

# Zellen unter Scherfluss

Dissertation

von  
Anna Martina Jötten



eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität Augsburg  
zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

Augsburg, April 2021

Erstgutachter: Prof. Dr. Achim Wixforth  
Zweitgutachter: Prof. Dr. István Kézsmárki

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 2021

# Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich prinzipiell mit der Wirkung von Scherfluss auf Zellen. Dabei beschäftige ich mich einerseits mit der Zelladhäsion an einer festen Oberfläche, und gehe im zweiten Teil über zu dem komplexeren Fall der Zell-Zell-Adhäsion bzw. Aggregaten von Zellen. Konkret wurden dazu zwei grundsätzlich verschiedene Fragen gestellt:

## Teil I: Welche physikalischen Parameter beeinflussen die Zelladhäsion, und wie lassen sie sich mikrofluidisch charakterisieren und einordnen?

Hier kommt ein mikrofluidischer Hybridbau zum Einsatz, der reproduzierbare Strömungsfelder in einem geschlossenen Volumen mit Fluoreszenzmikroskopie und der Möglichkeit, die Umgebungsbedingungen zu variieren, kombiniert [1]. Die Widerstandsfähigkeit adhärenter Zellen unter Fluss wird am Beispiel von SaOs-2 Knochentumorzellen auf dem Implantatmaterial Titan untersucht. Wie stabil diese Zell-Substrat-Bindung ist, entscheidet mit darüber, wie gut ein neu eingesetztes, künstliches Gelenk nach der Operation mit dem Knochen verwächst. In dieser Arbeit geht es insbesondere um den Einfluss der Scherrate, der Zelldichte und der Oberflächenrauigkeit [2, 3].

## Teil II: Wie stabil sind die Aggregate aus roten Blutkörperchen, sogenannte „Rosetten“, die sich bei Malariainfektion bilden?

Bei Malariainfektion befällt der Malariaparasit rote Blutkörperchen, die dadurch adhäsive Eigenschaften ausbilden. Durch das Aneinanderhaften von infizierten und uninfizierten roten Blutkörperchen bilden sich sogenannte Rosetten. Diese für den Patienten gefährlichen Zell-Zell-Aggregate werden durch Mikrofluidikkanäle mit Stenosen gepumpt, um deren Stabilität unter Deformation durch hohe Scherraten und geometrische Einschränkung größen- und blutgruppenabhängig zu untersuchen [4, 5].

In Abbildung 1 ist der Aufbau der Arbeit schematisch dargestellt. Im Wesentlichen basieren beide Teile I und II jeweils auf einem mikrofluidischen Aufbau mit dazu entwickelter halbautomatischer Bildauswertung, und lassen sich mittels eines thermodynamischen Modells beschreiben. Als Ergebnis wird die Zelladhäsion bzw. Ablösung jeweils in Abhängigkeit von der Scherrate und der Zeit betrachtet.

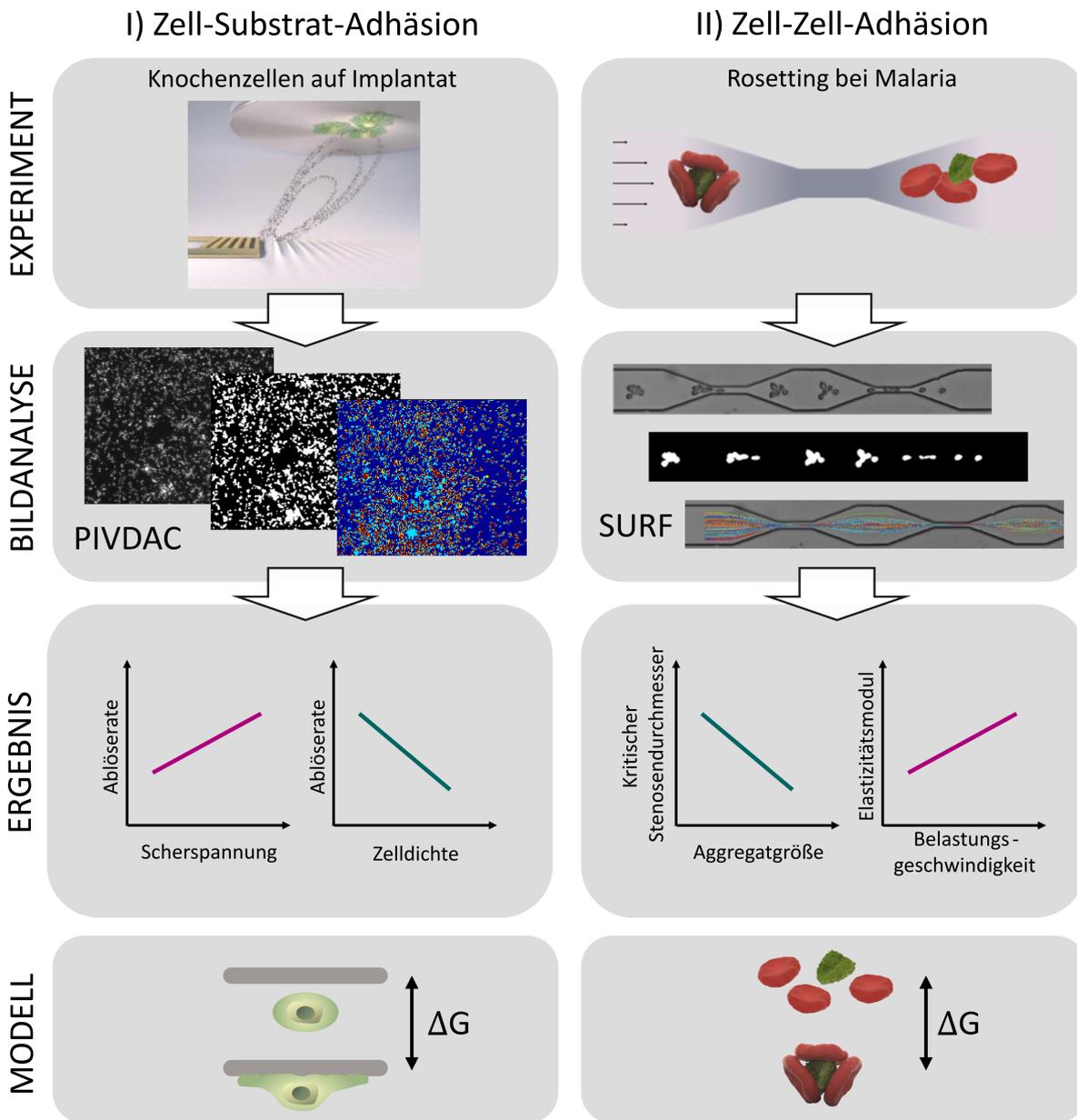
### Mikrofluidisches Experiment

Mithilfe von mikrofluidischen Aufbauten lässt sich eine, im Gegensatz zu großen Scherzellen oder durch Mikromanipulatoren, natürliche bzw. physiologenahe Art der Krafteinwirkung auf Zellen realisieren.

- (I) Die **zylindrische Mikroflussskammer** mit 8 mm Durchmesser und 2 mm Höhe besitzt einen Boden aus Lithiumniobat mit einer Elektrodenstruktur, siehe Kap. I.2. Bei Anlegen einer Wechselspannung werden auf dem piezoelektrischen Chip Oberflächenwellen angeregt, die wiederum eine Strömung, das sogenannte *acoustic streaming*, im Kammervolumen erzeugen.
- (II) Für die Versuche mit Aggregaten roter Blutkörperchen wird ein **Mikrokanal mit sich verengendem Querschnitt** von  $50 \times 8 \mu\text{m}^2$  auf Stenosen bis zu  $3,5 \times 8 \mu\text{m}^2$  verwendet, siehe Kap. II.3.2. Dabei enthält ein Reservoir am Einlass die Zellsuspension, die mittels einer Spritzenpumpe am Auslass durch den Mikrokanal gezogen wird.

### Halbautomatische Bildauswertung

In beiden Experimenten werden Mikroskopaufnahmen aufgenommen und mittels eines dafür entwickelten MATLAB Skripts halbautomatisch ausgewertet. Zur Erkennung und Quantifizierung der Zellen



**Figure 1:** Aufbau der Arbeit.

**Teil I, Zell-Substrat-Adhäsion.** Experiment: Mikroflussskammer zur Untersuchung von SaOs-2 Knochenkrebszellen auf dem Implantatmaterial Titan unter Scherfluss.

Bildanalyse PIVDAC, Particle Image Velocimetry De-Adhesion Correlation: Superposition der Mikroskopaufnahmen zu Beginn und Ende einer 60-minütigen Messung.

Ergebnis: Zellablösung als Funktion der Zeit, Scherspannung und Zelldichte.

Modell: Thermodynamische Betrachtung der Zustände A, adhären, und B, abgelöst.

**Teil II, Zell-Zell-Adhäsion.** Experiment: Mikrofluidikkanal mit Stenose zur Untersuchung von Aggregaten roter Blutkörperchen bei Malariainfektion (Rosetten) unter physiologischen Flussbedingungen.

Bildanalyse SURF, SURvival of Rosettes in Flow: Bild-zu-Bild-Verfolgung von Zellaggregaten.

Ergebnis: Überlebensrate der Rosetten abhängig von deren Größe und der Form der Stenose. Elastizität dieser Rosetten aus dem Spannungs-Dehnungs-Diagramm abhängig von der Belastungsgeschwindigkeit.

Modell: Thermodynamische Betrachtung der Zustände A, Rosette, und B, keine Rosette.

---

werden die Aufnahmen jeweils zunächst binarisiert, und die Entwicklung innerhalb der Bildfolgen herausgearbeitet.

- (I) **PIVDAC** (Particle Image Velocimetry De-Adhesion Correlation, Kap. I.3): Die Superposition der im Fünfminutentakt aufgenommenen Mikroskopaufnahmen als Funktion der Zeit ermöglicht es, Zellen zu unterscheiden, die während des Messzeitraums adhären bleiben, von solchen, die sich ablösen.
- (II) **SURF** (SURvival of Rosettes in Flow, Kap. II.4): Die Bild-zu-Bild-Verfolgung von Zellaggregaten in Hochgeschwindigkeitsvideos mit 2000 Bildern pro Sekunde erlaubt gleichzeitig eine detaillierte Auswertung des Einzelfalls, wie sich eine Rosette bei Passage einer Stenose verhält, sowie die automatische Auswertung vieler Einzelereignisse und somit eine statistische Betrachtung der Überlebensrate abhängig von Rosettengröße, Stenosengröße und Flussrate.

### Thermodynamische Modellierung

Der mechanische Prozess der Zelladhäsion oder -ablösung kann durch ein Zwei-Zustands-System (Zustand A, adhären, und Zustand B, ungebunden) beschrieben werden.

- (I) Zell-Substrat-Adhäsion: Ein Gibbs-Potential mit zwei Minima A und B und zusätzlicher linearer Komponente, die aus der Scherkraft durch den Scherfluss resultiert, beschreibt die Potentiallandschaft in der die Zellen entweder A, adhären sind, oder B, abgelöst wurden, vgl. Kap. I.4.1. Mit Kramers' Theorie der Reaktionskinetik lässt sich das Gleichgewicht von Adhäsion und Ablösung mathematisch beschreiben und daraus die intrinsische, sowie die scherratenabhängige Ablöserate bestimmen.
- (II) Zell-Zell-Adhäsion: Hier gibt es analog einen gebundenen Zustand A (Rosette), und einen ungebundenen Zustand B (keine Rosette), vgl. Kap. II.5.3.1. Die freie Energiedifferenz der Zustände nach Gibbs bringt die Abhängigkeit der Überlebensrate der Rosetten bei Durchfließen einer Stenose von deren Durchmesser  $d$  zum Ausdruck.

### Messparameter Scherspannung und Einwirkzeit

Resultierend wird jeweils die Zellablösung bzw. Deformation und Auflösung von Aggregaten abhängig von den primären Einflussgrößen Scherspannung und Einwirkzeit betrachtet.

- (I) Knochenzellen auf Implantat: Die Entwicklung der zellbedeckten Fläche im Laufe der **Zeit** wird für eine Stunde aufgezeichnet. Die Fläche wird in Zonen unterschiedlicher Scherrate unterteilt, um die Ablösung der Zellen als Funktion der **Scherspannung** zu betrachten, vgl. Kap. I.4.2.
- (II) Rosetting bei Malaria: Das Verhalten eines einzelnen Aggregats im Fluss wird mit hoher **Zeitauflösung** aufgezeichnet. Im Experiment variieren die **Scherspannung** und die **Dauer** der Stenosenpassage durch Anpassung der Flussrate und der Form der Kraftrampe, vgl. Kap. II.5.

### Hauptergebnisse

- (I) Widerstandsfähigkeit adhärenter Zellen gegenüber Scherfluss:
  - Ablöserate als Funktion der Scherspannung:** Mit zunehmender Scherrate nimmt der Anteil der abgelösten Zellen signifikant zu. Der Zusammenhang zwischen Ablöserate und Scherrate ist linear, vgl. Abb. I.4.3 C.
  - Ablöserate als Funktion der Zelldichte:** Die Ablösekinetiken zeigen eine signifikante Abnahme der Ablöserate mit zunehmender Zelldichte, vgl. Abb. I.4.7 G.
- (II) Dynamik von Aggregaten roter Blutkörperchen bei Malariainfektion unter physiologischen Mikroflussbedingungen:
  - Kritischer Stenosedurchmesser als Funktion der Aggregatgröße:** Je enger und länger die Stenose ist, desto stärker wird die Rosette beeinträchtigt, vgl. Abb. II.5.6 und II.5.9. Größere Rosetten zeigen sich dabei flexibler und dadurch widerstandsfähiger.
  - Elastizitätsmodul als Funktion der Belastungsgeschwindigkeit:** Der effektive Elastizitätsmodul der Rosetten nimmt mit der Belastungsgeschwindigkeit zu, unter langsamerer Belastung erscheinen Rosetten also weicher, vgl. Abb. II.6.7.



## Summary

This dissertation examines the impact of shear flow on cells. The first part deals with cell adhesion on a surface, while the second part covers the more complex case of cell-cell adhesion or aggregates of cells. In tangible terms, two research questions are formulated:

### **Part I: Which physical parameters affect cell adhesion, and how can they be characterised and classified via microfluidic approaches?**

A hybrid microfluidic setup provides a reproducible flow field in a closed volume, combined with fluorescence microscopy and the option of varied environmental conditions [1]. Investigating SaOs-2 bone cancer cells on titanium, a standard implant material, the resistivity of adherent cells under flow conditions is examined. The strength of this bond determines the quality of ingrowth of an implant, e.g. an artificial joint. In particular, the focus in this work is on the influence of the shear stress, the cell density and the surface roughness [2, 3].

### **Part II: How stable are aggregates of red blood cells, so-called *rosettes*, which form during Malaria infection?**

During Malaria infection, the Malaria parasite invades red blood cells, which consequently develop adhesive properties. These so-called *rosettes* form in a suspension of partially parasitized red blood cells, and are pumped through microfluidic channels with different stenoses, to measure their durability by deformation through high shear rates and physical constraints with respect to their size and the patients' blood group [4, 5].

Figure 1 shows the structure of this thesis. Essentially, both parts are based on a microfluidic setup combined with customized software to analyze the micrographs semi-automatically, and each includes the assignment of a thermodynamic model. In conclusion, we find the cell detachment as a function of shear rate and time in both cases.

### **Microfluidic Experiment**

Microfluidic techniques allow to apply force to cells in a way, that is closer to nature or physiological conditions than the circumstances of a larger flow chamber or micro manipulators.

- (I) The cylindrical flow chamber measures 8 mm in diameter and 2 mm in height, see chapter I.2. The bottom part is a lithium niobate piezoelectric chip with electrodes, which generate surface acoustic waves when a RF signal is applied. The surface acoustic waves lead to *acoustic streaming* in the liquid filling the chamber. The resulting flow field is dominated by a jet from the electrodes on the bottom of the closed compartment towards the top.
- (II) The aggregates of red blood cells pass microfluidic channels, which are initially 50 x 8  $\mu\text{m}^2$  in diameter and narrow down to stenoses down to 3.5 x 8  $\mu\text{m}^2$ , see chapter II.3.2. A reservoir at the channel inlet holds the cell suspension, which is drawn through the channel by a syringe pump.

### **Semi-automatic Image Analysis**

Both experiments include the recording of micrographs and the semi-automatic analysis using a custom-developed MATLAB script. To detect and quantify the cells, the images are binarized first. Then the focus lies on the changes within and along image sequences.

- (I) PIVDAC (Particle Image Velocimetry De-Adhesion Correlation): The superposition of micrographs as a function of time enables to distinguish cells, that stay adherent during the measurement, from cells that detach, see chapter I.3.

- 
- (II) SURF (SURvival of Rosettes in Flow): The frame-to-frame tracking of cell aggregates in high-speed videos with 2000 frames per second allows a detailed analysis of a single rosette and how it passes a stenosis, while simultaneously automatically analyzing many aggregates, see chapter II.4. This way the survival rate as a function of rosette size, shape and size of the stenosis and the flow rate becomes accessible.

### Thermodynamic Model

The mechanical process of cell adhesion and detachment can be described as a two-state system with state A, adherent, and state B, free.

- (I) Cell-Substrate-Adhesion: A Gibbs potential with two minima A and B and an additional linear component resulting from shear force describes the potential landscape in which the cells are either A, adherent, or B, detached, see chapter I.4.1. Kramers' theory of reaction kinetics provides the mathematical formulation of the equilibrium between A and B, and the detachment rate intrinsically and as a function of the shear rate.
- (II) Cell-Cell-Adhesion: The cells can analogously be in a bound state A (rosette) or an unbound state B (no rosette), see chapter II.5.3.1. Calculating the difference in Gibbs free energy leads to an expression, which shows the impact of the stenosis' diameter on the survival rate of rosettes when passing this stenosis.

### Measurement Parameters Shear Stress and Exposure Time

The detachment of the cells or the deformation or break-up of cell aggregates is determined as a function of the primary impact factors shear stress and time of exposure.

- (I) Bone Cells on Implant Material: The alteration of the area covered by cells over **time** is recorded for one hour. The surface is divided into zones according to the shear rate in order to monitor the detachment of the cells as a function of **shear stress**, see chapter I.4.2.
- (II) Rosetting in Malaria: The behavior of one individual cell aggregate is recorded with high **time resolution**. Between measurements, **shear stress** and **time of passage** are varied through the flow rate and the shape of the stenosis, see chapter II.5.

### Main Results

- (I) Resistivity of adherent cells against shear flow:  
**Detachment rate as a function of shear stress:** The percentage of detached cells increases significantly with increasing shear rate. The correlation of detachment rate and shear rate is linear, see Fig. I.4.3 C.  
**Detachment rate as a function of cell density:** The detachment kinetics show a significant reduction in detachment rate with increasing cell density, see Fig. I.4.7 G.
- (II) Dynamics of red blood cell aggregates in Malaria infection under physiological microfluidic conditions:  
**Critical diameter of the stenosis as a function of aggregate size:** The narrower and the longer the stenosis is, the more damage is done to a rosette, see Fig. II.5.6 and II.5.9. Larger rosettes appear more flexible and thereby more resistive.  
**Young's Modulus as a function of loading rate:** The effective Young's Modulus of rosettes decreases with higher loading rates. Thus rosettes appear softer, when a low loading rate is applied, see Fig. II.6.7.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
Summary	vii
<b>I Widerstandsfähigkeit adhärenter Zellen gegenüber Scherfluss</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung Zell-Substrat-Adhäsion</b>	<b>3</b>
<b>2 Messmethodik Mikroflussskammer</b>	<b>5</b>
2.1 Fluidscherspannung im Knochengewebe . . . . .	5
2.2 Die Mikroflussskammer . . . . .	7
2.3 Messprotokoll . . . . .	8
<b>3 Auswerteskript PIVDAC</b>	<b>9</b>
<b>4 Korrelation von Zelladhäsion, lokaler Scherrate und Zelldichte</b>	<b>13</b>
4.1 Thermodynamisches Modell . . . . .	13
4.2 Einfluss der Scherrate . . . . .	16
4.3 Einfluss der Oberflächenrauigkeit . . . . .	19
4.4 Einfluss der Zelldichte . . . . .	22
<b>5 Fazit Zell-Substrat-Adhäsion</b>	<b>25</b>
<b>II Dynamik von Aggregaten roter Blutkörperchen bei Malariainfektion unter physiologischen Mikroflussbedingungen</b>	<b>27</b>
<b>1 Einleitung Zell-Zell-Adhäsion</b>	<b>29</b>
1.1 Bedeutung von Malaria weltweit . . . . .	29
1.2 Haftung von Blutzellen bei Malaria . . . . .	31
1.3 Malaria und die AB0 Blutgruppen . . . . .	32
1.4 Rosetten unter physiologischen Flussbedingungen . . . . .	32
<b>2 Der Malariaparasit im menschlichen Blutkreislauf</b>	<b>37</b>
2.1 Das Blut . . . . .	37
2.2 Der Malariaparasit <i>Plasmodium falciparum</i> . . . . .	38
2.3 Probenvorbereitung <i>Plasmodium falciparum</i> . . . . .	42
2.4 Modellsystem: Aggregation über Makromoleküle . . . . .	44
<b>3 Variation des Mikroflussfelds</b>	<b>47</b>
3.1 Hydrodynamik . . . . .	47
3.2 Mikrofluidikaufbau . . . . .	52
3.3 Einfluss der Kanalgeometrie auf das resultierende Kraftfeld . . . . .	53
3.4 Elastische Verformung bei Passage einer Stenose . . . . .	56
<b>4 Verfolgung der Zellaggregate</b>	<b>59</b>
4.1 Erstellung der Trajektorien . . . . .	59
4.2 Auswertung entlang der Trajektorien . . . . .	63
4.3 Zusammenfassen und Exportieren der Ergebnisse . . . . .	66
4.4 Kategorisierung nach Rosettengröße . . . . .	67
4.5 Kategorisierung nach Aggregatzustand nach Passage der Stenose . . . . .	68

<b>5</b>	<b>Passage unterschiedlicher Stenosen</b>	<b>71</b>
5.1	Ausgangsgrößenverteilung der Rosetten . . . . .	72
5.2	Geschwindigkeit entlang der Stenose . . . . .	73
5.3	Einfluss der maximalen Kompression . . . . .	74
5.3.1	Thermodynamisches Modell: kritische Stenosenbreite . . . . .	76
5.3.2	Effektive Überlebensrate . . . . .	77
5.4	Einfluss der Elongation . . . . .	80
5.4.1	Kritische Stenosenlänge . . . . .	81
5.4.2	Simulation der Protein-Bindungskinetik . . . . .	83
5.5	Zellverlust der beschädigten Rosetten . . . . .	87
5.6	Lektin-induzierte Aggregate als Modellsystem . . . . .	88
5.7	Simulation von Zellaggregaten unter Fluss . . . . .	91
<b>6</b>	<b>Bestimmung der Elastizität durch Verformung unter Fluss</b>	<b>99</b>
6.1	Bestimmung der Elastizität von Melanomzellen . . . . .	99
6.1.1	Elastizität von Melanomzellen - Verformung unter Fluss . . . . .	100
6.1.2	Elastizität von Melanomzellen - Kraftspektroskopie . . . . .	102
6.2	Effektive Elastizität von Zellaggregaten . . . . .	106
6.2.1	Rosetten der Blutgruppen 0 und A . . . . .	107
6.2.2	Die Rolle der Belastungsgeschwindigkeit . . . . .	109
6.2.3	Lektin-induzierte Aggregate . . . . .	111
<b>7</b>	<b>Fazit Zell-Zell-Adhäsion</b>	<b>113</b>
	<b>Literatur</b>	<b>115</b>
	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>119</b>
	<b>Anhang A PIVDAC - Particle Image Velocimetry DeAdhesion Correlation</b>	<b>123</b>
A.1	PIVDAC_Zoning_28dBm.m . . . . .	123
	<b>Anhang B SURF - SURvival of Rosettes in Flow</b>	<b>127</b>
B.1	SURF_main.m . . . . .	127
B.2	SURF_video_reader.m . . . . .	127
B.3	SURF_textfile_reader.m . . . . .	129
B.4	SURF_sort_traces_by_rosette_size.m . . . . .	147
B.5	SURF_sort_traces_by_rosette_fate.m . . . . .	151
B.6	SURF_elastic_modulus.m . . . . .	154

## Teil I

# Widerstandsfähigkeit adhärenter Zellen gegenüber Scherfluss



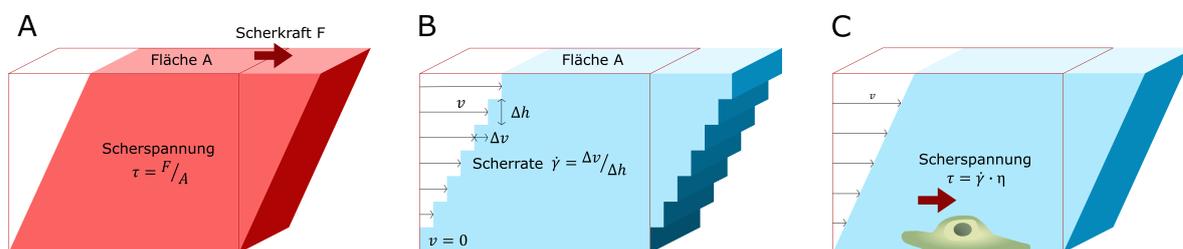
# 1

## Einleitung Zell-Substrat-Adhäsion

Teil I dieser Dissertation behandelt im Wesentlichen die Inhalte der beiden Veröffentlichungen „Exploring the Limits of Cell Adhesion under Shear Stress within Physiological Conditions and beyond on a Chip“ von 2016 in Diagnostics [2] und „Correlation of *in vitro* cell adhesion, local shear flow and cell density“ von 2019 in RSC Advances [3]. Beide Veröffentlichungen entstanden in Zusammenarbeit mit Dr. Melanie Stamp, die in ihrer 2017 veröffentlichten Dissertation [6], genauer in Kapitel 3 „Zelladhäsion unter Scherfluss“, auch Teile der gemeinsamen Ergebnisse behandelt. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den eigenen Beiträgen hierzu, beginnend mit der Entwicklung des Auswerteskripts „PIVDAC“, über den Einfluss der Oberflächenrauigkeit, bis schließlich hin zur Rolle der lokal wirkenden Scherkraft und deren Reduktion durch Zellen in der unmittelbaren Umgebung, und somit effektiv der Zelldichte.

### Widerstandsfähigkeit adhärenter Knochenkrebszellen gegenüber Scherfluss

Bei Einsetzen eines künstlichen Hüft- oder Kniegelenks ist es für das Wohl des Patienten schlussendlich entscheidend, wie belastbar die Bindung an der Grenzfläche von Zellmembran und Implantatoberfläche ist, um Schmerzen oder sogar einen Revisionseingriff zu vermeiden. Um vor Verwendung eines Materials zu bestimmen, ob eine gute Osseointegration, also das erfolgreiche Einwachsen in den Knochen, garantiert werden kann, gibt es verschiedene Ansätze die Belastbarkeit von Zellen auf Implantatmaterial *in vitro* durch deren Ablösung unter Krafteinfluss zu messen. Die Zellen werden dabei zum Beispiel einer Strömung ausgesetzt. Die durch die Strömung ausgeübte Kraft greift tangential zur Zelloberfläche an, es handelt sich also um eine Scherkraft, vgl. Abb. 1.1. Die Kraft oder Scherspannung, bei der



**Abbildung 1.1:** Was bedeutet Scherfluss? **A)** Eine Scherkraft ist eine Kraft, die tangential an der Oberfläche eines Körpers angreift, und eine Verkipfung der senkrechten Kanten zu einer festen Unterseite bewirkt. Die Scherkraft pro Flächeneinheit wird als Scherspannung  $\tau$  bezeichnet. Im Gegensatz dazu greifen Druck- oder Zugkräfte senkrecht an und bewirken eine Stauchung oder Dehnung des Körpers [7].

**B)** Strömt eine Flüssigkeit über eine ruhende Fläche, wirken zwischen den strömenden Flüssigkeitsschichten ebenfalls Scherkräfte. Die Änderung der Geschwindigkeit  $\Delta v$  mit der Höhe  $\Delta h$  wird als Scherrate  $\dot{\gamma}$  bezeichnet.

**C)** Multipliziert man die Scherrate mit der Viskosität  $\eta$  der Flüssigkeit, erhält man einen weiteren Ausdruck für die Scherspannung  $\tau$ . Welchen Einfluss ein solcher Scherfluss auf Zellen hat, die an einer festen Fläche angewachsen sind, ist Thema dieser Arbeit.

gerade 50% einer Zellpopulation abgelöst werden, entspricht der Adhäsionsstärke dieser Zellpopulation [8]. Um adhärenere Zellen einem Scherfluss auszusetzen, gibt es nach Khalili et al. [8] prinzipiell

vier Konzepte: eine Scherzelle, eine Zentrifuge, eine Flusskammer oder die Mikrofluidik. In einer Scherzelle rotiert eine Scheibe in Flüssigkeit oberhalb adhärenter Zellen auf einem festen Substrat [9, 10, 11], während die Zellen in zentrifugalen Aufbauten mitrotieren [12]. In Flusskammern ist, im Gegensatz zu Rotationskammern, durch den kontinuierlichen Durchfluss eine lineare Variation der Scherspannung möglich [13]. Das Herunterskalieren brachte die Mikrofluidik als Forschungsfeld hervor. Dies ermöglichte Experimente mit einzelnen Zellen [14, 15] und die Entwicklung komplexer, parallelisierter Mikrofluidiksysteme [16, 17]. Zur Erzeugung und Steuerung des Mikroflusses hat sich der Einsatz von akustischen Oberflächenwellen (*Surface Acoustic Wave*, SAW) etabliert [1, 2, 18]. Diese induzieren eine Strömung in der Flüssigkeit, die sich auf der Oberfläche befindet, auf der die akustische Welle propagiert. Dies ist prinzipiell auf zwei verschiedene Arten zur Forschung der Zelladhäsion zu nutzen. Entweder sind die Zellen direkt der SAW ausgesetzt, also auf derselben Oberfläche adhärert, was allerdings das Risiko von unbeabsichtigter Temperaturerhöhung oder möglicher Stimulation durch die Oberflächenwelle direkt birgt [19]. Eindeutiger auf den Fluss zurückzuführen sind Effekte in Aufbauten, in denen sich die Zellen auf einem Substrat befinden, das durch Flüssigkeit von der akustischen Oberflächenwelle getrennt ist, und diese somit nur der induzierten Strömung ausgesetzt sind. In einer solchen geschlossenen Mikroflussskammer lassen sich viele Zellen gleichzeitig innerhalb eines Experiments mit einer Bandbreite von Scherraten behandeln. Ist das Substrat nicht konfluent mit Zellen bedeckt, ist es so möglich das Ablösen einzelner Zellen mit der lokal wirkenden Scherspannung zu korrelieren.

In dieser Arbeit wird systematisch die Adhäsion der Knochenkrebszelllinie SaOs-2 auf einem Titanimplantat unter physiologisch relevanten Bedingungen in einer Mikroflussskammer [1] betrachtet. Die Parameter zur Erzeugung der Strömung sind hier so eingestellt, dass die Scherspannung in dem Bereich liegt, dem Knochenzellen *in vivo* ausgesetzt sind. Die interstitielle Flüssigkeit in den Hohlräumen im Inneren von Knochen, vgl. Abb. 2.1, kommt bei Belastung der Knochen in Bewegung, und erzeugt durch das Vorbeiströmen eine Scherspannung von  $0,8 - 3$  Pa auf die Knochenzellen [20, 21, 22]. In der in dieser Arbeit beschriebenen Mikroflussskammer wirkt eine Scherspannung von  $0,2 - 5,8$  Pa auf die knochenzellenähnlichen SaOs-2 Zellen. Die geschlossene Kammer ermöglicht es, unter Variation der Umgebungsparameter kontrolliert Kraft auf die adhärenen Zellen auszuüben, und von deren Widerstandsfähigkeit auf die optimalen Umgebungsparameter zu schließen, welche wiederum für die erfolgreiche Osseointegration entscheidend sind. Dazu wurden in früheren Arbeiten beispielsweise die Temperatur und der pH-Wert variiert, um fiebrige, entzündete Umgebungen im physiologischen Rahmen zu imitieren. In dieser Arbeit erlaubt ein Vergleich verschieden rauher Oberflächen aufzuzeigen, wie die Haftung der Zelle bzw. ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Scherfluss mit der Topographie des Substrats zusammenhängt. Diese Messreihe ergab ein lokales Optimum bei einer Rauigkeit von  $R_q = 22$  nm [2].

Durch die verbesserte Messtechnik der mikrofluidischen Flussfelder (*scanning particle image velocimetry*, sPIV) wird die lokale Schergeschwindigkeit mit der Zellablösung übereinander gelegt. Die Funktionalität der selbstentwickelten Software PIVDAC (*Particle Image Velocimetry De-Adhesion Correlation*) wird hier anhand von Messreihen mit standardmäßig sandgestrahltem Titan-Implantatmaterial demonstriert. Ein thermodynamisches Ratenmodell wird eingeführt, um den Prozess der Zelladhäsion und -ablösung zu beschreiben. Vergleich von Modell und experimentellen Ergebnissen, besonders unter gemäßigter Schereinwirkung, bestätigt die durch das Modell beschriebene Zunahme der Ablöserate mit zunehmender Scherkraft. Obwohl eine Vielzahl an Veröffentlichungen zur Ablösung von Zellen unter Fluss zu finden ist, konzentrieren sich nur wenige auf die Rolle der Zelldichte [23]. Im Rahmen dieser Arbeit wird jedoch eine deutliche Abhängigkeit der Zellablösung von der Zelldichte gezeigt. Die Ergebnisse stimmen sehr gut mit bereits veröffentlichten Modellsimulationen überein, für die nur geometrische Effekte betrachtet wurden [24]. Die hier beschriebene Methode öffnet ein weites Feld von Anwendungen, um eine Vielzahl an Zelllinien auf neuartigen Substraten oder in zeitabhängigen Flussfeldern zu erforschen [3].

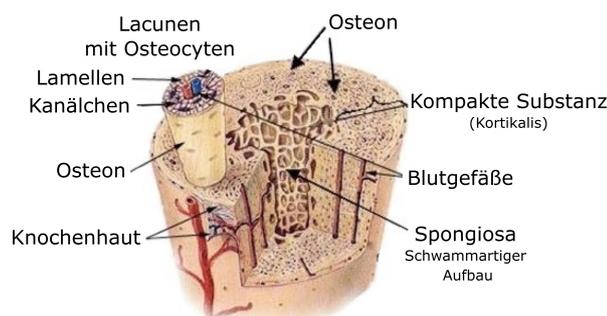
# 2

## Messmethodik Mikroflussskammer

Hier wird der von Hartmann et al. entwickelte mikrofluidische Hybridbau für Zelladhäsionsexperimente, der De-Adhesion Number Investigator, kurz DANI [1], vorgestellt, und das zugehörige Messprotokoll, sowie das verwendete Titanimplantatmaterial und die Kultivierung der SaOs-2 Zelllinie beschrieben.

### 2.1 Fluidscherspannung im Knochengewebe

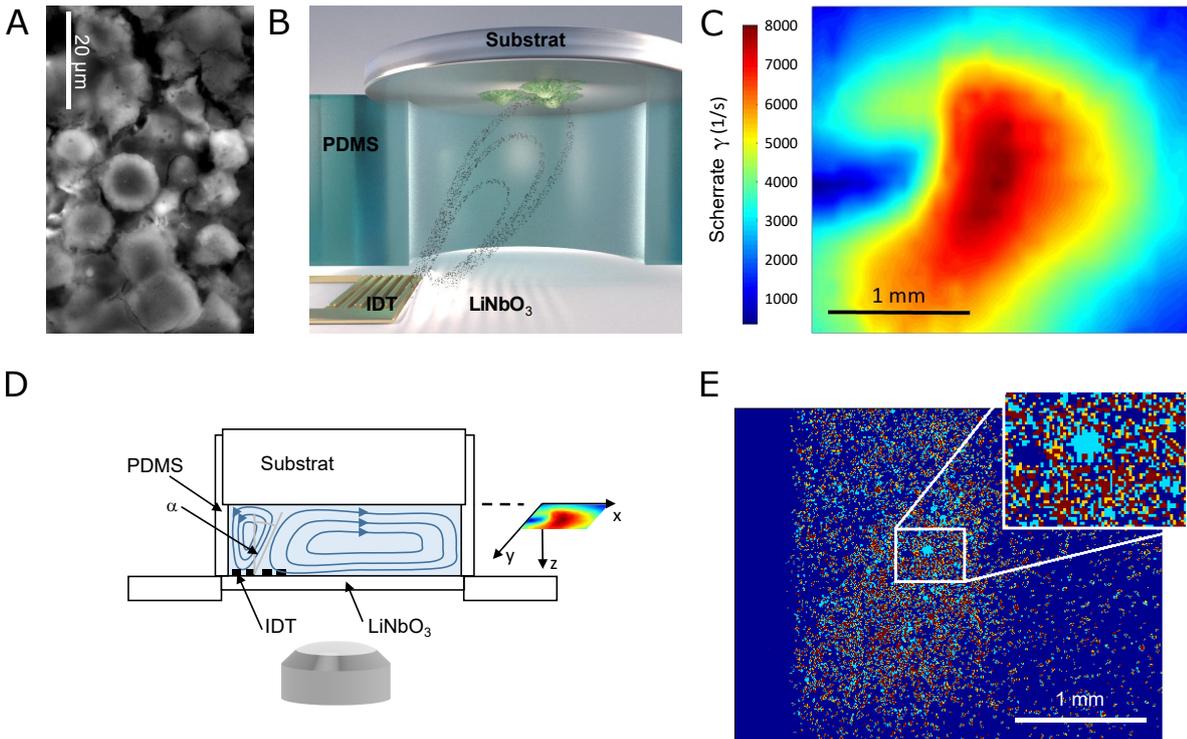
Das Knochenwachstum korreliert mit mechanischen Einflüssen wie Druck und Zugkräften, und im Besonderen mit Scherkräften durch das Strömen interstitieller Flüssigkeit. Wittkowske et al. geben einen Überblick über Knochenzellmodelle, die die Wirkung der Fluidscherspannung auf die Knochenbildung *in vitro* untersuchen [22]. Die interstitielle Flüssigkeit, die Flüssigkeit in den Zellzwischenräumen, versorgt Zellen z.B. mit Nährstoffen. Sie macht bis zu 20 % des Körpergewichts aus, innerhalb von Knochen füllt sie die Hohlräume des porösen Gewebes, vgl. Abb. 2.1. Man unterteilt diese Hohlräume in drei Kategorien nach ihrer Größe: einmal die vaskulären Kanäle mit Radius  $r \sim 20 \mu\text{m}$ , dann das lakuno-kanalikuläre Netzwerk, die Kanalstrukturen mit  $r \sim 0,1 \mu\text{m}$  innerhalb des mineralisierten Knochengewebes, das die Osteozyten umgibt, und winzige Zwischenräume von  $r \sim 0,01 \mu\text{m}$  zwischen mineralisierten Kristalliten und Kollagenfasern. Die interstitielle Flüssigkeit kommt bei körperlicher Aktivität verstärkt in



**Abbildung 2.1:** Architektur eines Knochens. Knochen bestehen aus einer äußeren harten Schicht (Osteon) und einer inneren schwammartigen Matrix aus Hydroxylapatit und Kollagenfasern. Das Gewebe umschließt durch funktionellen Knochenzellen (Osteozyten) gebildete 20 – 40  $\mu\text{m}$  dicke Kanäle, die Blutgefäße beinhalten, und das deutlich feinere lakuno-kanalikuläre Netzwerk, das zur Nährstoffversorgung der Knochenzellen mit Flüssigkeit gefüllt ist [25, 26].

Bewegung. Wird der Knochen bei Muskelkontraktion oder bei direkter mechanischer Belastung gebogen, wird das Gewebe auf der einen Seite gestaucht und auf der Gegenseite gedehnt. Die Flüssigkeit folgt dem entstehenden Druckgradienten von gestauchtem zu gedehntem Gewebe und muss dabei die engen Kanäle innerhalb der mineralisierten Knochenmatrix passieren. Auch in Ruhe kommt die interstitielle Flüssigkeit nicht zum Stillstand, da sie die hydrostatischen und osmotischen Druckunterschiede zwischen Blut, Interstitium und Lymphgefäßen ausgleicht. Durch den geringen Durchmesser dieser Kanäle treten

## 2. Messmethodik Mikroflusskammer



**Abbildung 2.2:** Messmethodik Mikroflusskammer [3].

A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von adhären Zellen auf einem Titansubstrat.

B) Darstellung des Aufbaus mit zellbewachsenem Titansubstrat an der Oberseite der Kammer. Im Inneren sind die Strömungslinien des *acoustic streaming* gekennzeichnet, das durch den Interdigital Transducer (IDT, goldene kammartige Struktur) erzeugt wird. Bild von C. Hohmann, NIM.

C) Scherkarte berechnet aus einer sPIV Messung für eine RF Leistung von 28 dBm.

D) Schematische Seitenansicht der Kammer aus Polydimethylsiloxan (PDMS) mit Interdigital Transducer (IDT) auf einem Lithiumniobat-Chip ( $\text{LiNbO}_3$ ) unten und der Titanprobe (Substrat) oben.

