Untersuchungen standen.

9 Anhang

A I: Abhängigkeit der dynamischen Viskosität von der Schergeschwindigkeit von Na-Alginat-Lösungen des Typs Acros bei unterschiedlichen Konzentrationen, T = 20 °C

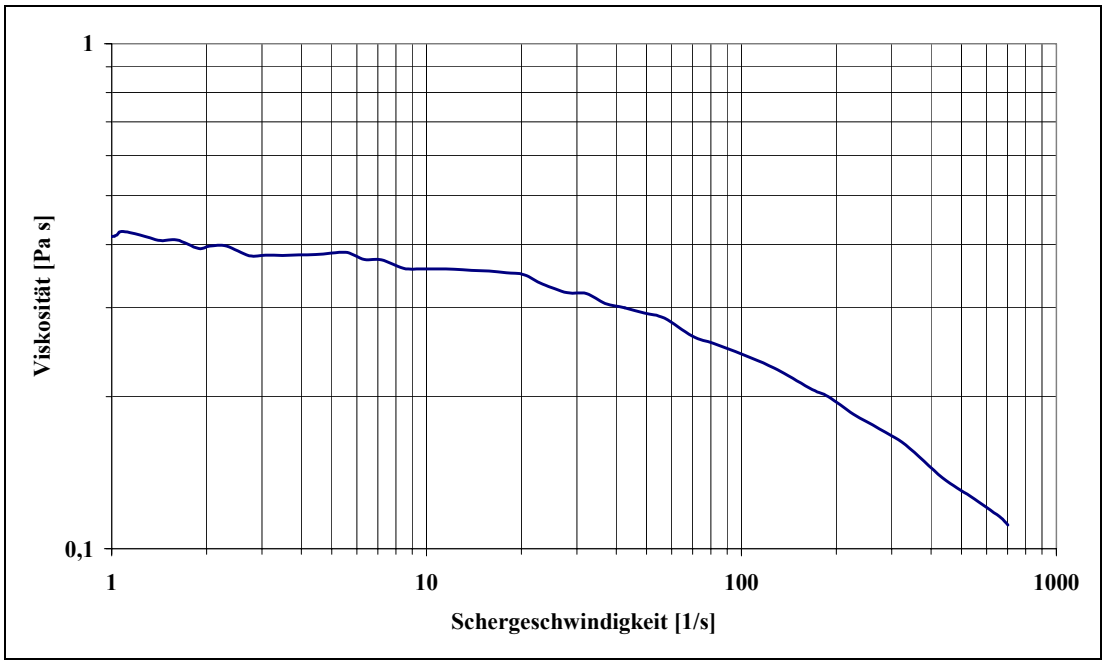


Abb. 9.1: Abhängigkeit der dynamischen Viskosität von der Schergeschwindigkeit von Na-Alginat-Lösungen des Typs Acros bei 1,00 % (w/v), T = 20 °C

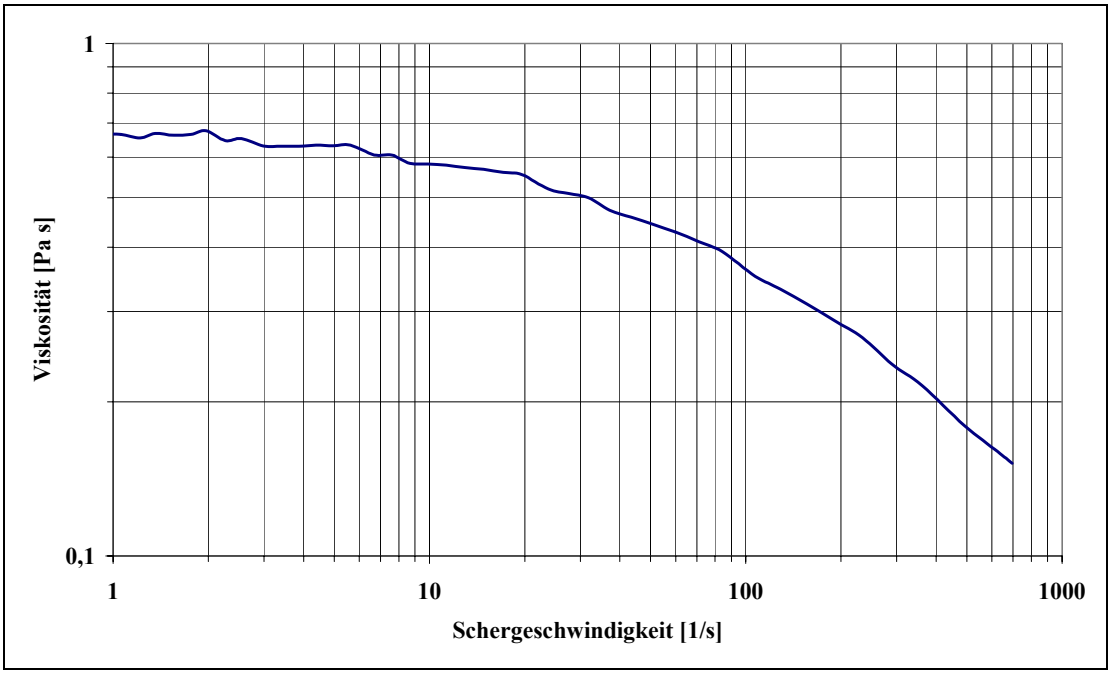


Abb. 9.2: Abhängigkeit der dynamischen Viskosität von der Schergeschwindigkeit von Na-Alginat-Lösungen des Typs Acros bei 1,25 % (w/v), T = 20 °C

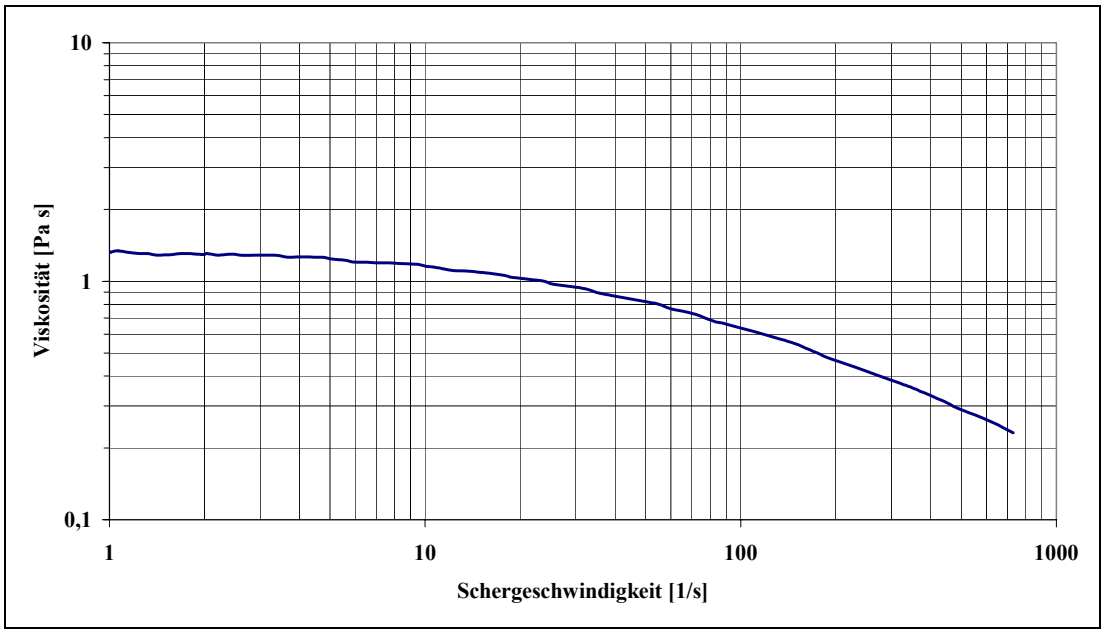


Abb. 9.3: Abhängigkeit der dynamischen Viskosität von der Schergeschwindigkeit von Na-Alginat-Lösungen des Typs Acros bei 1,50 % (w/v), T = 20 °C

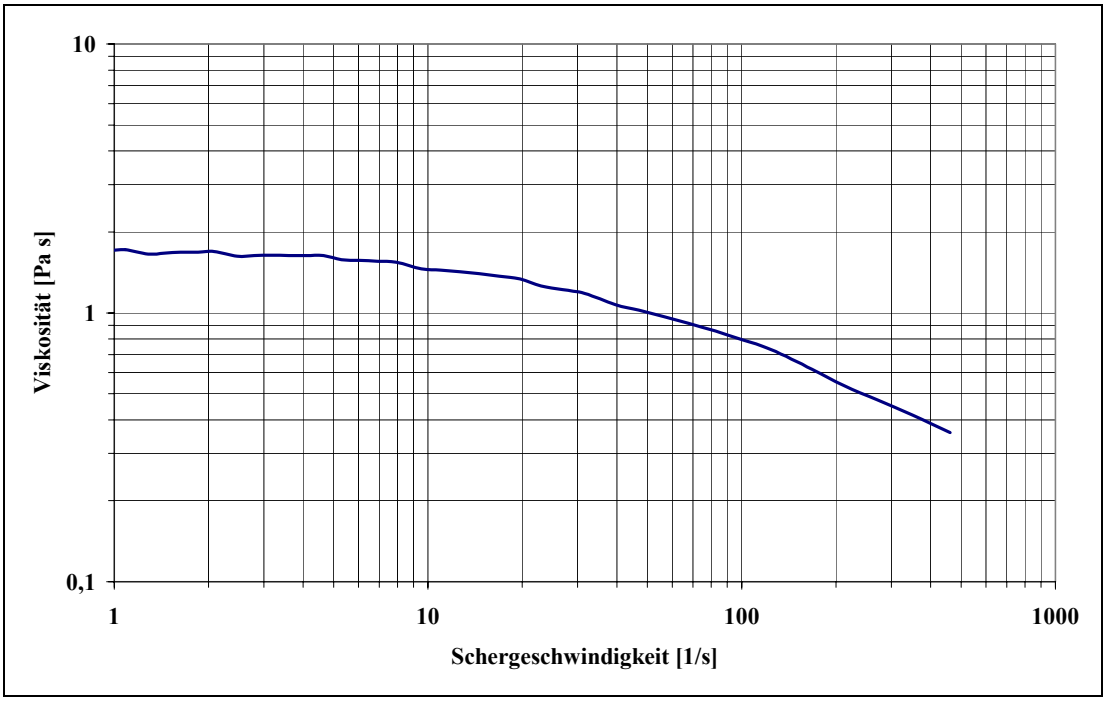


Abb. 9.4: Abhängigkeit der dynamischen Viskosität von der Schergeschwindigkeit von Na-Alginat-Lösungen des Typs Acros bei 1,75 % (w/v), T = 20 °C

