

Grundlagen der elektrisch induzierten Eiskeimbildung und ihre Anwendung in der Kryobiologie

Von der Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Physiker

Ansgar Petersen

aus Freiburg i. Br.

Berichter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Günter Rau
Univ.-Prof. Dr. phil. (Uni Wien) Heinrich Kurz

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Ansgar Petersen

**Grundlagen der elektrisch induzierten
Eiskeimbildung und ihre Anwendung
in der Kryobiologie**



Helmholtz-Institut
für Biomedizinische Technik
an der RWTH Aachen

Shaker Verlag
D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 2007

Copyright Shaker Verlag 2008

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-6976-0

ISSN 1430-7316

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technik der RWTH Aachen im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes. Ohne die Unterstützung durch zahlreiche Personen wäre die Arbeit in dieser Form nicht zu realisieren gewesen.

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Rau, der durch sein Vertrauen und seine weitreichende Unterstützung die bestmöglichen Rahmenbedingungen geschaffen und die Arbeit mit vielen Ideen begleitet hat. Herrn Prof. Kurz danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die freundliche Übernahme des Korreferates.

Frau Dr. Glasmacher gab mir als Gruppenleiterin die Möglichkeit dieses interessante Projekt in der Abteilung Kryobiologie zu bearbeiten. Herr Prof. Michely, heute am II. Physikalischen Institut der Universität zu Köln, hat mir in der Diskussion unterschiedlicher Aspekte große Unterstützung zuteil werden lassen und für die Interpretation der experimentellen Ergebnisse wichtige Gedankenanstöße gegeben. Für die Erstellung des Nukleationsmodells war der Austausch mit Herrn Dr. Staikov vom Forschungszentrum Jülich unentbehrlich. Herrn Prof. McGann von der University of Alberta, Kanada, danke ich für das interessante Kooperationsprojekt und die Durchführung der Simulationsrechnungen zur Zelldehydratierung. Herr Dr. Heschel, hat mir durch die Initiierung des Projektes während seiner Zeit als Gruppenleiter der Abteilung Kryobiologie diese interessante Forschungsthematik erst zugänglich gemacht und die weitere Entwicklung bis hin zur Korrekturlesung des Manuskripts in vertrauensvoller Weise begleitet.

Für die positive und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sind die Mitglieder der Abteilung Kryobiologie verantwortlich zu machen. Diese hat mich täglich motiviert und so ganz entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Der wissenschaftliche Beitrag war jedoch von nicht geringerer Bedeutung. Insbesondere sind in diesem Zusammenhang Sigrid Lüneberger und Bärbel Elbers zu nennen, deren außergewöhnliches Engagement im Bereich der Zellkultur, der Versuchsdurchführung sowie bei vielen alltäglichen Fragen unentbehrlich war. Ebenso unverzichtbar war der Beitrag zahlreicher Studentinnen und Studenten, von denen ich besonders Horst Hermani, Andreas Ritter und Hendrik Schneider für ihre großartige Arbeit danken möchte. Peter Schwindke hat beim Aufbau der Messelektronik einen wichtigen Beitrag geleistet und war bei technischen Details ein gern gefragter Ansprechpartner. Herrn Beckers danke ich für seine wertvolle Hilfe rund um das Labor, den Mitarbeitern der mechanischen Werkstatt unter Leitung von Herrn Faßbänder für ihren Beitrag zur Realisierung der experimentellen Aufbauten.

Der tiefste Dank gilt jedoch meiner Familie und Saskia, die mich unterstützt haben und für mich da waren.

Aachen, im Dezember 2007

Ansgar Petersen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Prozesse an der Elektrode	5
2.1.1	Bindungsverhältnisse in Wasser	5
2.1.2	Wasser im elektrischen Feld	7
2.1.3	Ausbildung einer elektrolytischen Doppelschicht	9
2.1.4	Ionenleitfähigkeit in wässrigen Lösungen	13
2.1.5	Reaktionsbedingte Durchtrittsströme an der Elektrode	16
2.1.6	Dynamik der Doppelschichtaufladung und das Ersatzschaltbild	19
2.1.7	Nichtlineare Dynamik für ideal polarisierbare Elektroden	22
2.2	Eiskeimbildung und Kristallwachstum	25
2.2.1	Energetik der Eiskeimbildung	25
2.2.2	Kristallwachstum	31
2.2.3	Destabilisierung der Eisfront durch Latentwärme und Lösungsadditive	32
2.3	Literaturüberblick induzierte Eiskeimbildung	35
2.3.1	Experimentelle Arbeiten	36
2.3.2	Theoretische Arbeiten	39
3	Experimentelle Untersuchungen	41
3.1	Experimenteller Aufbau und Ablauf	41
3.1.1	Aufbau des Friertisches	41
3.1.2	Aufbau der Elektroden	43
3.1.3	Pulsgenerator und Potenzialverläufe	45
3.1.4	Steuerung und Datenerfassung	46
3.1.5	Experimentelle Durchführung	47
3.2	Simulation der Feldverteilung	48
3.3	Ergebnisse I: Parametereinfluss	49