E) Superposition der Mikroskopaufnahmen zu Beginn und Ende einer 60-minütigen Messung. Der Farbcode visualisiert die möglichen Szenarien: Die dunkelblauen Flächen waren über den gesamten Messzeitraum nicht von Zellen bedeckt. Auf den hellblauen Flächen haben sich Zellen abgelöst, rote Flächen stehen für unveränderte Adhärenz. Flächen die zu Anfang frei waren, aber zu Ende von Zellen bedeckt sind, sind orange eingefärbt.

hier nach Weinbaum et al. hohe Wandscherraten zwischen 0,8 und 3 Pa auf [21]. Osteoblasten sind im Gegensatz zu Osteozyten nicht in der steifen, mineralisierten Knochenmatrix zu finden, sondern an der Oberfläche neugebildeten oder regenerierenden Knochenmaterials. Hier ist die Porosität geringer, das bedeutet, die Kanaldurchmesser sind größer und damit die auftretenden Scherspannungen geringer. Die Umgebung ist hier facettenreicher und damit die Flussparameter schwer einzugrenzen, es wurden Scherspannungen von wenigen Millipascal bis  $\geq 1$  Pa nachgewiesen. Nichtsdestotrotz wurde vielfach gezeigt, dass Osteoblasten und Osteozyten auf Scherspannungen über mehrere Größenordnungen reagieren, und die Bildung von Knochen dadurch maßgeblich gesteuert wird.

*In vitro* lassen sich durch die Kombination von Mikrofluidik und Zellen auf Biomaterialien physiologisch relevante Modelle erstellen, um biologische Interaktionen, die unter Fluidscherspannung zwischen diesen Materialien und Zellen auftreten, aufzudecken. Damit wird es möglich, die Charakterisierung und schließlich die Markteinführung neuer Biomaterialien zu beschleunigen, und gleichzeitig standardisierter und sicherer zu machen. Mestres et al. [27] diskutieren einige zellbasierte Mikrofluidiksysteme aus Studien zur Knochenregeneration, um das Potential solcher Systeme herauszuarbeiten die Kluft zwischen *in vitro* und *in vivo* Studien zu verschmälern. Ein solches Mikrofluidiksystem ist Gegenstand des ersten Teils dieser Arbeit und wird im Folgenden beschrieben.

## 2.2 Die Mikroflussskammer

Der DANI Versuchsaufbau besteht im Wesentlichen aus einer zylindrischen, mit Nährmedium befüllten Kammer, wie in Abb. 2.2 B und D dargestellt. Die Kammer fasst circa 160  $\mu\text{l}$ . Die Wände bestehen aus einem PDMS (Polydimethylsiloxan)-Ring, der Boden aus einem piezoelektrischen Lithiumniobat-Chip und der Deckel aus einem Plättchen des Titan-Implantatmaterials, das mit Zellen bewachsen ist. Durch den Chip wird in der flüssigkeitsgefüllten Kammer *acoustic streaming* erzeugt. Fingerartig angeordnete Elektroden auf einem piezoelektrischen Kristall, die alternierend mit gegensätzlichen Polen verbunden sind, können eine Oberflächenwelle (*Surface Acoustic Wave*, SAW) auf dem Substrat auslösen, wenn ein Hochfrequenzsignal mit Frequenz  $f$  anliegt, dessen Wellenlänge  $\lambda_{\text{SAW}}$  im Substrat dem Fingerabstand  $p$  zweier Finger auf dem selben Potential entspricht. Die Schallgeschwindigkeit  $c_{\text{SAW}}$  der akustischen Oberflächenwelle ist eine Materialkonstante.

$$f = \frac{c_{\text{SAW}}}{\lambda_{\text{SAW}}} = \frac{c_{\text{SAW}}}{p} \quad (2.1)$$

Für das hier verwendete  $128^\circ$  rot Y-Cut Lithiumniobat ist  $c_{\text{SAW}} = 3979 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ . Der für die DANI-Kammer gewählte Interdigital Transducer mit Periodizität  $p = 25 \mu\text{m}$  löst folglich bei Anlegen eines RF-Signals von 160 MHz und  $P_{\text{SAW}} = 28 \text{ dBm}$  Leistung eine akustische Oberflächenwelle aus. Die angeregte Rayleigh-Welle (SAW) koppelt an der Grenzfläche zwischen Piezoelektrikum und Flüssigkeit unter dem Rayleigh-Winkel  $\theta$

$$\sin \theta = \frac{c_{\text{Liquid}}}{c_{\text{SAW}}} = \frac{1484 \text{ m/s}}{3979 \text{ m/s}}, \quad \theta = 21,9^\circ, \quad (2.2)$$

der abhängig von den Schallgeschwindigkeiten in den beiden Medien ist, ein und induziert so eine Strömung in diesem Winkel zur Flächennormalen in Richtung des Kammerdeckels [28].

### Implantatmaterial

Das Implantatmaterial Titan (*Ti Gr.5-ELI*) stammt von der Firma Valbruna Edel Inox GmbH, Dormagen, Deutschland. Die Probenscheiben mit Radius 5 mm und Höhe 2 mm sind von der Firma Aesculap AG Tuttlingen, Deutschland, sandgestrahlt und weisen eine Rauigkeit von  $R_q = 3,76 \mu\text{m}$  auf. Die Rauigkeit wurde im Profilometer *Dektak 8 Advanced Development Profiler*, Veeco Instruments Inc., Oyster Bay, NY, USA bestimmt. Zur Beschreibung der Rauigkeit wird üblicherweise entweder der arithmetische Mittenrauwert  $R_a$  oder der quadratische Mittenrauwert  $R_q$

$$R_a = \frac{1}{l} \int_0^l |z(x)| dx, \quad R_q = \sqrt{\frac{1}{l} \int_0^l z^2(x) dx} \quad (2.3)$$

aus den Ordinatenwerten  $z$  innerhalb einer Einzelmessstrecke  $l$  berechnet,  $z$  ist der Abstand von der Mittellinie. Für  $R_a$  und  $R_q$  ergeben sich ähnliche Zahlenwerte.

Um den Einfluss unterschiedlicher Rauigkeit auf die Zelladhäsion zu untersuchen, wurden die Proben unterschiedlich fein geschliffen, um sieben Stufen von Rauigkeit zu erhalten. Dazu wurden die Scheiben in *Technovit 5071* (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) eingebettet und an der Poliermaschine *AutoMet 250* (Buehler, Illinois Tool Works Inc., Esslingen am Neckar, Deutschland) erst mit Schleifpapier der Körnungen 60, 320, 1000, 2500 und 4000, und anschließend mit polykristalliner Diamantpolitur (Korngröße  $1 \mu\text{m}$ ) und chemomechanischer Politur (Korngröße  $40 \text{ nm}$ ) abgeschliffen. Eine Analyse der Oberflächentopographie mittels Rasterkraftmikroskopie am AFM (*Nano Wizard 2*, JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland) ergab für die sechs weiteren Rauigkeitsstufen  $R_q = 640 \text{ nm}$ ,  $150 \text{ nm}$ ,  $70 \text{ nm}$ ,  $30 \text{ nm}$ ,  $22 \text{ nm}$ ,  $10 \text{ nm}$  und  $2 \text{ nm}$ .

Zur Vorbereitung für die Zelladhäsionsversuche wurden die Scheiben zehn Minuten lang im Ultraschallbad in 70/30 Ethanol/Wasser gereinigt und anschließend bei  $120^\circ\text{C}$  für 20 Minuten autoklaviert.

### Zelllinie SaOs-2

Die menschliche Knochenkrebszelllinie SaOs-2 (Sarcoma osteogenic) wurde bei CLS Cell Line Service GmbH gekauft und in DMEM Medium mit stabilem Glutamin,  $3,7 \text{ g l}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ ,  $1,0 \text{ g l}^{-1} \text{ D-Glucose}$  (Biochrom) unter Zusatz von 50 ml fetalem Kälberserum (FBS Superior, S 0615, Biochrom), 10 ml

HEPES 1 M (L 1613, Biochrom), 5 ml L-glutamine 200 mM (K 0283, Biochrom), 5 ml MEM vitamins 100 $\times$  (K 0373, Biochrom), und 1 ml Primocin (ant-pm-2, InvivoGen) in feuchter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert.

### 2.3 Messprotokoll

Als Standardmesslösung wurde eine Zellsuspension mit  $c_{\text{Standard}} = 300.000$  Zellen ml<sup>-1</sup> angesetzt. Für die Experimente mit Variation der Zelldichte wurde diese Konzentration von  $\frac{1}{10}c_{\text{Standard}}$  bis  $5 \times c_{\text{Standard}}$  variiert, vgl. Tabelle 4.6. Zum Anfärben der Zellen wurde 1  $\mu$ l Calcein Green AM Fluoreszenzfarbstoff (Invitrogen, 1  $\mu$ g Farbstoff gelöst in 1  $\mu$ l Dimethylsulfoxid) pro ml Zellsuspension hinzugegeben. Da der Farbstoff erst bei Abspaltung der Acetoxymethylester (AM) durch Reaktion mit intrazellulären Esterasen fluoresziert, werden nur lebende Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar (Anregung 485 nm, Emission 535 nm). 30 Minuten nach Zugabe des Farbstoffs werden 200  $\mu$ l der Zellsuspension, die ca. 60.000 Zellen enthalten, auf die Probe, die zunächst als Boden in dem PDMS Ring liegt, gegeben. Der Tropfen formt eine Kuppel, da die Kammer nur 160  $\mu$ l fasst. Nun wird die Kammer für 60 Minuten inkubiert. In dieser Zeit sinken die Zellen ab und adhären, vgl. Abb. 2.2 A. Anschließend wird der Überstand abpipettiert und durch frisches Nährmedium ersetzt, um nicht adhären Zellen zu entfernen. Während der folgenden 15 Minuten wird die Kammer mit dem Lithiumniobat-Chip verschlossen und umgedreht auf dem invertierten Mikroskop, einem Axiovert 200 M (Zeiss), installiert. Zum Start der Messung wird die mikrofluidische Strömung durch Anlegen des RF-Signals eingeschaltet. Nun werden eine Stunde lang alle fünf Minuten mit dem 2,5-fach Objektiv und einer Hamamatsu Orca 5G Kamera Fluoreszenzaufnahmen mit  $1344 \times 1024$  Pixeln aufgenommen. Das ergibt eine beobachtbare Fläche von  $3,48 \times 2,65$  mm<sup>2</sup>. Die Temperatur wird mit Hilfe eines Wärmebads konstant bei  $T = 37^\circ\text{C}$  gehalten. Um später den Einfluss des Scherflusses von Artefakten wie dem Ausbleichen des Farbstoffs und dem intrinsischen Ablösen absterbender oder der Schwerkraft nachgebender Zellen abzugrenzen, werden zu Referenzzwecken statische Messungen durchgeführt. Während einer solchen Referenzmessung ohne Strömung wurde die akustische Oberflächenwelle nicht aktiviert.

# 3

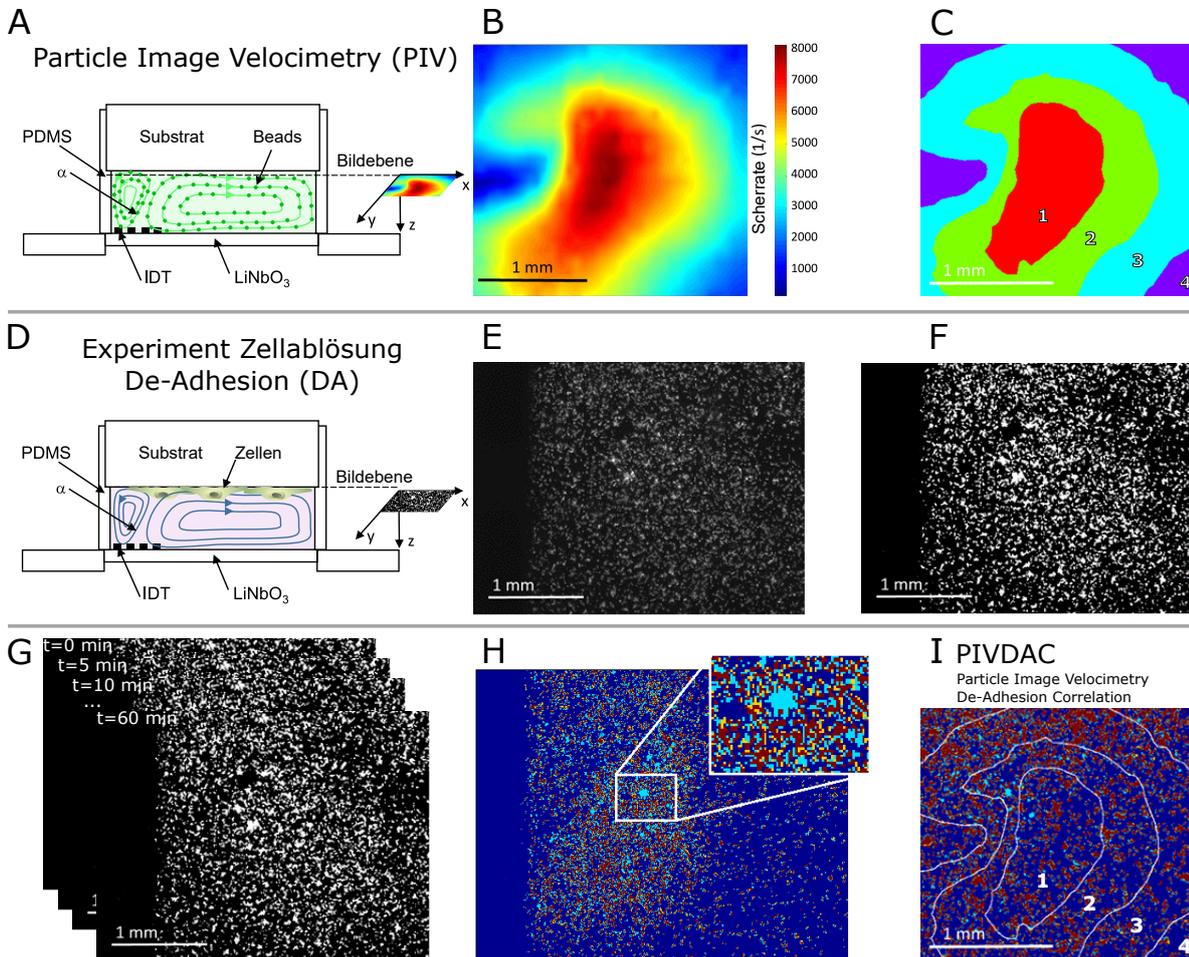
## Auswerteskript PIVDAC

Im Inneren der DANI Kammer wird, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, eine Strömung erzeugt, die von unten als Jet auf die Oberseite trifft, an der die Zellen adhärirt sind. Um die Ablösung in Abhängigkeit von der Zeit auswerten zu können, soll anhand der Mikroskopaufnahmen, die alle fünf Minuten von unten durch den Chip aufgenommen werden, jeweils die zellbedeckte Fläche bestimmt werden, vgl. Abb. 3.1 Mitte. Zusätzlich wird im Vorfeld das Flussfeld vermessen, um die Ablösung außerdem nach der lokal wirkenden Scherrate aufzulösen, vgl. Abb. 3.1 oben. Das hierzu entwickelte Skript ist in Anhang A zu finden. In diesem Kapitel werden die Funktionsweise von PIVDAC und die Arbeitsschritte einer Auswertung mit PIVDAC erläutert.

Die Flussgeschwindigkeiten werden ortsabhängig mittels scanning particle image velocimetry (sPIV) bestimmt, vgl. Abb. 3.1 oben. Dazu werden Latexbeads (Polysciences, Inc., Polybeadgermanb® polystyrene, Durchmesser 3  $\mu\text{m}$ ) in die flüssigkeitsgefüllte Kammer gegeben, die den Strömungslinien folgen, welche sich dadurch mit einer Hochgeschwindigkeitskamera (FASTCAM 1024PCI, Photron) sichtbar machen lassen. Das sPIV Skript berechnet die Geschwindigkeit aus Bildpaaren, basierend auf der Particle Image Velocimetry (PIV) Software nach Thielicke [29]. Die Werte werden von einem groben Gitter von  $39 \times 23$  Pixeln ( $72,5 \times 109 \mu\text{m}^2$ ) auf die höhere Auflösung der Mikroskopaufnahmen (2,59  $\mu\text{m}$  pro Pixel) interpoliert. Aus Geschwindigkeitsfeldern in mehreren Ebenen wird dann die Scherratenverteilung berechnet, vgl. Abb. 3.1 B. Relevant für die Krafteinwirkung durch den Scherfluss auf die Zellen ist das Feld direkt an der Kammerdecke, also wird die Scherratenebene zur weiteren Betrachtung möglichst nah an der Probenoberfläche gewählt. Diese liegt im Abstand von ca. 20  $\mu\text{m}$ , was in guter Näherung der Höhe der Zellen entspricht, und weist Werte zwischen 300 und 8000  $\text{s}^{-1}$  auf.

Um das Ablöseverhalten der Zellen während der Messung zu analysieren, wurde das MATLAB-basierte Skript PIVDAC (Particle Image Velocimetry De-Adhesion Correlation) entwickelt. Die Fluoreszenzaufnahmen werden zunächst in ImageJ (zur Verfügung gestellt vom National Institute of Health) in 8 Bit Schwarzweißbilder konvertiert, vgl. Abb. 3.1 E und F. Dazu wird für jede Bildserie ein individueller, aber konstanter Schwellwert gesetzt. PIVDAC liest diese Bilder ein und bestimmt den Anteil der zellbedeckten Fläche, indem weiße Pixel als Zellen und schwarze Pixel als Hintergrund interpretiert werden. Dadurch lässt sich durch Übereinanderlegen der Mikroskopaufnahmen die Änderung zwischen Beginn und Ende einer Messung visualisieren, vgl. Abb. 3.1 H. Die möglichen Szenarien sind farblich voneinander abgehoben: Die dunkelblauen Flächen waren über den gesamten Messzeitraum nicht von Zellen bedeckt. Auf den hellblauen Flächen haben sich Zellen abgelöst, rote Flächen stehen für unveränderte Adhärenz. Flächen, die zu Anfang frei waren, aber zu Ende von Zellen bedeckt sind, sind orange eingefärbt. Aus diesen Daten lässt sich die zellbedeckte Fläche gegen die Zeit auftragen und somit die Ablösung charakterisieren.

Als weiterer Messparameter wird jetzt die Verteilung der Scherrate herangezogen, die in dem betrachteten Bereich direkt oberhalb des IDTs von  $\sim 300 \text{ s}^{-1}$  bis  $\sim 8000 \text{ s}^{-1}$  reicht. Für eine systematische Betrachtung wird die Fläche nach der Scherrate in vier Zonen eingeteilt, vgl. Abb. 3.1 B und C. Legt man diese Zonen über die Aufnahmen der Zellen wie in Abb. 3.1 I, kann die Ablösung der Zellen für jede der vier Scherzonen separat aufgetragen werden, vgl. Abb. 4.3 B. Die Scherkarte aus



**Abbildung 3.1:** Zur Auswertung mit PIVDAC sind zwei unterschiedliche Messungen notwendig. **A)** Particle Image Velocimetry (PIV) zur Vermessung des Flussfelds. **B)** Scherrate berechnet aus einer sPIV Messung für  $P_{SAW} = 28$  dBm. **C)** Einteilung der Scherrate in vier Zonen abnehmender Scherrate  $\dot{\gamma}$ . Zone 1:  $\dot{\gamma} = 6122 - 8060 \text{ s}^{-1}$ , Zone 2:  $\dot{\gamma} = 4184 - 6122 \text{ s}^{-1}$ , Zone 3:  $\dot{\gamma} = 2246 - 4184 \text{ s}^{-1}$ , Zone 4:  $\dot{\gamma} = 307 - 2246 \text{ s}^{-1}$ .

**D)** Experiment zur Zelladhäsion bzw. -ablösung. **E)** Originalbild Fluoreszenzaufnahme. **F)** Konvertierung von E) in ein 8 Bit Schwarzweißbild, die Zellen sind weiß, der Hintergrund schwarz.

**Messung und Auswertung mit PIVDAC:**

**G)** Fluoreszenzaufnahmen der adhären Zellen werden 60 Minuten lang alle fünf Minuten aufgenommen.

**H)** Es wird von Bild zu Bild verglichen, ob sich Zellen abgelöst haben. Hier ist die Superposition der Mikroskopaufnahmen zu Beginn und Ende einer 60-minütigen Messung abgebildet. Der Farbcode visualisiert die möglichen Szenarien: Die dunkelblauen Flächen waren über den gesamten Messzeitraum nicht von Zellen bedeckt. Auf den hellblauen Flächen haben sich Zellen abgelöst, rote Flächen stehen für unveränderte Adhärenz. Flächen, die zu Anfang frei waren, aber zu Ende von Zellen bedeckt sind, sind orange eingefärbt.

**I)** Particle Image Velocimetry De-Adhesion Correlation (PIVDAC): Die vier Scherratenzonen aus C) werden über die Aufnahmen der Zellen gelegt, um das Ablösen abhängig von der Scherrate auszuwerten.

---

der sPIV Messung misst  $2,68 \times 2,39 \text{ mm}^2$ , ist also etwas kleiner als die  $3,48 \times 2,65 \text{ mm}^2$  messende Bildfläche der Mikroskopaufnahmen. Um übereinander passende Datensätze zu erhalten, werden Scherkarte und Mikroskopbilder aneinander ausgerichtet. Dazu werden die Mikroskopaufnahmen entsprechend zugeschnitten, und die Werte für die Scherrate auf die Auflösung der Mikroskopaufnahmen von  $1035 \times 923$  Pixeln interpoliert. Ein Beispiel für eine derartige Auswertung ist in Kapitel 4 in Abb. 4.3 A und B zu finden.



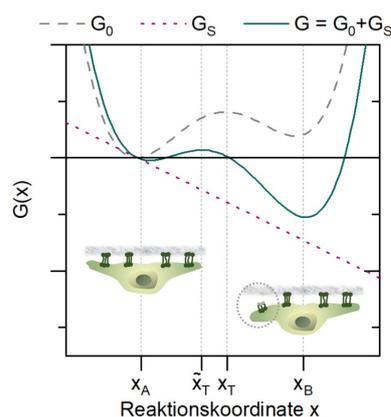
# 4

## Korrelation von Zelladhäsion, lokaler Scherrate und Zelldichte

Mithilfe der Mikroflusskammer werden SaOs-2 Knochenkrebszellen auf Titanplättchen inkubiert, und die Zellablösung unter Scherfluss untersucht. In unabhängigen Experimenten werden die Zelldichte und die Oberflächenrauigkeit variiert, ausgehend von den Standardbedingungen mit einer Oberflächenrauigkeit von  $R_q = 3,76 \mu\text{m}$  und einer Zellkonzentration von  $c_{\text{Standard}} = 300.000$  Zellen/ml, bei einer Temperatur von  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$  und dem pH-Wert  $\text{pH} = 7,4$ . In diesem Kapitel wird der Einfluss der Zelldichte, veröffentlicht von Jötten et al. [3], und der Einfluss der Oberflächenrauigkeit, veröffentlicht zusammen mit Ergebnissen zur Rolle von Temperatur und pH-Wert von Stamp, Jötten et al. [2], behandelt. Temperatur und pH-Wert liegen bei allen folgend erwähnten Messungen bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $\text{pH} = 7,4$ , da diese physiologischen Bedingungen die Adhäsion begünstigen [2]. Zur Beschreibung der Ergebnisse wird zunächst ein thermodynamisches Modell eingeführt, aus dem die Korrelation zwischen der Ablöserate  $R$  der Zellen und dem unmittelbaren Ergebnis, nämlich der zellbedeckten Fläche als Funktion der Zeit, hervorgeht.

### 4.1 Thermodynamisches Modell

Der mechanische Vorgang der Zelladhäsion und -ablösung ist auch ein thermodynamischer Prozess, bei dem die Zelladhäsionsmoleküle entweder im gebundenen (A) oder ungebundenen Zustand (B) sein können. Ich verfolge hier einen Minimalansatz und orientiere mich an den wegweisenden Arbeiten von Bell [30], wie in anderen früheren Arbeiten zu finden [11, 31, 32, 33]. Das entsprechende Gibbspotential  $G_0$  ist näherungsweise ein Potential mit zwei Minima, wie in Abb. 4.1 dargestellt. Die Reaktionskoordinate  $x$  mit Einheit  $[x] = \text{m}$  bezeichnet den Abstand des Adhäsionskontakts zum Substrat, wobei  $x_A$  der Abstand in gebundenem Zustand ist,  $x_B$  der Abstand bei Ablösung, und  $x_T$  der Abstand, der dem Übergangszustand zwischen A und B entspricht. Eine zusätzliche lineare Komponente  $G_S$



**Abbildung 4.1:** Gibbspotential  $G$  als Funktion der Reaktionskoordinate  $x$ .  $G_0$  beschreibt das Potential ohne Fluss,  $G_S$  das konstante Potential der Scherkraft. In Summe ergibt sich das effektive Potential unter Fluss  $G = G_0 + G_S$ . Die zwei lokalen Minima entsprechen den beiden Zuständen adhären (A) und abgelöst (B) eines Zelladhäsionsmoleküls [3].

#### 4. Korrelation von Zelladhäsion, lokaler Scherrate und Zelldichte

repräsentiert die konstante Scherkraft durch den akustisch getriebenen Fluss. Um den Prozess der Adhäsion und Ablösung mathematisch zu beschreiben, wende ich Kramers' Reaktionskinetiktheorie an.

In einem Gleichgewicht von angebundenen (A) und freien Fokalkontakten (B) lässt sich die Reaktionsgleichung mit den Koeffizienten  $k_{\text{on}}$  für die Adhäsion und  $k_{\text{off}}$  für die Ablösung aufschreiben

$$A \xrightleftharpoons[k_{\text{on}}]{k_{\text{off}}} B. \quad (4.1)$$

Die Zahl  $n_A$  der Fokalkontakte in Zustand A ändert sich mit der Zeit

$$\frac{dn_A}{dt} = -k_{\text{off}}n_A + k_{\text{on}}n_B. \quad (4.2)$$

Die Ablöserate  $k_{\text{off}}$  hängt nach Arrhenius von der Aktivierungsenergie  $E_{AA}$  ab, der Potentialdifferenz zwischen Zustand A und dem Übergangszustand zwischen A und B. Das Wiederanbinden  $k_{\text{on}}$  skaliert entsprechend mit der Potentialdifferenz  $E_{AB}$  zwischen Zustand B und dem Übergangszustand.

$$k_{\text{off}} \sim \exp\left(-\frac{E_{AA}}{k_B T}\right), \quad k_{\text{on}} \sim \exp\left(-\frac{E_{AB}}{k_B T}\right). \quad (4.3)$$

Wirkt eine konstante Kraft  $F$ , in diesem Fall der Scherfluss, wird das Potential  $G_0$  durch einen linearen Term  $G_S = -Fx$  zu  $G = G_0 - Fx$  ergänzt, vgl. Abb. 4.1. Entsprechend verschiebt sich der Übergangszustand von  $x_T$  zu  $\tilde{x}_T$  und damit die Aktivierungsenergie zu  $\tilde{E}_{AA} = E_{AA} - F\tilde{x}_T$  und die Ablöserate zu

$$\tilde{k}_{\text{off}} = \exp\left(-\frac{\tilde{E}_{AA}}{k_B T}\right) = \exp\left(-\frac{E_{AA} - F\tilde{x}_T}{k_B T}\right) = k_{\text{off}} \exp\left(\frac{F\tilde{x}_T}{k_B T}\right). \quad (4.4)$$

Die hier beschriebene Kraft  $F$  ist der Teil der auf die gesamte Zelle wirkenden Scherkraft, der auf einen einzelnen Fokalkontakt wirkt. Diese Bindung kann in erster Näherung als Feder mit Federkonstante  $k$  beschrieben werden, die um eine Länge  $z$  ausgelenkt wird. Setzt man  $x_A = 0$  und definiert somit  $x$  als den absoluten Abstand vom gebundenen Zustand, ergibt sich mit  $F = kz$  für die Raten aus Gleichung 4.4

$$\tilde{k}_{\text{off}} = k_{\text{off}} \exp\left(\frac{kzx}{k_B T}\right) \quad \text{und analog} \quad \tilde{k}_{\text{on}} = k_{\text{on}} \exp\left(-\frac{kzx}{k_B T}\right). \quad (4.5)$$

Um aus der Ablöserate der einzelnen Bindungen die Ablöserate ganzer Zellen herzuleiten, orientiere ich mich an der Argumentation von Garrivier et al. [31]. Deren Resultat ist eine Einteilung der einwirkenden Kraft  $F$  im Verhältnis zur Haftung in drei Niveaus „Niedrig“, „Moderat“, und „Hoch“, in denen die Ablösegeschwindigkeit  $v(F)$  einer Zelle jeweils unterschiedlich beschrieben werden muss. Die Ablösegeschwindigkeit ist interessant, da sie linear über den Zelldurchmesser mit der Ablöserate  $R$  zusammenhängt. Außerdem ist die Kraft  $F = \eta\beta\dot{\gamma}$  linear abhängig von der Scherrate  $\dot{\gamma}$ . Kennt man die Funktion  $v(F)$ , kann man also auch die Abhängigkeit  $R(\dot{\gamma})$  formulieren.

- **Niedriges Kraftniveau:** Niedrige Kräfte sind solche, die gerade über die kritische Kraft  $F_C$  hinausgehen, die mindestens nötig ist, um eine Zelle abzulösen. Hier skaliert die Ablösegeschwindigkeit  $v$  linear mit der wirkenden Kraft  $F$ .

$$v(F) = \frac{v_0 c(K_e)}{F_0} (F - F_C) \quad (4.6)$$

$$R(\dot{\gamma}) = R_0(\dot{\gamma} - \dot{\gamma}_c) \quad (4.7)$$

- **Moderates Kraftniveau:** Erhöht man die äußere Kraft, ist entscheidend, wie stark die Adhäsion ist. Ist die Adhäsion zunächst stark genug, dass sich die Zellen trotz hoher Krafteinwirkung nur langsam ablösen, gilt Kramers Theorie und es ergibt sich eine exponentielle Abhängigkeit zwischen Scherkraft und Ablösegeschwindigkeit  $v$ .

$$v(F) = v_0 \left(\frac{F_0}{F}\right)^{\frac{1}{4}} \exp\left(-\frac{F}{F_0}\right) \quad (4.8)$$

$$R(\dot{\gamma}) = R_0 \left( \frac{\dot{\gamma}_0}{\dot{\gamma}} \right)^{\frac{1}{4}} \exp \left( \frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_0} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.9)$$

- **Hohes Kraftniveau:** Können die Zellen der Scherkraft nicht mehr standhalten, ist der Verlauf wieder linear. Die Zellen folgen dem Fluss direkt.

$$v(F) = \frac{F}{\eta} \quad (4.10)$$

$$R(\dot{\gamma}) \sim \frac{\dot{\gamma}}{\eta} \quad (4.11)$$

Die Zeitentwicklung der zellbedeckten Fläche  $A(t)$  kann, wie in den Experimenten beobachtet, als exponentielle Abnahme beschrieben werden, vgl. z.B. Abb. 4.3 B.

$$A(t) = A_\infty + (1 - A_\infty) \exp(-R(\dot{\gamma})t) \quad (4.12)$$

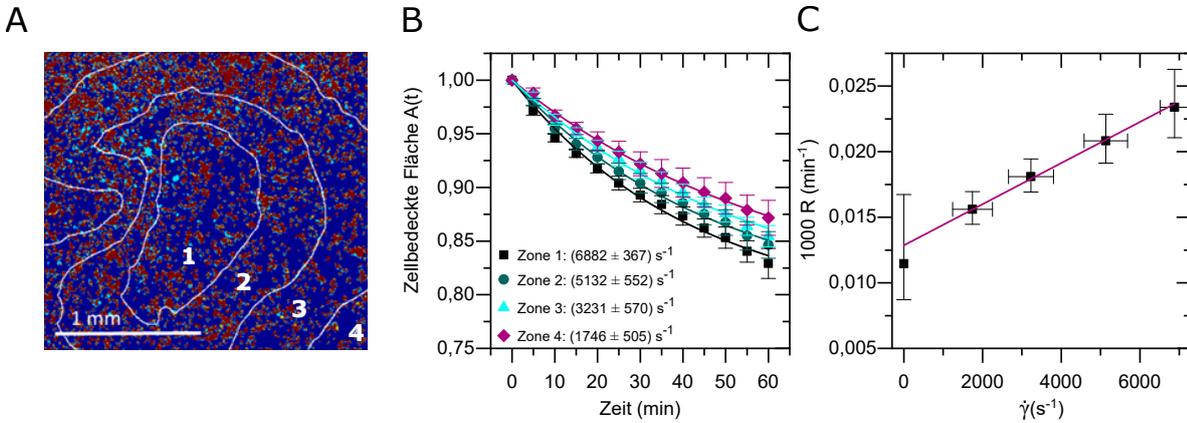
Die Ablöserate  $R$  wird folglich jeweils aus den Fitparametern mit Gleichung 4.12 bestimmt. Je nach Verhalten von  $R$  in Abhängigkeit von  $\dot{\gamma}$  kann schließlich das Verhältnis der wirkenden Kraft zur Zellhaftung in eins der drei Niveaus „Niedrig“, „Moderat“ oder „Hoch“ eingeordnet werden.

## 4.2 Einfluss der Scherrate

Wie in Kapitel 3 beschrieben, wird durch die Auswertesoftware PIVDAC eine Maske über die Mikroskopbilder gelegt, die diese in vier Zonen unterschiedlicher Scherratenbereiche aufteilt, vgl. Abbildungen 3.1 B, 4.3 A und Tabelle 4.2. Dadurch kann die exponentielle Abnahme der zellbedeckten Fläche  $A(t)$  nach Gleichung 4.12 für jede Zone individuell bestimmt werden. In Abbildung 4.3 sind die

	Zone 4	Zone 3	Zone 2	Zone 1	
von	bis	bis	bis	bis	$\dot{\gamma}(\text{s}^{-1})$
307	2246	4184	6122	8060	$\tau(\text{Pa})$
0,2	1,6	3,0	4,4	5,8	$\tau(\text{dyn/cm}^2)$
2	16	30	44	58	

**Tabelle 4.2:** Aufteilung der Zonen nach der Scherrate  $\dot{\gamma}$  und Umrechnung in die Scherspannung  $\tau = \eta\dot{\gamma}$  mit einer dynamischen Viskosität des Zellkulturmediums von  $\eta = 0,72$  mPas bei  $T = 37^\circ \text{C}$  [34].



**Abbildung 4.3:** A) Superposition der Mikroskopaufnahmen zu Beginn und Ende einer 60-minütigen Messung und der vier Scherzonen. Der Farbcode visualisiert die möglichen Szenarien, vgl. Abb. 3.1 H: Die dunkelblauen Flächen waren über den gesamten Messzeitraum nicht von Zellen bedeckt. Auf den hellblauen Flächen haben sich Zellen abgelöst, rote Flächen stehen für unveränderte Adhärenz. Flächen, die zu Anfang frei waren, aber zu Ende von Zellen bedeckt sind, sind orange eingefärbt.

B) Mit Zellen bedeckter Anteil der Fläche für jede Zone über den Messzeitraum von  $t = 60$  Minuten, Fitfunktion ist Gleichung 4.12.

C) Ablöserate  $R$  wie eingeführt in Kap. 4.1 mit Fitgleichung 4.7. Die Datenpunkte in B) und C) sind normierte Mittelwerte und deren Standardabweichungen.

Schritte dargestellt, wie die Ablöserate der Zellen  $R$  abhängig von der Scherrate  $\dot{\gamma}$  bestimmt wurde. Die Graphen zeigen Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten. Der Einfluss der Scherrate ist deutlich zu sehen. Mit zunehmender Scherrate von Zone 4 zu Zone 1 nimmt der Anteil der abgelösten Zellen signifikant zu. Die Fitparameter der Kurven nach Gleichung 4.12 aus Abb. 4.3 B liefern schließlich die Ablöserate der Zellen  $R$  für jede der vier Scherzonen. So ergibt sich die Abhängigkeit  $R(\dot{\gamma})$ , die in Abb. 4.3 C gezeigt ist. Um diese Experimente in das entsprechende Kraftniveau (niedrig, moderat oder hoch wie in Kap. 4.1 eingeführt) einzuordnen, ist der Zusammenhang zwischen  $R$  und  $\dot{\gamma}$  entscheidend. In Abb. 4.3 C ist ein linearer Zusammenhang zu sehen, das Kraftniveau ist also niedrig. Das bedeutet, für den Fit wird Gleichung 4.7 verwendet. Im Gegensatz zu ähnlichen Veröffentlichungen ist  $R(\dot{\gamma} = 0)$  hier positiv, es gibt also eine intrinsische Ablösung auch ohne Flusseinwirkung. Das ist vermutlich auf den invertierten Aufbau dieses Setups zurückzuführen, da sich die adhärennten Zellen an der nach unten zeigenden Seite des Deckels der Mikroflussskammer befinden, und somit auch durch Gravitation abgelöst werden.

Um zu verstehen, ob ein linearer Zusammenhang sinnvoll ist, und da es kaum Literatur zum Einfluss der Scherrate auf SaOs-2 Zellen auf Titanimplantaten gibt, werden die Ergebnisse nun mit denen aus verschiedenen Zell-Substrat-Kombinationen verglichen, und diese jeweils einem Kraftniveau aus dem in Kapitel 4.1 eingeführten Modell zugeordnet. Bei dem ersten Beispiel handelt es sich um *D. discoideum* Zellen auf Glas unter Scherfluss bis zu 20 Pa [35]. In den Experimenten in dieser Arbeit

wurden Werte von 0,2 Pa bis 5,8 Pa erreicht. Die Autoren Décavé et al. können den vorausgesagten scherflussinduzierten exponentiellen Abfall bei hohen Schergeschwindigkeiten zeigen. Die verschiedenen Zell-Substrat-Kombinationen können über die intrinsische Ablöserate  $R_0$  unter statischen Bedingungen in Relation gesetzt werden. In dieser Arbeit ist  $R_0 = 1,2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ , während der Wert im eben zitierten Fall mit  $R_0 = 1,5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  circa um einen Faktor 100 höher ist. Daraus ist zu schließen, dass deren Zellen viel schwächer an der Oberfläche adhäreren. Da in den Experimenten in dieser Arbeit zusätzlich noch niedrigere Scherraten herrschen, sind diese zweifellos in das niedrige Kraftniveau einzuordnen, und die oben zitierte Studie [31, 35] eine Stufe höher in das moderate Kraftniveau.

In einer ähnlichen, früheren Veröffentlichung stellen García et al. [36] eine *spinning disk* Scherzelle vor, in der sie adhärente, osteoblastartige Zellen auf Glas mit Fibronektinbeschichtung untersuchen. Sie beschreiben eine nichtlineare Abnahme des zellbedeckten Anteils bei zunehmender Scherrate, die in ähnlichem Rahmen liegt wie in dieser Arbeit, bzw. mit bis zu 10 Pa etwas darüber hinausgeht. Die in dieser Arbeit verwendeten SaOs-2 Zellen scheinen wieder stärker adhärent zu sein, da die adhären Zellen bei García et al. bei  $\sim 5$  Pa auf circa 60 % reduziert werden, obwohl die Inkubationszeit mit nur 15 Minuten, als auch die Zeit unter Scherfluss mit 10 Minuten deutlich kürzer ist [36]. Durch die schwächere Adhäsion ist die Scherkraft bei García et al. in das mittlere Kraftniveau einzuordnen.

Fritsche et al. [37] arbeiteten mit einer ähnlichen Kombination von Knochenzellen auf Titan. Die Zellen wuchsen in diesem Fall allerdings auf spiegelglatt geschliffenem Titan an und wurden in einer Scherzelle deutlich höheren Scherraten von  $\sim 50$  Pa ausgesetzt. Diese beiden Tatsachen, und der lineare Anstieg der Ablösung mit der Schergeschwindigkeit, weisen auf eine Einordnung in das hohe Kraftniveau, also hohe Krafteinwirkung bei schwacher Adhäsion, hin. Vermutlich resultiert die starke Bindung der Zellen in dieser Arbeit aus der hohen Oberflächenrauigkeit von  $R_q = 3,8 \mu\text{m}$  des verwendeten sandgestrahlten Titans.

Nachdem es sich in den bisherigen Beispielen um recht glatte Oberflächen handelte, werden jetzt die Arbeiten von Deligianni et al. [38] angeführt, die eine Reihe von Hydroxylapatitsubstraten unterschiedlicher Rauigkeit von  $R_q = 0,7 \mu\text{m}$  bis  $R_q = 4,7 \mu\text{m}$  in einer Scherzelle mit Scherraten von bis zu 60 Pa verwendeten. Die adhären humanen Knochenmarkzellen lösten sich bei Scherraten, die vergleichbar wären mit den in dieser Arbeit vorliegenden, nicht ab. Die augenscheinlich deutlich stärkere Adhärenz der Zellen bei Deligianni et al. ist vermutlich Ergebnis der deutlich längeren Inkubationszeit von vier Stunden, der kleineren Zellgröße und der Ähnlichkeit des künstlichen Knochenmaterialsubstrats zu tatsächlichem menschlichen Knochengewebe.

Ferner können niedrige Ablöseraten auf den adaptiven Fähigkeiten der Zellen beruhen. Ausgehend von einer bestimmten Bindungsstärke, die durch die Zell-Substrat-Kombination bedingt ist, reagieren die Integrine, die an die extrazelluläre Matrix binden, auf Scherspannung mit Verstärkung der Bindung [39]. Außerdem bilden Zellen bei Einsetzen moderater Scherspannung zusätzliche filopodiale Fortsätze aus, erst bei hohen Scherraten beginnen sie, sich zu einer Kugel zusammenzuziehen [40]. In der relativ langen Messzeit von 135 Minuten ab Aussaat der Zellen in dieser Arbeit kann dieser Effekt wahrscheinlich nicht vernachlässigt werden und bremst den Anstieg der Ablöserate mit der Scherrate.