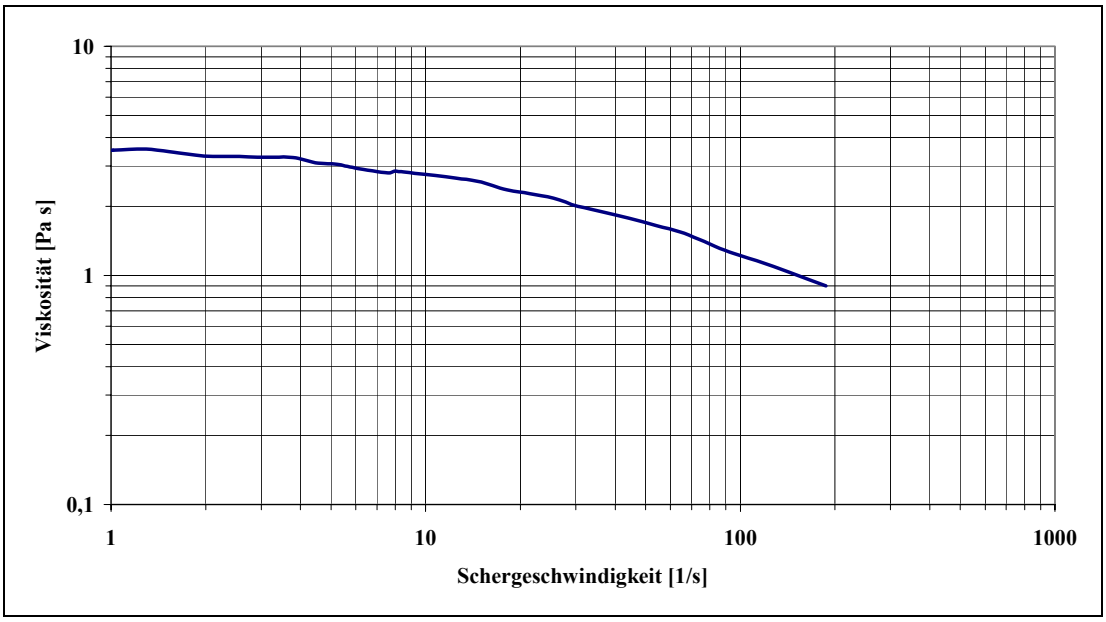


Abb. 9.5: Abhängigkeit der dynamischen Viskosität von der Schergeschwindigkeit von Na-Alginat-Lösungen des Typs Acros bei 2,00 % (w/v), T = 20 °C

A II: Oberflächenspannung der vermessenen Na-Alginat-Lösungen in Abhängigkeit von der Konzentration des Na-Alginates

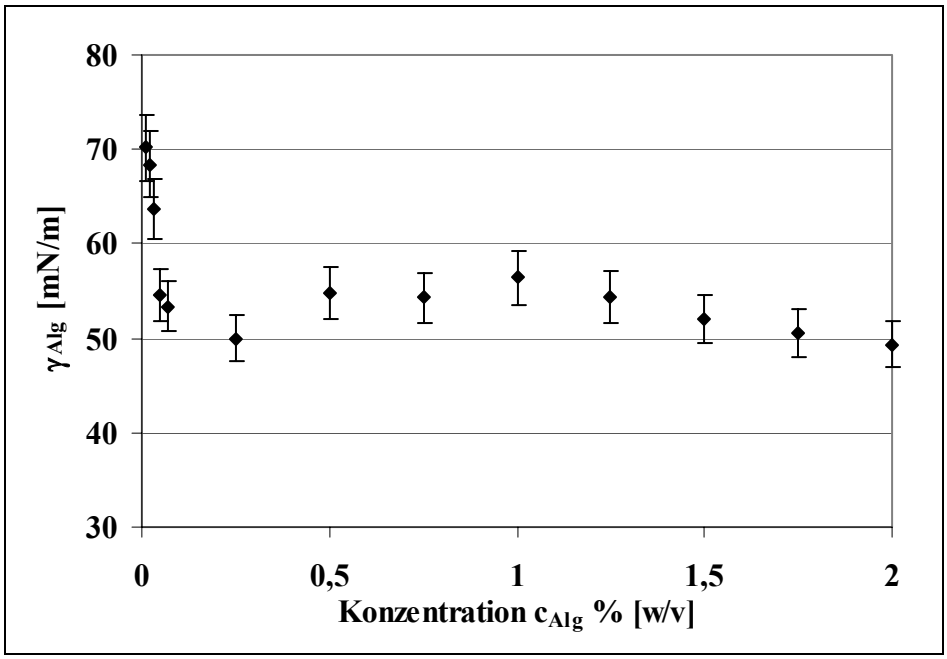


Abb. 9.6: Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Konzentration des Na-Alginates vom Typ Sigma 1

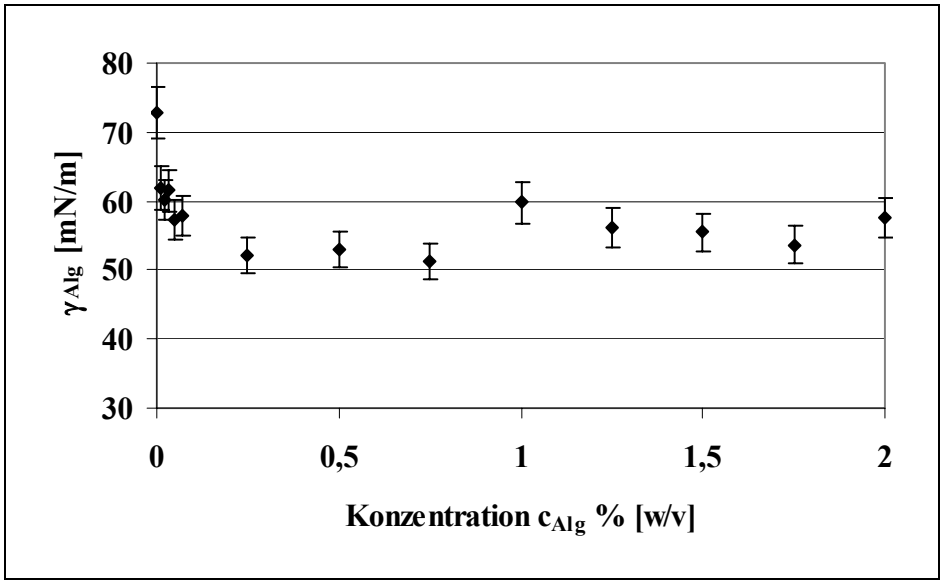


Abb. 9.7: Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Konzentration des Na-Alginates vom Typ Sigma 2

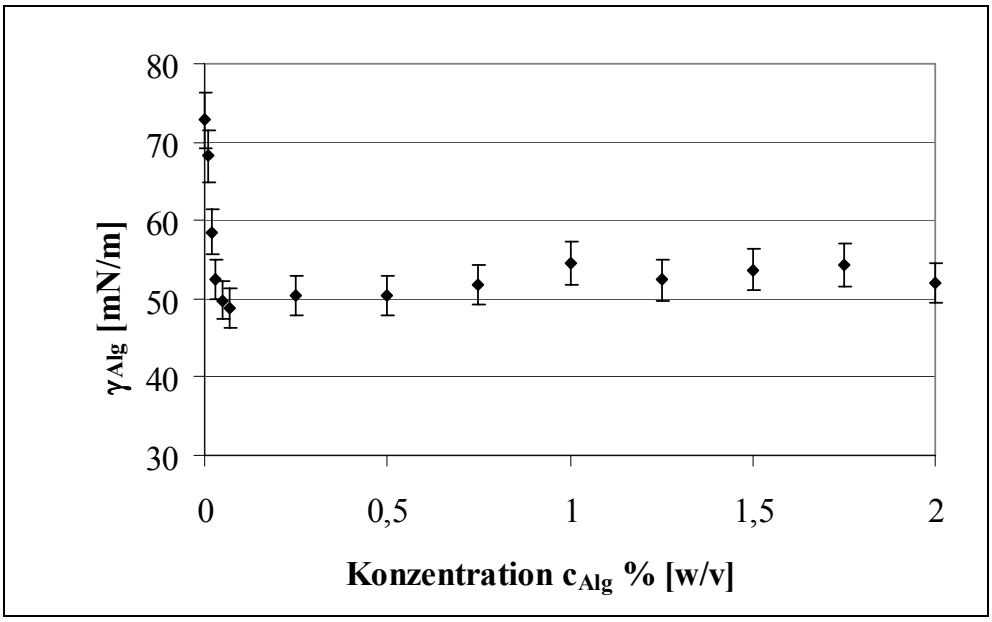


Abb. 9.8: Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Konzentration des Na-Alginates vom Typ Sigma 3

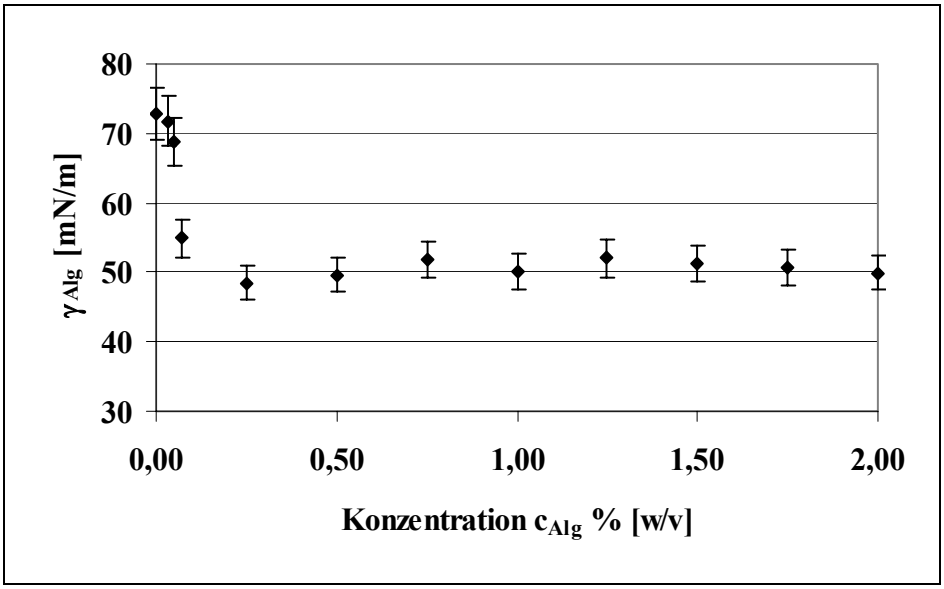


Abb. 9.9: Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Konzentration des Na-Alginates vom Typ Fluka

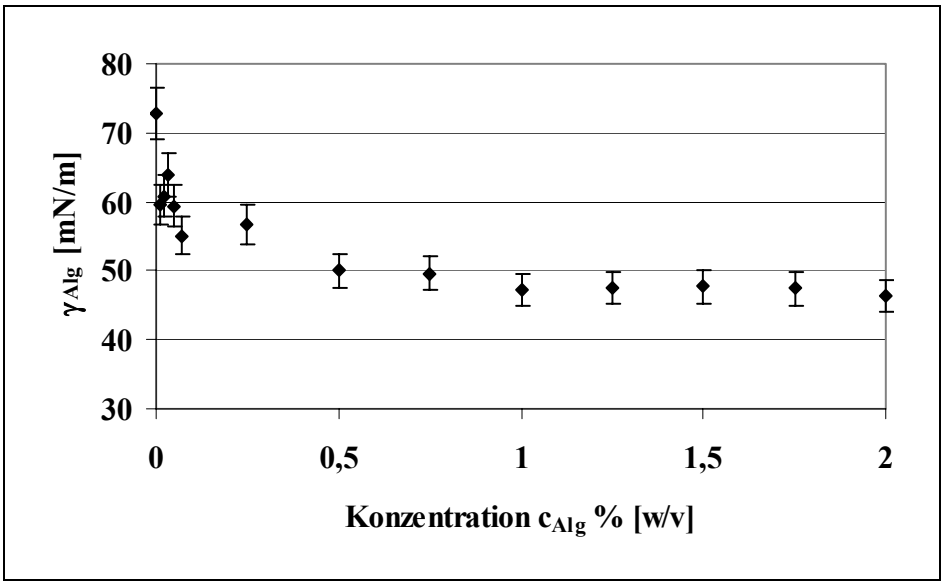


Abb. 9.10: Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Konzentration des Na-Alginates vom Typ Inotech