3.3.1	Eiskeimbildung an Isolatoroberflächen	50
3.3.2	Elektrodenmaterial und Polarität	52
3.3.3	Einfluss des Elektrodenabstands	54
3.3.4	Einfluss der Pulsdauer	57
3.3.5	Temperaturabhängigkeit	59
3.3.6	Einfluss von Additiven	59
3.3.7	Einfluss von Salzen	63
3.4	Ergebnisse II: spezielle Erkenntnisse	67
3.4.1	Variation des Spannungsprofils	67
3.4.2	Hochgeschwindigkeitsaufnahmen	68
3.4.3	Ort der Keimbildung an der Elektrode	69
4	Modell der induzierten Eiskeimbildung	75
4.1	Energetik der Eiskeimbildung im elektrischen Feld	76
4.2	Keimbildungsrate	78
4.3	Berechnung der Keimbildungsrate	81
4.3.1	Parameter des Exponentialterms	81
4.3.2	Exponentieller Vorfaktor	83
4.3.3	Keimbildungsrate im betrachteten System	84
4.4	Ergänzende Betrachtungen	86
5	Vergleich zwischen Modell und Experiment	91
5.1	Eiskeimbildung an der Goldspitzen-Elektrode	92
5.2	Der Einfluss experimenteller Parameter	97
5.2.1	Keimbildung ohne Ladungstransfer an der Elektrodenoberfläche	97
5.2.2	Negative Wirkung von Lösungionen und Einfluss der Probentemperatur	100
5.2.3	Einfluss des Elektrodenabstands	105
5.2.4	Einfluss nicht-ionischer Additive	107
5.2.5	Einfluss des Elektrodenmaterials	108
5.2.6	Besondere Effekte an kleinen isolierten Kugelelektroden . . .	109
5.3	Zusammenfassung	111

6	Anwendung in der Kryokonservierung	115
6.1	Problemstellung	115
6.1.1	Veränderung der Lösungszusammensetzung durch die Kristallisation	116
6.1.2	Suspendierte Zellen	118
6.1.3	Gefrierschutzadditive	120
6.1.4	Keimbildungstemperatur	122
6.1.5	Übliche Techniken zur Beeinflussung der Keimbildungstemperatur	124
6.2	Experimenteller Aufbau	125
6.3	Gezielte Variation der Keimbildungstemperatur	128
6.3.1	Probenpräparation	129
6.3.2	Wiedererwärmung der Proben	130
6.3.3	Bestimmung der Zellvitalität	131
6.3.4	Experimentelle Durchführung	132
6.4	Ergebnisse der Kryokonservierungsexperimente	134
6.4.1	Kryokonservierung humaner Fibroblasten	134
6.4.2	Kryokonservierung hämatopoetischer Vorläuferzellen	137
6.5	Simulation der Zelldehydrierung	139
6.5.1	Modell zur Simulation der Transportprozesse	139
6.5.2	Diskussion der Ergebnisse	143
6.6	Zusammenfassung	148
7	Anwendung in der Gefriertrocknung	151
7.1	Problemstellung	151
7.2	Bedeutung der Keimbildungstemperatur	153
7.3	Stand der Technik	154
7.4	Optimierung des Einfrierprozesses	155
7.4.1	Experimenteller Aufbau	155
7.4.2	Experimentelle Durchführung	157
7.4.3	Einfluss unterschiedlicher Additive auf die direkte Eiskeimbildung	157
7.4.4	Erfolg der elektrisch induzierten Eiskeimbildung	158
7.5	Trocknungsprozess	160
7.5.1	Experimenteller Aufbau	160
7.5.2	Auswertung des Trocknungsverlaufs	161
7.6	Zusammenfassung	166

8 Zusammenfassung und Ausblick	169
8.1 Zusammenfassung	169
8.2 Ausblick	172
A Ergänzende Abbildungen und Tabellen	173
A.1 Grundlagen	173
A.2 Elektrisch induzierte Eiskeimbildung	175
A.2.1 Herstellung der Elektroden	175
A.2.2 Konfiguration häufig eingesetzter Elektroden	176
A.2.3 Benutzeroberflächen der Steuerprogramme	180
A.2.4 Pulsgenerator	181
A.2.5 Feldenergie bei der Eischusterbildung	182
A.3 Kryokonservierungsexperimente	188
A.3.1 Anzüchtung der Fibroblasten	188
A.3.2 Vorbereitung der Zellsuspension	190
A.3.3 Zellmembranschädigung durch Me ₂ SO	191
A.3.4 Einfrierprotokolle	191
A.3.5 Wiedererwärmung der Proben nach Kryokonservierung	195
A.3.6 Auswasch- und Färbeprotokoll zur Bestimmung der Membranintegrität	197
A.3.7 Bestimmung der Membranpermeabilitätsparameter für humane Fibroblasten	198
A.4 Gefriertrocknungsexperimente	200