Abschließend kann diese Zell-Substrat-Kombination mit diesem hier verwendeten Scherfeld in das niedrige Kraftniveau eingeordnet werden, da ein moderates Flussfeld auf eine Oberfläche trifft, die durch ihre Rauigkeit die Zelladhäsion begünstigt. Diese spezifische Kombination von Zelltyp, Substrat und Scherflussbereich muss für jede Studie berücksichtigt werden. Bringt man die Zellen durch entsprechende Anpassung der für die Zelladhäsion relevanten Parameter in ihren niedrigen Kraftbereich, lassen solche Messungen aus ihrer Belastbarkeit unter Scherfluss umgekehrt Rückschlüsse auf die Stärke der Bindung dieser Zell-Substrat-Kombination zu.

Das hier verfolgte Konzept mehrerer Zonen unterschiedlicher Scherrate innerhalb einer Mikroflusskammer ist auch bei Kim et al. [41] zu finden. Sie beschreiben einen kaskadenartig enger werdenden Mikrokanal. Durch stufenweises Verringern des Durchmessers von  $834 \mu\text{m}$  bis  $500 \mu\text{m}$  bei konstant  $100 \mu\text{m}$  Höhe entstehen Zonen konstanter Scherspannung zwischen 3 und 6 Pa. Am Kanalboden adhäreren in 6h Inkubation Lungenkrebszellen auf Kollagen. Sie können damit die Zelladhäsionsstärke von Epithel- und Mesenchymzellen unterscheiden und schlagen als mögliche Anwendung ihres Systems die Forschung an Krebsmetastasen vor. Die Mikroflusskammer, die in dieser Arbeit zum Einsatz kommt, ist wesentlich vielseitiger. Die Scherraten lassen sich durch Design des Interdigital Transducers und durch die angelegte Leistung beliebig einstellen. Das kleine Volumen in der geschlossenen Kammer garantiert eine gute Temperaturkontrolle bei niedrigem Verbrauch an Zellmedium. Als Zellsubstrat lässt sich quasi

#### **4. Korrelation von Zelladhäsion, lokaler Scherrate und Zelldichte**

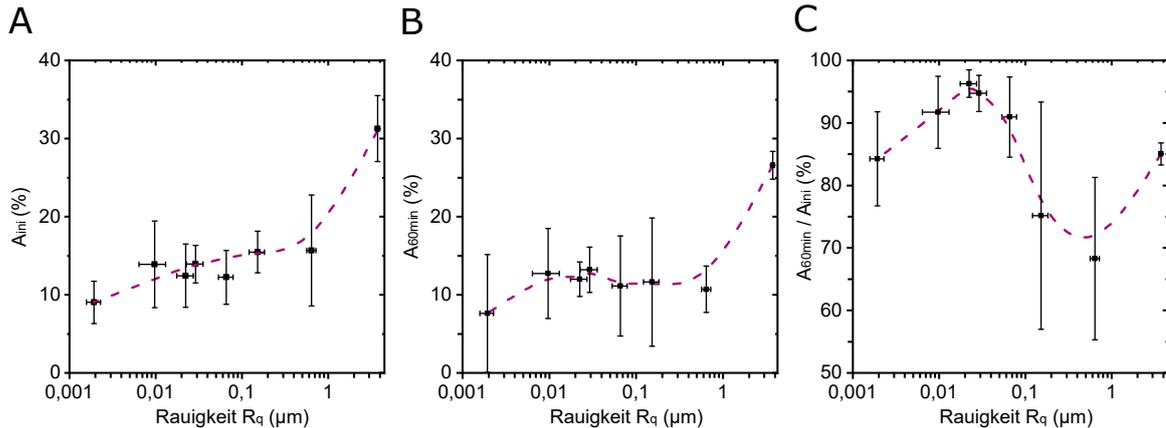
---

jedes Material einsetzen, so lange es in runden Scheiben von 1 cm Durchmesser vorliegt. Das bisher verwendete sandgestrahlte Titan wird im folgenden Kapitel nun durch unterschiedlich glatt geschliffene Proben ersetzt, um den Einfluss der Oberflächenrauigkeit auf die Zelladhäsion zu beleuchten.

### 4.3 Einfluss der Oberflächenrauigkeit

Kommt eine Zelle mit einer Oberfläche in Kontakt, beeinflusst die Oberflächenbeschaffenheit die Kinetik der Proteinadsorption [38], also das Knüpfen und Ausbreiten von Kontaktstellen und damit die Zelladhäsion. Um den Einfluss der Oberflächenrauigkeit auf die Zelladhäsion experimentell zu untersuchen, werden hier Implantatproben in sieben Rauigkeitsstufen von spiegelglatt,  $R_q = 2$  nm, bis sandgestrahlt,  $R_q = 3,76$   $\mu\text{m}$ , verwendet.

In Abb. 4.4 A ist die initial bewachsene Fläche  $A_{\text{ini}}$  vor Anschalten des Flusses gegen die Oberflächenrauigkeit aufgetragen. Hier sticht die sandgestrahlte, raueste Oberfläche mit einem Zellbewuchs von  $A_{\text{ini}} = 31 \% \pm 3 \%$  deutlich heraus, während alle glatteren Oberflächen mit Werten von  $A_{\text{ini}} \approx 15 \%$  ungefähr halb so dicht bewachsen sind.



**Abbildung 4.4:** Zelladhäsion auf unterschiedlich rauen Oberflächen [2].

- A) Initial bewachsene Fläche  $A_{\text{ini}}$  zum Startzeitpunkt der Messung.  
 B) Zellbedeckte Fläche  $A_{60\text{min}}$  nach 60 Minuten Messung unter Einfluss der Strömung.  
 C) Relative Änderung zwischen Anfang und Ende der Messung  $A_{\text{rel}} = A_{60\text{min}} / A_{\text{ini}}$ .

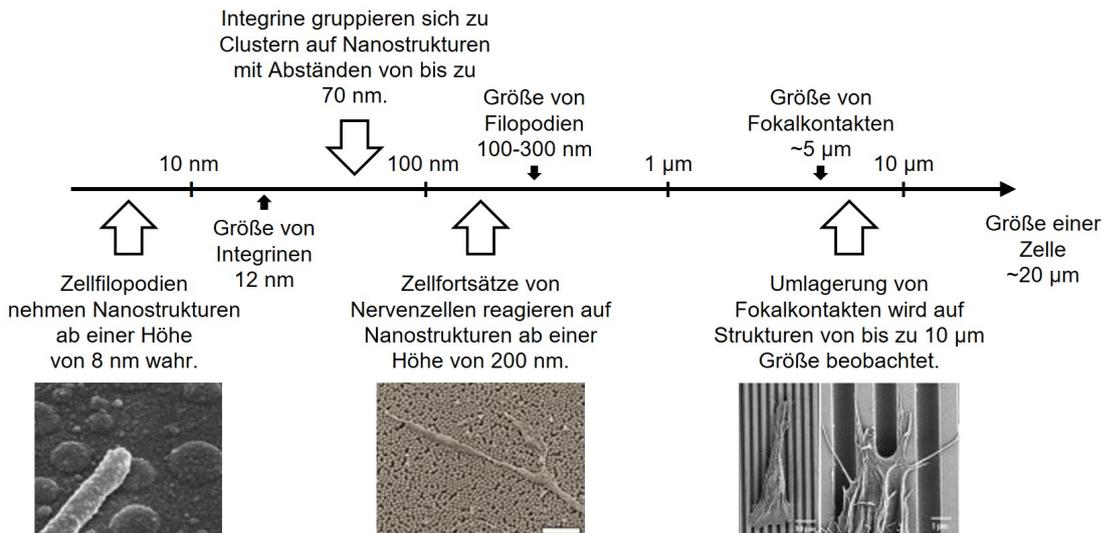
Nach 60 Minuten unter Fluss, vgl. Abb. 4.4 B, bleibt die Verteilung ähnlich. Betrachtet man allerdings die relative Änderung zwischen Beginn und Ende der Messung, wie in Abb. 4.4 C dargestellt, kristallisiert sich ein Maximum von adhärennten Zellen bei einer Rauigkeit von  $R_q = 22$  nm heraus. Hier bleiben  $A_{\text{rel}} = 96 \% \pm 4 \%$  bestehen. Auf der glattesten Oberfläche sind es noch  $A_{\text{rel}} = 84 \% \pm 8 \%$ , wie auch auf der rauesten mit  $A_{\text{rel}} = 85 \% \pm 3 \%$ . Dazwischen wird bei  $R_q = 640$  nm ein Minimum von  $A_{\text{rel}} = 68 \% \pm 12 \%$  durchlaufen.

Dieses Verhalten kann durch die Interaktionen der Zelle mit dem Substrat begründet werden, die über subzelluläre Mikrostrukturen Kontaktpunkte ausbildet [42]. Diese Kontaktstellen sind im Zytoskelett der Zelle verankert, und ermöglichen der Zelle über Integrine an eine außerezelluläre Matrix anzubinden [43]. Für eine optimale Adhäsion der Zelle weisen diese Bindungen auf der Basis von Integrinen eine typische Länge und eine maximale Kontaktfläche der Zelle mit dem Substrat auf [44]. Außerdem positioniert sich eine Zelle so auf einem Substrat, dass ihr Zytoskelett möglichst wenig verformt wird [45]. Variationen in der Mikrotopographie wirken sich also direkt auf die Zelladhäsion an einer Implantatoberfläche aus. Die optimale Rauigkeit unterscheidet sich jedoch für verschiedene Zelllinien. Osteoblastartige Zellen wachsen besser auf rauerer Oberflächen an, wobei Fibroblasten beispielsweise glattere Oberflächen bevorzugen [43]. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass SaOs-2 Zellen ein osteoblastartiges Verhalten mit einem lokalen Maximum bei  $R_q = 22$  nm zeigen [2].

Abbildung 4.5 gibt einen Überblick, inwiefern die Zelladhäsion von der Topographie des Substrats im Mikro- und Nanometerbereich beeinflusst wird [46]. Die Größe der Strukturen auf einer Oberfläche ist ein bestimmender Faktor für die Adhäsion, der Morphologie und der Ausrichtung einer Zelle. Genauer scheinen Strukturen bestimmter Größenordnungen das Zellwachstum besonders zu begünstigen. Auch wenn diese optimale Größe abhängig von Zelltyp und Substratmaterial variiert, stimmen diese meist mit den Abmessungen sensorischer Zellorganellen überein.

Zum Vergleich werden die Ergebnisse von Huang et al. [47] betrachtet, die das Anwachsen von osteoblastartigen Zellen auf ähnlichen, unterschiedlich rauen Oberflächen unter statischen Bedingungen

#### 4. Korrelation von Zelladhäsion, lokaler Scherrate und Zelldichte



**Abbildung 4.5:** Korrelation zwischen den Dimensionen der Substrattopographie und der Größe der Sinnesorgane einer Zelle nach Ngyuen et al. [46].

untersuchten. Auch sie zeigen, dass die Zelladhäsion im Bereich von  $50 \text{ nm} \leq R_a \leq 1,20 \text{ µm}$  sehr stark von der Oberflächenrauigkeit  $R_a$  abhängt, mit einem Optimum bei  $R_a = 150 \text{ nm}$  verglichen mit glatteren ( $R_a \leq 70 \text{ nm}$ ) oder raueren ( $R_a \geq 330 \text{ nm}$ ) Substraten. In dieser Arbeit ist ebenfalls ein Anstieg der Zelladhäsion mit zunehmender Rauigkeit bis  $R_q = 150 \text{ nm}$  zu verzeichnen, aber bei weiterer Erhöhung der Rauigkeit auf  $R_q = 640 \text{ nm}$  stagniert die Zelladhäsion. Daraus folgt, dass es eine bestimmte Oberflächenrauigkeit gibt, nämlich  $R_q = 150 \text{ nm}$  [48], die beim Erstkontakt das mechanische Ineinandergreifen von Zelle und Substrat erleichtert und langfristig die Bindung begünstigt. Unter Fluss nimmt die Zellablösung mit höherer Oberflächenrauigkeit  $R_q$  allerdings zu, vgl. Abb. 4.4 C. Dies lässt sich mit der scherflussaktivierten Verstärkung der Kontaktpunkte erklären [39]. Integrinrezeptoren fungieren als mechanische Sensoren, und lösen eine Aktivierung von Signalproteinen aus, die wiederum an der Verankerung des Zytoskeletts wirken [49]. Die Oberflächentopographie korreliert bekanntermaßen mit der Anordnung von Kontaktstellen und damit der Ausbildung der Fasern des Zytoskeletts, wobei ein Abstand von  $30 \text{ nm}$  ideal ist [44]. In Übereinstimmung damit erreicht die Zelladhäsion ihr Maximum unter dynamischen Bedingungen für  $R_q = 22 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ , vgl. Abb. 4.4 B und C. Cavalcanti-Adam et al. untersuchen das Anwachsen von Zellen auf nanostrukturierten Oberflächen unterschiedlichen Ligandenabstands dagegen im Statischen [50]. In ihrem Fall verhält sich das initiale Anwachsen der Zellen unabhängig von der Oberfläche gleich, aber das Ausbilden stabiler Kontaktstellen und das langfristige Spreizen wird durch eine kritische Ligandendichte bzw. einem Ligandenabstand von  $< 70 \text{ nm}$  maximiert. Auch wenn in dieser Arbeit die Oberflächentopographie verändert und nicht die Ligandendichte direkt kontrolliert wird, sind die Zusammenhänge vermutlich kongruent.

Chen et al. fassen Methoden zusammen, um die physikochemischen Eigenschaften von Biomaterialien dahingehend zu verändern, dass Osteoblasten besser adhären können [51]. Diese Methoden sind (1) Manipulation der Oberflächentopographie bzw. Rauigkeit, (2) Optimierung der Porengröße, (3) Modifizierung der Oberflächenbenetzbarkeit zur Erhöhung der Hydrophilie, (4) Manipulation der Oberflächenladung mittels Inkorporierung positiv geladener Monomere, (5) Implantieren bioaktiver Faktoren. Auch hier wird gezeigt, dass die Oberfläche nicht zu glatt oder zu rau sein darf. Optimal ist es, wenn die Rauigkeit natürlicher Knochen imitiert wird. In der klinischen Anwendung sind nach Stepanovska et al. einige mechanische, chemische und physikalische Verfahren etabliert, um die Oberfläche von Titanimplantaten für eine verbesserte Osseointegration zu behandeln [52]. Mechanische Verfahren sind Sandstrahlen und Schleifen, chemisch bedeutet durch Ätzen mit Säuren oder anodische Oxidierung, und unter physikalischen Verfahren sind weitere Methoden wie Laserbehandlung, Plasmaspritzverfahren und Sol-Gel-Methoden zusammengefasst. Die Ergebnisse aller Methoden sind ähnlich, es gibt keine universell hervorstehende. Generell sind Oberflächen mit Strukturierung im Mikrometerbereich günstiger für die Zelladhäsion als glatte Titanoberflächen. Rauere Oberflächen bieten eine größere Oberfläche und erleichtern die biomechanische Fixierung. In jüngster Zeit erscheinen nanostrukturierte Oberflächen vielversprechend, die der Nanoarchitektur natürlicher Knochen ähneln.

Zusammenfassend folgt daraus, dass eine Oberflächenrauigkeit in der Größenordnung der Filopodien ( $\sim 100$  nm, vgl. Abb. 4.5) für ein optimales Adhäsionsvermögen unter dynamischen Bedingungen auf relativ glatten Oberflächen sorgt. Auf deutlich raueren Oberflächen mit  $R_q$  im Bereich von mehreren Mikrometern treten vermutlich zusätzliche Effekte, wie das Abschirmen von ganzen Zellen, auf. Ausgehend von den Ergebnissen in diesem Kapitel ist im Sinne der Osseointegration eine Anpassung der Rauigkeit auf  $22 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$  zu empfehlen [2]. Die Existenz eines Optimums ist in der Zellmorphologie begründet: eine glatt polierte Oberfläche bietet wenig Ansatzpunkte für eine Zelle um Bindungen auszubilden, während eine sehr unebene Oberfläche wiederum das Ausbilden einer großen Kontaktfläche zwischen Zelle und Substrat erschwert, da sich die Zellmembran dafür stark verformen muss. Eine moderate Rauigkeit entspricht der Beschaffenheit von natürlichem Knochenmaterial.

## 4.4 Einfluss der Zelldichte

Während es einige Studien über die Scherratenabhängigkeit der Zellablösung bei relativ niedriger Zelldichte gibt, sind kaum systematische Studien über scherinduzierte Zellablösung als Funktion der Zelldichte auf den Substraten zu finden. Furukawa et al. zeigen, dass Zellen in einem konfluenten Zellrasen signifikant widerstandsfähiger gegen Scherfluss in einer Scherzelle sind als vereinzelte Zellen [23]. Andere Autoren erwähnen, dass Zellen sich nicht gegenseitig beeinflussen, wenn weniger als 7 % des Substrats mit Zellen bedeckt ist [35]. Üblicherweise wird dennoch in vielen Studien im Bereich von 50 % Bedeckung der Fläche gearbeitet [11].

Zur Variation der Zelldichte wurde in Zusammenarbeit mit Sebastian Angermann [53] die anfängliche Zellkonzentration in der Probenkammer von standardmäßig 60.000 Zellen pro 200  $\mu\text{l}$  auf den fünffachen Wert erhöht, und auf die Hälfte bzw. ein Zehntel verringert. Daraus ergeben sich nach 60 Minuten Inkubation entsprechend vier unterschiedliche Dichten auf dem Substrat, wie in Tabelle 4.6 aufgeführt. Im Übrigen wurde das zuvor erwähnte, standardisierte Messprotokoll eingehalten.

Zelldichte	Zellkonzentration in Suspension	Dichte auf Substrat ( $\text{mm}^{-2}$ )
Hoch	$5 \times c_{\text{Standard}}$	1600
Standard	$1 \times c_{\text{Standard}}$	320
Halb	$0,5 \times c_{\text{Standard}}$	160
Niedrig	$0,1 \times c_{\text{Standard}}$	32

**Tabelle 4.6:** Variation der Konzentration der Zellen in der Suspension ausgehend von der Standardkonzentration  $c_{\text{Standard}} = 300.000 \text{ Zellen ml}^{-1}$ . Bei Befüllen der Probenkammer mit 200  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Suspension resultiert daraus nach 60 Minuten Inkubationszeit die entsprechende, in der rechten Spalte aufgeführte Zelldichte auf dem Substrat. Für beispielhafte Mikroskopaufnahmen siehe Abb. 4.7 A-C.

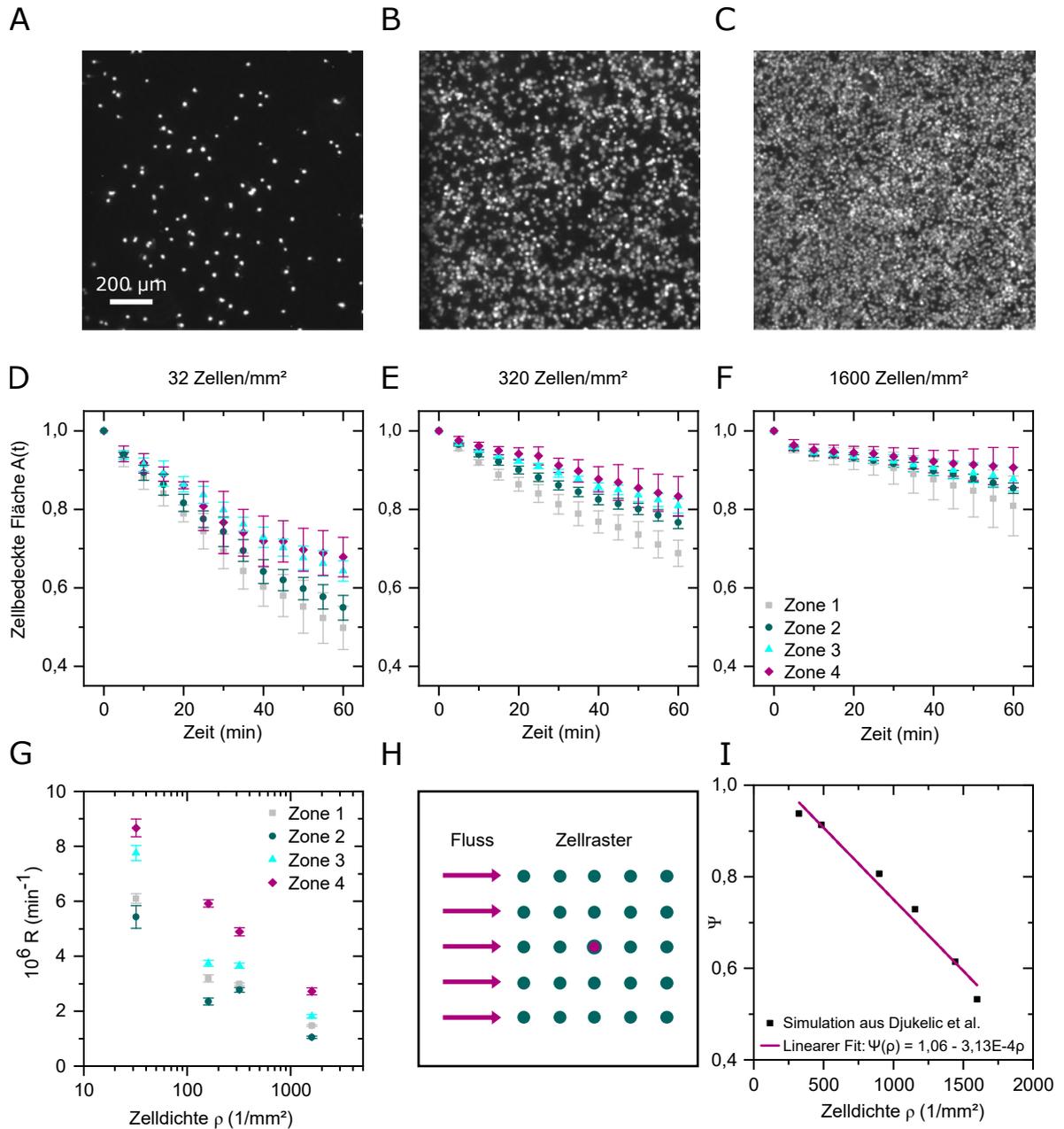
Abbildung 4.7 A-C zeigt beispielhafte Fluoreszenzaufnahmen bei drei der gewählten Zelldichten, darunter ist in Abb. 4.7 D-F jeweils die zellbedeckten Fläche für die vier Scherzonen als Funktion der Zeit nach Auswertung mit PIVDAC aufgetragen. Diese Ablösekinetiken zeigen eine signifikante Abnahme der Ablöserate mit zunehmender Zelldichte, vgl. Abb. 4.7 G. Im Grenzfall eines konfluenten Zellrasens mit 24 h Anwachszeit konnte keine Ablösung festgestellt werden. Sobald sich die Zellen berühren, bilden sie Zell-Zell-Kontakte aus, die maßgeblich für die Übertragung mechanischer Einflüsse und die Zellkommunikation verantwortlich sind [8], und somit den Zellrasen in sich stabilisieren. Für die tatsächlich auf eine Zelle wirkende Kraft kommt im konfluenten Fall damit eine Zug- oder Schubkomponente von benachbarten, eventuell höherem Scherfluss ausgesetzten Zellen hinzu. Dies kann zur Ablösung ganzer Stücke aus dem Zellrasen bei Versagen der Adhäsion an einer kleinen Stelle führen. Da der Einfluss der Zell-Zell-Adhäsion auf die Zell-Substrat-Adhäsion hier nicht systematisch zu bewerten ist, werden diese Versuche mit konfluentem Zellrasen nicht weiter verfolgt, und im Weiteren mit vereinzelten Zellen gearbeitet. Bei der höchsten hier verwendeten Zelldichte von 1600 Zellen  $\text{mm}^{-2}$  liegen die Zellen mit durchschnittlich einer Zelle pro  $25 \times 25 \mu\text{m}^2$  zwar recht dicht, aber für Konfluenz reicht diese Dichte bei der kurzen Inkubationszeit von einer Stunde nicht aus.

Betrachtet man die zellbedeckte Fläche als Funktion der Zeit nach Gleichung 4.12 bei unterschiedlicher Zelldichte, ergibt sich die in Abbildung 4.7 G dargestellte Ablöserate  $R$  abhängig von der Scherrate und als Funktion der Zelldichte  $\rho$ . Um den Zusammenhang  $R(\rho)$  zu verstehen, werden Ergebnisse aus Finite Elemente Simulationen von Djukelic et al. [24] herangezogen, und mit dem oben eingeführten thermodynamischen Modell kombiniert.

In erwähnter Simulation [24] werden die Zellen als halbkugelförmige, deformierbare Objekte abstrahiert, die auf einem Raster sitzen, wie in Abbildung 4.7 H dargestellt. Unter Scherfluss wird dann bei unterschiedlichen Abständen im Raster die von-Mises Spannung  $\sigma_{\text{Mis}}$  auf die Zelle in der Mitte bestimmt, und in Relation gesetzt mit der von-Mises Spannung, die auf eine einzeln liegende „Zelle“ unter den selben Scherflussbedingungen wirkt. Dieses Verhältnis wird als Einflussfaktor  $\Psi$  bezeichnet.

$$\Psi := \frac{\int \int \sigma_{\text{Mis}} dS_{\text{obs}}}{\int \int \sigma_{\text{Mis}} dS_{\text{ref}}} \quad (4.13)$$

Dabei ist  $S_{\text{obs}}$  die Oberfläche der observierten Zelle umgeben von benachbarten Zellen, und  $S_{\text{ref}}$  entsprechend die der Referenzzelle ohne Nachbarn. Mit zunehmender Dichte nimmt der Einfluss der



**Abbildung 4.7:** Zelladhäsion bei zunehmend dicht bewachsenen Oberflächen [3].

**Oben:** Fluoreszenzaufnahmen bei **A**) niedriger Zelldichte mit 32 Zellen/mm<sup>2</sup>, **B**) Standardzelldichte mit 320 Zellen/mm<sup>2</sup> und **C**) hoher Zelldichte mit 1600 Zellen/mm<sup>2</sup>.

**Mitte:** Zellbedeckte Fläche  $A(t)$  in den vier Scherzonen bei **D**) niedriger, **E**) Standard- und **F**) hoher Zelldichte. Die Datenpunkte in D-F sind normierte Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten.

**G**) Ablöserate  $R$  aus den Fits nach Gleichung 4.12 für die Zelldichten aus Tabelle 4.6, jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten.

**H**) Schema des Zellrasters für die Simulation nach Djukelic et al. [24] unter Fluss, Ansicht von Oben. Die markierte Zelle in der Mitte spürt durch die abschirmende Wirkung der umliegenden Zellen geringere Scherkräfte.

**I**) Ergebnis der Simulation ist der Einflussfaktor  $\Psi$  für die markierte Zelle in H) als Funktion der Zelldichte.

#### 4. Korrelation von Zelladhäsion, lokaler Scherrate und Zelldichte

---

Nachbarzellen zu, die effektiv wirkenden Kräfte werden also reduziert, vgl. Abb. 4.7 I. Dieser Effekt ist rein geometrisch durch Abschwächen des Flusses für „flussabwärts“ liegende Zellen. Zell-Zell-Kontakte werden nicht berücksichtigt, ein konfluenter Zellrasen kann hiermit also nicht beschrieben werden.

Dies soll jetzt in das thermodynamische Modell aus Kapitel 4.1 einfließen, unter der Annahme, dass die Scherkraft  $F$ , die in die Ablöserate aus Gleichung 4.4 eingeht, direkt proportional zum Einflussfaktor  $\Psi$  ist.  $\Psi$  ist wiederum eine Funktion der Fluidgeschwindigkeit und der Zelldichte  $\rho$ .

$$F(\rho) = F_0\Psi \approx F_0(\Psi_0 - m\rho) \quad (4.14)$$

Der Faktor  $m$  ist eine von der Fluidgeschwindigkeit und der Zellform abhängige Konstante, die mit zunehmender Fluidgeschwindigkeit zunimmt. Setzt man Gl. 4.14 in Gl. 4.4 ein, erhält man

$$\tilde{k}_{\text{off}} = k_{\text{off}} \exp\left(\frac{F\tilde{x}_T}{k_B T}\right) \sim \exp(F) = \exp(F_0(\Psi_0 - m\rho)) \sim \exp(-m\rho). \quad (4.15)$$

Unter der Annahme der Proportionalität  $R \sim \tilde{k}_{\text{off}}$  gilt

$$R \sim \exp(-m\rho). \quad (4.16)$$

Betrachtet man die Verläufe für  $R(\rho)$  in Abb. 4.7 G, scheint die Relation aus Gl. 4.16 plausibel. Während die Abschätzung für Zone 1, bei den höchsten Flussgeschwindigkeiten und Scherkräften, sehr gut mit den Daten übereinstimmt, besteht für die Zonen geringerer Scherrate eine gewisse Abweichung, die höchstwahrscheinlich mit den Abweichungen zwischen tatsächlicher und forcierter Zelldichte zusammenhängen. An dieser Stelle muss betont werden, dass  $m$  von der Fluidgeschwindigkeit und  $R$  von  $k_{\text{off}}$  abhängt, wobei  $k_{\text{off}}$  wiederum sehr stark von der Zell-Substrat-Kombination abhängig ist. Macht man sich klar, dass die Simulation von perfekt geformten, gleichmäßig verteilten, homogenen elastischen Objekten ohne jegliche biochemische Wechselwirkung ausgeht, ist die Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus unterschiedlich konzentrierten Suspensionen echter Zellen verblüffend.

# 5

## Fazit Zell-Substrat-Adhäsion

Zusammenfassend zeigen die statischen Experimente, dass SaOs-2 Zellen auf sandgestrahlten Titanimplantaten am besten unter Standardbedingungen, d.h. bei einer Oberflächenrauigkeit von  $R_q = 3,76 \mu\text{m}$ , einer Zellkonzentration von  $c_{\text{Standard}} = 300.000$  Zellen/ml, einer Temperatur von  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$  und dem pH-Wert  $\text{pH} = 7,4$  adhäreren. Für das Ablösen unter Scherfluss ergibt sich ein lokales Optimum bei einer Oberflächenrauigkeit von  $R_q = 22 \text{ nm}$  [2]. Mit zunehmender Zelldichte nimmt die Ablöserate der Zellen unter Fluss ab [3]. Durch das Übereinanderlegen der Scherkarte und der zeitabhängigen Zellablösung wird der Parameterraum um die Scherspannung erweitert. Zusammen mit der Beschreibung des Ablöseprozesses nach Kramers Theorie der Reaktionskinetik lässt sich daraus die spezifische Ablöserate  $R$  bestimmen, die von der Einwirkzeit und der Scherspannung abhängt. Dies erlaubt einen Rückschluss auf die Adhäsionskraft zwischen Zellen und Substrat [3].

Wesentlich ist die Erkenntnis, dass die Zellablösung unter Fluss stark von der Zelldichte abhängt. Dementsprechend, unterstützt durch ähnliche frühere theoretische Betrachtungen, sollte die Zelldichte immer vorrangig berücksichtigt werden, wenn Ergebnisse unterschiedlicher Studien zu Zelladhäsion und Ablösung verglichen werden.

Die quantitative Korrelation von lokaler Scherspannung und zeitabhängiger Ablösung kann die Schersensitivität beliebiger Zell-Substrat-Kombinationen aufzeigen. Interessant sind z.B. neuartige Metallionen freisetzende Implantatmaterialien [54] und Osteoblasten. Außerdem könnte die Zellablösung beispielsweise unter dynamisch modulierten Scherfeldern untersucht werden. Weiterführend könnten Zellbiologen mit der DANI-Kammer die erwähnten adaptiven Prozesse adhärenter Zellen unter Fluss analysieren. Solche Prozesse wären beispielsweise die Beweglichkeit adhäsiver Brücken, die Restrukturierung und Reorientierung des Zytoskeletts sowie Genexpression. Ein Vergleich mit *in vivo* Experimenten würde die biologische Relevanz solcher Studien stützen.

Durch die Kombination von Mikrofluidik und Zellbiologie lassen sich Modelle erstellen, um erfolgreich Interaktionen zwischen Biomaterialien und Zellen unter physiologisch relevanten Scherflussbedingungen aufzudecken. Solche Modelle bieten einen Weg, den Schritt von Experimenten *in vitro* zu Versuchen *in vivo* zu erleichtern, und damit die Charakterisierung und schließlich die Markteinführung neuer Biomaterialien zu beschleunigen und gleichzeitig zu standardisieren [27]. Für eine Realisierung einer solchen Standardisierung wäre die interdisziplinäre und interlaborale Zusammenarbeit involvierter Forschungsgruppen zur Vereinheitlichung bzw. Systematisierung der unterschiedlichen Experimente hierzu essentiell.



## Teil II

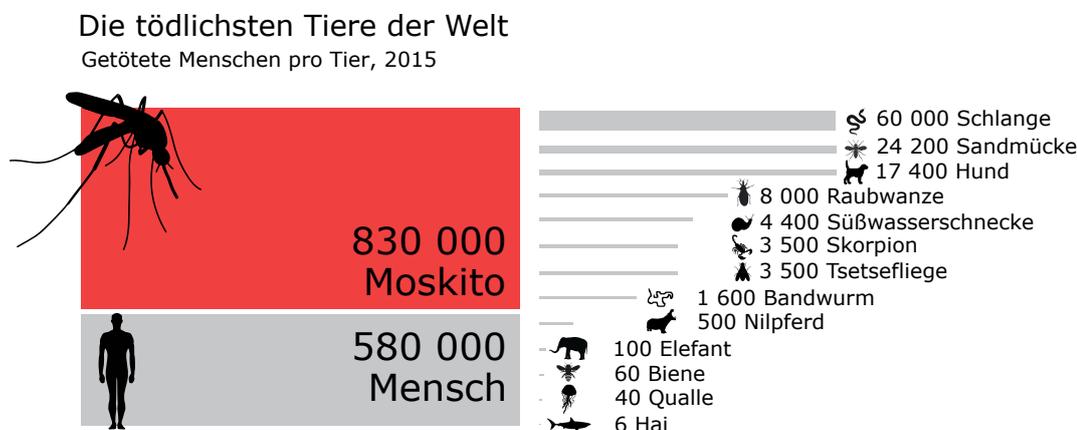
# Dynamik von Aggregaten roter Blutkörperchen bei Malariainfektion unter physiologischen Mikroflussbedingungen



# 1

## Einleitung Zell-Zell-Adhäsion

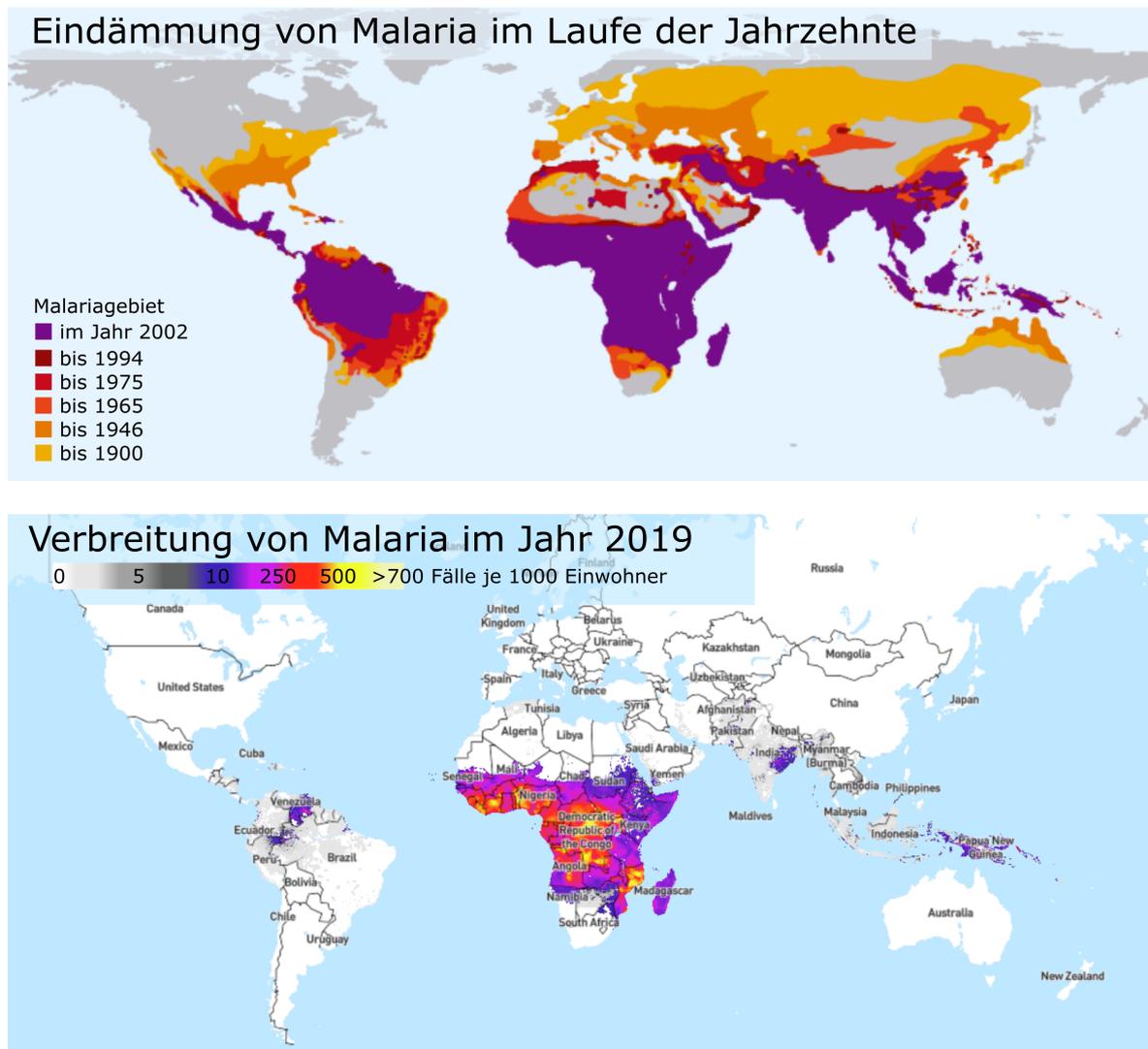
Im vorherigen Abschnitt wurde intensiv untersucht, wie Zellen auf verschiedenen Substraten haften, und wie stark die Adhäsion hydrodynamischen Kräften standhalten kann. Unter bestimmten Bedingungen steht jedoch nicht die Zell-Substrat-Wechselwirkung, sondern die Zell-Zell-Bindung im Vordergrund. Ein folgenschweres Beispiel ist die Rosettenbildung durch das Aneinanderhaften von roten Blutkörperchen bei Malaria. Dieses Phänomen ist Thema des größeren, zweiten Teils dieser Dissertation. Genauer geht es um die Dynamik von Aggregaten roter Blutkörperchen bei Malariainfektion unter physiologischen Mikroflussbedingungen. Einleitend wird in Kapitel 1.1 zunächst die Bedeutung von Malaria für die Weltgesundheit umrissen. Bevor Motivation und Fragestellung dieser Arbeit in Kapitel 1.4 ausgeführt werden, wird in Kapitel 1.2 beschrieben, wie sich bei Malariainfektion Aggregate roter Blutkörperchen bilden, und in Kapitel 1.3 welche Rolle die Blutgruppe des Patienten dabei spielt.



**Abbildung 1.1:** Moskitos sorgen weltweit für die meisten Todesfälle durch „Tiere“, mehr als die Hälfte dieser Menschen sterben an Malaria. Abbildung nach einer Aufstellung der tödlichsten Tiere der Welt von Bill Gates [55].

### 1.1 Bedeutung von Malaria weltweit

Weltweit starben im Jahr 2019 55,4 Mio. Menschen [59]. In über 70 % der Fälle war die Todesursache eine nichtübertragbare Krankheit wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung. Betrachtet man lediglich die einkommensschwachen Länder, spielen die übertragbaren Krankheiten mit ca. 60 % eine deutlich größere Rolle. Hier taucht Malaria in den Top 10 der häufigsten Todesursachen auf Platz 6 noch vor HIV (Platz 9) und Tuberkulose (Platz 8) auf [59]. Nichtsdestotrotz lebt ungefähr die Hälfte der Weltbevölkerung in Malariagebieten, und es erkrankten 229 Millionen Menschen im Jahr 2019 [60, 61]. Die über 400.000 Todesfälle durch Malaria jährlich machen den Moskito, der die Krankheit überträgt, zum tödlichsten Tier der Welt, vgl. Abb. 1.1 [55, 61].



**Abbildung 1.2:** Verbreitung von Malaria. **Oben:** Um 1900 war Malaria auf 53 % der Landfläche der Erde verbreitet. Zwischen 1900 und 2002 reduzierten sich die Malariagebiete flächenmäßig auf die Hälfte [56, 57]. **Unten:** Verbreitung von *Plasmodium falciparum* Malaria in Fällen pro 1000 Einwohnern im Jahr 2019 [58].