A III: Ermittlung des Volumenstromes an N_2 in Anlehnung an London et al.[125]

Berechnung des Stickstoffvolumenstromes für die AirJet-Apparatur

Stoffdaten der Gase bei $T=20°C$ und $p_{Umg}=101,3\ kPa$:

Sauerstoff: $\rho_{O2} := 1.3138 \cdot \frac{kg}{m^3}$ $\eta_{O2} := 0.00002037 \cdot Pa \cdot s$

Stickstoff: $\eta_{N2} := 0.00001760 \cdot Pa \cdot s$ $\rho_{N2} := 1.15 \frac{kg}{m^3}$

London et. al.:

Geometrische Grössen der Verkapselungsapparatur:

$D_{Rohr} := 0.0015 \cdot m$ $D_{Kap} := 0.001 \cdot m$ $V_{O2} := 0.21 \cdot \frac{m^3}{h}$

$A_{Kap} := \frac{\pi}{4} \cdot D_{Kap}^2$ $A_{Kap} = 7.854 \cdot 10^{-7} \cdot m^2$

$A_{Rohr} := \frac{\pi}{4} \cdot D_{Rohr}^2$ $A_{Rohr} = 1.767 \cdot 10^{-6} \cdot m^2$

Berechnung:

$v_{Rohr_O2} := \frac{V_{O2}}{A_{Rohr} - A_{Kap}}$ $v_{Rohr_O2} = 59.418 \cdot m \cdot s^{-1}$

$Re_{Düse_London} := \frac{v_{Rohr_O2} \cdot D_{Rohr} \cdot \rho_{O2}}{\eta_{O2}}$ $Re_{Düse_London} = 5.748 \cdot 10^3$

Diese Arbeit:

Geometrische Grössen der Verkapselungsapparatur:

$D_{Rohr} := 0.005\ m$

$A_{Rohr} := \frac{\pi}{4} \cdot D_{Rohr}^2$ $A_{Rohr} = 1.963 \cdot 10^{-5} \cdot m^2$

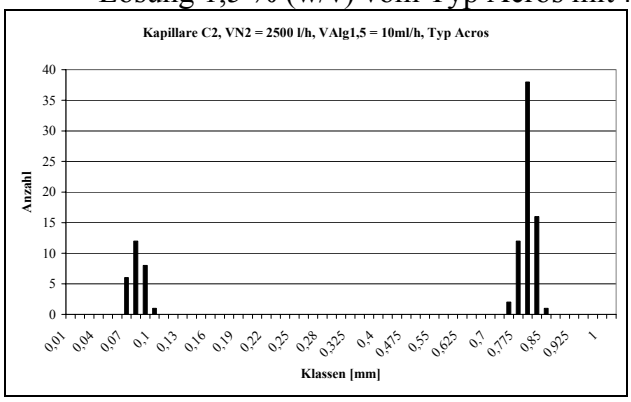
Berechnung:

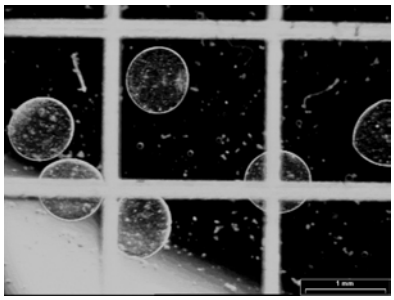
$v_{Rohr_N2} := \frac{Re_{Düse_London} \cdot \eta_{N2}}{\rho_{N2} \cdot D_{Rohr}}$ $v_{Rohr_N2} = 17.595 \cdot m \cdot s^{-1}$

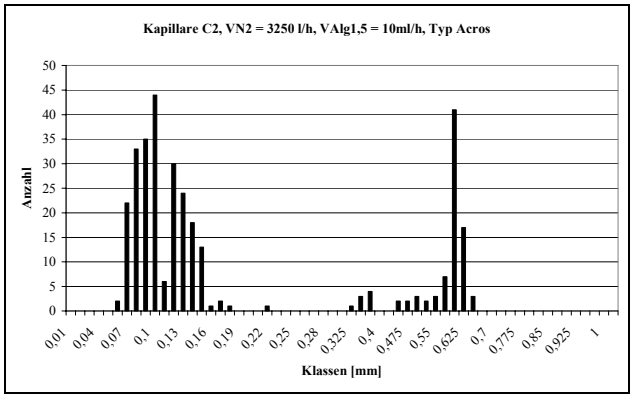
$A_{Rohr} := \frac{\pi}{4} \cdot D_{Rohr}^2$ $A_{Rohr} = 1.963 \cdot 10^{-5} \cdot m^2$

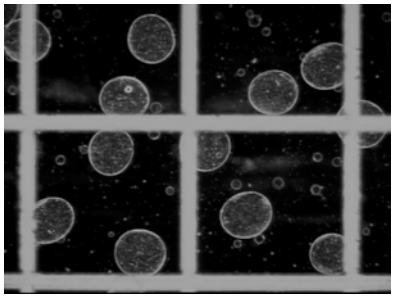
$V_{N2} := v_{Rohr_N2} \cdot (A_{Rohr} - A_{Kap})\ 3600$ $V_{N2} = 4.298 \cdot 10^3 \cdot m^3 \cdot h^{-1}$ erforderlicher N_2-Volumenstrom

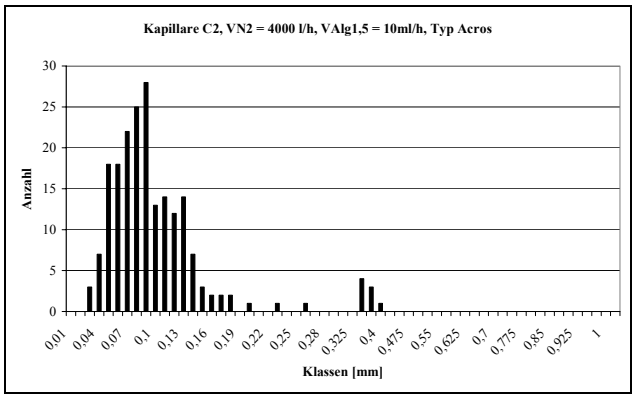
A IV: Kapselgrößen bei Verwendung der AirJet-Methode unter Nutzung der Na-Alginat-Lösung 1,5 % (w/v) vom Typ Acros mit η_0 = 1,43 Pa·s und Kapillare C2 (20 G)

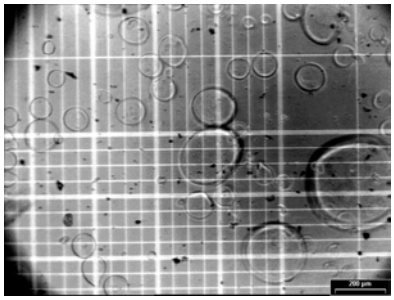




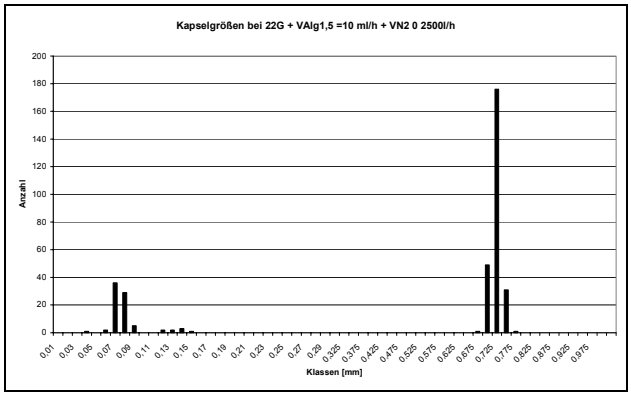


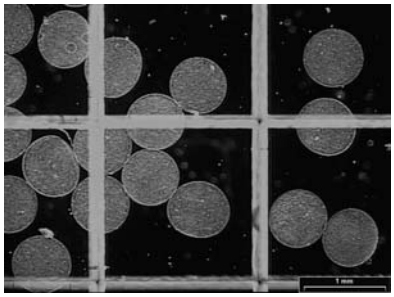


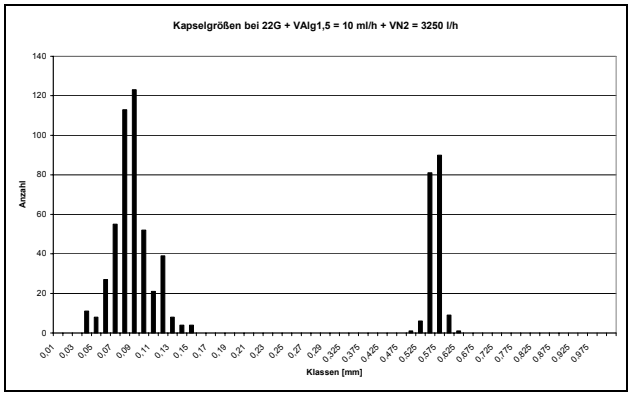


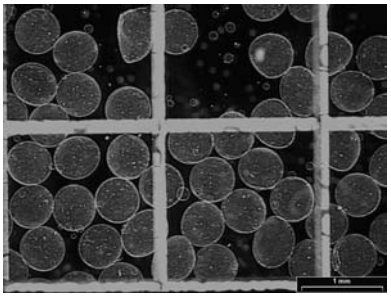


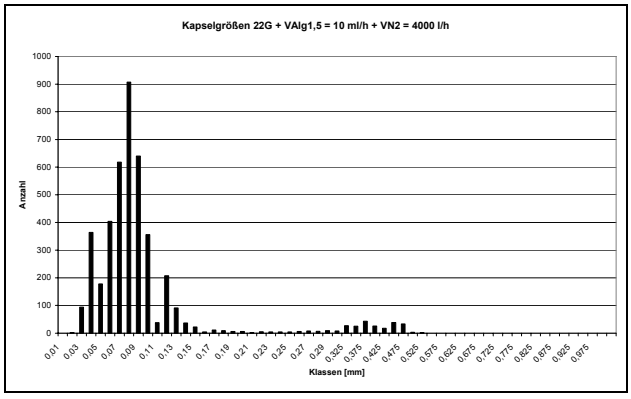
A V: Kapselgrößen bei Verwendung der AirJet-Methode unter Nutzung der Na-Alginat-Lösung 1,5 % (w/v) vom Typ Acros mit η_0 = 1,43 Pa·s und Kapillare C3 (22 G)