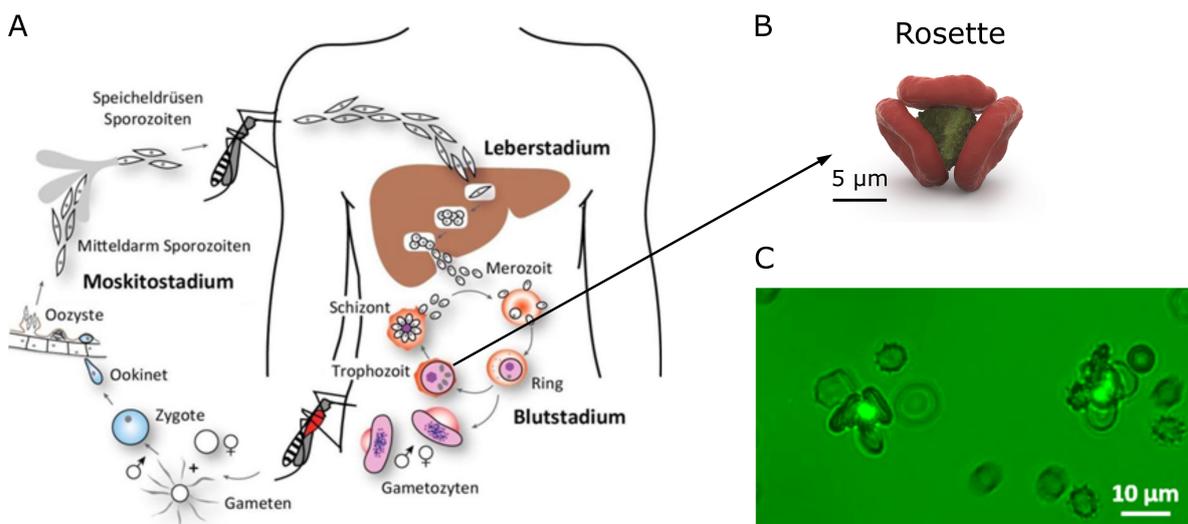
In den vergangenen Jahrzehnten wurden im Kampf gegen Malaria entscheidende Erfolge erzielt, aber auch Rückschläge verzeichnet. Die Eindämmung der Verbreitung von Malaria seit 1900 ist in Abb. 1.2 oben zu sehen. Das in der Nachkriegszeit konzipierte, teilweise erfolgreiche *Global Malaria Eradication Programme* lief 1969 aus. Das Nachlassen der Maßnahmen zog vor allem in Afrika ein Wiederaufleben der Krankheit nach sich. Erst in den 90er Jahren wurde erneut die Initiative ergriffen und durch neue Finanzierung wie den *Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria* entscheidende Hilfsmittel wie insektizidbehandelte Moskitonetze, Schnelltests und Medikamente verteilt. Nach dem World Malaria Report 2020 der Weltgesundheitsorganisation WHO sank die globale Sterblichkeit durch Malaria zwischen 2000 und 2019 um 60 % [61]. In der am stärksten betroffenen afrikanischen Region, vgl. Abb. 1.2 unten, starben statt 680.000 Menschen im Jahr 2000, im Jahr 2019 nur noch 384.000 Menschen an der Krankheit. Diese Zahlen stagnieren allerdings seit 2017. Die Gründe dafür liegen hauptsächlich in der Biologie: Der Parasit entwickelt Resistenzen gegen Malariamedikamente. Eine *PfKelch13* Mutation wurde als molekularer Marker für teilweise Artemisininresistenz identifiziert. Der verbreitete Wirkstoff Artemisinin zeigte besonders in Thailand und Bangladesch reduzierte Wirksamkeit. Eine andere Mutation führt dazu, dass sich der Parasit nicht mehr in Schnelltests nachweisen lässt, die auf dem *Histidin-rich Protein 2* (HRP2) basieren, da dieses durch das Fehlen der Gene *pfhrp2* und *pfhrp3* nicht exprimiert wird. Nicht nur der Parasit verändert sich, auch der Wirtsmoskito entwickelt Resistenzen gegen die verwendeten Insektizide. Einen großen Beitrag leistet hier die *Bill & Melinda Gates Foundation*, die mit 1,8 Mrd. USD (2017-2018) die Weltmalariaforschung zu 25 % finanziert. Dadurch wurden wichtige Innovationen wie der Impfstoff *Mosquirix* [61] und die Eindämmung der

Moskitopopulation durch gentechnische Veränderung, einem Projekt des Forschungskonsortiums *Target Malaria* [60], möglich.

Im Jahr 2020 erschwerte die COVID-19 Pandemie die Bekämpfung von Malaria zusätzlich. Bis April 2020 hatte sich das Coronavirus in allen malariaendemischen Ländern verbreitet, bis November 2020 wurden dort 22 Mio. Fälle und 600.000 Todesfälle gemeldet. Die pandemiebedingten Einschränkungen der Mobilität unterbrachen die ohnehin schwierige Malariaversorgung. Auch beispielsweise die Vorgabe, bei Fieber möglichst nicht das Haus zu verlassen, um die Verbreitung von COVID-19 einzudämmen, führte vermutlich zu zahlreichen unbehandelten Malariaerkrankungen, die sich ebenfalls durch Fieber äußern. Bereits im März 2020 gab es jedoch große Bemühungen, einen Kompromiss zwischen Malaria- und COVID-19-Maßnahmen zu finden. Nach WHO Vorgaben und finanzieller Unterstützung investierten die betroffenen Länder in umfassende Aufklärung und Versorgung des medizinischen Personals mit Schutzkleidung und die Verteilung von Medikamenten und langzeitwirksamen insektizidbehandelten Moskitonetzen [61]. Auf der anderen Seite brachte die durch COVID-19 getriebene intensive Forschung an mRNA-Impfstoffen auch die Entwicklung eines vielversprechenden, neuen Malariainpfstoffes voran. Richard Bucala, Yale School of Medicine, und Andrew Geall, Novartis Pharmaceuticals, meldeten im Herbst 2020 ein Patent für einen solchen mRNA-basierten Impfstoff an, und kündigten an, diesen noch 2021 an Menschen zu testen [62, 63].

## 1.2 Haftung von Blutzellen bei Malaria

Gegenstand dieser Arbeit sind Aggregate roter Blutkörperchen, die bei Malariainfektion auftreten. In diesem Abschnitt wird umrissen, wie *Rosetting* Zustände kommt und welche Bedeutung diesem Effekt für den Krankheitsverlauf zugeschrieben wird.



**Abbildung 1.3:** Rosettenbildung bei Malariainfektion.

**A)** Entwicklungsstadien des Erregers *Plasmodium falciparum* [64, 65]. Im Blutstadium können die Trophozoiten durch Agglomeration mit uninfizierten roten Blutkörperchen sogenannte „Rosetten“ bilden. Eine Rosette besteht aus einem infizierten und mindestens zwei uninfizierten roten Blutkörperchen.

**B)** Zeichnung einer Rosette © C. Hohmann, NIM. Die zentrale, grün eingefärbte Zelle stellt das infizierte rote Blutkörperchen dar.

**C)** Mikroskopische Aufnahme teilweise infizierter roter Blutkörperchen in Rosetten. Der Parasit ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Acridinorange* angefärbt.

Malaria wird durch Parasiten ausgelöst, die nicht direkt von Mensch zu Mensch übertragen werden, sondern mehrere Stadien durchlaufen und dabei zwischen Mosquito und menschlichem Wirt wechseln. Die verschiedenen Stadien sind in Abb. 1.3 A skizziert. Wird man also durch einen infizierten *Anopheles* Mosquito gestochen, injiziert das Insekt während seiner Blutmahlzeit *Plasmodien*. In diesem ersten Stadium nisten sich die Malariaparasiten zunächst in der Leber ein. Nach einer ca. zehntägigen Inkubationszeit kann der Parasit in das Blutstadium übergehen, die befallenen Leberzellen platzen auf und rote Blutkörperchen werden neue Wirtszellen. Nach erfolgreicher Invasion organisiert der Malariaparasit *Plasmodium falciparum*, der die lebensgefährlichste Form der Malaria, die *Malaria tropica*, auslöst, die Zellstruktur eines roten Blutkörperchens beträchtlich um. Die infizierten roten

Blutkörperchen (iRBK) werden dadurch steifer und gewinnen die Möglichkeit, an Gefäßwände und andere Blutzellen anzubinden. Die daraus resultierenden veränderten rheologischen Eigenschaften und die Neigung zur Zytoadhäsion trägt wesentlich zum Krankheitsverlauf bei. Entscheidend ist hier nicht zuletzt, dass der Parasit durch Zytoadhäsion Angriffe des Immunsystems vermeidet, indem die Oberfläche der infizierten Zellen durch Uninfizierte abgeschirmt wird und Zellen, die an Gefäßwände gebunden sind, die Aussortierung krankhafter Blutzellen in der Milz umgehen. Es treten unterschiedliche Arten der Zytoadhäsion auf: am Endothel, an der Plazentaschranke, an Blutplättchen, über Brücken aus Blutplättchen an anderen iRBK (Autoagglutination), an Leukozyten, und an uninfizierten roten Blutkörperchen (uRBK). Im zuletzt genannten Fall sind uRBK wie Blütenblätter um ein iRBK herum angeordnet, vgl. Abb. 1.3 B und C, man spricht von sogenannten *Rosetten*.

Solche Rosetten sind Hauptgegenstand dieser Arbeit. Die genaue Rolle dieser Rosettenbildung ist nicht geklärt, es gibt jedoch einige Theorien. Eine bereits widerlegte Theorie ist, dass auf diese Weise neue zu befallende uRBK bereits in die Nähe eines iRBK gebracht werden. Wahrscheinlicher ist ein Abschirmen der durch den Parasiten auf der Membran gebildeten Antigene durch Anbinden von uRBK, so dass diese Antigene nicht mehr für Immunzellen zugänglich sind. Ähnlich entkommen iRBK, die an Gefäßwänden oder im intervillösen Raum an den Zotten der Plazenta adhären, da sie nicht mehr das Blutreinigungssystem der Milz durchlaufen. Dort werden überalterte und krankhaft veränderte RBK aus dem Kreislauf genommen. Die Auswirkungen für den Patienten hängen stark vom Ort der Zytoadhäsion ab. Die befallenen Stellen an Gefäßwänden oder in der Plazenta entzünden sich, was zu fataler Gefäßundichtigkeit und Unterversorgung des Fötus führen kann. Im Falle der zerebralen Malaria ist der Blutfluss und damit die Versorgung des Gehirns beeinträchtigt. Ein fataler Ausgang einer Malariainfektion ist jedoch auch für den Parasiten unvorteilhaft. Parasitismus ist eine Beziehung zweier Organismen, wobei der eine vom anderen lebt und diesem dabei schadet. Im Laufe der Evolution entsteht jedoch ein möglichst friedvolles Gleichgewicht, so dass der Wirt den Parasiten ohne große Immunreaktion beherbergen kann. Aus dieser Perspektive betrachtet, könnte die Rosettenbildung eine Abmilderung der Symptome bewirken, wenn sie mit der Adhäsion an Gefäßwänden konkurriert und damit die Verletzung von Endothel eindämmt. Allerdings wird ein Gefäßverschluss durch die Kombination aus rosettierenden und adhären iRBK wahrscheinlicher. Wenn Rosetten auf Mikrogefäße treffen, könnten sie auseinander gezogen werden, und die iRBK so gezielt mit den Gefäßwänden in Kontakt bringen. Wie genau das Bilden von Rosetten nun den Krankheitsverlauf eines Malariainfizierten letztendlich beeinflusst, kann nach jetzigem Stand der Forschung nicht beantwortet werden [66].

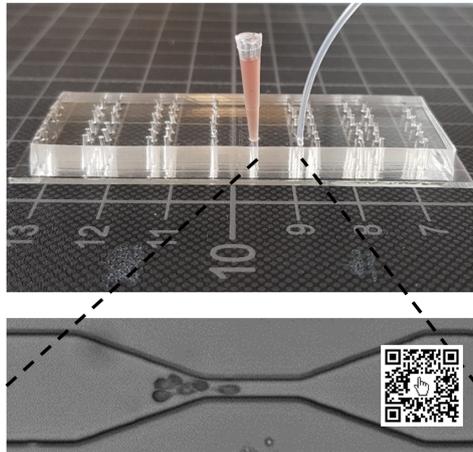
### 1.3 Malaria und die AB0 Blutgruppen

Die Charakteristika der auftretenden Rosetten werden in dieser Arbeit für die beiden Blutgruppen 0 und A verglichen. Ein Zusammenhang zwischen Malaria und den AB0-Blutgruppen wurde erstmals 1967 erörtert [67]. Studien, die eine Überrepräsentation von Blutgruppe 0 in malariaendemischen Regionen belegen, schreiben dem Malariaparasiten *P. falciparum* nicht nur einen Einfluss auf die Blutgruppenverteilung in der Bevölkerung zu, sondern sogar auf die ursprüngliche Entstehung von Blutgruppen [68, 69]. In jüngerer Vergangenheit wurden die Wechselwirkungen zwischen Parasit und den blutgruppenspezifischen Antigenen erforscht, um neue Ansätze für Wirk- oder Impfstoffe gegen Malaria zu finden [70]. Für Patienten unterschiedlicher Blutgruppen äußert sich im Krankheitsverlauf, dass Rosetten bei Blutgruppe 0 vergleichsweise seltener auftreten [71, 72, 73, 74]. Das Bilden von Rosetten kann den Parasiten vor dem Immunsystem schützen [75]. Rowe et al. [76] assoziieren reduzierte Rosettenbildung in Proben von Blutgruppe 0 Patienten mit einer 66 % niedrigeren Gefahr für diese Patienten, an der schweren Malaria zu erkranken. Unterschiedlich starke Neigung zur Rosettenbildung in den AB0 Blutgruppen wurde mehrfach nachgewiesen [75, 77, 78].

### 1.4 Rosetten unter physiologischen Flussbedingungen

Die Bildung und Stabilität solcher Rosetten unter Fluss wurde bereits in den 1990er Jahren mithilfe von Kegel-Platte-Viskosimetern und Mikropipetten untersucht [79, 80]. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Rosetten den Scherspannungen im menschlichen Blutkreislauf problemlos standhalten, und sich auch unter Fluss bilden können. Solche physiologischen Scherflussbedingungen wurden in diesen Experimenten durch das Anpassen der Flussraten in relativ großen Flusskammern realisiert. Hier werden zwar die richtigen Werte erreicht, die physische Einschränkung durch enge Gefäßwände wird hier jedoch nicht abgebildet. Das Herunterskalieren solcher Flusssysteme führt zur Mikrofluidik. Adams und Rowe

verwenden bspw. einen 800  $\mu\text{m}$  hohen Mikrokanal zur Analyse von Rosetten unter Fluss, und zeigen vergleichbare Ergebnisse zur Effizienz verschiedener Wirkstoffe zur Auflösung von Rosetten wie unter statischen Bedingungen. Kaul et al. [81] konnten in Versuchen an Ratten allerdings nur in Bereichen langsamen Blutflusses Rosetten nachweisen. Daraufhin wurde diskutiert, ob sich die rosettierenden RBK unter hoher Scherspannung voneinander lösen, um enge Arteriolen und Kapillaren zu passieren, und in den nachfolgenden weiteren Gefäßen umgehend neue Rosetten bilden. Wie genau das Bilden von Rosetten in das Gesamtsystem einspielt, ist wie schon erwähnt nicht ganz verstanden [82]. Es fehlen systematische Studien von Rosetten unter Fluss, die sowohl statistisch signifikant, als auch detailliert sind. Der



**Abbildung 1.4:** Mikrofluidiksystem aus PDMS auf einem Glasobjektträger ( $76 \times 26 \text{ mm}^2$ ) mit Reservoir und Schlauch, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, mit beispielhafter Mikroskopaufnahme. Ein solcher Objektträger trägt 36 Mikrofluidikkanäle, die jeweils einzeln mit Reservoir und Schlauch angeschlossen werden können. Die ausgestanzten Ein- und Auslässe sind zu sehen. Im Bild links ist einer der 36 Kanäle angeschlossen. Der Kanal im Beispielvideo ist 50  $\mu\text{m}$  breit, 8  $\mu\text{m}$  hoch und an der Engstelle 11  $\mu\text{m}$  breit.

Ansatz dieser Arbeit wird diesen beiden Ansprüchen gerecht. Die hier beschriebenen Experimente zeigen das Verhalten bzw. die Stabilität von Rosetten mit hoher Zeitauflösung von 2000 Bildern pro Sekunde und mehreren hundert Rosetten pro Datenpunkt, vgl. bspw. Abb. 5.4. Die hier verwendeten Mikrofluidikkanäle sind 50  $\mu\text{m}$  breit, 8  $\mu\text{m}$  hoch und weisen verschiedene Engstellen in der Größenordnung von Kapillaren auf, vgl. Abb. 1.4 und 3.4. Die hydrodynamischen Kräfte liegen hier mit einigen Piko- bis Nanonewton im Bereich von spezifischen Molekülbindungen [83], die die Zell-Zell-Bindungen innerhalb von Rosetten ausmachen. Rosetten unterschiedlicher Größe und Blutgruppe werden individuell bei Passage dieser Engstellen durch die automatische Auswertung von Hochgeschwindigkeitsaufnahmen über Bildserien von 50 – 100 Bildern studiert. Der dazu entwickelte Verfolgungsalgorithmus SURF (SURvival of Rosettes in Flow, siehe Kapitel 4) ermöglicht hohe Stichprobengrößen und unvoreingenommenen Vergleich zwischen den Blutgruppen 0 und A.

## Physiologische Relevanz und Bedeutung von Rosetting

Eine Frage, die sich hier aufdrängt, ist die physiologische Relevanz der vorliegenden Versuche. Kann ein rechteckiger Kanal und eine einfache Spritzenpumpe Flussbedingungen abbilden, die im Körper herrschen? Im menschlichen Körper ist der Blutfluss bekanntlich nicht kontinuierlich wie von einer Spritzenpumpe. Die Druckwelle, die vom Herzen ausgeht und in der Aorta stark charakteristisch ist, wird in den kleineren Gefäßen allerdings deutlich schwächer. Der Blutfluss weist dort kaum Schwankungen auf [84]. Um physiologische Flussbedingungen in so kleinen Gefäßen nachzuahmen, ist ein kontinuierliches Pumpen also richtig. Außerdem sind Blutgefäße elastisch, starre Mikrofluidikkanäle aus PDMS (Polydimethylsiloxan, ein durchsichtiges Polymer, das nach Aushärten biegsam aber formstabil ist) und Glas sind für solche Anwendungen dennoch weit verbreitet. Zhang et al. verwenden beispielsweise PDMS Kanäle mit 4  $\mu\text{m}$  breiten Schlitzten, um festzustellen, dass *P. vivax* Rosetten solche Hindernisse problemlos durchqueren können [85]. Auch Shelby et al. studieren das Blockieren von 2 – 6  $\mu\text{m}$  Stenosen durch *P. falciparum* infizierte rote Blutkörperchen. Boas et al. arbeiten mit einem Mikrokanal mit einer abrupten Verengung auf 8  $\mu\text{m}$ , um die Deformierbarkeit gesunder und künstlich veränderter roter Blutkörperchen zu messen [86]. Durch Zugabe von Glukose, Glutaraldehyd oder Diamid wird hier die krankhafte Veränderung bei Malaria nachgeahmt, einem ähnlichen Ansatz entstammen die Versuche mit Lektin im Rahmen dieser Arbeit.

Als Modell sind PDMS Kanäle also üblich und geeignet, es gibt dennoch Ansätze, Kapillargefäße besser *in vitro* nachzubilden. Im einfachsten Fall werden weichere, elastischere Polymermaterialien entwickelt, um das PDMS zu ersetzen [87]. Arakawa et al. gelang ein entscheidender Fortschritt, indem sie Kollagenkanäle innen mit Endothelzellen bewachsen ließen. Die Zellschichten werden durch Laserablation mit Kapillargefäßen von 5 – 10  $\mu\text{m}$  Durchmesser durchsetzt. Auch hier wurden normale und infizierte rote Blutkörperchen bei Passage verglichen. Ein erstes Ergebnis war, dass rote

Blutkörperchen mit Endothel ausgekleidete Mikrokanäle leichter passieren, als solche mit glatten Wänden. Die infizierten Zellen tendierten stark zur Adhäsion an den Kanalwänden, und trennten sich damit von den uninfizierten Zellen ab, provozierten dadurch aber auch das Blockieren der Kapillaren [88].

Dies führt direkt zur nach wie vor offenen, zentralen Frage: Welche Rolle spielen die Rosetten tatsächlich für den Krankheitsverlauf bei Malaria? Vorherrschend ist die Meinung, dass *Rosetting* eine Beihilfe oder Vorstufe zur Sequestrierung von infizierten roten Blutkörperchen am Endothel ist [85, 88]. Beschäftigt man sich mit Zellaggregaten, die im Blut mitschwimmen, und deren Funktion, begegnen einem unweigerlich Aggregate zirkulierender Tumorzellen. Tumorzellen innerhalb von Clustern zeigen höheres Metastasierungspotential, da sie im Verbund weniger leicht absterben und durch ihre langsamere Fluss- und Rollgeschwindigkeit leichter mit dem Endothel in Kontakt kommen als Einzelzellen [89, 90]. Hong et al. beobachteten in Mikrofluidikexperimenten, dass die CTC Zellcluster enge kapillarähnliche Kanäle passieren konnten, indem sich die Zellen ohne Schwierigkeiten je nach Kanaldurchmesser in lange Ketten oder zurück in Kugelform umordneten [90]. Ähnlich scheint dies auch für Rosetten zu gelten. Diese Arbeit ist ein Beitrag zur Aufdeckung der Rolle der Rosetten. Dabei gilt es besonders den Aspekt zu beleuchten, dass Blutgruppe A Patienten ein erhöhtes Risiko besitzen, an der schweren Malaria zu erkranken als Blutgruppe 0 Patienten.

### Dynamik von Aggregaten roter Blutkörperchen bei Malariainfektion unter physiologischen Mikroflussbedingungen

Im Folgenden wird kurz durch Teil II der vorliegenden Arbeit geführt. Der Teil zur Zell-Zell-Adhäsion gliedert sich in drei Grundlagen- und Methodenkapitel (Kapitel 2-4), sowie zwei Ergebniskapitel (Kapitel 5 und 6).

**Kapitel 2** führt ein in das Thema **Malaria**. Dabei werden folgende Fragen abgedeckt:

- Aus welchen Bestandteilen besteht Blut?
- Wie sieht der Lebenszyklus des Malariaparasiten aus?
- Wie verläuft die Krankheit Malaria und welche Behandlungsmethoden gibt es?
- Wie wird der Malariaparasit im Labor kultiviert und für Experimente präpariert?
- Inwiefern können Makromoleküle als Modellsystem für die Blutzellaggregation bei Malariainfektion dienen?

Der technische bzw. physikalische Teil der Arbeit, nämlich die **Mikrofluidik**, ist Thema des **dritten Kapitels**. Hier finden sich

- Grundlagen der Hydrodynamik,
- eine Beschreibung des Mikrofluidikaufbaus,
- eine Abschätzung der wirkenden Kräfte im Fluss,
- und eine Erklärung, wie sich die Elastizität eines Objekts unter Fluss aus dessen Verformung berechnen lässt.

**Kapitel 4** beschreibt das methodische Herzstück dieser Arbeit, den Algorithmus **SURF** (**SU**rval of **R**osettes in **F**low). Die MATLAB-basierte Software verfolgt Zellaggregate entlang des Mikrofluidikkanals, um deren Verformung und ein eventuelles Ablösen von Zellen zu detektieren und analysieren. Die Funktionalität ist unterteilt in

- die Erstellung der Trajektorien,
- die Auswertung entlang der Trajektorien inklusive der Erkennung von Zellverlustereignissen,
- das Zusammenfassen und Exportieren der Ergebnisse,
- das Klassifizieren der Rosetten nach ihrer Größe, und
- dem Feststellen des Zustands der Rosetten nach Passage der Stenose.

Das erste **Ergebniskapitel 5** beschäftigt sich mit der **Passage von Stenosen unterschiedlicher Geometrien**. Zu Anfang wird

- die Ausgangsgrößenverteilung der Rosetten zu Kanalbeginn, also vor Passage der Stenose, und
- die Geschwindigkeit entlang der Stenose

beschrieben. Daraufgehend geht es um Stenosen unterschiedlicher Form. Untersucht wird der Einfluss

- des engsten Durchmessers, und damit der maximalen Kompression der Zellaggregate, und
- der Länge der Stenose, bzw. unter welchem Winkel der Kanal sich verjüngt.

Darüber hinaus werden zwei Modelle betrachtet:

- Experimentell: Lektin-induzierte Aggregate roter Blutkörperchen, die den Rosetten in Form und Größe ähneln.
- Simulation: Eine Finite-Elemente-Simulation einer Kugel, die eine Stenose passiert.

Im zweiten **Ergebniskapitel 6** wird aufgegriffen, dass sich nach Kapitel 3 die **Elastizität** eines Objekts unter Fluss aus dessen Verformung berechnen lässt. Zunächst wird

- die Elastizität von Einzelzellen durch Verformung unter Fluss und durch Kraftspektroskopie bestimmt, und anschließend
- die effektive Elastizität von Zellaggregaten bzw. Rosetten.

Dieses interdisziplinäre Projekt wurde durch die Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Mats Wahlgren, darunter vor allem Dr. Kirsten Moll, am Karolinska Institut in Stockholm ermöglicht. Es führte zu den beiden eigenen Veröffentlichungen „Blood group and size dependent stability of *P. falciparum* infected red blood cell aggregates in capillaries“ von 2020 in *Biomicrofluidics* [4] und „Red blood cell aggregates in elongational flow“, in Arbeit [5].



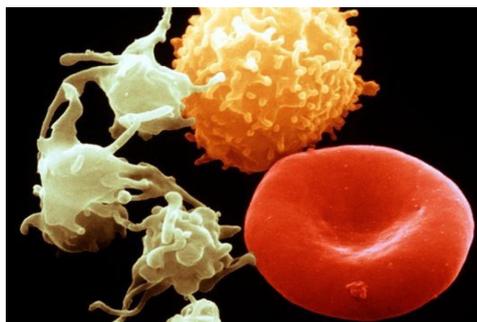
# 2

## Der Malariaparasit im menschlichen Blutkreislauf

Bei einer Malariainfektion befallen Malariaparasiten rote Blutkörperchen. Die Immunabwehrreaktion sorgt für die üblichen Fieberschübe, die zusätzlichen Symptome mit teilweise fatalen Folgen sind Ergebnis der verringerten Zahl an gesunden, funktionsfähigen roten Blutkörperchen und der zunehmenden Zahl an Infizierten, die den Blutfluss beeinträchtigen. In diesem Kapitel werden Aufbau und Funktion roter Blutkörperchen, die Interaktion des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* mit den Blutzellen im Patienten, und die Kultivierung des Parasiten im Labor zur Aufbereitung für die mikrofluidischen Experimente beschrieben.

### 2.1 Das Blut

Blut ist eine Mischung aus zellulären und flüssigen Bestandteilen. Etwa die Hälfte des Blutvolumens setzt sich aus den drei in Abb. 2.1 abgebildeten Arten von Blutzellen zusammen. Die roten Blutkörperchen machen mehr als 99 % des zellulären Volumens in Blut mit  $\sim 5 \cdot 10^{12}$  Zellen/Liter aus, dazu kommen deutlich weniger weiße Blutkörperchen ( $\sim 5 - 8 \cdot 10^9$  Zellen/Liter) und Blutplättchen ( $\sim 2 - 3 \cdot 10^{11}$  Zellen/Liter) [83, 91, 92, 93]. Rote Blutkörperchen dienen hauptsächlich dem Sauerstofftransport zum Gewebe und dem Kohlenstoffdioxidtransport zurück zur Lunge [94, 95]. Sie besitzen kein Erbgut und keinen Zellkern, und gehören somit zu den einfachsten Zellen in unserem Körper. Im Prinzip bestehen sie lediglich aus einer Hülle aus Zytoskelett und Plasmamembran, die mit einer Hämoglobinlösung als Zytoplasma gefüllt ist. Die Zellen haben eine flache, bikonkave Scheibenform mit einem Durchmesser von etwa  $7 - 8 \mu\text{m}$  und einer Höhe von etwa  $2 \mu\text{m}$  [83, 92]. Das ergibt ein Volumen von  $\sim 80 - 96 \mu\text{m}^3$  und eine Oberfläche von  $\sim 140 \mu\text{m}^2$ . Die Oberfläche einer Kugel mit dem gleichen Volumen wäre mit  $\sim 97 \mu\text{m}^2$  deutlich kleiner [83, 91, 96]. Dieses große Verhältnis von Oberfläche zu Volumen ermöglicht die extreme Verformbarkeit der roten Blutkörperchen [96], die sie benötigen, um die Kapillargefäße in der Mikrozirkulation zu passieren, die teilweise einen wesentlich kleineren Durchmesser haben als sie selbst [83]. Lässt die Verformbarkeit durch Alter oder krankhafte Veränderung der Zellen nach, werden sie in einer Art Filtergewebe in der Milz aussortiert und aus dem Blutkreislauf genommen. Bis dahin



**Abbildung 2.1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme der drei Arten von Blutzellen. Rechts rotes Blutkörperchen (rot), oben weißes Blutkörperchen (gelb) und einige Blutplättchen (grün) links (Jürgen Berger, MPI Tübingen).

hat ein gesundes rotes Blutkörperchen in seiner Lebensdauer von ungefähr 120 Tagen eine Strecke von  $\sim 400$  km zurückgelegt [97].

Bei einer Malariaerkrankung verringert sich die Verformbarkeit der infizierten roten Blutkörperchen, da sich der Parasit in diese einnistet, aber auch die uninfizierten roten Blutkörperchen sind weniger flexibel als im gesunden Menschen. Außerdem setzen sich infizierte Zellen an Gefäßwänden ab und können aneinander binden. Diese Phänomene akkumulieren sich und setzen so im schlimmsten Fall die Blutflussrate in den Kapillaren stark herab. Eine daraus resultierende Unterversorgung des Gewebes führt zu unterschiedlichen Symptomen der schweren Malaria. Dazu gehören akutes Nierenversagen oder Lungenödeme, bis zum Koma, wenn bei der sogenannten zerebralen Malaria das Gehirn betroffen ist [98]. Im Folgenden wird die Interaktion zwischen Malariaparasit und menschlichem Wirt genauer erläutert.

### 2.2 Der Malariaparasit *Plasmodium falciparum*

Die Krankheit Malaria wird durch Plasmodien verursacht. Der Entwicklungszyklus dieser Parasiten setzt sich aus mehreren Stadien zusammen, vgl. Abb. 1.3, die sich zunächst nach Lebensraum in Moskitostadium, Leber- und Blutstadium unterteilen lassen, wobei diese drei jeweils wiederum untergeordnete Entwicklungsstadien umfassen. Im menschlichen Wirt werden Leberstadium und Blutstadium durchlaufen, das Moskitostadium findet in Überträgermücken statt. Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch ist auf natürliche Weise nicht möglich, außer über die Plazenta einer malariakranken Mutter auf ihr ungeborenes Kind. Selten infizieren sich Menschen durch Kontakt mit infiziertem Blut, beispielsweise bei einer Bluttransfusion oder durch mangelnde Hygienemaßnahmen zwischen Patienten. Üblicherweise beginnt die Malariainfektion durch einen Stich einer weiblichen Stechmücke der Gattung *Anopheles*. Während des Blutsaugens gelangen die Parasiten mit dem Speichel der Mücke in den menschlichen Blutkreislauf [99]. Im Körper werden zunächst Leberzellen befallen. Während der Inkubationszeit von 7 – 15 Tagen treten noch keine Symptome auf, bis der Parasit im Leberstadium so weit herangereift ist und sich vermehrt hat, dass die Zellen aufbrechen und das Blutstadium erreicht wird. Jetzt zirkulieren die Parasiten mit dem Blut und befallen die roten Blutkörperchen [100], und der Patient spürt die für Malaria typischen, grippeähnlichen Symptome.

#### Entwicklungszyklus des Parasiten *Plasmodium falciparum*

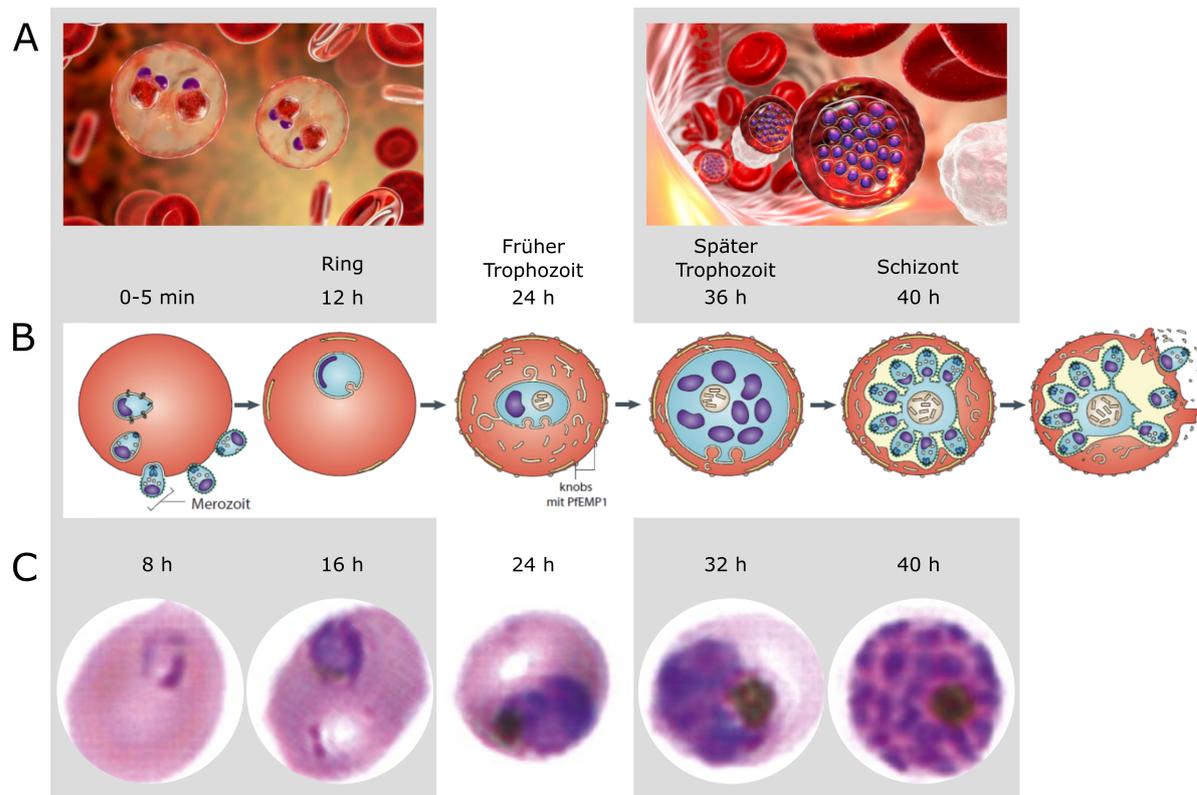
Der Entwicklungszyklus des Parasiten ist grob in drei Stadien nach den Lebensräumen Moskitostadium, Leber- und Blutstadium einzuteilen. Jedes dieser Stadien beinhaltet wiederum mehrere Entwicklungsschritte, vgl. Abb. 1.3 A und Abb. 2.2.

##### Leberstadium

Bei einer Blutmahlzeit eines infizierten weiblichen *Anopheles* Moskitos werden die Parasiten als *Sporozoiten* in die Haut eingebracht, vgl. Abb. 1.3 A oben. In den folgenden 1 – 3 Stunden schaffen es einige durch ungezieltes Voranbewegen in Blutgefäße einzudringen. Über den Blutkreislauf gelangen sie schließlich in die Leber. Sie erkennen Hepatozyten (Leberzellen) anhand ihrer Oberflächenproteine und dringen in diese ein. Dabei bilden sie eine Vakuole um sich. Innerhalb der folgenden 2 – 10 Tage bilden sich aus einem Sporozoit durch Replikation bis zu 40.000 Merozoiten. Nach Abschluss dieser Phase stülpen diese die Membran der Vakuole so aus, dass die Merozoiten die Hepatozyten mit einer Vesikelhülle als Merosomen verlassen, und erneut in den Blutkreislauf gelangen [100].

##### Blutstadium

Die freien Merozoiten, vgl. Abb. 1.3 A rechts und Abb. 2.2 B, befallen rote Blutkörperchen in einem mehrstufigen Prozess, der in nur zwei Minuten abgeschlossen ist. Präinvasiv binden Proteinliganden beim Erstkontakt der beiden Zellen zunächst schwach an bestimmte Rezeptoren. Dann orientiert sich der Merozoit um, ohne sich zu lösen, so dass seine Spitze in direkten Kontakt mit der Membran der Wirtszelle kommt. Hier wird die Bindung stabilisiert. Das führt zu einer Aktin-Myosin-getriebenen Verformung der Membran der Wirtszelle durch den Parasiten, bis er aktiv eingedrungen ist. Schon beim Eindringen bildet sich eine Membran um den Parasiten, die dann abschließend zu einer Vakuole wird. Ist das Eindringen abgeschlossen, schließt sich die Membran des roten Blutkörperchens. Die Wirtszelle durchläuft wegen des Wasserverlusts eine echinozytische Phase, erholt sich jedoch rasch und erlangt ihre übliche Form wieder. Die anschließende Entwicklungsphase innerhalb eines roten Blutkörperchens,



**Abbildung 2.2:** Intraerythrozytäre Phase im Blutstadium des Erregers *Plasmodium falciparum* ab Invasion eines roten Blutkörperchens durch einen Merozoiten (Zeitpunkt 0 h) über das Ringstadium (bis 24 h *post invasion*), das Trophozitenstadium (24 – 40 h *post invasion*) und das Schizontenstadium (ab 40 h *post invasion*), bis das rote Blutkörperchen nach ca. 48 h *post invasion* schließlich aufplatzt und neue Merozoiten frei werden.

**A)** Die Illustration links zeigt die typischen morphologischen Merkmale des Ringstadiums [101]. Die Vakuole des Parasiten ist als Ring sichtbar, der mit einem oder, in Kopfhörerkonfiguration, zwei dunklen Chromatinflecken ausgestattet ist. Eine Zelle kann mehr als einen solcher Ringe enthalten. Rechts ist das fortgeschrittene Schizontenstadium dargestellt. Hier hat sich der Parasit stark vermehrt und die Zelle ist mit den Vakuolen dicht gefüllt [102].

**B)** Schematische Darstellung der Blutstadien [103].

**C)** Mikroskopaufnahmen der unterschiedlichen Stadien im dünnen Blutaussstrich nach Giemsa-Färbung [104]. Die Giemsa-Farbstoffmischung wird standardmäßig zur Malariadiagnose eingesetzt [105].

die intraerythrozytäre Phase, dauert circa 48 h. In dieser Zeit multipliziert sich der Parasit asexuell, bis die Wirtszelle schließlich aufbricht und 16 – 32 Merozoiten frei werden, die wieder rote Blutkörperchen befallen [100].

### Intraerythrozytäre Phase

Ist ein Merozoit in ein rotes Blutkörperchen eingedrungen, beginnt die intraerythrozytäre Phase mit dem Ringstadium, vgl. Abb. 2.2. Der einzellige Parasit nimmt hier eine flache Schüsselform an, an deren Rand sich die Zellorganellen anordnen. Dieser Ring ist unter dem Mikroskop erkennbar [106], vgl. Abb. 2.2 C. Der Parasit wächst und wird runder, so dass nach circa 24 h kein Ring mehr zu erkennen ist. Dann ist das sogenannte Trophozitenstadium erreicht. Das in roten Blutkörperchen enthaltene Hämoglobin dient dem Parasiten als Nahrungsquelle. Bei der Stoffwechslung entstehen Hämozinkristalle, die unter dem Mikroskop als dunkle Flecken sichtbar werden. Deren Größe lässt Rückschlüsse auf den Fortschritt der Entwicklung des Parasiten zu [107]. Außerdem wird das rote Blutkörperchen als ganzes dicker und runder. Auf und unterhalb der Membran der Wirtszelle werden einige Proteine exprimiert. Dadurch werden einerseits die Spektrinfilamente innerhalb stärker vernetzt und damit die Zelle versteift [108], aber vor allem können sich über diese Oberflächenproteine nun Zell-Zell-Bindungen ausbilden. Relevant für diese Arbeit ist vor allem die Rosettenbildung. Man spricht von einer Rosette, wenn an eine infizierte Zelle mindestens zwei uninfizierte rote Blutkörperchen gebunden sind [109, 110]. Außerdem ist Autoagglutination, Bindungen zwischen mehreren infizierten Zellen, und Sequestrierung, die Adhäsion an das Endothel mit und ohne das Involvieren von Blutplättchen, zu beobachten [111,

## 2. Der Malariaparasit im menschlichen Blutkreislauf

112]. Schließlich wird das Schizontenstadium erreicht. Hier teilt sich der Parasit mehrmals, bis die Zelle dicht mit Vakuolen gefüllt ist [106]. Abschließend werden die Tochter-Merozoiten vom Parasitenrest, der hauptsächlich aus der Hämozoinvakuole besteht, abgetrennt. Ist die Entwicklung der Tochter-Merozoiten nach ungefähr 48 h *post invasion* abgeschlossen, platzt die Wirtszelle auf, die frei werdenden Merozoiten befallen wieder rote Blutkörperchen und es beginnt ein neuer Zyklus im Blutstadium.

### Moskitostadium

Parallel dazu entwickelt der Parasit im Blutstadium auch geschlechtliche Formen aus, die *Gametozyten*. Diese vermehren sich im menschlichen Körper nicht weiter. Werden sie bei einer Blutmahlzeit durch einen Moskito aufgenommen, vereinen sich weibliche und männliche Gametozyten in dessen Verdauungssystem zu einer Zygote. Daraus entwickeln sich schließlich die Sporozoiten, die auf den nächsten menschlichen Wirt übertragen werden. Somit ist der Zyklus vollendet [65, 100].

### Symptome und Behandlung einer Malariaerkrankung

**MALARIA No 1**

**The MOSQUITO DANGER**

Malaria Mosquito GREATLY MAGNIFIED

Mosquitoes suck Malarial Fever from Malaria Victims and carry the infection to sound and healthy people by biting them.

**THE REMEDY**

The Breadwinner, down with Malaria, money gone, family starving.

Wife selling her ornaments, stopped by wise man who sent for Doctor.

Doctor administered Quinine.

Patient recovered, Wife and Children happy.

Quinine is the only remedy for Malaria. Obtain it from Doctor, Post Office or Village-Dispensary.

The man who refused Quinine.

**QUININE THE REMEDY FOR MALARIA**

कुंनैरिन मलेरिया का इलाज है।

XXIX. BRITISH INDIA Page 48

Abbildung 2.3: Informationsblatt zu Malaria und der Wirkung von Chinin vom *Bureau for Increasing the Use of Quinine* aus dem Jahr 1927 [113].

Ist das Blutstadium erreicht, spürt der Malariapatient uncharakteristische Symptome wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen. Um Malaria von einem grippalen Infekt zu unterscheiden, muss das Blut des Patienten mikroskopisch untersucht werden. Die verbreitetste Methode ist die des „dicken

Tropfens“. Ein Blutstropfen wird auf einem Objektträger leicht verschmiert eingetrocknet, so dass man eine dicke Schicht („thick film“) von ungefähr 20 roten Blutkörperchen übereinander erhält. Ein Farbstoffgemisch, meist Giemsa-Lösung, wird hinzugegeben, um die DNA des Parasiten anzufärben. Unter dem Lichtmikroskop kann das Blut so nach Parasiten untersucht werden. Durch die Anreicherung von Zellen in einer dicken Schicht wird die Wahrscheinlichkeit des Entdeckens der infizierten Zellen erhöht [114]. Um Stadium und Art der Plasmodien zu bestimmen, eignet sich eher ein dünner Blutausschrieb ohne Eintrocknen der Zellen, vgl. Abb. 2.2 C. Ein solcher Nachweis von Plasmodien im Blut geht jedoch nicht zwingend mit einer Malariaerkrankung einher. Einwohner von endemischen Gebieten können durch wiederholte Infektion über Jahre eine gewisse Immunität entwickeln. Sie tragen den Malariaparasit in sich, sind aber klinisch gesund. Bei dem Auftreten der ersten Symptome kann die Parasitendichte im Blut andererseits noch so niedrig sein, dass ein entnommener Blutstropfen keine Parasiten enthält. Bei negativem Befund muss der Test bei Verdacht in den Folgetagen wiederholt werden. Laut der Leitlinie für Diagnostik und Therapie der Malaria der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG) liegt die Nachweisgrenze bei nur 50 Parasiten pro Mikroliter Blut [115]. Ein Mikroliter Blut enthält circa 4 – 5 Millionen rote Blutkörperchen.

Die Schwere der Krankheit hängt von der Art des Plasmodiums und dem Grad der Immunität des Infizierten ab. Wie oben erwähnt, entwickelt sich bei mehrfacher Infektion eine sogenannte Semiimmunität, die die Symptome stark abmildert. Besonders gefährdet sind daher Kleinkinder und Reisende, die zum ersten Mal dem Malariaparasiten ausgesetzt sind [99, 100]. Es sind sechs humanpathogene Plasmodienarten bekannt. *Plasmodium falciparum* löst die lebensgefährlichste Form von Malaria aus, die *Malaria tropica*. Die Sterblichkeit unbehandelter, nicht immuner Patienten liegt hier bei bis zu 20 %. Die Symptome sind vielseitig und hängen meist mit der Dezymierung und krankhaften Veränderung der Blutzellen zusammen. Es kommt zu hämolytischer Anämie, einer Form von Blutarmut durch erhöhten vorzeitigen Zerfall roter Blutkörperchen, Mangel an Thrombozyten (Blutplättchen) im Blut, krankhafter Vergrößerung der Milz und der Leber, akutem Nierenversagen oder zu einem Kreislaufkollaps. Ist das zentrale Nervensystem betroffen, spricht man von zerebraler Malaria. Dies äußert sich in Krampfanfällen und Bewusstseinsstörungen bis zum Koma [99, 100]. Die mildere, sehr häufig weltweit auftretende Form *Malaria tertiana* wird meist durch *P. vivax* hervorgerufen. Weniger weit verbreitet und vergleichsweise harmlos sind die Plasmodienarten *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri* und *P. malariae* [99, 100]. In den letzten 15 Jahren sind in Südostasien, besonders Malaysia, vermehrt auch schwere Fälle von *P. knowlesi* Malaria bei Menschen aufgetreten. Von dieser Plasmodienart waren bis dahin hauptsächlich Javaneraffen, eine Makakenart, betroffen [116].

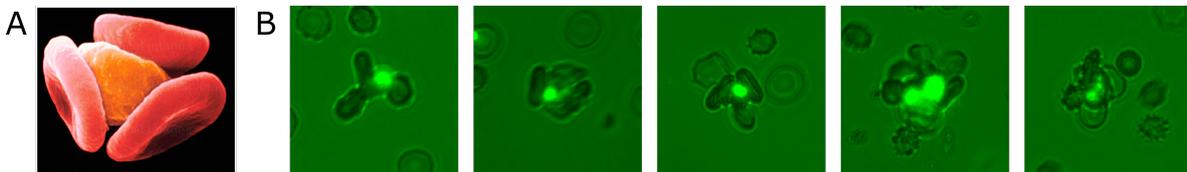
Malaria ist grundsätzlich behandelbar, wenn die Krankheit rechtzeitig erkannt wird. Die meisten Todesfälle treten auf, weil ein grippaler Infekt fehldiagnostiziert wird oder keine Medikamente zugänglich sind. Die Form der Therapie wird an den Schweregrad der Erkrankung und den vorliegenden Erreger angepasst. Handelt es sich um die schwere, komplizierte *Malaria tropica*, muss der Patient auf einer Intensivstation behandelt werden. Schon im 17. Jahrhundert wurde in Südamerika begonnen, Malaria mit Chinin aus der Rinde des Chinarindenbaumes zu behandeln. Um 1900 begannen die Briten, die in Indien mehr Soldaten an Malaria als an den Krieg verloren, den Chinarindenbaum nach Indien zu importieren und die Behandlung mit Chinin dort zu verbreiten, vgl. Abb. 2.3. Sie vermischten das bittere Chininpulver mit Zucker, Wasser, Zitrone und Gin, um es genießbar zu machen - der Gin Tonic war geboren [113]. Erst in der Neuzeit wurde Chinin als Wirkstoff weitgehend durch Artemisinin ersetzt, einem Wirkstoff aus dem Beifußgewächs *Artemisia annua*, das aus der ostasiatischen Volksmedizin als fiebersenkendes Mittel bekannt ist. Artemisinin löst weniger Nebenwirkungen aus und setzt die Sterblichkeit deutlicher herab [115, 117]. Wegen zunehmender Ausbreitung von Resistenzen müssen die Wirkstoffe laufend ergänzt werden. Die heute handelsüblichen Medikamente enthalten Chinin-, Artemisinin- und Chloroquinderivate [100, 118]. Diese Stoffe wirken alle erst im Leber- oder im Blutstadium, Sporoziten sind unempfindlich [117]. Eine sogenannte Malariaphylaxe, bei der ein Medikament z.B. während und nach einer Reise in tropische Gebiete eingenommen wird, schützt also streng genommen nicht vor einer Infektion, sondern stellt lediglich die sofortige Bekämpfung sicher, sobald der Parasit in das Blutstadium übergegangen ist [117]. Wegen der vielfältigen Erscheinungsformen des Parasiten und der Resistenzlage werden kombinierte Präparate verwendet, die in unterschiedlichen Stadien angreifen, beispielsweise Atovaquone/Proguanil (Malarone) oder Artemether/Lumefantrin (Riamet). Proguanil schädigt den Parasiten im Leberstadium, Atovaquone verlangsamt bzw. unterbindet einige für den Malariaerreger überlebensnotwendige Stoffwechselvorgänge. Chininverwandte Stoffe (z.B. Chloroquin, Mefloquin, Primaquin) reichern sich dem pH-Gradienten folgend in der sauren Verdauungsvakuole des Parasiten an. Im Blutstadium bei der Verstoffwechslung von Hämoglobin entsteht Häm, ein für den Parasiten giftiges Abbauprodukt, das normalerweise zu Hämzinkristallen verfestigt wird, um es unschädlich zu machen. Diese Polymerisation wird durch Chinin und Chloroquin

unterbunden, so dass das giftige Häm vorhanden bleibt und den Parasiten schließlich abtötet. Artemisinin-derivate wirken ähnlich hemmend auf die Hämoglobinbildung und behindern die Entwicklung des Parasiten im Blutstadium außerdem durch Hemmung des Membrantransports [115, 117]. Der erste Impfstoff gegen Malaria *Mosquirix* steht kurz vor der Zulassung, die Entwicklung gestaltete sich schwierig. Gute Ergebnisse in der Bekämpfung der Krankheit bringt das Verhindern von Mückenstichen durch Eindämmung der Mücke durch Insektizide oder Moskitonetze [117].

### 2.3 Probenvorbereitung *Plasmodium falciparum*

Im Labor lässt sich der Parasit in Zellkulturflaschen unter Zugabe von roten Blutkörperchen in Kultur halten. Für die Experimente in dieser Arbeit wird der Malariaparasit *Plasmodium falciparum*, Stamm S 1.2, nach Standardprotokoll kultiviert und durch 5% Sorbitol synchronisiert [114]. Die verwendeten RBK und Seren stammen von schwedischen Spendern an die Blutbank des Karolinska Universitätskrankenhauses in Stockholm, Schweden, mit Genehmigung durch die Ethikkommission vor Ort, Genehmigungskennzahl 2009/668-31/3. Für die Experimente werden Trophozoiten, infizierte rote Blutkörperchen im Stadium 32 – 38 h *post invasion*, benötigt. Das Stadium einer vorliegenden Probe ist nach Anfärben mit Acridinorange unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

#### Anfärben mit Acridinorange



**Abbildung 2.4:** Rosettierende rote Blutkörperchen.

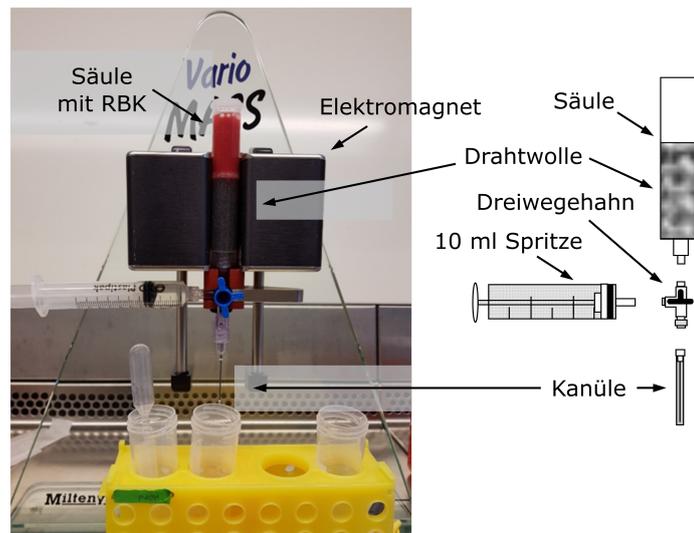
A) Aufnahme einer Rosette aus einem infizierten, zentralen und drei adhärenen, uninfizierten roten Blutkörperchen mit einem Rasterelektronenmikroskop, Vergrößerung 3600fach [119].

B) Beispiele von Rosetten nach Anfärben mit Acridinorange, Vergrößerung 40fach.

Acridinorange ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der leicht Zellmembranen passieren kann. Das planare, polyaromatische Molekül  $C_{17}H_{19}N_3$  interagiert auf zweierlei Arten mit den Zellorganellen. Aufgrund der basischen Eigenschaften dringt es zum einen in die Lysosomen ein, in deren sauren Milieu es protoniert wird und somit nicht mehr zurück diffundieren kann [120]. Hier liegt es elektrostatisch gebunden vor und weißt einen Fluoreszenzübergang im roten Bereich mit Absorption bei  $\lambda = 492$  nm und Emission bei  $\lambda = 650$  nm auf. So lässt sich nachweisen, ob die sauren Kompartimente der Zelle intakt sind. Außerdem kann es sich interkalierend in DNA Stränge einlagern. Hier ist das Molekül über  $\pi - \pi$ -Bindungen gebunden und fluoresziert im grünen Bereich mit Absorption bei  $\lambda = 466$  nm und Emission bei  $\lambda = 526$  nm [121, 122]. Zur Identifizierung infizierter roter Blutkörperchen wird die grüne Fluoreszenz durch Einlagerung von Acridinorange in die DNA des Parasiten genutzt, siehe Abb. 2.4 und Abb. 1.3 C. Uninfizierte rote Blutkörperchen enthalten keine DNA und leuchten daher nicht.

#### Selektieren von Trophozoiten durch magnetische Zellsortierung

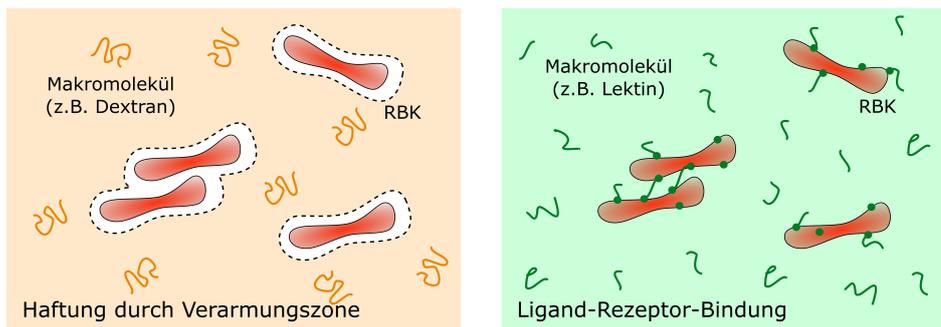
Der Parasit verstoffwechselt Hämoglobin, als Abfallprodukt entsteht Hämoglobin. Da dieses in gelöster Form für den Parasiten toxisch ist, wird es zu Kristallen konsolidiert. Die Hämoglobinkristalle sind magnetisch [124]. Die magnetische Eigenschaft der infizierten Zellen im fortgeschrittenen Trophozitenstadium lässt sich zur Zellsortierung ausnutzen. Dazu dient der in Abbildung 2.5 dargestellte VarioMACS Separator (Miltenyi Biotec), MACS steht für MAGnetic Cell Sorting [114, 123]. Der Aufbau besteht im Wesentlichen aus einem Elektromagneten, dem VarioMACS Magnet, und einer Säule, die mit einer Art Drahtwolle gefüllt ist. Die MACS-Säule wird in den Hohlraum des Magneten eingespannt. Zunächst wird sie mit 150 ml 2 % BSA in PBS befüllt und mindestens fünf Minuten lang inkubiert, um die Säule für unspezifische Adhäsion zu passivieren. 4 – 6 ml Malariakultur mit  $P = 5 - 10$  % Parasitämie, d.h. 5 – 10 % der roten Blutkörperchen sind infiziert, werden nun zentrifugiert, das Zellpellet in 2 ml 2 % BSA/PBS gelöst und zur Auflösung der Rosetten die Suspension fünf mal manuell durch eine 0,6 mm Kanüle gezogen. Nun wird die Säule unten geöffnet, um die Passivierungslösung ablaufen zu lassen. Anschließend wird die Säule wieder geschlossen und oben die Zellsuspension eingefüllt. Die Säule wird mit 2 % BSA/PBS aufgefüllt und für zehn Minuten im Magneten stehen gelassen, so dass die roten Blutkörperchen durch die Drahtwolle sedimentieren können. Die parasitierten Zellen



**Abbildung 2.5:** Aufbau eines VarioMACS Separators (Miltenyi Biotec) zur magnetischen Zellsortierung, MACS steht für MAGnetic Cell Sorting [114, 123].

haften am magnetisierten Material in der Säule. Nach der Inkubationszeit wird die Säule mit 50 ml 2 % BSA/PBS gespült, um die uninfizierten RBK größtenteils auszuwaschen. Anschließend wird die Säule aus dem Magneten genommen und mit der Unterseite nach oben außerhalb eines Magnetfelds eingespannt. So lösen sich die infizierten Zellen von dem nicht mehr magnetisierten Drahtgeflecht und lassen sich mit 50 ml 2 % BSA/PBS ausspülen. Die stark verdünnte Suspension wird bei 1500 rpm fünf Minuten zentrifugiert und das Pellet fünf mal in 50 ml PBS gewaschen. So kann ein Anteil von 70 – 90 % infizierter roter Blutkörperchen (iRBK) erreicht werden. Diese an iRBK angereicherte Probe mit  $P = 70 - 90 \%$  wird in MCMS, Malariakulturmedium mit 10 % humanem Serum, mit uninfizierten RBK resuspendiert, um für die Experimente gleichbleibend eine Suspension von  $P = 20 \%$  und einem Hämatokrit von  $H = 1 \%$  herzustellen. Der Hämatokrit bezeichnet den Volumenanteil einer Suspension, den die roten Blutkörperchen ausmachen. Das Blut eines Mannes hat typischerweise einen Hämatokrit von  $H \approx 45 \%$ , das einer Frau einen etwas niedrigeren von  $H \approx 40 \%$ . Die zuzufügenden RBK, um die niedrigere Parasitämie zu erreichen, sind  $\text{RBK}_0$  aus Blutgruppe 0 für Experimente mit Blutgruppe 0, und  $\text{RBK}_A$  aus Blutgruppe A für die entsprechende Messsuspension aus Blutgruppe A. Die infizierten RBK sind in beiden Fällen aus Blutgruppe 0, da zur Kultivierung des Malariaparasiten  $\text{RBK}_0$  verwendet werden.

### 2.4 Modellsystem: Aggregation über Makromoleküle



**Abbildung 2.6:** Die Aggregation roter Blutkörperchen (RBK) kann durch Makromoleküle ausgelöst werden. Dabei wird die Haftung entweder dadurch vermittelt, dass an der Zelloberfläche eine Verarmungszone entsteht, wie es bspw. bei Dextranen der Fall ist (links). Handelt es sich allerdings um ein Molekül wie Lektin, das an Rezeptoren auf der Membran des RBKs binden kann, halten die Moleküle die Zellen direkt zusammen (rechts). Schema nach Zhang et al. [125].

Auch im gesunden Organismus aggregieren rote Blutkörperchen reversibel, was maßgeblich für die nicht-newtonschen Eigenschaften von Blut verantwortlich ist. Zur Aggregation von Erythrozyten muss die Aggregationsenergie größer als die elektrostatische Abstoßung der einzelnen Zellen und der mechanischen Einwirkung der Scherspannung im Fluss sein. Eine geringe Scherspannung begünstigt die Bildung von Aggregaten durch vermehrten Zell-Zell-Kontakt. Die rheologischen Eigenschaften des Blutes sind aus diesem Grund stark von der Gefäßgeometrie abhängig [126]. Haftvermittler innerhalb solcher Blutzellaggregate sind oft Makromoleküle. Das Polysaccharid Dextran und das Glykoprotein Lektin sind dafür bekannte Stoffgruppen, die auf unterschiedliche Weise funktionieren.

#### Dextran: Haftung durch Unterdruck

Dextrane sind verzweigte Polysaccharide, welche aus mehreren tausend Glukoseeinheiten bestehen. In Wasser bilden diese hochviskose, schleimähnliche Lösungen. In der Medizin werden Dextrane häufig als Blutersatz bzw. Plasmaexpander eingesetzt, da sie einen hohen kolloidosmotischen Druck hervorrufen und somit Flüssigkeit aus dem Gewebe in die Gefäße strömt [127, 128]. Unter Zugabe von Dextran bilden sich aus roten Blutkörperchen reversible, geldrollenartige Aggregate, sogenannte Rouleaus. Diese Form entsteht, da sich auf der Zelloberfläche eine Verarmungszone ausbildet, in welcher die Dextrankonzentration und Viskosität im Vergleich zum Medium deutlich geringer sind und somit die Zellen durch Druckunterschiede mit den flachen Seiten aneinander gezogen werden [129], vgl. Abb. 2.6 links. Im menschlichen Körper bilden sich solche Rouleaus durch Proteine wie Fibrinogen.

Die bei Malariainfektion gebildeten Rosetten bestehen aus einem zentralen, infizierten Blutkörperchen und einer kugelförmigen Formation der gesunden Zellen um dieses herum. Da diese Form deutlich von der geldrollenartigen Erscheinung der Dextranaggregate abweicht, wird zunächst die mittels Lektinen induzierte Aggregation betrachtet [130].

#### Lektin: Ligand-Rezeptor-Bindung

Lektine sind Glykoproteine pflanzlichen Ursprungs, die in Gemüse, besonders in Hülsenfrüchten, enthalten sind. Sie können in größeren Mengen toxisch wirken, sind jedoch in der Regel nicht hitzebeständig [131, 132]. Da sie hauptsächlich aus kovalent gebundenen Kohlenwasserstoffen bestehen, können sie an Saccharidgruppen in Glycoprotein- oder Glycolipid-Membranen reversibel binden. Das bedeutet, eine Bindung an die Rezeptoren der roten Blutkörperchenmembran mittels Ligand-Rezeptor-Erkennung ist möglich, vgl. Abb. 2.6 rechts. Die Proteine sind multivalent, d.h. sie weisen die entsprechenden Bindungsgruppen an mehreren Seiten des Moleküls auf, weshalb sie auch mehrere Zellen an sich binden können. Es entsteht eine nicht-kovalente Kraft, welche in kurzer Distanz zu spezifischer und starker Agglutination führt [133, 134]. Um eine vergleichbare Aggregationsenergie zu erhalten, reicht eine deutlich geringere Oberflächenkonzentration an Lektinen aus, als an Dextranmolekülen [126]. Dies unterstützt die These, dass die Bindung der Dextrane lediglich unspezifisch erfolgt, wohingegen Lektine eine feste, spezifische Bindung eingehen. In dieser Arbeit sollen Lektin-induzierten Aggregate das Verhalten von Rosetten bei Malariainfektion imitieren, da die Bindung der Blutkörperchen im

Krankheitsbild den oben beschriebenen Charakteristika folgt und in der Fachliteratur als „lectin-like“ [77, 130] beschrieben wird. Das hier verwendete Lektin ist *Triticum Vulgare*, welches auch unter *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) bekannt ist. Es schützt den Weizen vor Insekten und Bakterien, und wird bspw. von Cserti et al. ebenfalls zum Vergleich der Aggregation bei Malariainfektion herangezogen [36].

Auf Basis der Beschreibung von Shu Chien et al. [126, 133] zur Herstellung von Erythrozytenaggregaten wurde das folgende Präparationsprotokoll entwickelt. Zu Beginn wird 500  $\mu\text{l}$  einer Suspension mit einem Hämatokrit von  $H = 2\%$  und einer Lektinkonzentration von  $c = 4\ \mu\text{g/ml}$  hergestellt. Diese steht für 10 Minuten bei Raumtemperatur, um dem Aggregieren Zeit zu geben. Anschließend wird die Suspension dreifach gewaschen. Das bedeutet, die Suspension wird jeweils 3 Minuten bei  $3000\ \text{min}^{-1}$  zentrifugiert und der klare Überstand abpipettiert, das Pellet wird anschließend in 500  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Dieses Verfahren ist Ergebnis einer Studie, die Anabelle Schepp im Rahmen ihrer von mir betreuten Bachelorarbeit durchführte [135]. Hierbei wurde die Lektinkonzentration und das Präparationsprotokoll danach ausgewählt, in welchem Fall die Größenverteilung der entstehenden Aggregate am ehesten den Charakteristika von Rosetten bei Malariainfektion entsprach [135].



# 3

## Variation des Mikroflussfelds

Die mechanischen Eigenschaften einer Zelle spielen für viele biologische Phänomene eine wesentliche Rolle. Bei einer Malariainfektion beeinflussen die veränderten Eigenschaften der roten Blutkörperchen den Krankheitsverlauf beispielsweise stark. Mikrofluidiksysteme bieten eine Möglichkeit, solche Abweichungen der Deformierbarkeit und des Adhäsionsverhaltens *in vitro* systematisch zu untersuchen [136]. In solchen Mikrokanälen wird ein Kraftfeld erzeugt, das entweder durch eine physische Verengung, durch Scherfluss oder durch Dehnströmung realisiert wird, um die Deformierung durchfließender Zellen zu charakterisieren [137]. So lassen sich *in vitro* vergleichbare Flussbedingungen schaffen, die Blutzellen *in vivo* in der Mikrozirkulation erfahren. Hier messen die Kapillargefäße nur 3 – 10  $\mu\text{m}$  im Durchmesser [88]. Das bedeutet, dass sich rote Blutkörperchen stark verformen können müssen, um die Kapillaren zu passieren, die teilweise einen kleineren Durchmesser aufweisen als die Zellen selbst [88]. Gerade an solchen kritischen Stellen ist eine Verringerung der Deformierbarkeit ungünstig. Kommt noch eine erhöhte Neigung zur Adhäsion hinzu, sind die Folgen für den Malariapatienten fatal. Um dieses Zusammenspiel aus mechanischer Versteifung und Zytoadhäsion *in vitro* zu untersuchen, entwickelten beispielsweise Arakawa et al. ein dreidimensionales Mikrogefäßsystem von Endothelzellen in einer Kollagenmatrix, mit Kapillaren, die von uninfizierten roten Blutkörperchen problemlos passiert werden, während infizierte darin akkumulieren [88]. Das dritte Phänomen, das bei Malaria auftritt und bei Arakawa et al. nicht betrachtet wird, ist die Bildung von Rosetten. Um deren Rolle zu verstehen, ist entscheidend, deren Verhalten bzw. Stabilität unter Fluss zu beleuchten. Aufgrund des kleinen Durchmessers der Mikrogefäße im Körper ist es sinnvoll, auch im Experiment Mikrokanäle zu verwenden, die eine physische Einschränkung der Zellagglomerate schaffen [137]. Daher werden in dieser Arbeit Kanäle mit Engstellen von 3, 5 – 15  $\mu\text{m}$  Durchmesser verwendet, um Rosetten unter Fluss zu beobachten.

In diesem Kapitel gebe ich einen Einblick in Grundlegendes aus der Hydrodynamik, beschreibe den Mikrofluidikaufbau und die Herstellung der Mikrofluidikkanäle, und betrachte abschließend die Kräfte, die aufgrund des Flussfeldes in den unterschiedlichen Kanalgeometrien auf ein mitschwimmendes Objekt wirken, und zu dessen Deformation führen, was später für die Ermittlung eines effektiven Elastizitätsmoduls der Rosetten herangezogen wird.

### 3.1 Hydrodynamik

In der Hydrodynamik wird die Bewegung von Flüssigkeiten unter der Einwirkung von Kräften beschrieben. Dabei sind Volumenkräfte, wie z.B. die Schwerkraft, Flächenkräfte aufgrund von Druckdifferenzen, und Reibungskräfte relevant [7]. Im 19. Jahrhundert untersuchte Léonard Marie Poiseuille (1797-1869) anhand unterschiedlicher Flüssigkeiten in Glaskapillaren den Zusammenhang zwischen Flussrate  $Q$ , Druckdifferenz  $\Delta p$ , Kapillarlänge  $L$  und -durchmesser  $D$  [138]. Er definierte eine von Art und Temperatur der Flüssigkeit abhängige Größe  $K''$  und fand

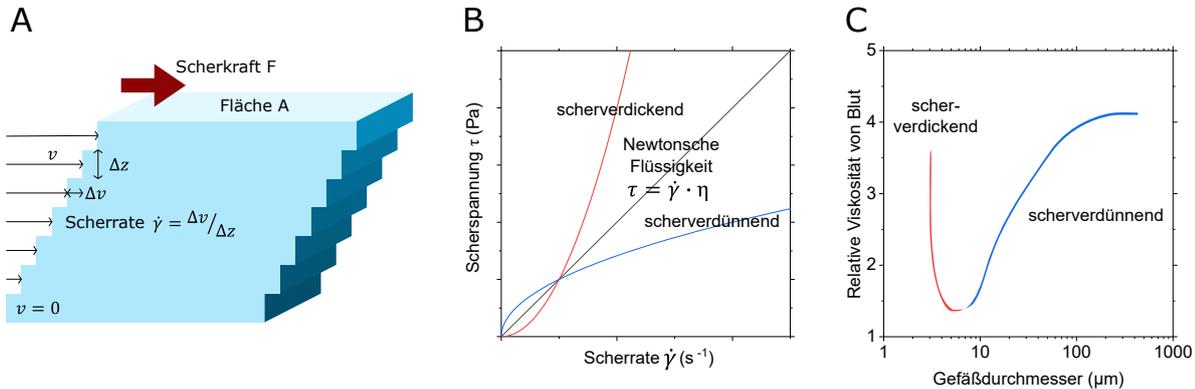
$$Q = \frac{K'' p D^4}{L}. \quad (3.1)$$

### 3. Variation des Mikroflussfelds

Mit Bekanntwerden des Begriffes der Viskosität  $\eta$  wurde die Konstante  $K'' = \pi/128\eta$  umformuliert, und Gleichung 3.1 wurde als das Gesetz von Hagen-Poiseuille bekannt, vgl. Gl. 3.14.

#### Innere Reibung einer Flüssigkeit - Die Viskosität

Die Viskosität beschreibt die innere Reibung einer Flüssigkeit, die eine materialspezifische, temperaturabhängige Größe ist. Die dynamische Viskosität  $\eta$  wird in  $[\eta] = \text{Ns/m}^2 = \text{Pas}$  gemessen, für Wasser bei  $20^\circ\text{C}$  ist  $\eta$  beispielsweise  $\eta = 1 \text{ mPas}$ . Das Verhältnis aus dynamischer Viskosität und Dichte  $\rho$  wird als kinematische Viskosität  $\nu = \eta/\rho$  bezeichnet [7].



**Abbildung 3.1: A)** Die Viskosität einer Flüssigkeit bestimmt die Scherkraft, die angewendet werden muss, um eine Platte mit Geschwindigkeit  $v$  über eine ruhende Platte zu ziehen, wenn sich zwischen den beiden Platten diese Flüssigkeit befindet. Der Geschwindigkeitsunterschied  $\Delta v$  zweier Schichten, die übereinander gleiten, im Verhältnis zum Abstand  $\Delta z$  der beiden Schichten wird als Scherrate  $\dot{\gamma} = \frac{dv}{dz}$  bezeichnet.

**B)** Für sogenannte Newtonsche Flüssigkeiten ist die Viskosität  $\eta$  unabhängig von der Scherrate. Die Scherspannung  $\tau$  nimmt also linear mit der Scherrate zu,  $\tau = \dot{\gamma} \cdot \eta$ . Nicht-newtonsche Flüssigkeiten können scherverdickend oder -verdünnend sein.

**C)** Die Viskosität von Blut nimmt mit abnehmendem Gefäßdurchmesser durch die dort herrschenden höheren Scherraten zunächst ab, verhält sich also scherverdünnend. Werden die Gefäße so klein, dass ihr Durchmesser dem eines roten Blutkörperchens ähnlich wird, kehrt sich das Verhalten um [139].

Befindet sich eine dünne Flüssigkeitsschicht der Dicke  $2d$  zwischen zwei Platten, von denen eine festgehalten, und eine mit der Geschwindigkeit  $v$  bewegt wird, vgl. Abb. 3.1 A, ist die Kraft  $F$

$$F = \eta A \frac{dv}{dz} \quad (3.2)$$

nötig, um die innere Reibung zwischen den Flüssigkeitsschichten zu überwinden [7]. Die Höhe dieser Kraft bestimmt die Viskosität  $\eta$ . Das Flussfeld zwischen den beiden Platten ist linear, das heißt, die Strömungsgeschwindigkeit nimmt linear mit dem Abstand von der ruhenden Platte zu. Man spricht in diesem Fall von einer Couette-Strömung. Allgemein wird die Geschwindigkeitsänderung senkrecht zur Flussrichtung als Schergeschwindigkeit oder Scherrate  $\dot{\gamma}$

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dz}, \quad [\dot{\gamma}] = \text{s}^{-1}, \quad (3.3)$$

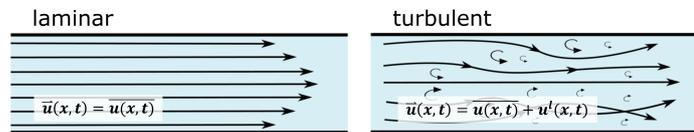
bezeichnet. Die Scherspannung  $\tau$ , die aufgrund der Scherrate wirkt, hängt für Newtonsche Flüssigkeiten von der Viskosität ab. Genauer gesagt, werden Flüssigkeiten, für die das Gesetz von Newton

$$\tau = \eta \dot{\gamma} = \frac{dF}{dA} \quad (3.4)$$

mit konstanter Viskosität gilt, als idealviskos oder newtonsch bezeichnet [140], vgl. Abb. 3.1 B. Bei nicht-newtonschen Flüssigkeiten ändert sich die Viskosität mit der Scherrate. Beispiele für scherverdünnende Flüssigkeiten sind Blut, Ketchup und Polymerlösungen, scherverdickend sind Dispersionen mit hoher Feststoffkonzentration, z.B. mit Speisestärke [140].

## Viskosität und Trägheit - Die Reynoldszahl

Die Bahnlinien, die sich ergeben, wenn man Flüssigkeitsvolumenelementen einer strömenden Flüssigkeit folgt, zeigen das Strömungsfeld. Sind die Stromlinien geordnet, parallel und zeitlich unverändert, spricht man von laminarer Strömung, treten Störungen oder Verwirbelungen auf, herrschen turbulente Verhältnisse, vgl. Abb. 3.2. Ob eine Strömung laminar oder turbulent ist, hängt vom Verhältnis



**Abbildung 3.2:** Bei laminarer Strömung sind die Stromlinien geordnet, parallel und zeitlich unverändert. Solche Verhältnisse niedriger Reynoldszahlen stellen sich ein, wenn die Flüssigkeit sehr viskos (Gletscher) oder das Gefäß sehr schmal ist (Mikrofluidik). Kommen zeitlich veränderliche Wirbel und Störungen hinzu, bspw. durch Steine in einem Bach, spricht man von turbulenter Strömung.

der viskosen Kräfte und der Trägheitseffekte ab. Je höher die Viskosität bzw. die innere Reibung einer Flüssigkeit, desto „stabiler“ bzw. laminarer ist das Flussfeld. Dieses Verhältnis wird durch die Reynoldszahl  $Re$

$$Re = \frac{\text{Trägheit}}{\text{Reibung}} = \frac{\rho v^2}{\eta v/l} = \frac{\rho v l}{\eta}. \quad (3.5)$$

beschrieben [7]. Hier gehen die Materialkonstanten Dichte  $\rho$  und Viskosität  $\eta$  der Flüssigkeit ein, sowie die charakteristische Geschwindigkeit  $v$  und Länge  $l$  des Systems. Die charakteristische Länge ist beispielsweise der Durchmesser des Kanals. Bei rechteckigem Querschnitt mit Kanalbreite  $w$  und Kanaltiefe  $h$  wird der hydraulische Durchmesser  $D_h$

$$D_h = \frac{2wh}{w+h} \quad (3.6)$$

verwendet. Je höher  $Re$ , zum Beispiel bei hoher Geschwindigkeit, großem Kanaldurchmesser und niedriger Viskosität, desto turbulenter die Strömung. Ist  $Re$  klein, typischerweise  $Re < 1000$ , wie bei niedriger Geschwindigkeit, kleinem Kanaldurchmesser oder hoher Viskosität, herrschen laminare Verhältnisse [7].

## Strömung idealer Flüssigkeiten - Die Gleichung von Bernoulli

Für ideale Flüssigkeiten ist die Viskosität zu vernachlässigen, außerdem sind Flüssigkeiten in der Regel inkompressibel. Strömt durch jede Stelle eines Rohres mit Querschnitt  $A$  dasselbe Volumen pro Zeiteinheit  $Q = V/t$ , wie es bei inkompressiblen, quellen- und senkenfreiem Fluss der Fall sein muss, gilt die Kontinuitätsgleichung

$$Q = \text{const} = A_1 v_1 = A_2 v_2. \quad (3.7)$$

Verengt sich der Querschnitt  $A$ , nimmt also die Geschwindigkeit  $v$  zu. Die Zunahme an kinetischer Energie eines Volumenelements  $\Delta V$  geht mit einer Abnahme des Drucks einher. Die Energiebilanz  $\Delta E_{\text{kin}} = \Delta p \Delta V$  ergibt die Gleichung von Bernoulli

$$p + \frac{1}{2} \rho v^2 + p_0 = \text{const}, \quad (3.8)$$

die besagt, dass die Summe aus statischem Druck  $p$ , Staudruck  $\frac{1}{2} \rho v^2$  und dem Druck  $p_0$ , der in der ruhenden Flüssigkeit herrschen würde, stets konstant ist [7].

## Strömung durch ein Rohr - Das Gesetz von Hagen-Poiseuille

Fließt eine Flüssigkeit angetrieben durch einen Druckunterschied  $\Delta p = p_1 - p_2$  laminar durch ein Rohr mit Radius  $R$ , bildet sich ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil aus. Die Geschwindigkeitsverteilung

### 3. Variation des Mikroflussfelds

lässt sich herleiten, wenn man zunächst das Gleichgewicht aus Reibung und Druck an einem Flüssigkeitszylinder mit Radius  $r$  und Länge  $l$  betrachtet.

$$-\eta 2r\pi l \cdot \frac{dv}{dr} = r^2 \pi \Delta p \quad (3.9)$$

Das Integral über  $r$  ergibt

$$-\frac{4\eta l}{\Delta p} v = r^2 + C, \quad (3.10)$$

wobei die Geschwindigkeit  $v$  an den Wänden  $r = R$  gleich Null ist (Haftbedingung). Die Integrationskonstante ist also  $C = -R^2$  und es ergibt sich das sogenannte Poiseuille-Profil

$$v = \frac{\Delta p}{4\eta l} (R^2 - r^2), \quad (3.11)$$

bzw. mit der Maximalgeschwindigkeit im Zentrum des Rohres  $v(r = 0) = v_{\max}$

$$v = v_{\max} - \frac{\Delta p}{4\eta l} r^2. \quad (3.12)$$

Die Flussrate  $Q$  ist der Volumenstrom durch eine Fläche  $A$  senkrecht zur Strömung mit Geschwindigkeit  $v$ , für das eben beschriebene Rohr mit Radius  $R$  gilt also

$$Q = \int_A v dA = \int_0^R v 2\pi r dr. \quad (3.13)$$

Mit dem Ausdruck aus Gleichung 3.11 für die Geschwindigkeit erhält man somit wiederum das Gesetz von Hagen-Poiseuille [7],

$$Q = \frac{\pi \Delta p R^4}{8\eta l}, \quad (3.14)$$

das Poiseuille wie erwähnt, vgl. Gl. 3.1, im 19. Jahrhundert experimentell bestimmte.

Stellt man dieselben Betrachtungen für den Fluss durch ein Rohr rechteckigen Querschnitts der Breite  $w$  und Höhe  $h$  an [141], wird die Flussrate  $Q$  abhängig vom Druckgradienten  $G$  beschrieben durch

$$Q = \frac{8Gb}{\eta w} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{\beta_n^4} \left(1 - \frac{2b \tanh \beta_n}{2\beta_n b}\right), \quad \text{mit } \beta_n = (2n-1) \frac{\pi}{w}, \quad (3.15)$$

und für die Maximalgeschwindigkeit gilt

$$v_{\max} = \frac{3}{2} v = \frac{3Q}{2wh}. \quad (3.16)$$

Daraus lässt sich die mittlere Scherrate  $\dot{\gamma}(x)$  abschätzen zu

$$\dot{\gamma}(x) = \frac{v_{\max}(x)}{w/2} = \frac{3Q}{h} \frac{1}{w^2(x)}. \quad (3.17)$$

### Bewegung einer Flüssigkeit - Die Navier-Stokes-Gleichung

Die Bewegungsgleichung einer Strömung bzw. eines Volumenelements einer Flüssigkeit in Strömung wird wie für einen festes Objekt durch die Summe der angreifenden Kräfte bestimmt. Drei Arten von Kraft sind hier zu beachten. Erstens Volumenkräfte, die von außen angreifen, und proportional zu Volumen bzw. Masse sind, wie z.B. die Schwerkraft  $d\mathbf{F}_{\text{ext}} = \rho g dV$ , oder allgemein  $d\mathbf{F}_{\text{ext}} = \rho a_{\text{ext}} dV$ . Zweitens kommen durch ein Druckgefälle wirkende Kräfte  $d\mathbf{F}_p = -\nabla p dV$ , und drittens die Reibungskräfte  $d\mathbf{F}_R = \eta \Delta \mathbf{v} dV$  dazu. Die Summe dieser Kräfte bestimmt die Beschleunigung  $\mathbf{a}$  des Volumenelements. Dies ist ausgedrückt in der Navier-Stokes-Gleichung

$$\rho \mathbf{a} = \mathbf{F}_{\text{ext}} - \nabla p + \eta \Delta \mathbf{v} \quad \text{mit } \mathbf{a} = \frac{d\mathbf{v}}{dt}. \quad (3.18)$$

Je nach Größenverhältnis der Kräfte zueinander lassen sich einige Sonderfälle betrachten. Ist die Reibung zu vernachlässigen, wird eine ideale Flüssigkeit mit der Viskosität  $\eta = 0$  beschrieben. Ist die innere Reibung dagegen hoch, herrschen laminare Bedingungen, vgl. Abb. 3.2. Turbulente Strömung tritt auf, wenn die Trägheit z.B. durch große Änderungen der Geschwindigkeit entlang der Strömungslinien stark ins Gewicht fällt. Im stationären Fall erfährt ein strömendes Volumenteilchen keine zeitabhängige Beschleunigung. Kann die Trägheit vernachlässigt werden, wie im Fall sehr niedriger Reynoldszahlen, reduziert sich die Navier-Stokes-Gleichung auf die Stokes-Gleichung [141]

$$\mathbf{F}_{\text{ext}} - \nabla p + \eta \Delta \mathbf{v} = 0. \quad (3.19)$$

### Viskosität von Blut

Blut besteht aus einer wässrigen Phase, dem Blutplasma, das Salze, Zucker und Proteine enthält, und zellulären Bestandteilen, den roten und weißen Blutkörperchen sowie Blutplättchen. Die roten Blutkörperchen dominieren hier und machen 40 – 50 % des Blutvolumens aus [139].