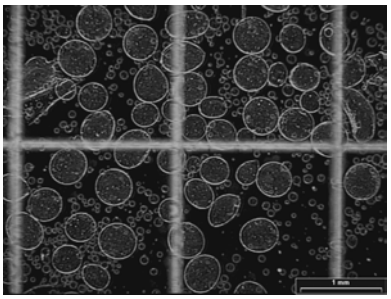


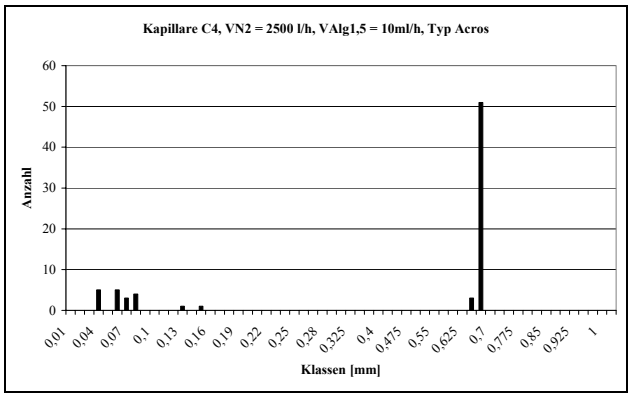


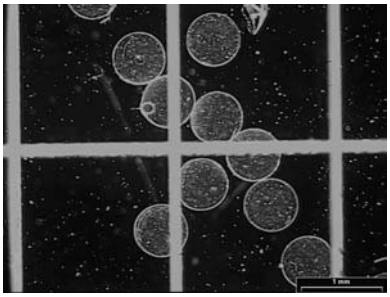


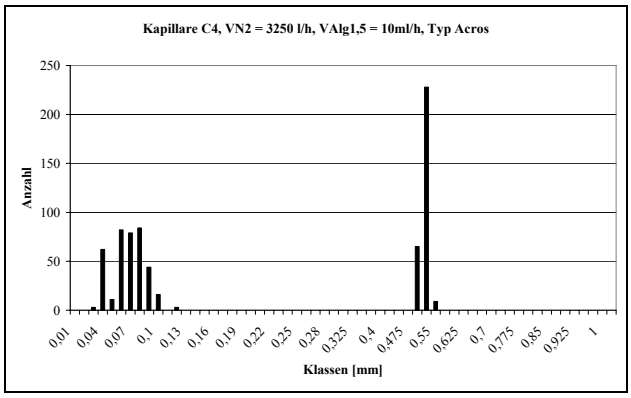


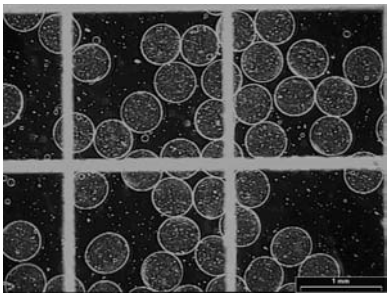


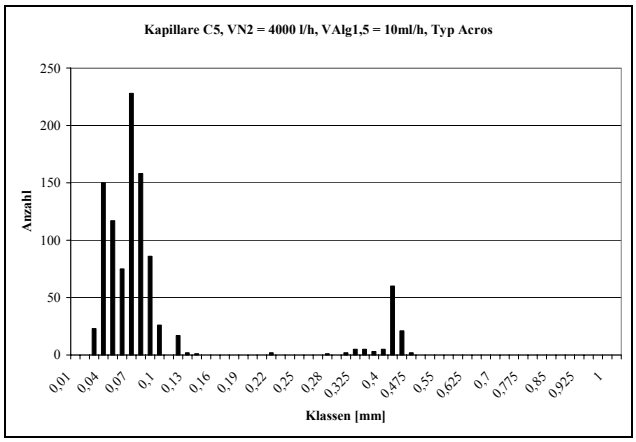


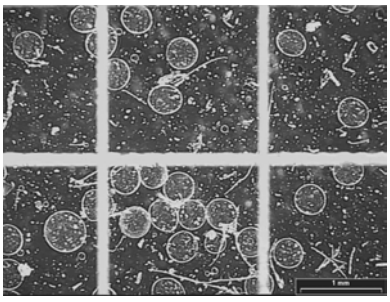

Kapillare C4, VN2 = 2500 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
60
50
40
30
20
10
0
0,01 0,04 0,07 0,1 0,13 0,16 0,19 0,22 0,25 0,28 0,325 0,4 0,475 0,55 0,625 0,7 0,775 0,85 0,925 1
Klassen [mm]

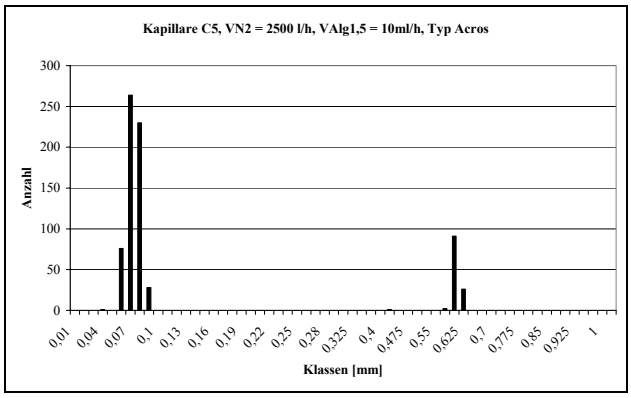


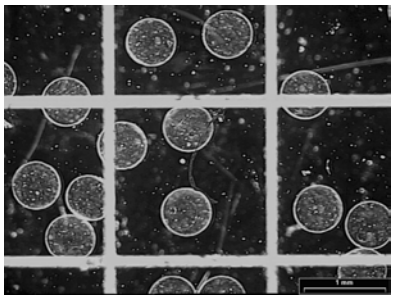

Kapillare C4, VN2 = 3250 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
250
200
150
100
50
0
0,01 0,04 0,07 0,1 0,13 0,16 0,19 0,22 0,25 0,28 0,325 0,4 0,475 0,55 0,625 0,7 0,775 0,85 0,925 1
Klassen [mm]

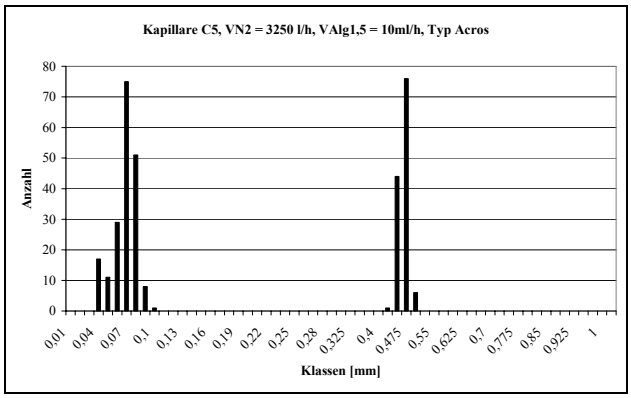


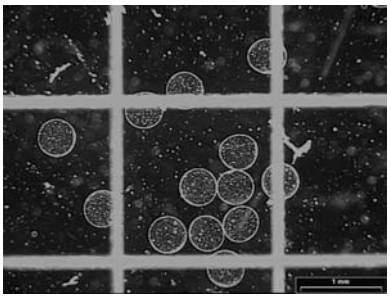

Kapillare C5, VN2 = 4000 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
250
200
150
100
50
0
0,01 0,04 0,07 0,1 0,13 0,16 0,19 0,22 0,25 0,28 0,325 0,4 0,475 0,55 0,625 0,7 0,775 0,85 0,925 1
Klassen [mm]

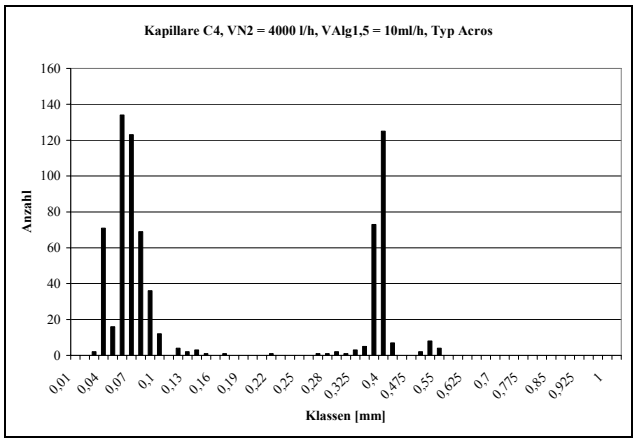


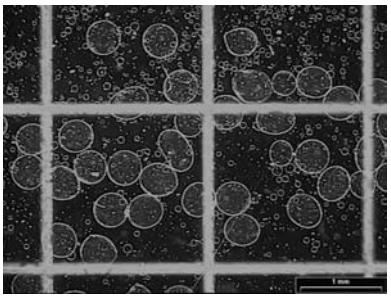

Kapillare C5, VN2 = 2500 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
300
250
200
150
100
50
0
0,01 0,04 0,07 0,1 0,13 0,16 0,19 0,22 0,25 0,28 0,325 0,4 0,475 0,55 0,625 0,7 0,775 0,85 0,925 1
Klassen [mm]

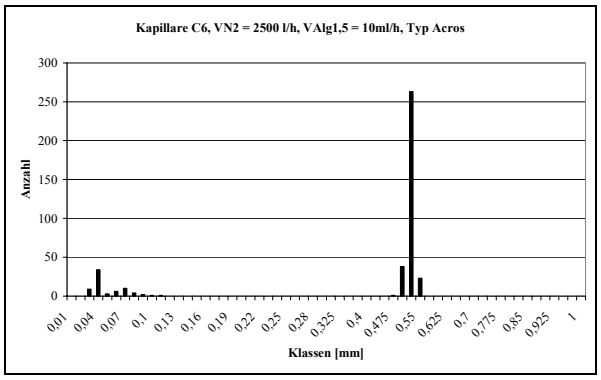


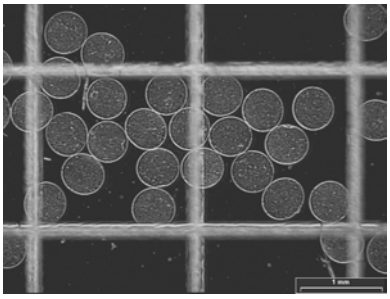

Kapillare C5, VN2 = 3250 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0,01 0,04 0,07 0,1 0,13 0,16 0,19 0,22 0,25 0,28 0,325 0,4 0,475 0,55 0,625 0,7 0,775 0,85 0,925 1
Klassen [mm]

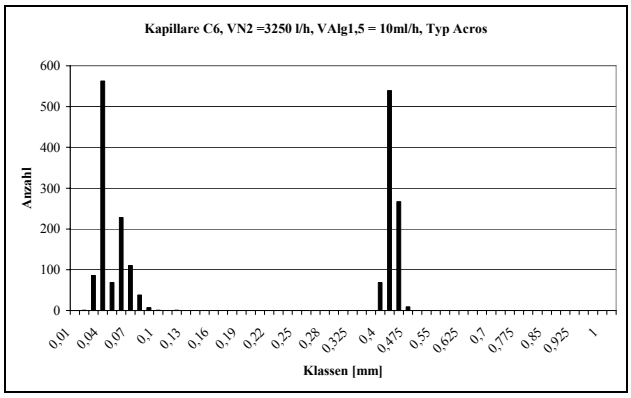


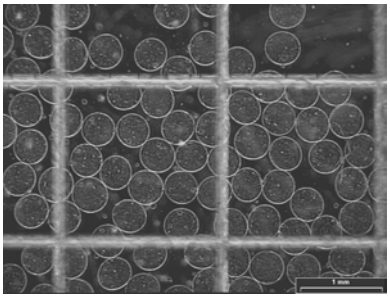

Kapillare C4, VN2 = 4000 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0,01 0,04 0,07 0,1 0,13 0,16 0,19 0,22 0,25 0,28 0,325 0,4 0,475 0,55 0,625 0,7 0,775 0,85 0,925 1
Klassen [mm]