Das Blutplasma ist eine newtonsche Flüssigkeit mit einer Viskosität zwischen 1,16 mPas und 1,35 mPas bei 37°C. Der deutliche Unterschied zu Wasser mit 0,69 mPas bei 37°C ist hauptsächlich auf die enthaltenen Proteine zurückzuführen [139].

Vollblut hat auf Grund der roten Blutkörperchen starke nicht-newtonsche Eigenschaften, vgl. Abb. 3.1. Die Fließspannung, also die Mindestspannung, ab der nichtlineares Verhalten auftritt, ist abhängig vom Hämatokrit und wird ab einem Hämatokrit von  $H = 4$  % beobachtet. Außerdem tragen die Aggregation und die Deformation der roten Blutkörperchen zur effektiven Viskosität des Bluts bei, die mit Zunahme der Scherrate abnimmt. Durch den sogenannten Fåhræus-Lindqvist-Effekt nimmt die Viskosität auch mit abnehmendem Gefäßdurchmesser ab, da sich eine zellarme Schicht an der Wand bildet. Dies kehrt sich bei Durchmessern unter 10  $\mu\text{m}$  jedoch um, wenn der Gefäßdurchmesser den Zelldurchmesser erreicht, und keine zellarme Schicht mehr aufrecht erhalten werden kann. Die niedrigere Viskosität bei hoher Scherrate entlastet das Herz im Vergleich zur Leistung, die ohne Scherverdünnung nötig wäre [139].

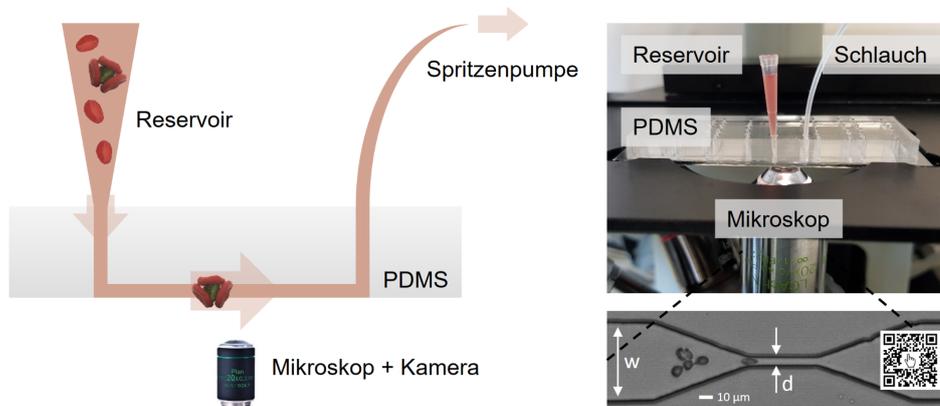
### Auftrieb und Gleichgewichtspositionen

Auf ein Teilchen im Fluss wirken unterschiedliche Kräfte. Die Strömungswiderstandskraft aufgrund des Geschwindigkeitsunterschieds zwischen Teilchen und umgebender Flüssigkeit hält das Teilchen gewissermaßen auf den Strömungslinien. Seitliche Kräfte wie die Auftriebskraft durch den Schergradienten und die Wandabstoßung wirken senkrecht zur Strömungslinie und erklären das Migrieren von Teilchen zu bestimmten Gleichgewichtspositionen. Dort heben sich die zum Zentrum gerichtete Wandabstoßung und die zur Wand gerichteten Auftriebskraft durch den Schergradienten genau auf [142].

Die genaue Gleichgewichtsposition ist abhängig von der Deformierbarkeit, Größe und Form der Teilchen und der Viskoelastizität der Flüssigkeit. Deformierbare Zellen positionieren sich beispielsweise eher auf der Diagonalen eines Kanals mit rechteckigem Querschnitt, während sich harte Kugeln an den vier Punkten auf den Hauptachsen des Querschnitts einfinden. So lassen sich beispielsweise Zellen unterschiedlicher Deformierbarkeit mikrofluidisch sortieren [143].

## 3.2 Mikrofluidikaufbau

Nun wird zunächst die Herstellung eines Mikrofluidikkanals beschrieben, und anschließend Aufbau und Durchführung der Mikrofluidikexperimente erläutert. Der Mikrofluidikkanal aus Polydimethylsiloxan (PDMS) auf Glas wird im *soft lithography* Verfahren hergestellt [144]. Dabei wird zunächst eine Negativform des Kanals gefertigt, die schließlich mit einem durchsichtigen Polymer aufgegossen wird, das aushärtet und somit den Mikrofluidikkanal als Aussparung aufweist.



**Abbildung 3.3:** Mikrofluidikaufbau bestehend aus einem Mikrofluidikkanal in PDMS auf einem Glasobjektträger, einer Pipettenspitze als Probenreservoir am Kanaleinlass und einem PTFE Schlauch am Kanalauslass, der mit einer Spritzenpumpe verbunden ist. Die Kanalbreite  $w$  wird in den Stenosen auf den Stenosedurchmesser  $d$  reduziert. Die Kameraaufnahmen werden mithilfe eines invertierten Mikroskops von unten aufgenommen.

### Herstellung eines Mikrofluidikkanals

Im ersten Schritt wird der gewünschte Umriss des späteren Kanals zweidimensional in einem Grafikprogramm, bspw. AutoCAD, gezeichnet. Diese Zeichnung wird auf eine Folie gedruckt, so dass das spätere Kanalinnere durchsichtig bleibt, und der Bereich außenherum schwarz bedruckt ist. Nun wird ein Siliziumwafer als glattes Trägermaterial genutzt, und durch *spin coating* mit dem Fotolack Nano<sup>TM</sup>SU8-10, Microchem, belackt. Dabei werden die Parameter für die Schleuderbeschichtung so eingestellt, dass die Lackdicke der gewünschten späteren Kanaltiefe entspricht. Um den Lack zu verfestigen, wird der belackte Wafer zunächst gebacken. Nach dem Abkühlen ist der Lack trocken und kann im Maskaligner belichtet werden. Hier wird die eben erwähnte Folienmaske auf den Wafer gelegt, so dass die Kanalstrukturen durch Belichten mit UV-Strahlung auf den Wafer übertragen werden. Der Lack polymerisiert bei Belichtung aus. Die umgebenden, schwarz abgedeckten Bereiche werden nach einem weiteren Backschritt in einem Entwicklerbad abgelöst. Zurück bleibt also die Kanalstruktur, die auf der Folienmaske durchsichtig war, als dreidimensionaler Körper aus ausgehärtetem Lack auf dem Wafer. Diese „Negativform“ wird nun mit dem Elastomer Polydimethylsiloxan (PDMS) aufgegossen. Nach etwa vier Stunden bei 70 °C härtet es aus, und ist dann thermisch und chemisch beständig, biokompatibel und auch durch seine optische Eigenschaften für den Einsatz in der Zellmikroskopie geeignet. PDMS besteht aus zwei Komponenten, dem Polymer selbst und einem Linker, deren Verhältnis die spätere Härte bestimmen. In dieser Arbeit wird ein Volumenverhältnis Linker zu Polymer von 1:10 verwendet. Ausgehärtet lässt sich das PDMS als Block recht einfach vom Siliziumwafer abnehmen, dabei bleibt die Negativform erhalten und kann wiederverwendet werden. Der PDMS-Block weist nun an einer Seite die Mikrofluidikkanäle als Rillen auf. Zur späteren Kontaktierung der Kanäle werden nun mit einer Biopsiestanze Löcher durch den Block gestanzt, bevor die Oberfläche mit den eingelassenen Kanälen mit einem Glasobjektträger verschlossen wird. Dazu werden Glas- und PDMS-Oberfläche in einem Sauerstoffplasma aktiviert. Bringt man die Oberflächen im Anschluss an diese Behandlung in Kontakt, bilden sich kovalente Bindungen aus [145]. Dadurch ist der Kanal dicht abgeschlossen.

Eine Alternative zur Folienmaske bieten Laserbelichtungssysteme, mit denen sich direkt bestimmte Umrisse belichten lassen, ohne eine Maske zu produzieren. Dabei bleiben die eben beschriebenen Arbeitsschritte zum Belacken und Entwickeln des Siliziumwafers bestehen, an Stelle einer Maske ist jedoch lediglich eine Bilddatei nötig, die dann durch den Laser abgerastert und auf den Wafer projiziert wird. Mit Folienmasken gerät man an eine Auflösungsgrenze, wenn man Strukturen kleiner als 5 µm

abbilden möchte. Daher wurde für die in dieser Arbeit verwendeten Kanäle hauptsächlich der LPKF ProtoLaser LDI verwendet.

### Aufbau und Ablauf einer Messung

Der Fluss in den so gefertigten Mikrofluidikkanälen wird über eine Spritzenpumpe *Harvard PHD2000*, Harvard Apparatus, gesteuert. Zum initialen Befüllen des Kanals wird eine 250  $\mu\text{l}$  fassende Glasspritze, *Hamilton Gastight Syringe*, Hamilton Bonaduz AG, zunächst mit phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline*, PBS,  $\text{pH} = 7,4$ ) aufgezogen, und über eine Kanüle mit Außendurchmesser  $d = 0,5$  mm und einen Polytetrafluoroethylen (PTFE) - Schlauch (Durchmesser  $d_{\text{außen}} = 1,09$  mm,  $d_{\text{innen}} = 0,38$  mm) mit dem gestanzten Auslass des Kanals verbunden, vgl. Abb. 3.3. Die Spritze wird in die Spritzenpumpe eingespannt. Bei einer Flussrate von  $Q = 100$   $\mu\text{l}/\text{h}$  wird der Kanal vorsichtig vom Auslass her befüllt, bis am Einlass ein Tropfen austritt. Nun wird mit einer Pipette 30  $\mu\text{l}$  der Messlösung mit den roten Blutkörperchen aufgenommen, und diese Pipettenspitze in den Einlass eingesteckt, so dass zwischen ausgetretenem Tropfen und Messlösung keine Luftblase entsteht. Für die Experimente wird die Spritzenpumpe im Rückwärts-Betrieb verwendet, das heißt, die Spritze wird langsam aufgezogen, so dass die Messlösung aus dem Reservoir, der Pipettenspitze, durch den Kanal gezogen wird. Dazu wird eine Flussrate von  $Q = 10 - 50$   $\mu\text{l}/\text{h}$ , meist  $Q = 25$   $\mu\text{l}/\text{h}$  eingestellt. Beobachtet wird der Fluss nun von unten durch ein invertiertes Mikroskop *Nikon Diaphot 300* mit einem  $20\times$  Objektiv, an das eine Hochgeschwindigkeitskamera *FASTCAM Mini UX50 Typ 160K-M-16G*, Photron, angeschlossen ist, vgl. Abb. 3.3. Mit der Software *Photron Fastcam Viewer PFV* von Photron werden mit einer Bildrate von 2000 Bildern pro Sekunde und einer Belichtungszeit von  $1/32000$  s Videos aufgenommen. Um ein möglichst langes Stück des 50  $\mu\text{m}$  breiten Kanals abzubilden, wird eine Bildgröße von  $1280 \times 120$  Pixel gewählt. Dies entspricht einer Fläche von  $704 \times 66$   $\mu\text{m}^2$  in der Bildebene, also werden die Zellen über 0,7 mm Kanallänge aufgenommen. Bei dieser Bildgröße können maximal 74531 Bilder bzw. 37 s Echtzeit aufgenommen werden, bis der Speicher der Kamera erschöpft ist. Zur Auswertung dieser Videos dient die selbst entwickelte Software SURF, deren Funktionsweise in Kap. 4 beschrieben ist.

### 3.3 Einfluss der Kanalgeometrie auf das resultierende Kraftfeld

Die auf eine Zelle im Fluss wirkenden Kräfte hängen maßgeblich von der Kanalgeometrie und der Flussrate ab. Hier wird zunächst die Form der Kanäle beschrieben, und anschließend auf die daraus resultierenden Kompressions- und Scherkräfte eingegangen.

Die verwendeten Mikrofluidikkanäle sind  $L = 7$  mm lang und konstant  $h = 8$   $\mu\text{m}$  hoch. Die Kanalbreite von  $d_1 = 50$   $\mu\text{m}$  wird in den Stenosen auf den Stenosendurchmesser  $d_2$  reduziert. Für unterschiedliche Formen der Stenose werden zwei Parameter variiert. Erstens der Stenosendurchmesser  $d$  an der engsten Stelle, und zweitens der Verengungswinkel bzw. damit die Länge der Stenose. Zunächst wird die Elongationslänge bei  $e = 55$   $\mu\text{m}$  festgehalten, und für die Breite  $d$  die fünf Werte  $d = 14,5$   $\mu\text{m}$ ,  $11$   $\mu\text{m}$ ,  $7$   $\mu\text{m}$ ,  $5$   $\mu\text{m}$  und  $3,5$   $\mu\text{m}$  eingesetzt, vgl. Abb. 3.4 B. Für die Stenosendurchmesser  $d = 7$   $\mu\text{m}$  und  $d = 5$   $\mu\text{m}$  werden zusätzlich zur Standardausführung mit  $e_{\text{Std}} = 55$   $\mu\text{m}$  die drei Varianten  $0,2\times$ ,  $2\times$  und  $3 \times e_{\text{Std}}$  unterschiedlicher Elongationslänge verwendet, vgl. Abb. 3.4 C.

Alle Stenosen im verwendeten Set lassen sich geometrisch wie folgt beschreiben, vgl. Abb. 3.4 A. Der Durchmesser des Kanals  $d$  ist vor der Verengung konstant  $d = d_1 = 50$   $\mu\text{m}$ , und an der engsten Stelle unterschiedlich stark verengt auf einen Durchmesser  $d = d_2$ . Über die Elongationslänge  $e$  zwischen Ansatz der Stenose  $x = x_s$  und Beginn der engsten Stelle  $x = x_e$  setzt sich der Durchmesser  $d_e$  aus der Höhe des Elongationsdreiecks  $h_e$  und dem Durchmesser  $d_2$  zusammen.

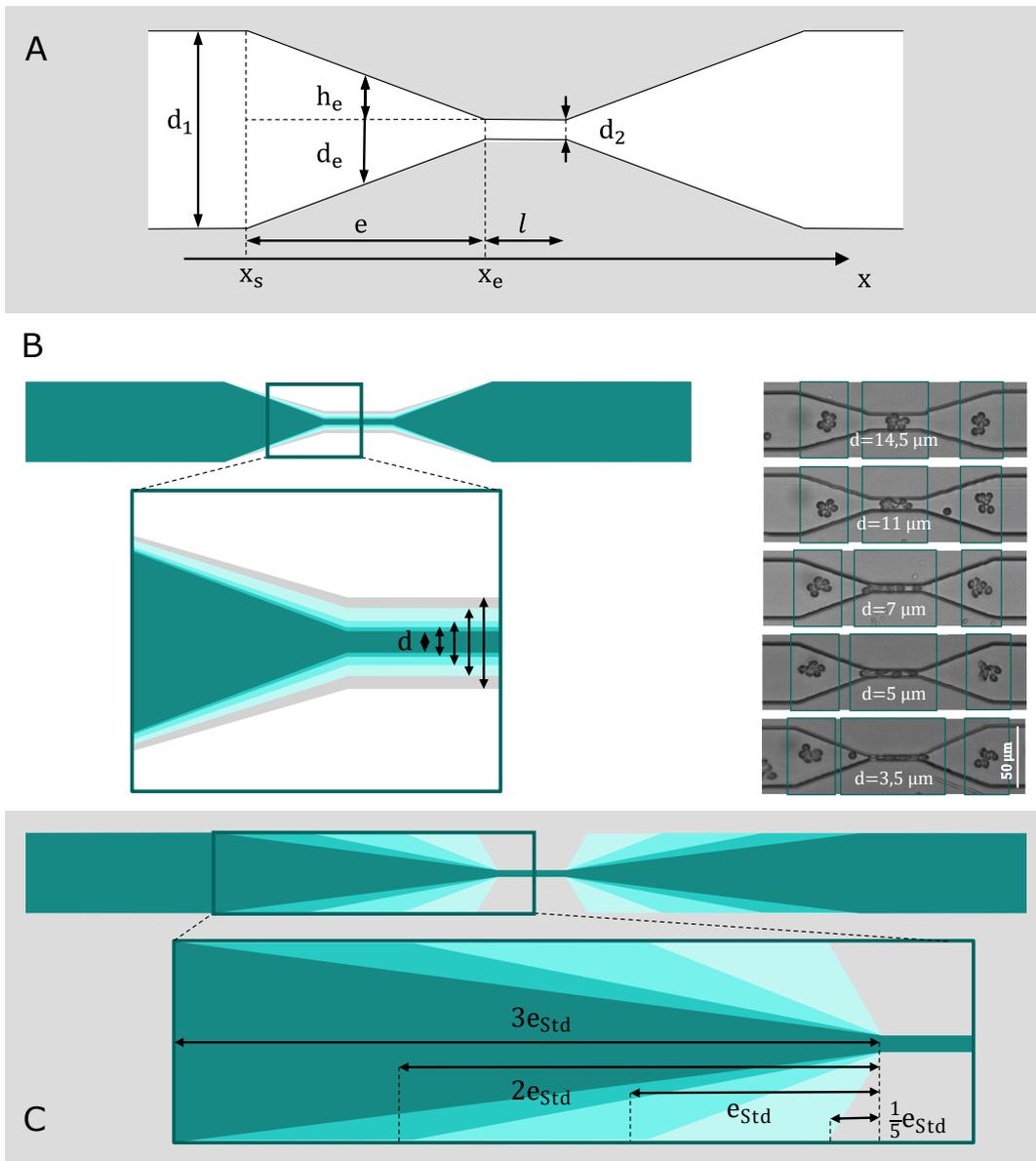
$$d(x, x \in [x_s, x_e]) = 2h_e(x) + d_2 \quad (3.20)$$

Setzt man  $x_s = 0$  erhält man durch Anwenden des Strahlensatzes für die Höhe  $h_e$

$$h_e(x) = \frac{x_e - x}{x_e} \cdot \frac{d_1 - d_2}{2}. \quad (3.21)$$

Für den Durchmesser  $d(x, x \in [x_s, x_e])$  ergibt sich

$$d(x) = d_1 - \frac{d_1 - d_2}{e}x. \quad (3.22)$$



**Abbildung 3.4:** Kanalgeometrie mit Stenose. **A)** Schema. Ein gerader Kanal mit Durchmesser  $d_1$  verjüngt sich ab einer Stelle  $x_s$  über die Elongationslänge  $e$  auf die Stenosenbreite  $d_2$ . Nach der Länge  $l$  des schmalsten Abschnitts verbreitert sich der Durchmesser symmetrisch auf den Ursprünglichen  $d_1$ . Die Höhe des Elongationsdreiecks  $h_e$  ist ein Hilfsparameter zur Berechnung des Durchmessers  $d_e(x)$  entlang der  $x$ -Koordinate.

Set der verwendeten Stenosen **B)** fünf unterschiedlicher Breiten  $d$  und **C)** vier unterschiedlicher Elongationslängen  $e$ . Der Mikrofluidikkanal ist  $L = 7 \text{ mm}$  lang und konstant  $h = 8 \mu\text{m}$  hoch. Die Kanalbreite von  $d_1 = 50 \mu\text{m}$  wird in den Stenosen über die Elongationslänge  $e$  auf den Stenosedurchmesser  $d_2$  reduziert.

**B)** Der Stenosedurchmesser  $d_2 = d$  variiert von  $d = 14,5 \mu\text{m}$  bis  $d = 3,5 \mu\text{m}$ . Rechts beispielhafte Mikroskopaufnahmen von Rosetten bei Passage der jeweiligen Stenosen.

**C)** Der Zulauf der Stenose wird im Vergleich zur Standardlänge von  $e_{\text{Std}} = 55 \mu\text{m}$  einmal verkürzt auf ein Fünftel, und auf das Doppelte bzw. Dreifache verlängert.

Die mittlere Flussgeschwindigkeit  $v$  hängt bei konstanter Flussrate  $Q$  nur vom Querschnitt  $A$  des Kanals ab. Mit der Kanaltiefe  $a$  und dem Durchmesser  $d(x)$ , Gl. 3.22, lässt sich die Geschwindigkeitsentwicklung bei Passage der Verengung also durch die Gleichung

$$v(x) = \frac{Q}{A(x)} = \frac{Q}{ad(x)} = \frac{v_1 \cdot d_1}{d(x)} \quad (3.23)$$

beschreiben. Mit welcher Geschwindigkeit sich mitschwimmende Aggregate im Fluss tatsächlich bewegen, ist in Kapitel 5.2 erläutert bzw. in Abb. 5.3 dargestellt.

Die Zeit, die für das Durchströmen des trapezförmigen Elongationsstücks der Stenose benötigt wird, wird hier mit Komprimierungszeit  $t_{\text{komp}}$  bezeichnet und lässt sich aus dessen Volumen  $V_{EL}$  und der Flussrate bestimmen

$$t_{\text{komp}} = \frac{V_{EL}}{Q} = \frac{\frac{1}{2}(d_1 + d_2) \cdot e \cdot a}{v_1 \cdot d_1 \cdot a} = \frac{\frac{1}{2}(d_1 + d_2) \cdot e}{v_1 \cdot d_1}. \quad (3.24)$$

### Kompression und Scherung

Zur Abschätzung der Kraft  $F_{\text{Stenose}}$ , die in der Stenose auf ein Zellaggregat wirkt, beziehe ich mich auf die Arbeiten von Dudani [146] und Armistead [147], die Zellen bei Passage einer Mikrofluidikkanal-Kreuzung beschreiben. Dort werden die Zellen an einem Punkt durch Zufluss von beiden Seiten senkrecht zur Flussrichtung zusammengedrückt und in Flussrichtung lang gezogen. Dudani et al. bezeichnen dies als *Hydropipetting*, da die Zellen sich hier in einem Flussfeld befinden, das eine Art Düse formt, wie es beim Einsaugen durch die Spitze einer Mikropipette der Fall ist. Ähnlich verhält es sich in den in dieser Arbeit verwendeten Stenosen, nur dass die Kompression senkrecht zur Flussrichtung nicht durch eine Strömung, sondern von sich verengenden Wänden ausgeübt wird. So kann die Beschreibung der wirkenden Kräfte direkt aus [146] und [147] übertragen werden. Im Wesentlichen handelt es sich um eine druck- und eine scherabhängige Komponente. Am Zusammenflusspunkt entstehen senkrecht zur Flussrichtung zwei entgegengesetzte Druckgradienten. Daraus resultiert eine Kompression durch die Strömungswiderstandskraft  $F_K$

$$F_K = \frac{1}{2} C_W A_S \rho v^2 \quad (3.25)$$

abhängig von der Dichte des umgebenden Fluids  $\rho$ , dem Quadrat der Geschwindigkeit  $v$ , dem Strömungswiderstandskoeffizienten  $C_W$  und der Querschnittsfläche der Zelle  $A_S$ . Ist der Fluss so langsam, dass Trägheitseffekte vernachlässigt werden können, ist der Strömungswiderstandskoeffizient  $C_W$  einer Kugel  $C_W = 24/Re$  abhängig von der Reynoldszahl. Unter Beachtung der Trägheit lässt sich  $C_W$  nicht theoretisch bestimmen. Nach Brown [148] gilt näherungsweise

$$C_W = \frac{24}{Re} (1 + 0,150 Re^{0,681}) + \frac{0,407}{1 + \frac{8710}{Re}}. \quad (3.26)$$

Bei Beschleunigung des zentralen Flusses wird die Zelle einer erhöhten Schubspannung  $\tau$  ausgesetzt, also einer Scherkraft  $F_S = \tau A_O$  mit Zelloberfläche  $A_O$ , die zur Deformation längs der Flussrichtung führt. Die Scherspannung  $\tau$  ist das Produkt aus Scherrate  $\dot{\gamma}$  und dynamischer Viskosität  $\eta$ . Die Scherrate  $\dot{\gamma}$  wird mit dem Quotienten von Geschwindigkeit  $v$  und Zelldurchmesser  $2r$  abgeschätzt.

$$F_S = 4\pi r^2 \eta \dot{\gamma} = 2\pi r \eta v \quad (3.27)$$

Insgesamt summieren sich Kompressions- und Scherkomponente zu

$$F_{\text{Stenose}} = F_K + F_S. \quad (3.28)$$

In dieser Arbeit bewegen sich Aggregate roter Blutkörperchen in Zellmedium mit einer Viskosität von  $\eta = 1,04$  mPas und einer Dichte von  $\rho = 1000 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$  durch Kanäle, die sich von  $50 \times 8 \mu\text{m}^2$  auf  $\sim 5 \times 8 \mu\text{m}^2$  verjüngen. Bei den verwendeten Flussraten von  $Q \sim 20 \frac{\mu\text{l}}{\text{h}}$  ergeben sich Geschwindigkeiten von  $v \sim 1 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$  und Reynoldszahlen von  $Re \approx \frac{1000 \cdot 0,1 \cdot 10 \cdot 10^{-6}}{10^{-3}} = 1$ . Für ein typisches, mittelgroßes Aggregat mit Radius  $r = 15 \mu\text{m}$  (Klasse 4) beträgt die Scherkraft  $F_S = 10^{-8} \text{ N} = 1 \text{ nN}$  und die Kompressionskraft  $F_K = 10^{-7} \text{ N} = 10 \text{ nN}$ . Die in Summe auf ein Aggregat wirkende Kraft  $F_{\text{Stenose}} = F_K + F_S$  wird also von der Druckkomponente dominiert.

### 3. Variation des Mikroflussfelds

Die Abschätzung der Kräfte bewegt sich hier für beide Komponenten an der Grenze des Gültigkeitsbereichs. Gleichung 3.25 gilt streng genommen nicht im Stokes-Limit kleiner Reynoldszahlen, für Gleichung 3.27 müssten die Wände weit von der bewegten Kugel entfernt sein. Wie gut die Abschätzung dennoch ist, wird anhand einer Simulation des Experiments in Kapitel 5.7 bewertet. In der Simulation wird die Physik der mikroskopischen Interaktionen an der Zell-Fluid-Grenzfläche nachgebildet, während hier makroskopisch die Kraft auf das ganze Objekt im Fluss abgeschätzt werden muss. Ergeben sich dennoch ähnliche Abhängigkeiten, stützt dies den hier gewählten Ansatz. Zum konkreten Vergleich stellt sich die Frage:

Wie hängt die Gesamtkraft  $F_{\text{Stenose}}$  nun von der Geschwindigkeit ab?

Der Strömungswiderstandskoeffizient  $C_W$  einer Kugel vereinfacht sich für kleine Reynoldszahlen zu  $C_W = 24/Re$ , vgl. Gl. 3.26. Mit den Gleichungen 3.5  $Re = \frac{\rho^2/3vD_h}{\eta}$  und 3.6  $D_h = \frac{2dh}{d+h}$  gilt

$$F_{\text{Stenose}} = \frac{1}{2}C_W A_S \rho v^2 + 2\pi r \eta v \quad (3.29)$$

$$= \frac{1}{2} \frac{24}{Re} A_S \rho v^2 + 2\pi r \eta v \quad (3.30)$$

$$= \frac{1}{2} \frac{24}{\frac{2}{3}v\rho/\eta \frac{2dh}{d+h}} \pi r^2 \rho v^2 + 2\pi r \eta v \quad (3.31)$$

$$= 9\pi r^2 \frac{dh}{d+h} \eta v + 2\pi r \eta v. \quad (3.32)$$

$$(3.33)$$

Auf den ersten Blick hängt  $F_{\text{Stenose}}$  somit linear von der Geschwindigkeit  $v$  ab. Nicht alle anderen vorkommenden Größen sind jedoch bei Passage der Stenose konstant, der Durchmesser  $d$  nimmt linear mit dem Ort ab. Durchmesser  $d$  und Geschwindigkeit  $v$  hängen unmittelbar über die Kontinuitätsgleichung  $v_0 d_0 = vd$  zusammen. Damit ergibt sich

$$F_{\text{Stenose}} = 9\pi r^2 \eta \left( \frac{v}{h} + \frac{v^2}{v_0 d_0} \right) + 2\pi r \eta v \quad (3.34)$$

$$= (9\pi r^2 \eta / h + 2\pi r \eta) v + \frac{9\pi r^2 \eta}{v_0 d_0} v^2 \quad (3.35)$$

$$= f_{\text{lin}} v + f_{\text{qu}} v^2. \quad (3.36)$$

$$(3.37)$$

Die Kraft setzt sich also aus zwei Komponenten zusammen, die eine linear und die andere vom Quadrat der Geschwindigkeit abhängig. Mit den oben angenommenen experimentellen Parametern sind beide Beiträge mit  $f_{\text{lin}} = 0,89 \times 10^{-6}$  Ns/m und  $f_{\text{qu}} = 1,3 \times 10^{-6}$  Ns<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> in der selben Größenordnung. Die entsprechend resultierende Spannung auf ein solches Objekt unter Fluss wird in Kapitel 5.7 durch Finite Elemente Simulation ermittelt und mit der hier beschriebenen analytischen Abschätzung verglichen. Dort finden sich zugehörige Graphen.

### 3.4 Elastische Verformung bei Passage einer Stenose

Verformt sich ein Material im einfachsten Fall linear elastisch, sind Spannung  $\sigma$  und Dehnung  $\epsilon$  nach dem Hooke'schen Gesetz zueinander proportional.

$$\sigma = E\epsilon \quad (3.38)$$

Der Elastizitätsmodul  $E$  entspricht somit der Steigung im Spannungs-Dehnungs-Diagramm  $\sigma(\epsilon)$ . Die Dehnung  $\epsilon$  beschreibt die relative Längenänderung eines Körpers

$$\epsilon = \frac{\Delta L}{L} \quad (3.39)$$

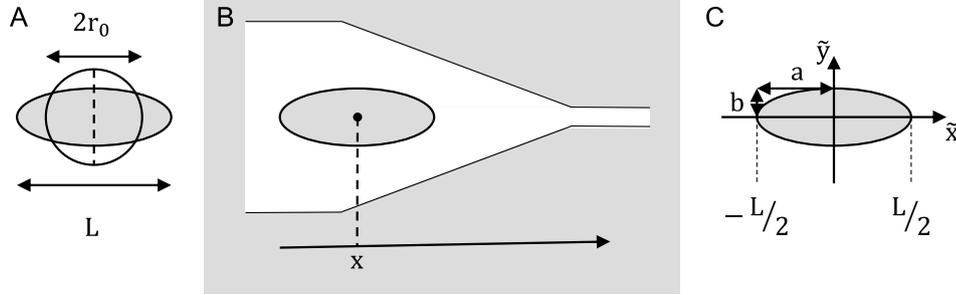
unter der Spannung  $\sigma$

$$\sigma = \frac{F}{A}. \quad (3.40)$$

In dieser Arbeit werden nahezu runde Objekte im Flussfeld lang gezogen. Die Dehnung wird nach Gleichung 3.41 als Längenänderung im Verhältnis zum runden Zustand definiert, vgl. Abb. 3.5 A und Äquivalenzradius  $r_0$  für jede Klasse nach Gleichung 4.1.

$$\epsilon = \frac{L - 2r_0}{2r_0} \quad (3.41)$$

Die Spannung ist an jeder Stelle  $x$  im Kanal von der dort herrschenden Kraft  $F_{\text{Stenose}}$  abhängig. Die



**Abbildung 3.5:** Definitionen zur Bestimmung von Dehnung  $\epsilon$  und Spannung  $\sigma$ .

A) Die Dehnung ist die relative Längenänderung im Verhältnis zum runden Zustand,  $\epsilon = \frac{L - 2r_0}{2r_0}$ .

B) Bewegt sich ein Aggregat auf eine Engstelle zu, wirkt an jeder Position  $x$  eine andere Spannung  $\sigma(x)$ .

C) Koordinatensystem des Aggregats  $(\tilde{x}, \tilde{y})$  mit Koordinatenursprung  $(\tilde{x} = 0, \tilde{y} = 0)$  im Zentrum der Ellipse mit den Halbachsen  $a = L/2$  und  $b$ .

Herleitung für die Kraft  $F_{\text{Stenose}}$  bezieht sich auf ein kugelförmiges Objekt, also ist die Spannung  $\sigma(x)$  die Kraft  $F_{\text{Stenose}}(x)$  an der Stelle  $x$  auf die Bezugsfläche  $A = 4\pi r_0^2$ .

$$\sigma = \frac{F}{A} = \frac{F_{\text{Stenose}}(x)}{4\pi r_0^2} \quad (3.42)$$

Bewegt sich ein Aggregat nun auf eine Engstelle zu, wie in Abb. 3.5 B dargestellt, wirkt an jeder Position  $x$  eine andere Spannung  $\sigma(x)$ . Außerdem ist die Spannung über die Ausdehnung  $L$  des Aggregats unterschiedlich. Dazu wird ein gewichteter Mittelwert über das Aggregat berechnet. Geht man von einer elliptischen Form mit den Halbachsen  $a$  und  $b$  aus, lautet die Ellipsengleichung

$$\frac{\tilde{x}^2}{a^2} + \frac{\tilde{y}^2}{b^2} = 1, \quad (3.43)$$

wenn man sich im Koordinatensystem des Aggregats  $(\tilde{x}, \tilde{y})$  befindet, dessen Koordinatenursprung  $(\tilde{x} = 0, \tilde{y} = 0)$  im Zentrum der Ellipse liegt, vgl. Abb. 3.5 C. Die Halbachsen  $a$  und  $b$  sind aus den SURF-Trajektorien bekannt. Damit gilt für den halben Durchmesser  $\tilde{y}$  an der Stelle  $\tilde{x}$

$$\tilde{y}(\tilde{x}) = b\sqrt{1 - \frac{\tilde{x}^2}{a^2}}. \quad (3.44)$$

Dieser halbe Durchmesser  $\tilde{y}(\tilde{x})$  dient als Gewicht für die Spannung auf das Aggregat an dieser Stelle  $\tilde{x}$ . Insgesamt ist die Spannung  $\sigma_{\text{Aggregat}}$  an einer Position  $x$  die Summe über die gewichteten Spannungen über die Länge des Aggregats im Verhältnis zur Summe der Gewichte.

$$\sigma_{\text{Aggregat}}(x) = \frac{\sum_{\tilde{x}=-L/2}^{L/2} \sigma(x + \tilde{x})\tilde{y}(\tilde{x})}{\sum_{\tilde{x}=-L/2}^{L/2} \tilde{y}(\tilde{x})} \quad (3.45)$$

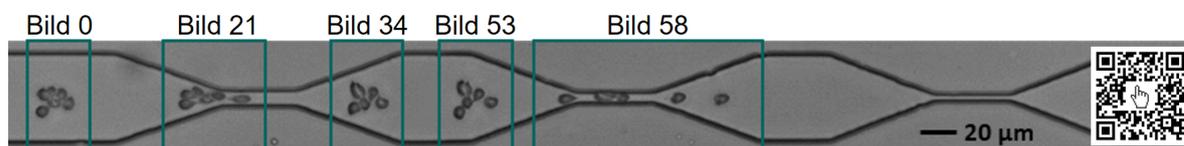
Die Summation erfolgt in Schritten von einem Pixel. Ein Pixel der Mikroskopaufnahme entspricht einer tatsächlichen Länge von  $0,55 \mu\text{m}$ . Dehnung  $\epsilon(x)$  (Gl. 3.41) und Spannung  $\sigma(x)$  (Gl. 3.45) erhält man aus einem Experiment als Funktion des Ortes im Kanal. Im Spannungs-Dehnungs-Diagramm betrachtet man nun die Spannung als Funktion der Dehnung  $\sigma(\epsilon)$ , um über das Hooke'sche Gesetz (Gl. 3.38) den Elastizitätsmodul  $E$  zu bestimmen. Die Schritte zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls sind in Abbildung 6.6 anhand einer Beispielmessung aufgeführt.



# 4

## Verfolgung der Zellaggregate

In diesem Kapitel wird die Funktionsweise der MATLAB basierten Software **SURF** (**SUR**vival of **R**osettes in **F**low) erläutert. Sie dient zur Auswertung der Hochgeschwindigkeitsaufnahmen der Zellen bei Passage eines Mikrofluidikkanals. Bei einer Standardmessung mit einer Bildrate von 2000 Bildern pro Sekunde entsteht ein Video mit 74531 Einzelbildern mit den Maßen  $1280 \times 120$  Pixel. Ausschnitte eines solchen Videos sind in Abb. 4.1 zu sehen. Mit SURF werden diese Videos eingelesen, die Rosetten identifiziert und entlang des Kanals verfolgt, um deren Verformung und Ereignisse wie den Verlust von Zellen zu analysieren. Der zugehörige Code ist in Anhang B zu finden. Um die Ausgabe der Zwischenergebnisse und die Funktionsweise von SURF zu veranschaulichen, sind alle Abbildungen in diesem Kapitel aus derselben Messung entnommen. Bei dieser im Folgenden als Beispielmessung bezeichneten Messung handelt es sich um einen Kaskadenkanal mit drei Stenosen kleiner werdenden Durchmessers von  $d = 11 \mu\text{m}$ ,  $7 \mu\text{m}$  und  $5 \mu\text{m}$  und Rosetten in Blutgruppe A.



**Abbildung 4.1:** Ausschnitte aus der Videoaufnahme, die in diesem Kapitel zur Demonstration der Software SURF dient. Die Flussrichtung ist von links nach rechts. Zu sehen ist eine Rosette bei Passage eines Kaskadenkanals mit drei Stenosen kleiner werdenden Durchmessers von  $d = 11 \mu\text{m}$ ,  $7 \mu\text{m}$  und  $5 \mu\text{m}$ .

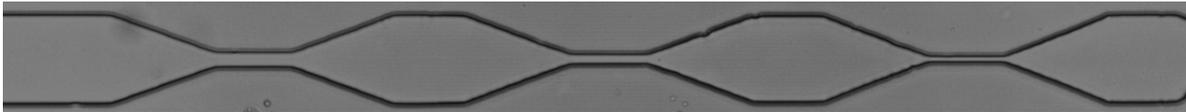
### 4.1 Erstellung der Trajektorien

In der Hauptdatei `SURF_main.m` sind die Dateipfade der auszuwertenden Videos hinterlegt. Für jedes Video wird nacheinander die Funktion `SURF_video_reader.m` aufgerufen, die eine Textdatei erzeugt, in der tabellarisch für jedes Bild die erkannten Objekte und deren Größe und Position aufgelistet sind. Diese Textdatei wird wiederum von der Funktion `SURF_textfile_reader.m` eingelesen. Dieses Skript dient schließlich zum eigentlichen Identifizieren und Verfolgen der Rosetten von Bild zu Bild.

#### Einlesen der Videos und Identifizieren der Zellen

Mit der Funktion `SURF_video_reader.m` wird das Video eingelesen und zunächst der Hintergrund bestimmt, um diesen von allen Bildern zu subtrahieren. Dazu wird über die ersten 1000 Bilder des Videos für jeden Pixel der Median des Grauwerts bestimmt. Dieses Medianbild, vgl. Abb. 4.2, ist der Hintergrund, der nun von jedem Bild abgezogen wird. Das Ergebnisbild enthält 8-Bit-Integerwerte, die negativ sein können. Es muss also in 16-Bit-Integer konvertiert und reskaliert werden, um wieder durchweg positive, als Grauwerte interpretierbare Werte zu erhalten. Abschließend wird jedes Bild durch einen kantenerhaltenden Filter geglättet.

#### 4. Verfolgung der Zellaggregate



**Abbildung 4.2:** Das Hintergrundbild wird pixelweise über den Median des Grauwerts der ersten 1000 Bilder eines Videos berechnet.

Auf den so vorbereiteten Bildern sollen nun die Objekte, bzw. hier konkret rote Blutkörperchen und Aggregate aus solchen, erkannt werden. Einfaches Binarisieren nach dem Grauwert einzelner Pixel mittels eines Schwellwerts ist hier nicht das Mittel der Wahl, um Artefakte wie das Erkennen von Zellteilstücken zu vermeiden. Geschlossene Formen lassen sich besser durch einen Konturplot abbilden. Die ersten zehn Bilder des Videos werden verwendet, um den idealen Schwellwert für die Konturlinien zu finden. Diese „Höhenlinien“ grenzen Bereiche bestimmten Grauwerts voneinander ab. In diesem Fall werden nur zwei Niveaus unterschieden, nämlich „Zelle“ (dunkel) und „Hintergrund“ (hell). Erstellt man Konturplots mit der MATLAB Funktion `imcontour` für zwei Niveaus, wird automatisch ein Schwellwert ermittelt und ausgegeben. Der Mittelwert dieses automatischen Schwellwerts aus den ersten zehn Bildern wird um 25 % herabgesetzt. Dieser neue Schwellwert ist erfahrungsgemäß gut geeignet, um die Umrisse der Zellen durch einen Konturplot zu erfassen. Diese Konturlinien werden in weiß auf schwarzem Hintergrund gezeichnet, und mit weißen Pixeln gefüllt. Zur weiteren Korrektur werden weiße Flächen, die den Bildrand berühren, ebenso entfernt wie solche, die kleiner als 20 Pixel sind. Die Merkmale der verbleibenden Objekte werden mit der MATLAB Funktion `regionprops` bestimmt. Die erkannten Objekte werden von links nach rechts nummeriert, sie sind also nach x-Koordinate sortiert. Für jedes Objekt werden die Nummer des Einzelbildes, die Nummer des Objekts, die x- und y-Koordinaten des Zentrums, die Fläche in Pixeln, die große und kleine Achse der umgebenden Ellipse, sowie deren Exzentrizität und Orientierung bestimmt und in eine Tabelle eingetragen, vgl. Abb. 4.3. Diese Tabelle wird als Textdatei `object_locations.txt` abgespeichert. Die Parameter der

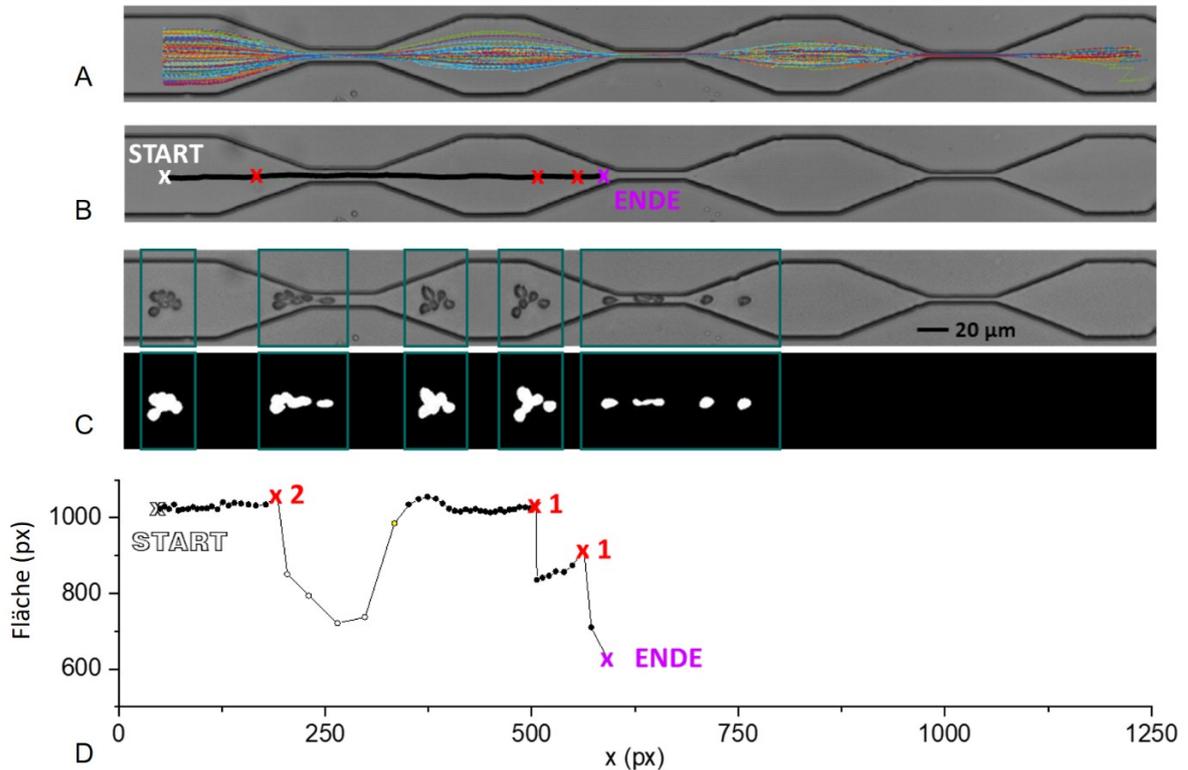
#frame	#object	x Pos (pixel)	y Pos (pixel)	Area	MajorAxisLength	MinorAxisLength	Eccentricity	Orientation
1	1	17	89	216	20.6002	13.4592	0.75705	34.3026
1	2	52	51	222	17.6332	16.247	0.38865	86.1993
1	3	779	66	212	19.4916	14.0523	0.69299	61.5089
1	4	799	75	228	25.6857	11.6331	0.89156	54.2129
1	5	886	47	201	18.4961	14.2823	0.63541	-71.5301
2	1	22	89	219	20.9432	13.4232	0.7676	31.8978
2	2	58	51	222	17.7113	16.1857	0.40603	86.1193
2	3	788	66	213	19.38	14.1618	0.68265	62.4629
2	4	806	76	226	25.5335	11.5796	0.89125	55.9508
2	5	894	48	208	18.7276	14.5523	0.62943	-78.1575
3	1	28	89	220	20.9879	13.4566	0.76741	33.4513
3	2	64	51	223	17.6706	16.299	0.38629	-77.1965
3	3	796	66	214	19.4497	14.2731	0.67932	64.8112
3	4	814	76	229	25.4736	11.695	0.88838	57.6465
3	5	902	48	206	19.1248	14.162	0.67205	-73.5669
4	1	33	89	218	20.7544	13.4804	0.76034	32.7018
4	2	70	51	224	17.6695	16.3565	0.37828	-80.7045
4	3	804	66	209	19.3039	14.0234	0.68721	67.932
4	4	821	77	228	25.174	11.8108	0.88311	57.3019
4	5	911	50	208	18.5867	14.6374	0.61629	-66.217
5	1	39	89	222	20.9013	13.6248	0.75834	32.7405
...								
74531	1	22	67	199	17.3678	14.6594	0.53625	61.0895
74531	2	44	33	207	16.8414	15.7876	0.34817	-22.2645
74531	3	84	97	188	17.2498	13.9594	0.58746	14.2266
74531	4	85	38	211	17.8249	15.1744	0.52467	-49.5882
74531	5	218	57	149	17.881	11.0991	0.78403	-14.4302
74531	6	479	93	165	16.0602	13.1914	0.5704	-0.84516

**Abbildung 4.3:** Für jedes erkannte Objekt werden diese neun Merkmale in neun Spalten in der Textdatei `SURF_object_locations.txt` abgespeichert. 1) die Nummer des Einzelbildes, 2) die Nummer des Objekts, 3) die x- und 4) die y-Position des Zentrums, 5) die Fläche des Objekts in Pixeln, 6) die große und 7) die kleine Achse, sowie 8) die Exzentrizität und 9) die Orientierung der umgebenden Ellipse.

umgebenden Ellipse ermöglichen später die Analyse der Verformung der Aggregate. Die Exzentrizität  $e$  ist das Verhältnis des Abstands der Brennpunkte zur Länge der großen Achse. Dieser Wert liegt zwischen 0 und 1, je runder die Ellipse desto niedriger die Exzentrizität  $e$ . Für  $e = 0$  ergäbe sich ein Kreis, für  $e = 1$  eine Linie.

#### Identifizierung der Rosetten

Im nächsten Schritt wird die Textdatei `SURF_object_locations.txt` durch die Funktion `SURF_textfile_reader.m` eingelesen. Durch dieses Zwischenspeichern der Objektparameter wird der Arbeitsspeicher entlastet, da das Video nicht weiter zugänglich sein muss, sondern lediglich eine Textdatei. Um nun Rosetten von Einzelzellen unterscheiden zu können, wird zunächst die



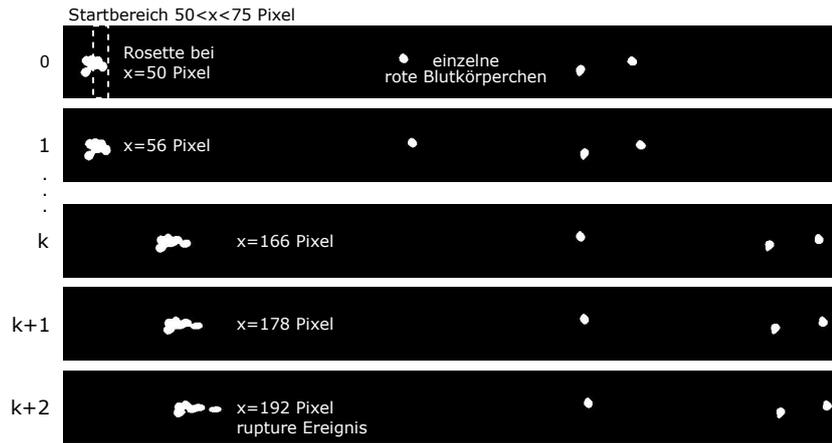
**Abbildung 4.4:** A) Resultat der Auswertung des Beispieldvideos sind 344 Trajektorien. B) Beispieltrajektorie Nummer 7 aus der Beispieldmessung, Position im Kanal von Start bis Ende mit Markierung der Zellverlustereignisse. C) Originalmikroskopaufnahmen und binarisierte Bilder der verfolgten Rosette bei Schritt 0, 21, 29, 48 und 58 der Trajektorie. Der Zeitschritt zwischen zwei Bildern beträgt 0,5 ms. D) Fläche der Rosette in Pixeln als Funktion der x-Koordinate. Die Unterscheidung der Zellverlustereignisse in 1) *real rupture* and 2) *rupture and reconnect* erfolgt nachträglich. Die Bezeichnungen der vier möglichen Ereignisse sind in Abbildung 4.7 aufgeführt.

durchschnittliche Größe  $A_{\text{RBK}}$  der einzelnen Zellen bestimmt. Da diese deutlich häufiger auftreten als Zellaggregate, wird der Median der Größen aller erkannten Objekte gebildet und als  $A_{\text{RBK}}$  gesetzt. Die Objekte werden nun auf solche reduziert, die größer sind als das 1,5-fache dieser Einzelzellfläche. Die verbleibenden Objekte mit  $A > 1,5 A_{\text{RBK}}$  werden als Rosetten bezeichnet. Nur solche Objekte, die Rosetten, sollen nun entlang des Kanals von Bild zu Bild verfolgt werden.

## Aufnahme der Trajektorien

Um eine Trajektorie zu initiieren, muss zunächst auf einem Startbild eine Rosette bei Eintreten in den Bildbereich identifiziert werden. Die Videos sind so aufgenommen, dass die Zellen von links bei  $x = 0$  Pixel in den Bildausschnitt kommen, und ihn rechts bei  $x = 1280$  Pixel verlassen. Der linke Bildrand  $0 \text{ Pixel} < x < 50 \text{ Pixel}$  wird ignoriert, um die Objekte erst zu betrachten, wenn sie vollständig in den Bildausschnitt eingetreten sind. In y-Richtung misst das Bild 120 Pixel, der Kanal ist an der breitesten Stelle 90 Pixel breit. Auf jedem Bild wird nun im Bereich des Kanalansfangs  $50 \text{ Pixel} < x < 75 \text{ Pixel}$  abgefragt, ob sich hier eine Rosette befindet. Der Startbereich ist in Abb. 4.5 eingezeichnet. Falls ja, wird eine Trajektorie mit Startpunkt  $(x_0, y_0)$  auf Bild 0 angelegt. Im Beispieldbild 0 in Abb. 4.5 und Abb. 4.4 befindet sich die Rosette bei Start der Trajektorie bei  $x_0 = 50, y_0 = 66$ . Auf dem nächsten Bild werden zunächst nur die Rosetten mit größerer x-Koordinate, also flussabwärts, betrachtet, die nicht mehr als 150 Pixel in x-Richtung oder 45 Pixel in y-Richtung entfernt sind, da weitere Distanzen von einem zum nächsten Einzelbild eines Videos im vorliegenden Flussfeld nicht zurückgelegt werden können. Von diesen Rosetten auf Bild 1 wird diejenige bestimmt, die den geringsten Abstand zur Startrosette aus Bild 0 bei  $(x_0, y_0)$  hat. Nun wird die Fläche dieser neuen Rosette auf Bild 1 bei  $(x_1, y_1)$  überprüft, um zu entscheiden, ob es sich um dieselbe Rosette handeln kann, deren Trajektorie gerade erstellt wird. Hat sich die Fläche zwischen Rosette 0 und Rosette 1 um mehr als 50 % verändert, werden die Objekte flussaufwärts zwischen  $x_0$  und  $x_0 - d$  mit in Betracht gezogen.  $d$  ist der Durchmesser, den ein Kreis mit der Fläche  $A$  von Rosette 0 hätte,  $d = 2\sqrt{A/\pi}$ . Gibt es

#### 4. Verfolgung der Zellaggregate

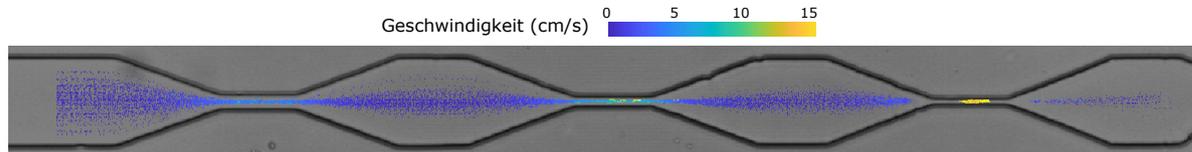


**Abbildung 4.5:** Bild zu Bild Verfolgung. Befindet sich eine Rosette auf Bild  $k$  im Startbereich  $50 \text{ Pixel} < x < 75 \text{ Pixel}$ , wird eine Trajektorie initiiert. Jeweils auf dem folgenden Bild  $k + 1$  wird die passende Rosette identifiziert, um die Trajektorie fortzusetzen.

hier eine Rosette, deren Fläche um weniger als 50 % von Rosette 0 abweicht, wird diese zu Rosette 1. Das kann beispielsweise vorkommen, wenn die Rosette einen kleinen Teil verliert, der flussabwärts voraus ist. In diesem Fall „springt“ der Mittelpunkt der Rosette flussaufwärts. Diese Eventualität wird hier berücksichtigt, um sicherzustellen, dass bei einer Ruptur der Rosette in mehrere Teile immer der größte verbleibende Teil weiterverfolgt wird. Sind alle Kriterien erfüllt, wird Rosette 1 also Rosette 0 zugeordnet, und auf dieselbe Weise auf dem nächsten Bild Rosette 2 bestimmt. Die Trajektorie endet auf Bild  $n$ , wenn auf Bild  $n + 1$  keine adäquate Rosette mehr zu finden ist. Dieser Fall tritt ein, wenn der rechte Rand erreicht ist und die Rosette den Bildausschnitt verlassen hat, oder wenn die Rosette zertrennt wurde und kein verbleibender Teil mit  $A > 1,5 A_{\text{RBK}}$  existiert. Nach Abschluss der Trajektorie, die auf Bild 0 bzw. auf einem Bild  $k$  begann, beginnt die Suche nach der nächsten Rosette auf Bild  $k + 1$ . Hier wird zunächst überprüft, ob es sich um dieselbe Rosette handelt, die beginnend mit Bild  $k$  verfolgt wurde. Falls ja, wird keine Trajektorie initiiert, sondern direkt zu Bild  $k + 2$  übergegangen. Bild für Bild wird so für den Start einer Trajektorie in Betracht gezogen, bis alle Rosetten im Video verfolgt wurden. Trajektorien, die weniger als fünf Schritte lang sind, werden aussortiert. Bei den verwendeten Flussgeschwindigkeiten von  $v \approx 0,1 \frac{\text{m}}{\text{s}}$  und einer Bildrate von 2000 Bildern pro Sekunde erstrecken sich die Trajektorien üblicherweise über circa 100 Bilder. In Abb. 4.4 A sind die Trajektorien, die sich für die Beispielmessung ergeben haben, auf das Hintergrundbild des Kanals gezeichnet. Für eine Beispieltrajektorie in Abb. 4.4 B sind Beispielbilder der verfolgten Rosette in Abb. 4.4 C zu sehen. Darunter ist die Fläche als Funktion von  $x$  entlang des Kanals aufgetragen. Die weiteren Parameter, wie beispielsweise die Flächenänderung und die Maße der umgebenden Ellipse, werden ebenfalls für jede Trajektorie als Plot abgespeichert. Eine Beispielauswertung mit allen Daten ist im Anhang unter Abb. B.11 zu finden.

## 4.2 Auswertung entlang der Trajektorien

Das Verhalten der Rosetten entlang der Trajektorien lässt sich nun im Detail auflösen. Aus den bereits erzeugten Daten lässt sich beispielsweise die Fläche der Rosette als Funktion von  $x$  betrachten, oder die weiteren abgespeicherten Merkmale, die große und die kleine Achse und die Exzentrizität der umgebenden Ellipse (vgl. Abb. B.11). Zwischen zwei Bildern vergeht die Zeit  $\Delta t = 0,5$  ms. Betrachtet man nun die Veränderung der Position von Bild zu Bild, erhält man die Geschwindigkeit, vgl. Abb. 4.6. Durch Übereinanderlegen der Geschwindigkeitsvektoren aller Trajektorien ergibt sich



**Abbildung 4.6:** Aus jedem Schritt jeder Trajektorie lässt sich aus der Differenz der Positionen auf Bild  $k$  und Bild  $k+1$  die Geschwindigkeit berechnen. Durch Übereinanderlegen der Geschwindigkeitsvektoren aller Trajektorien ergibt sich das Geschwindigkeitsfeld im Kanal. Die Geschwindigkeit ist in der Beispielmessung wie zu erwarten höher, je enger die Stenose ist.

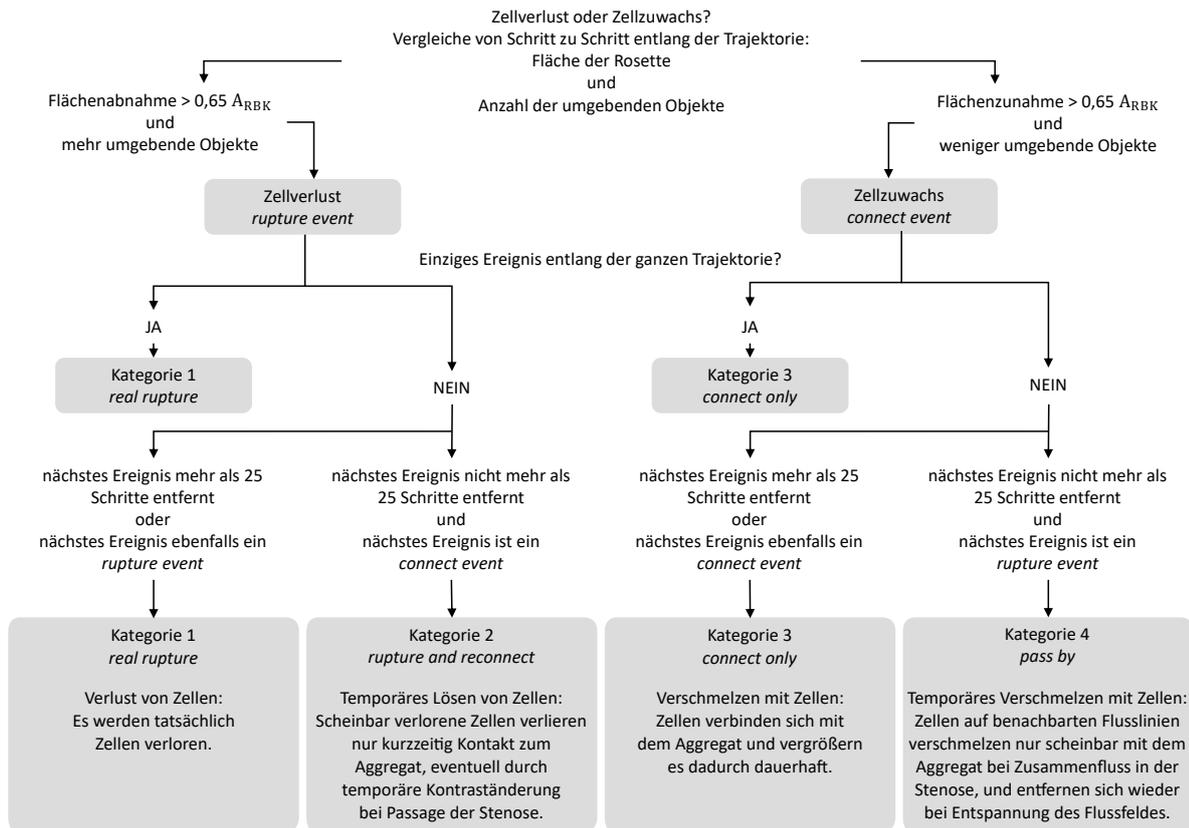
das Geschwindigkeitsfeld im Kanal. Daraus lässt sich die Flussrate  $Q \approx A_{\text{Kanal}} \bar{v}_{10}$  abschätzen. Um sich auf den geraden Teil des Kanals zu beschränken, in dem der Querschnitt  $A_{\text{Kanal}} = 50 \times 8 \mu\text{m}^2$  ist, wird dazu die mittlere Geschwindigkeit  $\bar{v}_{10}$  vorläufig aus den ersten zehn Schritten aller Trajektorien bestimmt. Dies ist lediglich eine erste Abschätzung, da größere Aggregate langsamer sind, und die Einschränkung auf die ersten zehn Schritte nicht bei jeder Flussrate und jeder Kanalgeometrie ausreicht. An späterer Stelle im Skript wird die Flussrate aus den nach Rosettengröße sortierten Trajektorien zuverlässiger, mit niedrigerer Fehleranfälligkeit, aus der Geschwindigkeit der kleinen Aggregate innerhalb der ersten 200 Pixel bestimmt, siehe Kap. 4.4 und Anhang B.4. Vom Startpunkt bis zu dem letzten Punkt der Trajektorie, der innerhalb eines Bereichs von  $\Delta x = 200$  Pixel liegt, wird über die komplette Distanz  $d = \sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}$  und die Anzahl der Schritte die Geschwindigkeit  $\bar{v}$  und daraus die Flussrate  $Q = A_{\text{Kanal}} \bar{v}$  berechnet. Außer der Position ändert sich von Bild zu Bild auch die Größe der Rosetten, vgl. Abb. 4.4 D. Die relative Größenänderung als Funktion von  $x$  ist für die Beispieltrajektorie in Abb. B.11 zu finden.

### Ereignisse entlang der Trajektorien

Rosetten ändern bei Passage eines Kanals nicht nur Form und Größe, es können auch Zellen abgelöst werden, oder in der Nähe befindliche Zellen adhären an das Aggregat. Solche Ereignisse werden in vier Szenarien kategorisiert, vgl. Abb. 4.7. Um die Stabilität der Rosetten zu charakterisieren, ist besonders Kategorie 1) *real rupture* interessant. Die Anzahl dieser Ereignisse sagt aus, wie viele Zellen tatsächlich abgelöst werden. Um dies zuverlässig zu bestimmen, werden zunächst von Bild zu Bild Zellablösung und Zellzuwachs identifiziert, und dann entlang der Trajektorie im Fall der Zellablösung die Szenarien 1) *real rupture* und 2) *rupture and reconnect*, bzw. im Fall des Zellzuwachses die Szenarien 3) *connect only* und 4) *pass by* überprüft.

Die Implementierung dieser Kategorisierung in SURF ist als Flussdiagramm in Abb. 4.7 dargestellt. Um diese Ereignisse identifizieren zu können wird zunächst von Bild zu Bild die Flächenänderung der Rosette überprüft, und ob sich die Anzahl der Objekte um eine Rosette herum ändert. So kann man das Ablösen oder Anhaften von Zellen erkennen. Für jede Rosette wird also im Bild  $k$  die Anzahl der umgebenden Objekte im Bereich  $x_k - 115 < x < x_k + 115$  einschließlich einzelner Zellen bestimmt. Dies wird mit der Anzahl der Objekte im entsprechenden Bereich im vorherigen Bild  $k - 1$  verglichen, und der Unterschied zwischen Bild  $k$  und Bild  $k - 1$  erfasst. Der Abstand von 115 Pixeln ist etwas mehr als die Standardelongationslänge. Ein engerer Bereich würde bei großen Aggregaten nicht ausreichen, ein zu breiter Bereich ist artefaktbehaftet, da Zellen in den von der Kamera erfassten Bildbereich eintreten oder diesen verlassen können, und sich die Anzahl der vorhandenen Objekte dadurch ändert. Ändert sich die Fläche um mehr als  $0,65 A_{\text{RBK}}$  und gleichzeitig die Anzahl der umgebenden Objekte, handelt es sich bei Flächenverlust und gleichzeitigem Erscheinen neuer Objekte um ein Zellablöseereignis, bzw. ein Zellzuwachsereignis bei Verringerung der umgebenden Objekte und gleichzeitiger Flächenzunahme.

#### 4. Verfolgung der Zellaggregate



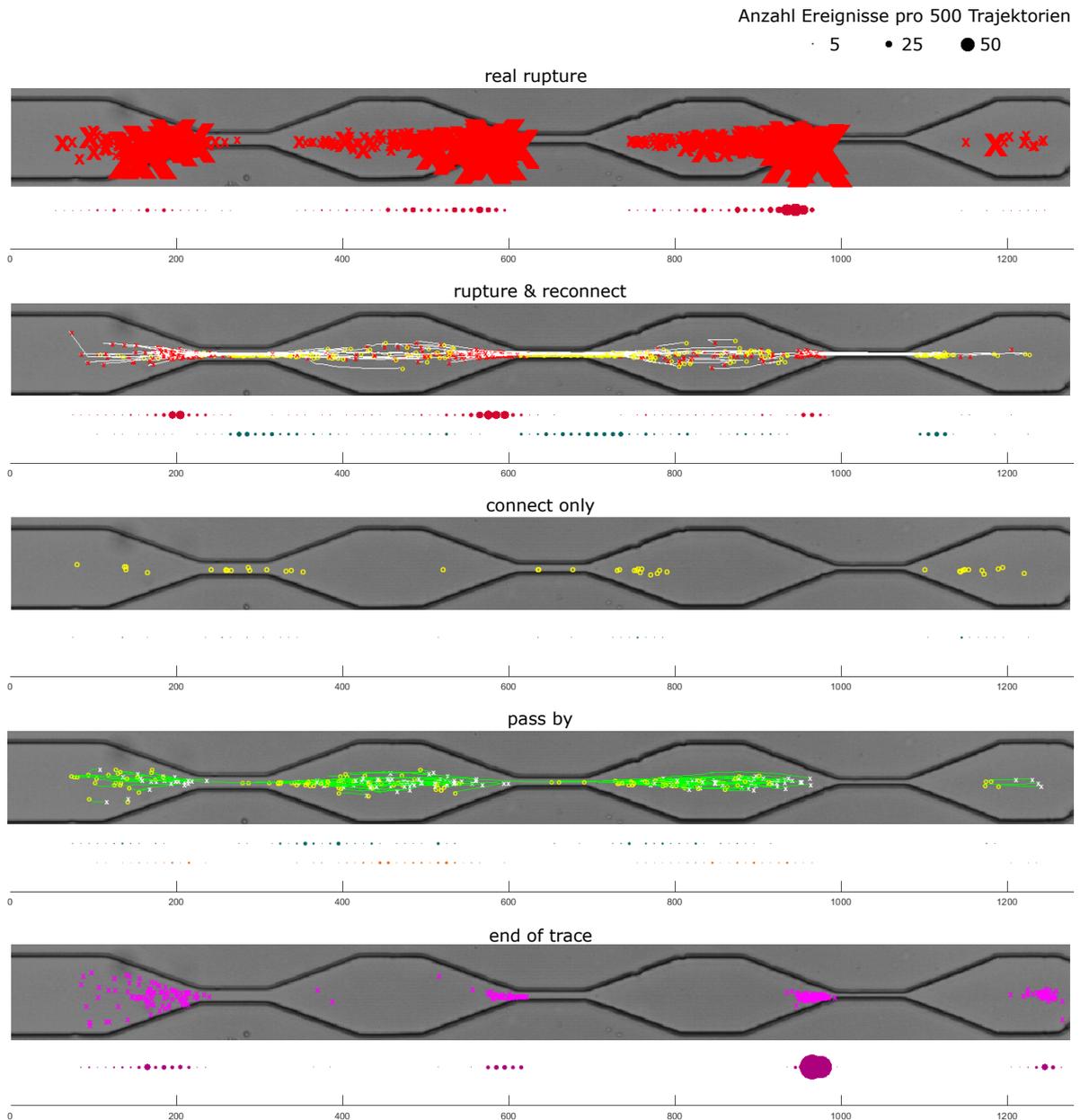
**Abbildung 4.7:** Kategorisierung der Ereignisse entlang einer Trajektorie in die vier Kategorien *real rupture*, *rupture and reconnect*, *connect only* und *pass by*.

#### Einordnung von Zellverlust in *real rupture* oder *rupture and reconnect*

Die Entscheidung, ob es sich bei einem Zellverlustereignis tatsächlich um Kategorie 1) *real rupture* oder aber Kategorie 2) *rupture and reconnect* handelt, erfordert die Betrachtung der ganzen Trajektorie. Ist das vorliegende Zellverlustereignis das einzige Ereignis, das entlang der ganzen Trajektorie registriert wurde, wird es als *real rupture* deklariert. Gibt es weitere Ereignisse, wird es nur als *real rupture* eingeordnet, falls das nächste Ereignis mehr als 25 Schritte entfernt auftritt, oder das nächste Ereignis ebenfalls ein Zellverlustereignis ist. Ist das nächste Ereignis dagegen ein Zellzuwachsereignis und nicht mehr als 25 Schritte entfernt, fällt es in Kategorie 2) *rupture and reconnect*.

#### Einordnung von Zellzuwachs in *connect only* oder *pass by*

Analog wird zur Unterteilung der Zellzuwachsereignisse in die Kategorien 3) *connect only* und 4) *pass by* vorgegangen. Ist das vorliegende Zellzuwachsereignis das einzige Ereignis entlang der ganzen Trajektorie, fällt es in Kategorie 3) *connect only*. Gibt es weitere Ereignisse, wird es nur als *connect only* eingeordnet, falls das nächste Ereignis mehr als 25 Schritte entfernt auftritt, oder das nächste Ereignis ebenfalls ein Zellzuwachsereignis ist. Ist das nächste Ereignis dagegen ein Zellverlustereignis und nicht mehr als 25 Schritte entfernt, liegt der Fall Kategorie 4) *pass by* vor.



**Abbildung 4.8:** Registrierte Ereignisse *real rupture*, *rupture and reconnect*, *connect only* und *pass by* entlang der 344 Trajektorien aus der Beispielmessung und Endpunkte dieser Trajektorien *end of trace* jeweils mit Markierungen an der Position, an der sich die Rosette zum Zeitpunkt des Ereignisses befindet. Jeweils unterhalb ist die Häufigkeit des jeweiligen Ereignisses (Anzahl Ereignisse pro 500 Trajektorien) entlang des Kanals durch passend skalierte Kreise dargestellt, x-Achse in Pixeln.

***real rupture*:** Die Größe der roten Kreuze skaliert mit der Fläche, um die die Rosette beim jeweiligen *real rupture* Ereignis verkleinert wurde.

***rupture and reconnect*:** Eine weiße Linie entlang der Trajektorie verbindet ein Zellverlustereignis, mit einem roten Kreuz markiert, bis zu einem darauf folgenden, mit gelbem Kreis markierten, Zellzuwachsereignis. Solche Zellverlustereignisse sollen erkannt werden, um nicht fälschlicherweise als *real rupture* gezählt zu werden.

***connect only*:** Ein Zellzuwachsereignis ohne vorangehenden oder nachfolgenden Zellverlust ist mit einem gelben Kreis markiert.

***pass by*:** Folgt einem Zellzuwachs ein Zellverlust, verbinden sich Zellen also nur temporär, soll diese Art von Zellverlust ebenfalls nicht fälschlicherweise als *real rupture* eingeordnet werden. Solche *pass by* Ereignisse sind hier mit einer grünen Linie entlang der Trajektorie dargestellt, der Zellzuwachs am Anfang in Gelb und der abschließende Zellverlust in Weiß.

***end of trace*:** Das Ende jeder Trajektorie ist hier durch ein violette Kreuz gekennzeichnet. Die Kategorisierung der Ereignisse durch den SURF Algorithmus ist in Abbildung 4.7 dargestellt.

### 4.3 Zusammenfassen und Exportieren der Ergebnisse

Zuletzt wird jede Trajektorie  $i$  als Textdatei `SURF_trace i.txt` exportiert, und die Zusammenfassung der gesamten Auswertung des Videos als Textdatei `event_counter_grid.txt` gespeichert. Wie in Abb. 4.9 gezeigt, enthält die Textdatei `SURF_trace i.txt` für jeden Schritt der verfolgten Rosette die Nummer  $i$  der Trajektorie, die Nummer  $k$  des jeweiligen Einzelbildes zur eindeutigen Lokalisierung im Originalvideo,  $x$ - und  $y$ -Position des Zentrums und die Fläche der Rosette auf Bild  $k$ , sowie große und kleine Achse und Exzentrizität der umgebenden Ellipse. Hinzu kommen die Unterschiede zum folgenden Bild  $k + 1$  in Fläche,  $x$ -Position und Anzahl der umgebenden Objekte, sowie die absolute Anzahl der umgebenden Objekte in Bild  $k$  und Bild  $k + 1$ . Die letzten beiden Spalten enthalten die Informationen zu den Ereignissen entlang der Trajektorie. Spalte `event` enthält die Flächenänderung in Pixel, falls ein Zellzuwachs- oder Zellverlustereignis an dieser Stelle registriert wurde. Die weitere Kategorisierung ist in Spalte `cat event` mit den Kennziffern 1 – 4 eingetragen.

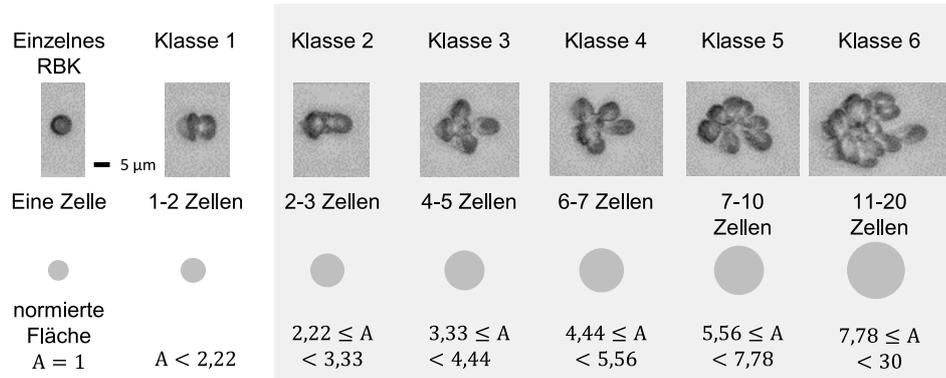
```
=====
results SURF      I:\Stockholm Sept Okt 2018\BGA\BGA 25 mulhr_20180928_155155\BGA 25 mulhr_20180928_155155.avi
total traces:    344
flow rate (mul/h): 12.3611
=====
#trace #frame x Pos y Pos Area MajorAxis MinorAxis Eccentricity dArea dx #sur #sur fr+1 diff #objects event cat event
=====
7 1209 50 66 1024 46.3438 33.8287 0.6835 5 6 1 1 0 0 0
7 1210 56 66 1029 46.2236 34.0605 0.67604 -16 5 1 1 0 0 0
7 1211 61 66 1023 46.0983 33.92 0.67718 12 6 1 1 0 0 0
7 1212 67 66 1035 46.4285 34.0039 0.68088 -16 5 1 1 0 0 0
7 1213 72 65 1019 46.2234 33.7719 0.68278 3 6 1 1 0 0 0
7 1214 78 65 1022 46.4069 33.7367 0.68666 1 6 1 1 0 0 0
...
7 1227 166 64 1032 57.9925 27.4813 0.88059 3 12 1 1 0 0 0
7 1228 178 63 1035 62.3799 26.0514 0.90862 25 14 1 1 0 0 0
7 1229 192 63 1060 70.1463 24.153 0.93885 -210 12 1 2 1 -210 2
7 1230 204 62 850 55.6032 22.7241 0.91268 -56 26 2 2 0 0 2
7 1231 230 63 794 72.1863 18.153 0.96786 -73 35 2 2 0 0 2
7 1232 265 62 721 78.0986 13.8073 0.98425 16 33 2 2 0 0 2
7 1233 298 62 737 79.4008 14.2094 0.93386 248 36 2 1 -1 248 2
7 1234 334 63 985 81.0387 18.9475 0.97228 50 17 1 1 0 0 0
7 1235 351 63 1035 63.2891 25.11 0.91793 14 12 1 1 0 0 0
...
7 1255 492 64 1027 49.9329 41.9374 0.54278 -2 6 1 1 0 0 0
7 1256 498 64 1025 52.355 41.1776 0.61758 6 7 1 1 0 0 0
7 1257 505 64 1031 55.8432 40.3154 0.69196 -196 1 1 2 1 -196 1
7 1258 506 63 835 46.1552 32.0126 0.72037 6 7 2 2 0 0 0
7 1259 513 63 841 45.3395 32.9115 0.68781 5 8 2 2 0 0 0
7 1260 521 63 846 44.8935 33.7792 0.65867 12 8 2 2 0 0 0
7 1261 529 63 858 45.9798 34.0938 0.67096 -2 10 2 2 0 0 0
7 1262 539 63 856 47.9835 33.3131 0.71972 18 10 2 1 -1 0 0
7 1263 549 63 874 52.1517 31.683 0.79431 40 14 1 1 0 0 0
7 1264 563 63 914 60.8725 28.4176 0.88434 -204 9 1 2 1 -204 1
7 1265 572 63 710 43.0346 25.5016 0.80551 -85 20 2 2 0 0 0
7 1266 592 63 625
```

**Abbildung 4.9:** Jede Trajektorie  $i$  wird als Textdatei `SURF_trace i.txt` exportiert. Die Spalten enthalten von links nach rechts 1) die Nummer der Trajektorie, 2) die Nummer des Einzelbildes, 3)  $x$ - und 4)  $y$ -Position des Zentrums in Pixel, 5) die Fläche, 6) die große Achse, 7) die kleine Achse, 8) die Exzentrizität der umgebenden Ellipse, 9) die Flächenänderung und 10) die Änderung der  $x$ -Position zum folgenden Bild, 11) die Anzahl der umgebenden Objekte, 12) die Anzahl der umgebenden Objekte im folgenden Bild, 13) die Änderung der Anzahl der umgebenden Objekte, 14) die Flächenänderung, falls ein Zellzuwachs- oder Zellverlustereignis vorliegt, 15) Kategorie 1 – 4 des Ereignisses. Hier `SURF_trace_7.txt` für die Beispieltrajektorie 7.

Um ortsaufgelöst zu sehen, an welchen Stellen im Kanal welche Ereignisse wie häufig auftreten, wird zunächst ein Raster erstellt in Schritten von 10 Pixeln im Bereich  $55 \text{ Pixel} \leq x \leq 1275 \text{ Pixel}$  in  $x$ - und  $0 \text{ Pixel} \leq y \leq 110 \text{ Pixel}$  in  $y$ -Richtung. Trajektorie für Trajektorie werden die Ereignisse in dieses Raster eingetragen. Der Zählerstand für jede Kategorie 1 – 4 und `end of trace` pro Rasterfeld wird schließlich abgespeichert und ist in der Textdatei `event_counter_grid.txt` zu finden. Da im verwendeten Kanaldesign die  $y$ -Position nicht entscheidend ist, wird außerdem die Spaltensumme gebildet, um das Raster auf die  $x$ -Dimension zu reduzieren. Endergebnis sind also Zählerstände für jede Kategorie 1 – 4 und `end of trace` in Schritten von 10 Pixeln im Bereich  $55 \text{ Pixel} \leq x \leq 1275 \text{ Pixel}$  in  $x$ -Richtung entlang des Kanals. Diese Zeilenvektoren sind in Abb. 4.8 veranschaulicht und werden ebenfalls zur weiteren Verarbeitung der Daten in der Textdatei `event_counter_grid.txt` gespeichert. So kann man die Ereignisse an einer bestimmten Stelle im Kanal betrachten und somit beispielsweise die Bereiche vor, in und nach einer Stenose untereinander vergleichen.

## 4.4 Kategorisierung nach Rosettengröße

Um den Einfluss der Rosettengröße auf deren Verhalten im Fluss zu studieren, werden die Trajektorien nun nach Anfangsgröße der Rosetten klassifiziert. Dazu dient das Skript `SURF_sort_traces_by_rosette_size.m`, Anhang B.4. Innerhalb einer Klasse sollen sich vergleichbare Zellaggregate befinden. Die Größe wird auf die durchschnittliche Fläche  $A_{\text{RBK}}$  einer einzelnen Zelle normiert.  $A_{\text{RBK}}$  wird für jede Messung individuell ermittelt, da je nach Ausleuchtung und Fokusebene kleine Abweichungen von Messung zu Messung auftreten können. Nach dieser normierten Größe werden die Rosetten in sechs Klassen eingeteilt, vgl. Abb. 4.10. Per Definition innerhalb dieser Arbeit sind



**Abbildung 4.10:** Klassifizierung von Aggregaten in sechs Klassen aufsteigender Größe. Die Größe wird auf die durchschnittliche Fläche  $A_{\text{RBK}}$  einer einzelnen Zelle normiert. Der Durchmesser der grauen Kreise ist der Äquivalentdurchmesser für die jeweilige Klasse, also das kreisförmige Flächenäquivalent für ein mittleres Aggregat dieser Klasse, vgl. Gl. 4.1. Aggregate der Klassen 2 – 6 werden als Rosetten bezeichnet.