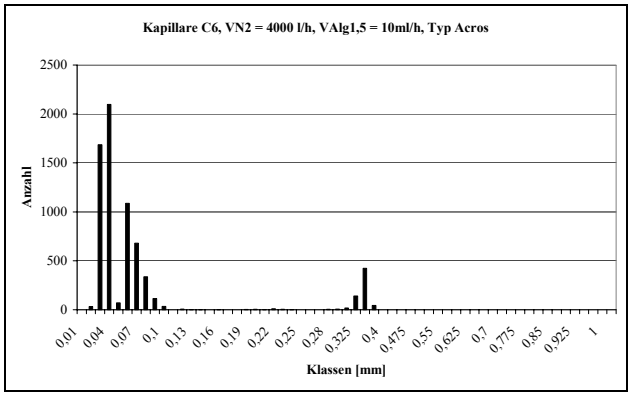


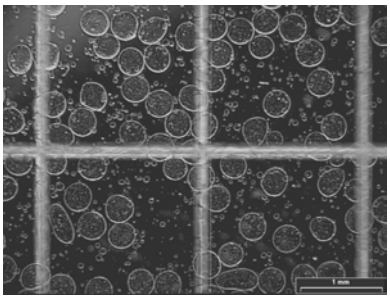

Kapillare C6, VN2 = 2500 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
300
250
200
150
100
50
0
0,01 0,04 0,07 0,1 0,13 0,16 0,19 0,22 0,25 0,28 0,325 0,4 0,475 0,55 0,625 0,7 0,775 0,85 0,925 1
Klassen [mm]

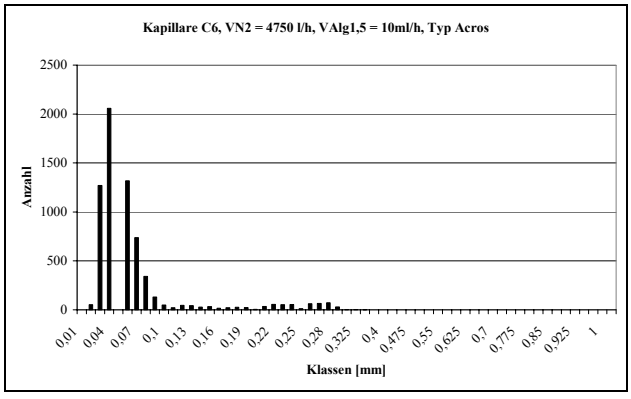


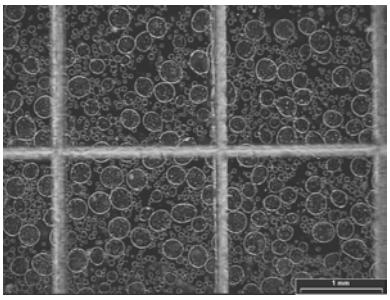

Kapillare C6, VN2 =3250 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
600
500
400
300
200
100
0
0,01 0,04 0,07 0,1 0,13 0,16 0,19 0,22 0,25 0,28 0,325 0,4 0,475 0,55 0,625 0,7 0,775 0,85 0,925 1
Klassen [mm]

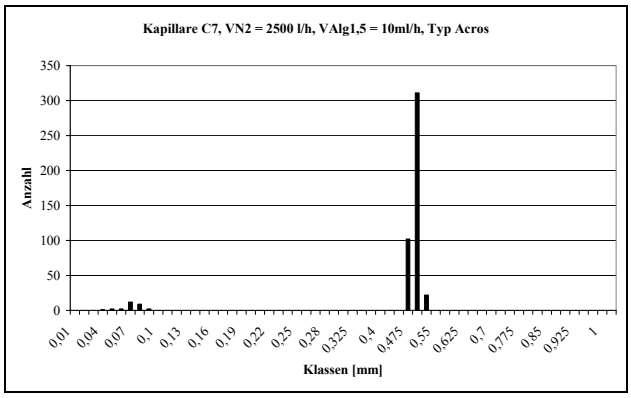


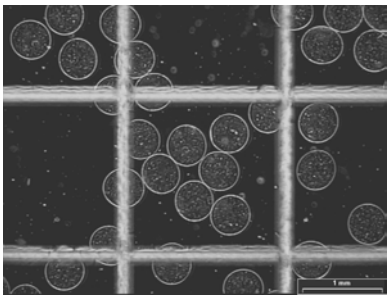

Kapillare C6, VN2 = 4000 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
2500
2000
1500
1000
500
0
0,01 0,04 0,07 0,1 0,13 0,16 0,19 0,22 0,25 0,28 0,325 0,4 0,475 0,55 0,625 0,7 0,775 0,85 0,925 1
Klassen [mm]

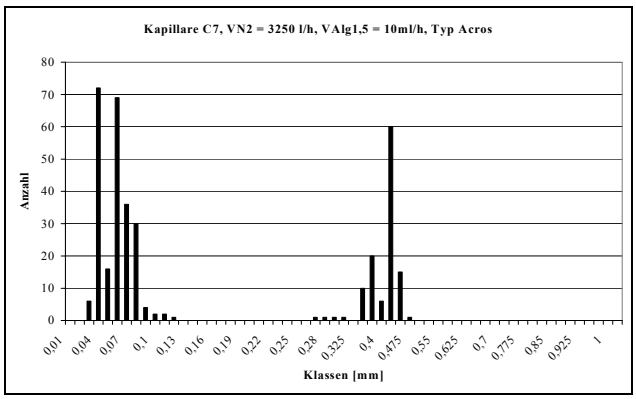


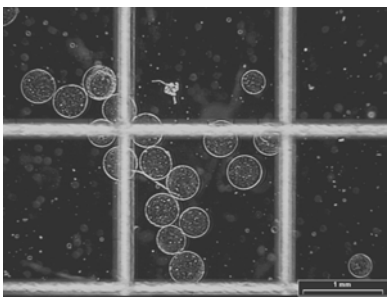

Kapillare C6, VN2 = 4750 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
2500
2000
1500
1000
500
0
0,01 0,04 0,07 0,1 0,13 0,16 0,19 0,22 0,25 0,28 0,325 0,4 0,475 0,55 0,625 0,7 0,775 0,85 0,925 1
Klassen [mm]

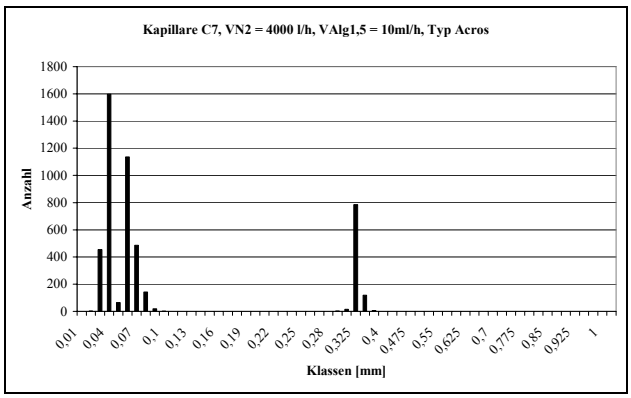


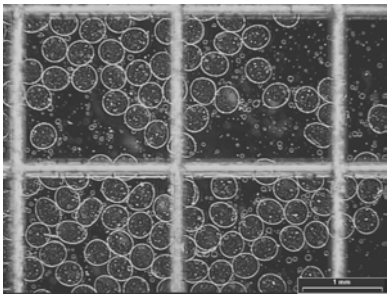

Kapillare C7, VN2 = 2500 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
Klassen [mm]

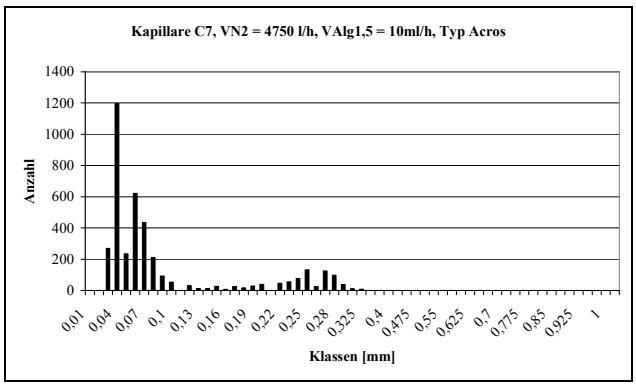


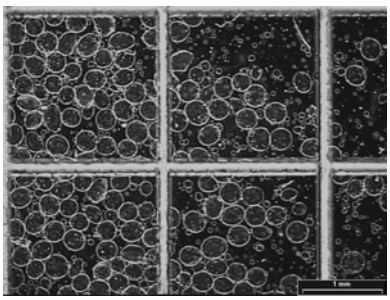

Kapillare C7, VN2 = 3250 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
Klassen [mm]



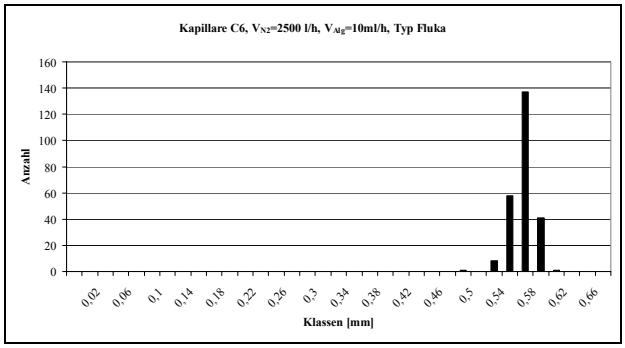

Kapillare C7, VN2 = 4000 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
Klassen [mm]

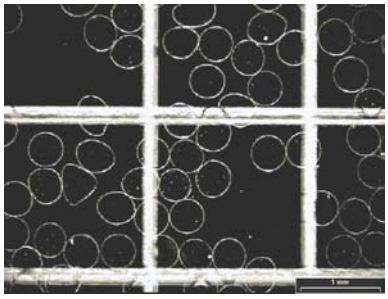


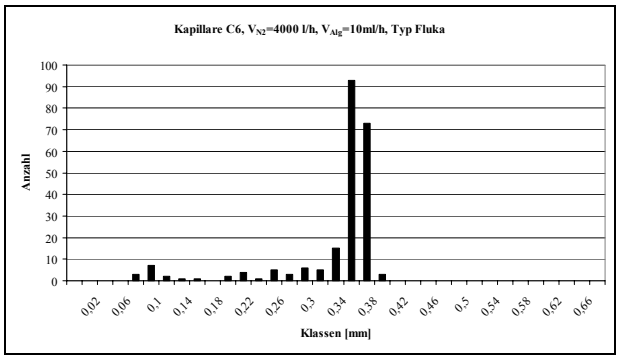

Kapillare C7, VN2 = 4750 l/h, VAlg1,5 = 10ml/h, Typ Acros
Anzahl
Klassen [mm]

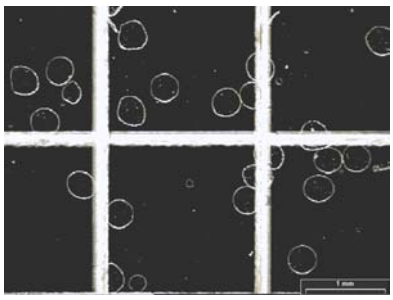


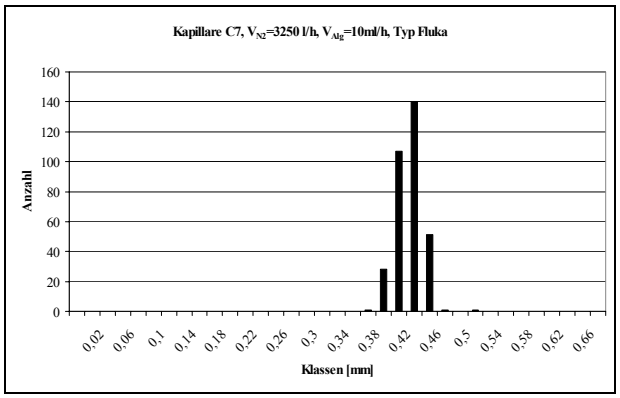
A VI: Kapselgrößen bei Verwendung der AirJet-Methode unter Nutzung der Na-Alginat-Lösung 1,5 % (w/v) vom Typ Fluka mit η_0 = 0,48 Pa·s

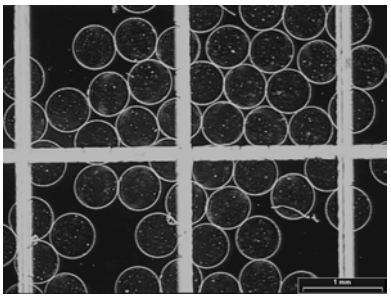


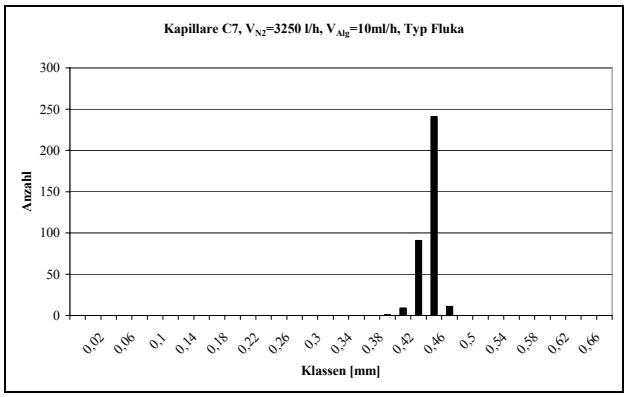


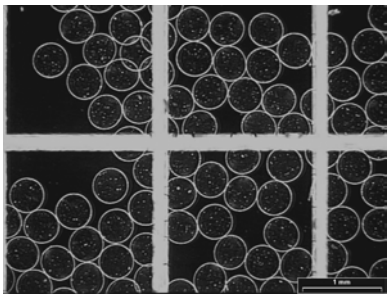


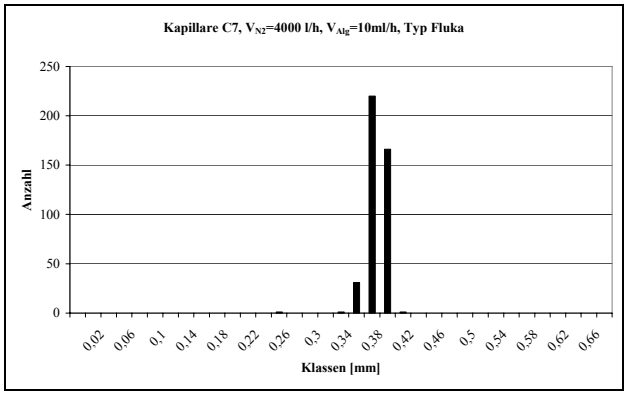


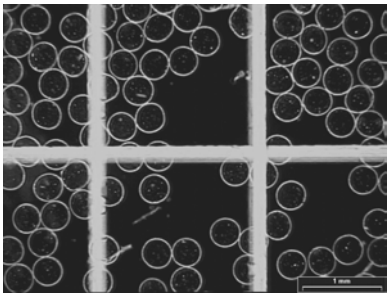

Kapillare C7, V_{N2}=3250 l/h, V_{Alg}=10ml/h, Typ Fluka
Anzahl
0
20
40
60
80
100
120
140
160
0,02
0,06
0,1
0,14
0,18
0,22
0,26
0,3
0,34
0,38
0,42
0,46
0,5
0,54
0,58
0,62
0,66
Klassen [mm]

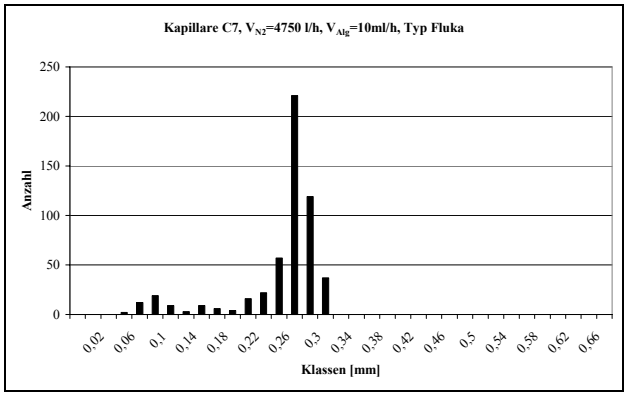


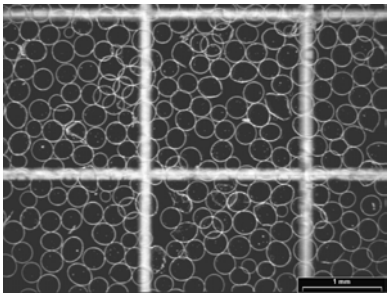

Kapillare C7, V_{N2}=3250 l/h, V_{Alg}=10ml/h, Typ Fluka
Anzahl
0
50
100
150
200
250
300
0,02
0,06
0,1
0,14
0,18
0,22
0,26
0,3
0,34
0,38
0,42
0,46
0,5
0,54
0,58
0,62
0,66
Klassen [mm]




Kapillare C7, V_{N2}=4000 l/h, V_{Alg}=10ml/h, Typ Fluka
Anzahl
0
50
100
150
200
250
0,02
0,06
0,1
0,14
0,18
0,22
0,26
0,3
0,34
0,38
0,42
0,46
0,5
0,54
0,58
0,62
0,66
Klassen [mm]




Kapillare C7, V_{N2}=4750 l/h, V_{Alg}=10ml/h, Typ Fluka
Anzahl
0
50
100
150
200
250
0,02
0,06
0,1
0,14
0,18
0,22
0,26
0,3
0,34
0,38
0,42
0,46
0,5
0,54
0,58
0,62
0,66
Klassen [mm]



10 Lebenslauf

Geburtsdatum:	18.11.1969
Geburtsort:	Halle / S.
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Sept. 1986 - Juni 1988:	Gymnasium in Köthen, Abschluß: Abitur
Nov. 1988 – Febr. 1989:	Wehrdienst
März 1989 – Aug. 1989:	Vorpraktikum zum Studium im VEB Orbitaplast Weißandt - Gölzau
Sept. 1989 – Aug. 1991	Studium Polymertechnik an der Technischen Hochschule „Carl Schorlemmer“ Leuna-Merseburg
Sept. 1991	Wechsel zum Studiengang Kunststofftechnik an die Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Oktober 1996:	Abschluß des Studiums als Dipl.-Ing. für Kunststofftechnik
Okt. 1996 – Aug. 1997:	Erweiterungsstudiengang Materialwissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Sep. 1997 – Okt. 1998:	Mitarbeiter der Forschungs- und Entwicklungsabteilung der Kind Hörgeräte GmbH & Co KG in Großburgwedel
Feb. 1999 – Feb 2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. habil. J. Kreßler, Professur „Heterogene Polymermaterialien“
Mai 2002 – April 2003	Mitarbeiter in der Forschungs- und Entwicklungsabteilung der Inotech Encapsulation AG, Dottikon (Schweiz), Schwerpunkt Feasibility Studien
Seit Mai 2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Professur für Zellkulturtechnik und Stammzellbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

11 Literatur

1 Thies Technology Inc., http://thiestechnology.com/definit.htm.
2 Bakan, J. A., in Microencapsulation and Nanoencapsulation-Processes and Pharmaceutical Applications, CRS-APV Joint Workshop, Bosten, **1990**, 412.
3 Prüße,U., Landesbauforschung Völkerode, **2000,** Sonderheft 214.
4 Bergmann, C., Luft, G., Chem. Eng. Technol., **1998**, 21 (1), 33.
5 Garofalo, F. A., Chang, T. M. S., Biomat., Art. Cells, Art. Org., **1989**, 17 (3), 271.
6 Förster, M. Mansfield, J., Schellenberger, A., Dautzenberg, H., Enzme Microb. Technol., **1994**, 16 (9), 777.
7 Luzzi, A. L., Gerraughty, R. J., Journal of pharmaceutical Science, **1967**, 56 (9), 1174.
8 Cleland, J. L., Johnson, O. L., Putney, S., Jones, A. J. S., Advances Drug Delivery Reviews, **1997**, 28, 71.
9 El-Gibaly, I., Anwar, M. M.; Bull. Pharm. Sci., **1998,** 21 (2), 117.
10 Chandy, T.,Mooradian, D. L., Gundu, H. R. R., J. Appl. Polym. Sci., **1998**, 70, 2143.
11 Götze, M., Torner, H., Kauffold, P., König, I. Dautzenberg, H., Loth, F., Pharmazie, **1986**, 41 (4), 250.
12 Hari, P. R., Chandy, T., Sharma, C. P., J. Microencapsulation, **1996**, 13 (3), 319.
13 Andrianov, K. A., Payne, L. G., Advanved Drug Delivery Reviews, **1998**, 31, 185.
14 O´Hagan, D. T., Singh, M.; Gupta, R. K.; Advanved Drug Delivery Reviews, **1998**, 32, 225.
15 Hari, P. R., Chandy, T., Shama, C. P., J. Microencapsulation, **1996**, 13 (3), 319.
16 Kawashima, Y., Handa, T., Kasai, A., Takenaka, H., Lin, S. Y., Ando, Y., Journal of Pharmaceutical Sciences, **1985**, 74 (3), 264.
17 Mallard, C., Coudanet, J., Rault, I., Vert, M., J. Microencapsulation, **2000**, 17 (1), 81.
18 Muzzarelli, R. A. A., Miliani, M., Cartolari, M., Genta, I., Perugini, P., Modena, T., Pavanetto, F., Conti, B., S.T.P. Pharma Sciences, **2000**, 10 (1), 51.
19 Wan, L. S. C., Heng, P. W. S., Chan, L. W., J. Microencapsulation, **1992**, 9 (3), 309
20 Bhatnagar, S., Nakhare, S., Vyas, S. P. J. Microencapsulation, **1995**, 12 (1), 13.
21 Sanchez, A., Villamayor, B., Guo, Y., McIver, J., Alonso, M. J., International Journal of Pharmaceutics, **1999**, 185, 255.
22 Patel, M. P., Cruchley, A. T., Coleman, D. C., Swai, H., Braden, M., Williams, D. M., Biomaterials, **2001**, 22, 2319.
23 Iooss, P, Ray, A.-M., Grimandi, G., Daculsi, G., Merle, C., Biomaterials, **2001**, 22, 2785.
24 Lim, F., Sun, A. M., Science, **1980**, 210, 908.
25 Lim, F., Applied Biochemistry and Biotechnology, **1984**, 10, 81.
26 Garofalo, F. A., Eng., M., Chang, T. M. S., Biomat., Art. Cells, Art. Org., **1989**, 17 (3), 271.
27 Prakash, S., Chang, T. M. S., Art. Cells, Blood Subs., and Immob. Biotech., **1999**, 27 (3), 291.
28 Lanza, R., Ecker, D. M., Kühtreiber, W. M., Marsh, J. P., Ringeling, J., Chick, W. L., J. Mol. Med., **1999**,77, 206
29 Soon-Shiong, P., Heintz, R. E., Merideth, N., Yao, Q. X., Yao, Z., Zheng, T., Murphy, M., Moloney, M. K., Schmehl, M., Harris, M., Mendez, Ro., Mendez, Ra., Sandford, P. A., The Lancet, **1994**, 343, 950.
30 FAZ **2001**, Nr. 72, 26.03.2001.
31 Schellenberger, A., Förster, M., Mansfeld, J., Schlussbericht „Immobilisierung von Zell-/ und Zell-/Enzymsystemen in Symplexmikrokapseln“, **1991**, Förderkennzeichen 0319769A.

32 Ram, Z., Culver, K. W., Oshiro, E. M., Viola, J. J., DeVroom, H. L., Otto, E., Long, Z., Chiang, Y., McGarrity, G. J., Muul, L. M., Katz, D., Blaese, R. M., Oldfield, E. H., Nat Med, **1997**, 3, 1354.

33 Zurn, A.D., Baetge, E. E., Hammang, J. P., Tan, S. A., Aebischer, P., Neuroreport, **1994**, 6 (1), 113.

34 Basta, G., Rossodivita, M. E., Osticioli, L., Luca, G.; Brunetti, P., Calafiore, R., J. Submicrosc. Cytol. Pathol., **1996**, 28 (2), 209.

35 Calafiore, R., BASTA, G., Sarichielli, P., Luca, G., Tortoioli, C., Brunetti, P., Acta Diabetol, **1996**, 33, 150.

36 Clayton, H.A., James, R. F. L., London, N. J. M., Acta Diabetol., **1993**, 30, 181.

37 Darquy, S.; Reach, G., Diabetologia, **1985**, 28, 776.

38 De Vos, P., De Haan, B. J., Schilfgaarde, van R, Biomaterials, **1996**, 18, 1085.

39 Fritschy, W. M., Gerrits, P. O., Wolters, G. H., J., Pasma, A., van Schilfgaarde, R., Biotechnic & Histochemistry, **1995**, 70 (4), 188.

40 Gharapetian, H., Davies, N. A., Sun, A. M., Biotechnology and Bioengineering, **1986**, XXVIII, 1595.

41 Gröhn, P., Klöck, G., Schmitt, J., Zimmermann, U., Horcher, A., Bretzel, R. G., Hering, B. J., Brandhorst, H., Zekorn, T-., Federlin, K., Exp Clin Endocrinol, **1994**, 102, 380.

42 Horcher, A., Zekorn, T., Siebers, G., Klöck, G., Schnettler, R., Arnold, M., Federlin, K., Zimmermann, U., Bretzel, R. G., Transplantation Proceedings, **1992**, 24 (6), 2950.

43 King, A., Anderson, A., Sandler, S., Transplantation, **2000**, 70 (2), 380.

44 King, A., Sandler, S., Anderson, A., Hellerström, C., Kulseng, B., Skjak-Braek, G., Diabetes Gare, **1999**, 22 (2), B121.

45 Leu, F.-J., Chen, C.-F., Chiang, W.-P. E., Chern, H.-T., Shian, L.-R., Chung, T.-M., Wang, J., Sun, A. M., J. Formosan Med Assoc, **1992**, 91 (9), 849.

46 Machluf, M., Orsola, A., Atala, A., World J Urol, **2000**, 18, 80.

47 Merten, O.-W., Dautzenberg, H., Palfi, G. E., Cytotechnology, **1991**, 7, 121.

48 Schrenzenmeier, J., Kirchgessner, J., Gerö, L., Kunz, L. A., Beyer, J., Müller-Klieser, W., Transplatation, **1994**, 57 (9), 1308.

49 Siebers, U., Zekorn, T., Horcher, A., Hering, B., Bretzel, R. G., Zimmermann, U., Federlin, K., Transplantation Proceedings, **1992**, 24 (3), 950.

50 Siebers, U., Horcher, A., Brandhorst, H., Brandhorst, D., Hering, B., Federlin, K., Bretzel, R. G., Zekorn, T., J Mol Med, **1999**, 77, 215.

51 Sugamori, M. E., Sefton, M. V., Trans Am Soc Artif. Intern. Organs, **1989**, XXXV, 791

52 Sun, A. M., Methods in Enzymology, **1988**, 137, 575.

53 Sun, Y., Ma, X., Zhou, D., Vacek, I., Sun, A. M., Bioartificial Pancreas, **1996**, 98 (6), 1417.

54 Woods, E. J., Liu, J., Zieger, M. A. J., Lakey, J. R. T., Critser, J. K., Cell Transplantation, **1999**, 8, 699.

55 Yang, H., Wright, J. R., Transplantation, **1999**, 67 (6), 815.

56 Yoshioka, T., Hirano, R., Shioya, T., Kako, M., Biotechnology and Bioengineering, **1990**, 35, 66.

57 Zekorn, T., Horcher, A., Siebers, U., Federlin, K., Bretzel, R. G., J Mol Med, **1999**, 77, 193.

58 Zekorn, T., Endl, U., Horcher, A., Siebers, U., Bretzel, R. G., Federlin, K., Transplantion Proceedings, **1995**, 27 (6), 3362.

59 Sakai, S., Ono, T., Ijima, H., Kawakami, K., Biomaterials, **2001**, 22, 2827.

60 Hasse, C., Schrezenmeir, J., Stinner, B, Schark, C., Wagner, P. K., Neumann, K. Rothmund, M., World J. Surg., **1994**, 18, 630.

61 Aoki, K., Hakamada, K., Umehara, Y., Seino, K., Itabashi, Y., Sasaki, M., Transplantation Proceedings, **2000**, 32, 1118.
62 Dixit, V., Arthur, M., Reinhardt, R., Gitnick, G., Artificial Organs, **1992**, 16 (4), 336.
63 Honiger, J., Balladur, P., Mariani, P., Calmus, Y., Vaubourdolle, M., Delelo, R., Capeau, J., Nordlinger, B., Biomaterials, **1995**, 16 (10), 753.
64 Ito, Y.; Chang, T. M. S., Artif Organs, **1992**, 16 (4), 422.
65 Wan, L. S. C., Heng, P. W. S., Chan, L. W., J. Microencapsulation, **1992**, 9 (3), 309.
66 Wells, G. D. M., Fisher, M. M., Sefton, M. V., Biomaterials, **1993**, 14 (8), S. 615.
67 Vishwanath, R., Nebel, R. L., McMillan, W. H., Pitt, C. J, Macmillan, K.L., Theriogenologie, **1997**, 48, 369.
68 Nebel, R. L., Vishwanath, R., McMillan, W. H., Pitt, C. J, Animal Reproduction Science, **1996**, 44, 79.
69 Nebel, R. L., Saacke, R. G., Reprod Dom. Anim, **1996**, 31, 85.
70 Al-Hendy, A., Hortelano, G, Tannenbaum, G. S., Chang, P. L., Human Gene Therapy, **1995**, 6, 165.
71 Chang, P. L., Shen, N., Westcott, A. J., Human Gene Therapy, **1993**, 4, 433.
72 Chang, P.L., Heng, P. W. S., Wan, L. S. C., J. Microencapsulation, **1997**, 14 (5), 545.
73 Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A.-M., Remy, J.-S., Pharmaceutical Research, **1998**, 15 (9), 1332.
74 Maysinger, D., Piccardo, P., Filipovic-Grcic, J., Cuello, A. C., Neurochem. Int., **1993**, 23, 2, 123.
75 Maysinger, D., Piccardo, P., Liberini, P., Jalsenenjak, I., Cuello, A. C., Neurochem. Int., **1994**, 24, 5, 495.
76 Maysinger, D., Kriegelstein, K.,Filipovic-Grcic, J., Sendtner, M., Unsicker, K., Richardson, P, Experimental Neurology, **1996**, 138, 177.
77 Miyamoto, H., Okada, N., Yoshioka, T., Suzuki, R., Sakamoto, K., Katsume, A., Saito, H., Tsutsumi, Y., Kubo, K., Nakagawa, S., Ohsugi, Y., Mayumi, T., Biol. Pharm. Bull., **1999**, 22 (3), 295.
78 Moser, C., Speaker, T. J., Offit, P. A., Vaccine, **1997**, 15 (16), 1767.
79 Offit, P.A., Khoury, C. A., Moser, C. A., Clark, H. F., Kim, J. E., Speaker, T. J., Virology, **1994**, 203, 134.
80 Oh, D. J., Choi, S. K., Chang, H. N., Choe, T. B., Cytotechnology, **1993**, 13, 41.
81 Ozawa, C. R., Springer, M. L., Blau, H. M., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **2000**, 40, 295.
82 Prakash, S., Chang, T. M. S., Art. Cells, Blood Subs., and Immob. Biotech., **1999**, 27 (3), 291.
83 Robitaille, R., Desbiens, K, Henley, N., Hallé, J.-P., J. BIOMED. MAT. RES.,**1999**, 45, 3, 223.
84 Ross, C., Ralph, M., Chang, P. L., Human Gene Therapy, **1999**, 10 (1), 49.
85 Shimi, S.M., Hopwood, D., Newman, E. L., Cuschieri, A., Br. J. Cancer, **1991**, 63, 675.
86 Tai, I. T., Sun, A. M., The FASEB Journal, **1993**, 7, 1061.
87 Tresco, P. A., Winn, S. R., Aebischer, P., ASAIO Journal, **1992**, 17.
88 Ozawa, C. R., Springer, M. L., Blau, H. M., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **2000**, 40, 295.
89 Basic, D., Vacek, I., Sun, A. M., Art. Cells, Blood Subs., and Immob. Biotech., **1996**, 24 (3), 219.
90 www-fhs.mcmaster.ca/gene/methods/apa-over.htm.
91 Lum, Z. P., Tai, I. T., Krestow, M., Norton, J., Vacec, I., Sun, A. M., Diabetes, **1991**, 40, 1511.

92 Lum, Z. P., Krestow, M., Tai, I. T., Vacec, I., Sun, A. M., Transplantation, **1992**, 53, 1180.
93 Robitaille, R., Pariseau, J. P., Leblond, F. A., Lamoureux, M., Lepage, Y., Hallé, J. P., J. biomed. Mat. Res., **1999**, 44(1), 116.
94 Pariseau, J. F., Leblond, F. A., Harel, F., Lepage, Y., Hallé, J. P., J. biomed. Mat. Res., **1995**, 29, 1331.
95 De Vos, P., De Haan, B., Pater, J., Van Schilfgaarde, R., Transplantation, **1996**, 62(7), 893.
96 Chicheportiche, D., Reach, G., Diabetologia, **1988**, 31, 54.
97 Schrenzenmeir, J., Gerö, L., Laue, C., Kirchgessner, J., Mueller-Klieser, W., Altmann, J. J., Transpl. Proc., **1992**, 24, 2925.
98 Schrenzenmeir, J., Kirchgessner, J., Gerö, L., Kunz, L. K., Beyer, J., Mueller-Klieser, W., Transplantation, **1994**, 9, 1308.
99 Dautzenberg, H., Loth, F., Wagenknecht, W., Philipp, B., Das Papier, **1985**, 39 (12), 601.
100 Hunkeler, D., Prokop, A., Powers, A., Haralson, M., DiMari, S., Wang, T., **1997**, 22, 232.
101 Hunkeler, D., in New Biomedical Materials, Ed. Haris, P. I., Chapman, D., IOS Press, Amsterdam, **1998**, 157.
102 Renken, A., Hunkeler, D., Polimery, **1998**, 43 (9), 530.
103 Prokop, A., Hunkeler, D., DiMari, S., Haralson, M. A., Wang, T. G., Advances in Polymer Science, **1998**, 136, 1.
104 Prokop, A., Hunkeler, D., DiMari, S., Haralson, M. A., Wang, T. G., Advances in Polymer Science, **1998**, 136, 53.
105 Hunkeler, D., Prokop, A., Cherrington, A., Rajotte, R., Sefton, M., Bioartificial Organs II: Technology, Medicine & Materials, **1999**, Annals of the new york academy of science, 875.
106 Phillip, B., Dautzenberg, H., Linow, K.-J., Kötz, J., Dawydoff, W., Pogr. Polym. Sci., 1989, 14, 91.
107 Prokop, A., Hunkeler, D., Cherrington, A. D., Annals of the New York Academy of Sciences, 1997, 831.
108 Yang, H., Wright, Jr., J. R., in Cell encapsulation technology and therapeutics, Ed. Kühtreiber, M. W., Lanza, R. P., Chick, W. L., Birkhäuser, Bosten, **1999**, 79.
109 Zimmermann, U., Mimietz, S., Zimmermann, H., Millgärtner, M., Schneider, H., Ludwig, J., Hasse, C., Hasse, A., Rothmund, M, Fuhr, G., BioTechniques**, 2000**, 29, 564.
110 Klöck, G., Pfeffermann, A., Ryser, C., Gröhn, P., Kuttler, B., Hahn, H.-J., Zimmermann, U., Biomaterials, **1997**, 18, 707.
111 Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G., Tibtech, **1990**, 8, 71.
112 Kulseng, B., Skjåk-Bræk, G., Ryan, L., Andersson, A., King, A., Faxvaag, A., Espevik, T., Transplantation, **1999**, 67, 978.
113 Skaurud, Ø., Dornish, M., Skjåk-Bræk, G., Product Flyer, Pronova Biomedical, Norway, N-3002, Drammen.
114 Zimmermann, U., Klöck, G., Federlin, K., Hannig, K., Kowalski, M., Bretzel, R. G., Horcher, A. H., Entenmann, H., Elekrophoresis, **1992**, 13, 269.
115 Hasse, C., Schrenzenmeier, J., Stinner, B., Schark, C., Wagner, P. K., Neumann, K., Rothmund, M., World J. Surg., **1994**, 18, 630.
116 Weber, W., Fux, C., Daoud-El Baba, M., Keller, B., Weber, C. C., Kramer, B. P., Heinzen, C., Aubel, D., Bailey, J. E., Fussenegger, M., Natur Biotechnology, **2002**, 20, 901.
117 Goosen, M. F. A., O´Shea, G., Gharapetian, S. C., Sun, A. M., Biotechnology and Bioengineering, **1985**, XXVII, 146.

118 Vandenbossche, G. M. R., Van Oostveldt, J. P. R., J. Pharm. Pharmacol., **1991**, 43, 275.
119 Sakai S, Ono T, Ijima H, Kawakami K., J. Microencapsul, **2000**, 17(6), 691.
120 De Vos, P., De Haan, B., Van Schilfgaarde, R., Biomaterials, **1997**, 18, 273.
121 Eggers, J. Rev. Mod. Phys., **1997**, 69, 865.
122 Schmidt, P., Wazel, P., Phys. uns. Zeit, **1984**, 15, 113.
123 Brandenberger, H., Dissertation, **1999**, ETH Zürich, Diss. ETH Nr. 13103.
124 Renken, A., Hunkeler, D., Polimery, **1998**, 43 (9), 530.
125 London, N. J. M., Chamberlain, R. L., Rumford, G. M., James, R. F. L., Bell, P. R. F., Surg. Res. Comm., **1989**, 4, 271.
126 Wolters, G. H. J., Fritschy, W. M., Gerrits, D., van Schilfgaarde, R., Journal of Applied Biomaterials, **1992**, 3, 281.
127 Heinzen, C., Dissertation, **1995,** ETH Zürich, Diss. ETH Nr. 11345.
128 Poncelet, D., Poncelet De Smet, B, Beaulieu, C., Neufeld, R. J., in Fundamentals of animal cell encapsulation and immobilization, Ed. Goosen, M. F. A., CRC Press, Boca Raton, **1993**, 113.
129 Harkins, W. D., Brown, F. E., J. Am. Chem. Soc., **1919**, 41, 499.
130 Bird, R. B., Transport Phenomena, John Wiley & Sons, New York, **1960**.
131 Foscolo, P. U., Gibilaro, L. G., Waldram, S. P., Chem. Eng. Sci., **1983**, 38 (8), 1251.
132 Prüße, U., Dalluhn, J., Bredford, J., Vorlop, K.-D.,CIT, **2000**, 72, 8, 852.
133 Leidig, E., Prüsse, U., Vorlop, K.-D., Winter, J., Bioprocess Engineering, **1999**, 21, 5
134 freundliche Überlassung der geniaLab® BioTechnologie – Produkte und Dienstleistungen GmbH, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany.
135 Prüße, U., Dalluhn, J., Breford, J, Vorlop, K.-D., CIT, **2000**, 72 (8), 852.
136 Schwinger, C., Koch, S., Jahnz, U., Wittlich, P., Rainov, N. G., Kressler, J., JOM, **2002**, 19 (3), 273.
137 Rayleigh, Lord, Proc .London Math. Soc., **1878**, 10, 4.
138 Weber, C., Zeitschrift für angewandte Mathematik und Mechanik, **1931**, 11 (2), 136.
139 freundliche Überlassung durch die Inotech Encapsulation AG, Dottikon (CH).
140 Schmiedel, H., Handbuch der Kunststoffprüfung, Carl Hanser Verlag, München, Wien, **1992**.
141 DIN ISO 53454, Prüfung von Kunststoffen, Druckversuch.
142 Daly, M. M., Knorr, D., Biotechnology Progress, **1988**, 4 (2), 76.
143 Bartkowiak, A., Hunkeler, D., Chem. Mater., **1999**, 11, 2486.
144 Zhang, Z., Saunders, R., Thomas, C. R., J. Mircoencapsulation, **1999**, 16 (1), 117.
145 Rose, T., Neumann, B., Thielking, H., Koch, W., Vorlop, K.-D., Chem. Eng. Technol., **2000**, 23 (9), 769.
146 Sun, G., Zhang, Z., J. Microencapsulation, **2001**, 18 (5), 593.
147 Gaumann, A., Landes, M., Jacob, B., Pommersheim, R., Laue, C., Vogt, W., Schrenzenmeier, J., Biomaterials, **2000**, 21, 1911.
148 Leblond, F. A., Tessier, J, Hallé, J. P., Biomaterials, **1996**, 17, 2097.
149 Labhasetwar, R. A., Joshi, S. V., Dorle, A. K., J. Microencapsulation, **1988**, 5, 339.
150 Peirone, M., Ross, C. J.D., Hortelano, G., Brash, J. L., Chang, P. L., J. Biom. Mat. Res, **1998**, 42 (4), 587.
151 Schwinger, Ch., Kressler, J., Koch, S., Rainov, N. G., Klemenz, A., Proc. ACS, PMSE, **2001**, 84, 894.
152 Klemenz, A., Schwinger, Ch., Brand, J., Kressler, J., J. Biom. Mat. Res., Part A, **2003**, 65A, 2, 237.
153 Lemons, R. A., Quate, C. F., Appl. Phys. Lett, **1974**, 24, 163.
154 Quate, C., in Scanned image Microskopy, Ed. Ash, E.A., Academic Press, London, **1980**, 23.

155 Briggs, A., Acoustic Microskopy, Clarendon Press, Oxford, **1992**.
156 Maev, R. G., Levin, V. M., IEEE Trans. UFFC, **1997**, 44, 1224.
157 Klemenz, A., Brandt, J., Raum, K., Haberland, E. J., Gudziol, S., Schwinger, C., Smitmans, L., and Leicht, S., **2002**, "Ultraschall-Rastermikroskopie zur Untersuchung biologischer Gewebe," *19. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg*.
158 Hussey, M.,Diagnostic Ultrasound, Blackie& Son Ltd. Glasgow, **1975**, 73.
159 Hoppe, M., Breiter-Hahn, J., IEEE Trans SU, **1985**, 32, 289.
160 Raum, K; Nachtigall, W.; Cobet, U., Ber. Vogelw. Hiddensee, **1999**, 15, 73.
161 Quate, C., Ash, E. A., Proc. Int. Conf. Optics in Biomed. Sciences, Graz, **1981**, 25.
162 Meunier, A., Katz, J. L., Christel, T., Sedel, K. J., J Othop. Res., **1988**, 6, 770.
163 Katz, J. L., Meunier, A., J Biomech. Eng., **1993**, 115, 543.
164 Zimmermann, M. C., Prabhakar, A., Chokshi, B. V., Budhwani, N., Berendt, H. J., J. BIOMED. MAT. RES., **1994**, 28, 931.
165 Turner, C. H., Chandran, A., Pidiparti, V., Bone, **1995**, 17, 85.
166 Raum, K., Brandt, J., Klemenz, A., Cobet, U., Z. Med. Phys., **1999**, 9, 246.
167 Smitmans, S., Raum, K., Brandt, J., Klemenz, A., IEEE Int. Ultras. Symp., San Juan, Puerto Rico, Proccedings, **2001**, 1379.
168 Katz, J. L., Bumrerraj, S., Drayfuss, J., Wang, Y, Spencer, P., J. Biom. Mat. Res. (Appl. Biomat.), **2001**, 58, 366.
169 Kushibiki, J, Ha, K. L. Kato, H., Chubiachi, N., Dunn, F., IEEE Ultasonic Sumposium Preprint, **1987**, 837.
170 Hildebrandt, J. A., Rugar, D., Johnson, R. N., Quate, C. F., PNAS, **1981**, 78, 1656.
171 Breiter-Hahn, J., J Microsc, **1990**, 146, 29.
172 Litniewski, J., Breiter-Hahn, J., J Microsc., **1990**, 158, 95.
173 Forster, J. S., Rugar, D, IEEE Trans. SU, **1985**, 139.
174 mündliche Mitteilung Dr. U. Jahns, geniaLab GmbH, Braunschweig.
175 Hershko, V., Nussinovitch, A, J. Agric Food Chem., **1998**, 46, 2988.
176 Sinquin, A., Houzelle, M. C., Hubert, P., Choplin, L., Virot, M. L., Dellacherie, E., Langmuir, **1996**, 12, 3779.
177 VDI Wärmeatlas, 8. überarbeitete und erweiterte Auflage, Springer-Verlag, Berlin, **1997.**
178 Brauer, H., Grundlagen der Einphasen- und Mehrphasenströmungen, Sauerländer, Aarau, Frankfurt, 1971.
179 Wilkinson, M. C., Journal of Colloid and Interface Science, **1972**, 40 (1), 14.
180 mit freundlicher Unterstützung von Dr. E. Otto, GTI Inc, Gaithersburg, USA.
181 mit freundlicher Unterstützung von Dr. P. Aebisher, University Lausanne, Switzerland.
182 mit freundlicher Unterstützung von Dr. M. Behrens, Barrow Neurological Institute, Phoenix, USA.
183 Serp, D., Catana, E., Heinzen, C., von Stockar, U., Marison, I. W., Biotechnol. Bioeng, **2000**, 70, 41.
184 Koch, S., Schwinger, C., Heinzen, C., Kressler, J., Rainov, N. R., J. Microencapsulation, **2003**, 20, 3, 303.
185 Schwinger, C., Klemenz, A., Raum, K., Kressler, J., Landesbauforschung Völkerode, **2002**, SH 241, 51.
186 Koch, S., Dissertation in Vorbereitung, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2003**.