Rosetten mindestens  $1,5 A_{\text{RBK}}$  groß. Um in Schritten von 1 – 2 Zellen von Klasse zu Klasse zu gehen, vgl. Abb. 4.10 oben, wurden die Klassengrenzen des Histogramms folgendermaßen gewählt:  $1,5 A_{\text{RBK}}$ ;  $2,22 A_{\text{RBK}}$ ;  $3,33 A_{\text{RBK}}$ ;  $4,44 A_{\text{RBK}}$ ;  $5,56 A_{\text{RBK}}$ ;  $7,78 A_{\text{RBK}}$  und  $30 A_{\text{RBK}}$ . Für jede Klasse  $k$  wird ein repräsentativer Mittelwert  $A_k$  angegeben, vgl. Abb. 4.10 und Gleichung 4.1, und für weitere Berechnungen ein Äquivalentradius  $r_0$  eines Kreises mit Fläche  $A_k$  verwendet,

$$r_0 = \sqrt{A_k/\pi}, \quad A_k = [1,86; 2,78; 3,89; 5,00; 6,67; 9] A_{\text{RBK}}. \quad (4.1)$$

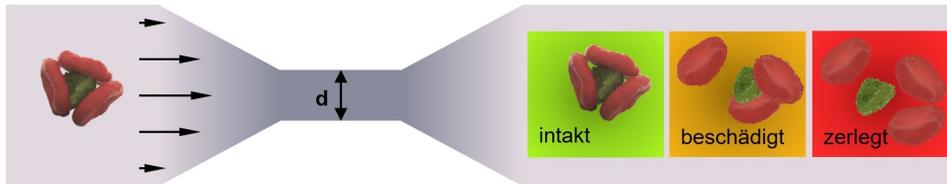
$A_{\text{RBK}}$  wird in Pixeln ermittelt als der am häufigsten vorkommende Wert in der Größenverteilung. Somit liegt  $r_0$  ebenso für jede Messung individuell in Pixeln vor.

Üblicherweise spricht man von einer Rosette, wenn das Aggregat aus einem infizierten und mindestens zwei uninfizierten, adhären roten Blutkörperchen besteht. Objekte, die in den Mikroskopaufnahmen ungefähr  $A \approx 1,5 A_{\text{RBK}}$  bis  $A \approx 2 A_{\text{RBK}}$  groß erscheinen, sind teilweise noch keine Rosetten, sondern beispielsweise nur zwei uninfizierte Zellen, die sich zufällig nahe beieinander befinden. Um solche fälschlicherweise als Rosette behandelten Objekte von der weiteren Auswertung auszuschließen, wird im Folgenden nur mit den Aggregaten der Klassen 2 – 6 gearbeitet.

Durch das Klassifizieren der Rosetten im Nachhinein wird sichergestellt, dass Rosetten nicht während der Nachverfolgung im Kanal durch den Verlust von Zellen in eine andere Kategorie fallen können, wie es bei einer Einteilung nach Größe und Position ohne Verfolgung der Rosetten der Fall wäre. Dies ist ein klarer Vorteil gegenüber einer auf Momentaufnahmen beschränkten Ermittlung der Größenverteilungen der Aggregate, und rechtfertigt so den hohen Aufwand für die Nachverfolgung. Wie in Kap. 4.2 erläutert, wird außerdem die Flussgeschwindigkeit für jede Klasse einzeln bestimmt. Die größte Aussagekraft für die tatsächliche Flussrate, die im Kanal herrscht, resultiert aus der Geschwindigkeit der kleineren Rosetten der Klassen 2 und 3. Je größer die Aggregate werden, desto mehr berühren sie die Kanalwände und bewegen sich dadurch langsamer als die Flüssigkeit, die sie umgibt.

## 4.5 Kategorisierung nach Aggregatzustand nach Passage der Stenose

Um eine Aussage über die Stabilität der Rosetten treffen zu können, ist letztendlich interessant, ob eine Rosette eine Stenose unbeschadet passieren kann, oder ob dabei Zellen abgelöst werden, eventuell so viele, dass die Rosette vollständig in ihre Bestandteile zertrennt wird, vgl. Abb. 4.11. Dazu dient das Skript `SURF_sort_traces_by_rosette_fate.m`. Hier wird die x-Koordinate des Endes der Stenose eingetragen, und ausgegeben, welche Ereignisse bis dahin auftreten. So kann man bestimmen, welcher Anteil der Rosetten nach Passage der Stenose in welchem der drei Zustände „intakt“, „beschädigt“ oder „vollständig zerlegt“ ist.



**Abbildung 4.11:** Der Zustand einer Rosette nach Passage einer Stenose ist entweder „intakt“ (grün), „beschädigt“ (gelb) oder „vollständig zerlegt“ (rot).

### Überlebensrate bei Passage der Stenose

Alle Rosetten, die nicht vollständig zerlegt werden, sondern direkt nach der Stenose noch vorhanden sind, werden als „Überlebende“ gezählt. Unter diesen „Überlebenden“ wird weiter unterschieden zwischen solchen, die Zellen verloren haben, und solchen, die in ihrer Größe unverändert sind.

### Zellverlust der beschädigten Rosetten

Für Rosetten, die beschädigt wurden, wird nun bestimmt, wie viele Zellen im Mittel jeweils abgetrennt wurden. Dazu wird auf den Trajektorien der beschädigten Rosetten die Verlustfläche zu allen registrierten *real rupture* Ereignissen aufsummiert, und durch die Anzahl dieser Rosetten geteilt. Diese mittlere von einer beschädigten Rosette verlorene Fläche wird durch die Fläche einer einzelnen Zelle  $A_{\text{RBK}}$  geteilt. Dieser Wert dient als Abschätzung für die im Mittel abgetrennten roten Blutkörperchen, vgl. Kap. 5.5, und wird für jede Rosettenklasse in der Textdatei `damaged_area.txt` gespeichert.

### Viskoelastische Verformung der unbeschädigten Rosetten

Um die elastischen Eigenschaften zu studieren bzw. um zu sehen, wie stark sich die Rosetten verformen können, ohne Zellen zu verlieren, wird für die Rosetten, die intakt bleiben, die Spannungs-Dehnungs-Kurve betrachtet. Die Arbeitsschritte dazu sind im Ergebniskapitel zum Elastizitätsmodul, Kap. 6, in Abbildung 6.6 aufgeführt. Dazu wird, wie in Kap. 3.4 beschrieben, Dehnung  $\epsilon(x)$  (Gl. 3.41) und Spannung  $\sigma(x)$  (Gl. 3.45) als Funktion des Ortes im Kanal bestimmt. Die Länge  $L$  der Rosetten, die in die Dehnung  $\epsilon(x)$  eingeht, ist die lange Achse der umgebenden Ellipse  $a$ . Für alle Trajektorien der unbeschädigten Rosetten einer Rosettenklasse werden zunächst lange und kurze Ellipsenachse  $a(x)$  und  $b(x)$ , sowie die Geschwindigkeit  $v(x)$  jeweils in ein Diagramm geplottet, und über diese in Fenstern von 10 Pixeln in x-Richtung gemittelt, vgl. Anhang B.6.

Der Geschwindigkeitsverlauf entlang der Stenose ähnelt einer Gaußkurve, vgl. Abb. 5.3 B. Die Daten werden daher vorläufig phänomenologisch durch eine Gaußfunktion nach Gl. 4.2 angepasst. Die vier Fitparameter sind die vertikale Verschiebung  $v_0$ , die Position des Maximums  $x_c$ , die Peakbreite  $w = 2\sigma$  und die Fläche  $A = 2\sigma v(w)$ .

$$v(x) = v_0 + \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\frac{(x - x_c)^2}{w^2}\right) \quad (4.2)$$

Die Position des Maximums der Geschwindigkeit fällt mit der Mitte der Stenose zusammen, und dient zur Abgrenzung des Deformationsbereichs. Da Gaußkurven nach Gl. 4.2 den Geschwindigkeitsverlauf nicht für alle Kanalgeometrien exakt genug beschreiben, dient sie nur als erste Abschätzung des

Verlaufs. Für Berechnungen der wirkenden Kräfte, die auf  $v(x)$  basieren, wird nicht die gefittete sondern eine geglättete Kurve für  $v(x)$  verwendet. Das Glätten erfolgt in drei Schritten: Zunächst werden Ausreißer durch einen gleitenden Median über fünf Datenpunkte, das entspricht fünf Pixeln oder  $2,4 \mu\text{m}$ , eliminiert. Anschließend wird das eigentliche Glätten durch einen gleitenden Mittelwert über fünf Datenpunkte vorgenommen, und schließlich werden die Zwischenwerte durch eine Spline-Funktion interpoliert, um die Schrittweite  $\Delta x$  von  $\Delta x = 10$  Pixeln auf  $\Delta x = 1$  Pixel zu verfeinern.

Weiter werden die umgebenden Ellipsen der Rosetten betrachtet. Innerhalb des engsten Teils der Stenose treten häufig Artefakte auf, da die Rosetten nicht richtig erkannt werden können, weil sie optisch mit dem Kanalrand verschmelzen. Solche verfälschenden Werte werden aussortiert. Dadurch entsteht meist eine Lücke in den Messwerten, die mit der Position des engsten Teils der Stenose zusammenfällt. Der Fitbereich für  $a$  und  $b$  endet daher entweder am Beginn der Lücke oder an der Position der maximalen Geschwindigkeit. Die gemittelten Kurven für die beiden Achsen werden durch die Exponentialfunktionen Gl. 4.3 und Gl. 4.4 angenähert.

$$a(x) = a_0 + \exp(k_a(x - x_{ca})) \quad (4.3)$$

$$b(x) = b_0 - \exp(k_b(x - x_{cb})) \quad (4.4)$$

Die Fitfunktionen werden wie folgt initialisiert: Der Parameter  $a_0$  bzw.  $b_0$  wird festgehalten und gleich dem Median über den Anfangsbereich der Kurve gesetzt. Der Parameter  $k$  wird kaum eingeschränkt, der Startwert liegt bei  $k = 0,01$  und darf sich im Intervall  $k \in [0; 0,2]$  bewegen. Die Verschiebung in x-Richtung  $x_c$  wird initialisiert mit dem x-Wert, bei dem der oben beschriebene Fitbereich endet.

Die Dehnung wird nach Gleichung 3.41 als Längenänderung im Verhältnis zum runden Zustand definiert, vgl. Abb. 3.5 A. Der kreisförmige „Ruhezustand“ einer Rosette wird aus der Fläche am Kanalansatz berechnet, vgl. Kap. 4.4 bzw. Gleichung 4.1. Für  $\epsilon(x)$  entlang des Kanals ergibt sich aus der Fitfunktion  $a(x)$

$$\epsilon(x) = \frac{a(x) - 2r_0}{2r_0}. \quad (4.5)$$

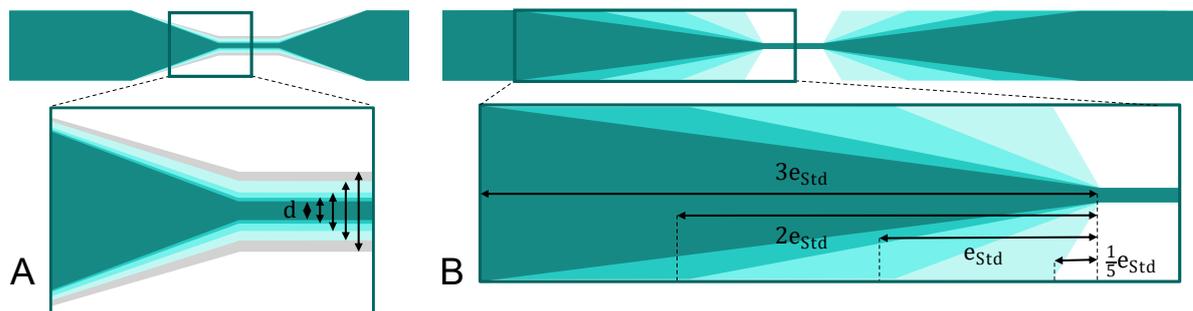
Die Spannung  $\sigma(x)$  als Funktion des Ortes, Gl. 3.45, wird wie in Kap. 3.4 beschrieben aus der Geschwindigkeit  $v(x)$  berechnet. Daraus lässt sich schließlich ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm wie in Abbildung 6.6 E erstellen. Betrachtet man also die Spannung als Funktion der Dehnung  $\sigma(\epsilon)$ , entspricht die Steigung nach dem Hooke'schen Gesetz (Gl. 3.38) dem Elastizitätsmodul  $E$ . Solche Diagramme und die entsprechenden Arbeitsschritte werden im Ergebniskapitel 6.2 behandelt.



# 5

## Passage unterschiedlicher Stenosen

Die Frage, die diesem Kapitel zugrunde liegt, lautet: Wie gut kann ein Blutzellaggregat unterschiedliche Stenosen passieren, und welchen Einfluss haben Parameter wie die Rosettengröße und die Form der Stenose? Zur Beantwortung werden Ergebnisse zu Mikrofluidikexperimenten, wie sie in Abb. 3.3 bzw. Kapitel 3.2 beschrieben sind, beschrieben und diskutiert. Dieses Kapitel basiert größtenteils auf den beiden eigenen Veröffentlichungen „Blood group and size dependent stability of *P. falciparum* infected red blood cell aggregates in capillaries“ von 2020 in *Biomicrofluidics* [4] und „Deformation of Red Blood Cell Aggregates in Elongational Flow“, Manuskript [5].



**Abbildung 5.1:** Die verwendeten Stenosen unterscheiden sich im Stenosedurchmesser  $d$  an der engsten Stelle, und der Länge  $e$  des Zulaufs zur Stenose.

**A)** Zunächst wird die Länge der Stenose bei  $e_{\text{Std}} = 55 \mu\text{m}$  festgehalten, und der Durchmesser zwischen  $d = 14,5 \mu\text{m}$ ,  $11 \mu\text{m}$ ,  $7 \mu\text{m}$ ,  $5 \mu\text{m}$  und  $3,5 \mu\text{m}$  variiert.

**B)** Die Elongation wird variiert, indem die Stenose ausgehend von der Standardausführung mit  $e_{\text{Std}} = 55 \mu\text{m}$  auf ein Fünftel verkürzt, bzw. auf das Doppelte und das Dreifache verlängert wird. Diese unterschiedlich langen Stenosen gibt es mit zwei verschiedenen Stenosedurchmessern von  $d = 5 \mu\text{m}$  bzw.  $d = 7 \mu\text{m}$ .

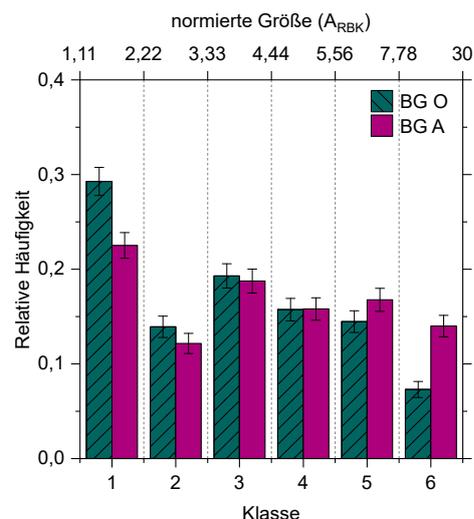
Die Geometrien der verwendeten Mikrofluidikkanäle bzw. Stenosen unterscheiden sich im Stenosedurchmesser  $d$  an der engsten Stelle und der Länge  $e$  des Zulaufs zur Stenose, wie in Kapitel 3.3 eingeführt und in Abb. 5.1 aufgegriffen. Nach variierendem Parameter  $d$  oder  $e$  lässt sich zum einen der Einfluss der Kompression, vgl. Kap. 5.3, und zum anderen der Einfluss der Elongation, vgl. Kap. 5.4, untersuchen. Zur Variation der Kompression wird die Länge der Stenose bei  $e_{\text{Std}} = 55 \mu\text{m}$  festgehalten, der Durchmesser der Stenose  $d$  nimmt die fünf Werte  $d = 14,5 \mu\text{m}$ ,  $11 \mu\text{m}$ ,  $7 \mu\text{m}$ ,  $5 \mu\text{m}$  und  $3,5 \mu\text{m}$  an, vgl. Abb. 5.1. Die Elongation wird variiert, indem die Stenose ausgehend von der Standardausführung mit  $e_{\text{Std}} = 55 \mu\text{m}$  auf ein Fünftel verkürzt, bzw. auf das Doppelte und das Dreifache verlängert wird. Diese unterschiedlich langen Stenosen gibt es mit zwei verschiedenen Stenosedurchmessern von  $d = 5 \mu\text{m}$  bzw.  $d = 7 \mu\text{m}$ .

Auf dieser experimentellen Grundlage wird folgenden Fragestellungen nachgegangen:

- **Welche Anfangsbedingungen liegen vor?** Hier wird die Größenverteilung der Rosetten am Kanalbeginn bestimmt und der Unterschied zwischen den Blutgruppen A und 0 aufgezeigt, vgl. Kap. 5.1.
- **Wie verhält sich die Flussgeschwindigkeit entlang der Stenose?** Durch die große Ausdehnung der Aggregate im Vergleich zur Geometrie der Stenose ist die Geschwindigkeit der Aggregate bei Passage der Stenose nicht alleine durch den Kanalquerschnitt und die Kontinuitätsgleichung zu beschreiben, vgl. Kap. 5.2.
- **Welchen Einfluss hat der Stenosendurchmesser?** Wie gut eine Rosette eine Stenose passieren kann, hängt offensichtlich mit dem Durchmesser der engsten Stelle und dem Durchmesser der Rosette zusammen. In Kap. 5.3 werden diese Abhängigkeiten untersucht.
- **Welchen Einfluss hat die Stenosenlänge?** Nicht nur die engste Stelle der Stenose ist für den Ausgang entscheidend, auch die Länge des Zuflusses bzw. Auslasses, also wie steil die Verengung zuläuft. Kap. 5.4 zeigt, dass nicht etwa ein abruptes Verengen verhängnisvoller ist, sondern die flachen, längeren Stenosen.
- **Wie viele Zellen verlieren die Rosetten durchschnittlich?** Nachdem bisher lediglich unterschieden wurde, ob Rosetten die Stenose beschädigt oder unbeschädigt passieren können, werden in Kap. 5.5 die beschädigten Rosetten genauer betrachtet und beschrieben, wie viele Zellen die unterschiedlich großen Rosetten jeweils verlieren.
- **Sind Lektin-induzierte Aggregate ein gutes Modellsystem?** Lektine führen eine Verklumpung von roten Blutkörperchen hervor, die in Form und Größe der Rosettenbildung ähnelt. In Kap. 5.6 werden solche Lektin-induzierten Aggregate untersucht und anhand ihrer Stabilität mit Rosetten verglichen.
- **Wie ähnlich verhalten sich eine im Experiment beobachtete Rosette und eine simulierte Kugel?** Abschließend wird in Kap. 5.7 eine Finite Elemente Simulation herangezogen, um das Verhalten von Blutzellaggregaten und einer Kugel in Äquivalentgröße bei Passage einer Stenose theoretisch zu beschreiben und die Ergebnisse der Simulation und der Experimente qualitativ zu vergleichen.

### 5.1 Ausgangsgrößenverteilung der Rosetten

**Abbildung 5.2:** Größenverteilung der Rosetten auf die Klassen 1-6 in Blutgruppe A und 0 zu Kanalbeginn. Die Einordnung in Klassen erfolgt nach der auf die Projektionsfläche eines einzelnen roten Blutkörperchens  $A_{RBK}$  normierten Größe.



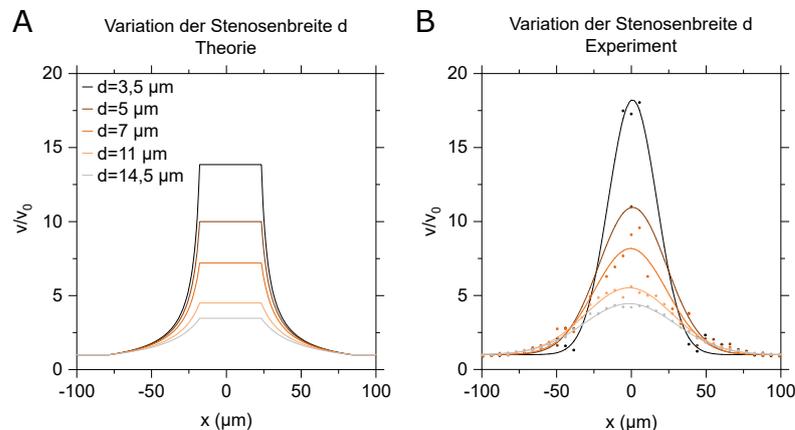
Durch den SURF Trackingcode werden Rosetten am Anfang des Kanals erkannt, und entlang des Kanals verfolgt. Jede Rosette wird nach ihrer Größe zu Beginn der Trajektorie in eine Klasse einsortiert, vgl. Kap. 4.4. Betrachtet man die Größenverteilung zu Beginn des Kanals für alle Messungen aus Kap. 5.3 in den Blutgruppen 0 und A, ergibt sich das Histogramm in Abb. 5.2. Die Größe einer Rosette wird in Vielfachen der Fläche eines einzelnen roten Blutkörperchens  $A_{RBK}$  angegeben. Die Klassengrenzen des Histogramms wurden wie folgt gewählt:  $1,5 A_{RBK}$ ;  $2,22 A_{RBK}$ ;  $3,33 A_{RBK}$ ;  $4,44 A_{RBK}$ ;  $5,56 A_{RBK}$ ;

7,78  $A_{\text{RBK}}$  und 30  $A_{\text{RBK}}$ , vgl. Kap. 4.4. Der Unterschied zwischen den Größenverteilungen von Rosetten der beiden Blutgruppen werden bei den Kleinsten (Klasse 1) und bei den Größten (Klasse 6) am deutlichsten. Klasse 1 und 2 ist in Blutgruppe 0 deutlich stärker vertreten, während in Blutgruppe A höhere Werte für die Klassen 5 und 6 erreicht werden. Im mittleren Größenbereich in Klasse 3 und 4 ist kein Unterschied festzustellen. Es ist bekannt, dass Rosetten in Blutgruppe A häufiger auftreten und größere Aggregate bilden, dieses Ergebnis ist also im Einklang mit der Literatur.

Wird eine Rosette nun bei Passage einer Stenose verfolgt, ordnet der SURF Algorithmus den Zustand der Rosette nach der Stenose entweder als (i) unbeschädigt, (ii) beschädigt oder (iii) vollständig zerlegt ein. Unbeschädigte Rosetten haben keinen Zellverlust erlitten, Beschädigte hingegen schon. Verliert eine Rosette jedoch so viele Zellen, dass kein Rest bleibt, der die Mindestgröße für eine Rosette von 1,5  $A_{\text{RBK}}$  übersteigt, wird von (iii) vollständiger Zerlegung gesprochen. Das Gegenstück hierzu, die Summe der Anteile in Zustand (i) unbeschädigt und (ii) beschädigt, wird als Überlebensrate bezeichnet. Die Farben der Balken in den Abbildungen 5.4 und 5.8 entsprechen diesen drei Zuständen: (i) unbeschädigt, grün, (ii) beschädigt, gelb, (iii) zerlegt, rot. Ein Balkendiagramm fasst pro Stenose und Blutgruppe jeweils die Ergebnisse aus 500 – 1500 Trajektorien von Rosetten der Klassen 2 – 6 zusammen. Die 90 % Konfidenzintervalle der gezeigten Experimente liegen durchweg unter 5 %. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit sind hier keine Fehlerbalken eingezeichnet. In Abb. 5.6 A sind die Konfidenzintervalle als Fehlerbalken in einer anderen Darstellung derselben Messdaten zu finden. Die genauen Werte sind als Zusatzmaterial zur Veröffentlichung in *Biomicrofluidics* [4] zugänglich.

## 5.2 Geschwindigkeit entlang der Stenose

Theoretisch verhält sich die Geschwindigkeit eines kleinen, im Fluss mitbewegten, Objekts bei Durchfließen einer Stenose nach der Kontinuitätsgleichung, Gl. 3.7, wie in Abb. 5.3 A dargestellt. Mit Verengen des Querschnitts von  $A_0$  auf  $A_d$  nimmt die Geschwindigkeit zu, ist im engsten Teil konstant, und nimmt symmetrisch wieder auf die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  ab. Für die fünf in dieser



**Abbildung 5.3:** Geschwindigkeit entlang der Stenose, normiert auf die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$ .

A) Theoretischer Verlauf nach Gleichung 3.23.

B) Mittlere Geschwindigkeit berechnet aus den Trajektorien der Rosetten der Klasse 3 aus jeweils einem Beispielexperiment mit  $v_0 \approx 1 \text{ cm/s}$ , beschrieben durch eine Gaußskurve. Die Beispielexperimente sind aus dem Datensatz zu Abb. 5.4 B, Blutgruppe 0. Die Fitkurven beruhen auf Gleichung 4.2.

Arbeit verwendeten Stenosen unterschiedlichen Querschnitts  $A_d$ , die bspw. in Abb. 5.1 A schematisch dargestellt sind, liegt das Plateau jeweils bei  $v/v_0 = A_0/A_d$ . Dieser Verlauf wird nun experimentell überprüft. Berechnet man die Geschwindigkeit der Rosetten aus den mit SURF ermittelten Trajektorien, ist anstelle eines Plateaus ein näherungsweise gaußförmiger Peak zu sehen, vgl. Abb. 5.3 B für die Geschwindigkeit von Rosetten der Klasse 3 aus einer Beispielmessung. Die Daten werden durch eine Gaußfunktion nach Gl. 4.2 angepasst. Die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  wird als Mittelwert im Anfangsbereich ermittelt, und dieser Fitparameter festgehalten. Je größer die Rosetten sind, desto mehr weichen die Werte für die Geschwindigkeit von Trajektorie zu Trajektorie voneinander ab, und desto ungenauer ist der Fit. Über eine solche statistische Unsicherheit hinaus ist jedoch kein systematischer Zusammenhang zwischen Größe oder y-z-Position der Rosetten und der Geschwindigkeit messbar.

Abb. 5.3 wirft die Frage auf, warum Theorie und Experiment hier so stark voneinander abweichen. Das

Glätten der Plateaukanten lässt sich durch die räumliche Ausdehnung der Rosetten erklären. Vor allem bei Eintritt in den engsten Teil der Stenose ist die Rosette sehr lang gezogen, oft länger als der engste Teil der Stenose lang ist. Deren Geschwindigkeit ist also eine Art gleitender Durchschnitt veränderlicher Breite. Der Peak der normierten Geschwindigkeit  $v_{\text{exp}}/v_0$  liegt zudem über dem erwarteten Wert  $v_{\text{theo}}/v_0$ . Das Abweichen des Verhältnisses  $v/v_0$  kann entweder durch überproportionales Beschleunigen auf  $v_{\text{exp}} > v_{\text{theo}}$  bedingt sein, oder aus der unterschiedlichen Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit resultieren. In der Theorie ist  $v_0$  die mittlere Geschwindigkeit  $v_0 = Q/A_0$ . Da die Geschwindigkeit der umgebenden Flüssigkeit aus den experimentellen Daten nicht zu bestimmen ist, handelt es sich in diesem Fall bei  $v_0$  um die Geschwindigkeit  $v_R$  der mitfließenden Rosetten. Bewegen sich diese nun bei großem Kanalquerschnitt langsamer als die Durchschnittsgeschwindigkeit  $v_M$ , und erreichen im engeren Teil zunehmend die Durchschnittsgeschwindigkeit, weil sie einen zunehmenden Anteil des Querschnitts selbst ausfüllen, folgt eine Überschätzung des Verhältnisses  $v/v_0$  im Experiment. Die Beobachtung  $v_{\text{theo}}/v_M < v_{\text{exp}}/v_R$  entspräche also bei  $v_{\text{theo}} = v_{\text{exp}}$  einer Unterschätzung der Anfangsgeschwindigkeit  $v_0 = v_R < v_M$ . Geht man von einem Poiseuilleflussprofil aus, und, wie im Experiment beobachtet, vorwiegend zentral orientierten Rosetten, die einen beträchtlichen Teil des Querschnitts einnehmen, ist davon auszugehen, dass  $v_R$  und  $v_M$  nahe beieinander liegen, bzw. dass sich die Rosetten, die die langsamen Randbereiche meiden, eher schneller als  $v_M$  als langsamer bewegen. Die Geschwindigkeit ist folglich bei Passage der Stenose um 10 – 30 % deutlicher erhöht, als theoretisch erwartet. Vermutlich liegt das daran, dass der Querschnitt  $A_d$  durch das Vorhandensein der Zellen effektiv reduziert ist.

### 5.3 Einfluss der maximalen Kompression

Zur Untersuchung des Einflusses der maximalen Kompression innerhalb der Stenose werden Stenosen fünf unterschiedlichen Durchmessers verwendet. Diese sind auf zwei verschiedene Arten in den Mikrofluidikkanal integriert. Zunächst wird das Verhalten von Rosetten in Stenosenkaskaden untersucht, bei denen jeweils vier kleiner werdende Stenosen hintereinander angeordnet sind, vgl. Abb. 5.4 A. Im Anschluss werden Einzelstenosen betrachtet, vgl. Abb. 5.4 B. Hier weist der Kanal über die gesamte Länge denselben Querschnitt auf, und ist lediglich an einer Stelle auf den Stenosendurchmesser  $d$  verengt.

#### Stenosenkaskade

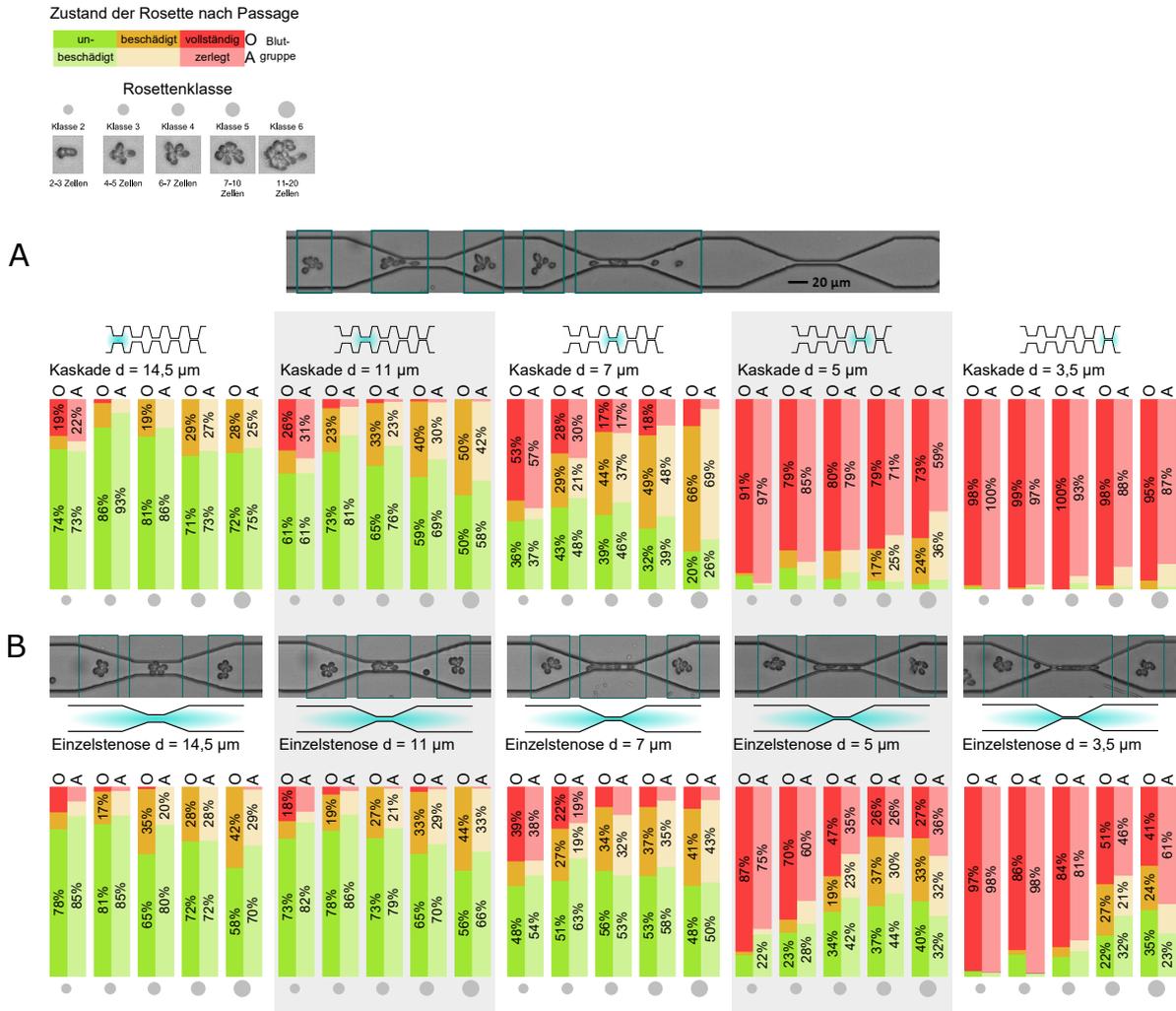
In einer „Stenosenkaskade“ lassen sich Rosetten unter stufenweise zunehmender Scherbelastung beobachten. Die resultierenden Balkendiagramme in Abb. 5.4 zeigen zunächst, dass zwischen der breitesten und der schmalsten Stenose alle Werte von 100 % bis 0 % Überlebensrate angenommen werden. Folglich sind für die untersuchten Flussraten, bzw. die durchmesserabhängigen Flussgeschwindigkeiten, die relevanten Stenosenbreiten hiermit vollständig abgedeckt, um im Körper auftretende Effekte mit hoher Wahrscheinlichkeit aufzuzeigen. Betrachtet man die Größenabhängigkeit innerhalb eines Stenosendurchmessers, erkennt man wie erwartet eine Abnahme der unbeschädigten Aggregate mit Zunahme der Größe, während der Anteil der Beschädigten allerdings so stark zunimmt, dass die Überlebensrate für größere Rosetten sogar steigt. Intuitiv erscheint das zunächst schwer nachvollziehbar, lässt sich aber mit der erhöhten Verformbarkeit und Flexibilität der größeren Rosetten erklären. Aus je mehr Zellen eine Rosette besteht, desto mehr Zellen kann sie verlieren, bevor sie vollständig zerlegt ist.

Vergleicht man die Überlebensrate für die beiden betrachteten Blutgruppen, erscheinen die Rosetten in Blutgruppe A wie erwartet stabiler zu sein als in Blutgruppe 0. Blutgruppe A Rosetten überstehen die zwei kleinsten Stenosen zu einem relativ um bis zu 24 % höheren Anteil, in den größeren Stenosen mit  $d = 7, 11, \text{ und } 14,5 \mu\text{m}$  liegt der Anteil der Unbeschädigten absolut stets circa 10 % über dem Vergleichswert aus Blutgruppe 0.

#### Einzelstenosen

Nun werden Einzelstenosen betrachtet, um vor jeder Stenose dieselbe Ausgangssituation zu schaffen. Im vorhergehenden Abschnitt waren mehrere, kleiner werdende Stenosen hintereinander angeordnet, hier weist jeder Kanal eine einzelne Stenose auf, vgl. Abb. 5.4 B. Form und Durchmesser der fünf Stenosen von  $d = 14,5 \mu\text{m}$  bis  $d = 3,5 \mu\text{m}$  bleiben dabei identisch.

Für die beiden größten Stenosen,  $d = 14,5 \mu\text{m}$  und  $d = 11 \mu\text{m}$ , unterscheiden sich die Ergebnisse aus den einzelnen Stenosen kaum von der Kaskade. Dies ist damit zu erklären, dass die erste, größte Stenose einer Kaskade im Prinzip dasselbe Experiment darstellt, wie eine einzelne Stenose gleicher



**Abbildung 5.4:** Verteilung auf die drei Zustände „unbeschädigt“ (grün), „beschädigt“ (gelb) und „vollständig zerlegt“ (rot) der Rosetten nach Passage einer Stenose

**A)** bei kaskadenartig angeordneten, kleiner werdenden Stenosen fünf unterschiedlicher Breiten von  $d = 14,5 \mu\text{m}$  (links) bis  $d = 3,5 \mu\text{m}$  (rechts). Die zugehörige Stenose ist jeweils hellblau im Schema der Kaskade markiert. Da der Bildausschnitt jeweils nur drei Stenosen abdecken kann, sind für diese Ergebnisse die Auswertungen aus Videos übereinandergelegt, die entweder die ersten drei, die mittleren drei oder die letzten drei Stenosen zeigen. Jeder Balken ist ein Mittelwert aus 3 – 4 unabhängigen Messungen bzw. 100 – 500 Trajektorien.

**B)** für Einzelstenosen fünf unterschiedlicher Breiten von  $d = 14,5 \mu\text{m}$  (links) bis  $d = 3,5 \mu\text{m}$  (rechts). Jeder Balken ist ein Mittelwert aus 2 – 3 unabhängigen Messungen bzw. 50 – 400 Trajektorien.

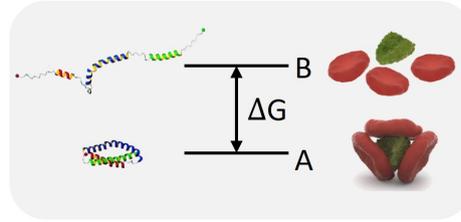
Die Fläche der grauen Kreise unten entspricht jeweils der Größe der Rosetten in der betreffenden Rosettenklasse 2 – 6, wie in Abb. 4.10 eingeführt. Die Ergebnisse in Blutgruppe A und 0 sind mit A bzw. 0 gekennzeichnet [4]. Oberhalb sind Beispiele für die Passage einer Rosette der jeweiligen Stenose gezeigt.

Größe. Erst bei den nachfolgenden Stenosen liegen unterschiedliche Voraussetzungen vor, und es sind dementsprechend Unterschiede in den Ergebnissen zu verzeichnen. Die Stenose mit  $d = 7 \mu\text{m}$  überstehen beispielsweise mehr Rosetten, wenn sie als Einzelstenose vorliegt, als im Kaskadenfall. Am deutlichsten wird der Unterschied zwischen Kaskade und Einzelstenose bei Passage der kleinsten Stenosen. Während die Überlebensrate bei  $d = 3,5 \mu\text{m}$  und  $d = 5 \mu\text{m}$  in der Kaskade nahezu von der Rosettenklasse unabhängig ist, nimmt dieser Anteil der Überlebenden in den Einzelstenosen gleicher Größe signifikant mit der Rosettengröße zu. Dies legt nahe, dass eine Rosette, die nicht vorbelastet ist, stabiler ist, als eine, die bereits eine andere, wenn auch etwas größere, Stenose passieren musste. Auch wenn eine Rosette also nach Passage einer Stenose noch intakt wirkt, scheinen die Bindungen gelockert zu sein und im Folgenden weniger Belastung standzuhalten. Das Aufrechterhalten bzw. Bilden von Rosetten im Körper unter ständiger Scherflusseinwirkung wird vermutlich auf ähnliche Art beeinträchtigt.

### 5.3.1 Thermodynamisches Modell: kritische Stenosenbreite

Aus der Sicht des Parasiten ist es nicht entscheidend, ob eine Rosette unbeschädigt, d.h. in Größe oder Zellanzahl konstant bleibt, sondern nur, ob die infizierte Zelle überhaupt von weiteren, schützenden Zellen umgeben ist. Aus diesem Grund liegt nun der Fokus auf der sogenannten Überlebensrate, also der Summe aus Unbeschädigten- und Beschädigtenanteil, bzw. dem Gegenstück zum Anteil der vollständig zerlegten Rosetten, und wie diese Überlebensrate von den umgebenden physikalischen Parametern abhängt.

**Abbildung 5.5:** Zweizustandssystem der Faltung eines Proteins, links [149], bzw. des Aggregationsgrads einer Rosette, rechts. Die Energieniveaus der beiden Zustände (A) gebunden bzw. gefaltet und (B) gelöst bzw. entfaltet unterscheiden sich um die Differenz der Gibbs'schen freien Energie  $\Delta G$ .



Die relevante physikalische Größe, die sich bei Variation des Durchmessers für eine passierende Rosette ändert, ist auf den ersten Blick die Scherrate. Im breiten Teil des Kanals liegt die mittlere Scherrate nach Gleichung 3.17 bei  $\dot{\gamma} \approx 250 \text{ s}^{-1}$ , bei Verengung des Kanals nimmt sie zu bis auf Werte von  $\dot{\gamma} \approx 3.500 \text{ s}^{-1}$  in der größten Stenose mit  $d = 14,5 \mu\text{m}$  bzw.  $\dot{\gamma} \approx 30.000 \text{ s}^{-1}$  in der kleinsten,  $d = 3,5 \mu\text{m}$  breiten, Stenose. Unsere Experimente zeigten allerdings, dass vergleichbare Scherratenwerte in unterschiedlicher Kanalarchitektur zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Das Vorhandensein der Zellen, die temporär den ganzen Stenosenquerschnitt ausfüllen können, führt vermutlich dazu, dass das Abschätzen der Scherrate ohne Einbezug der Zellen zu grob ist, beziehungsweise dass die Scherrate die physische Einschränkung der Rosetten nicht ausreichend beschreibt. Das Inverse des Stenosedurchmessers  $\frac{1}{d}$  ist deutlich besser geeignet, eine Stenose zu charakterisieren. Abb. 5.6 A zeigt also die Überlebensrate als Funktion der inversen Breite  $\frac{1}{d}$  basierend auf dem selben Datensatz wie die Balkendiagramme in Abb. 5.4 B.

Der Verlauf der Kurven in Abb. 5.6 A ähnelt der temperatur- oder kraftinduzierten Entfaltung von Proteinen oder RNA [150, 151, 152]. Auf dieser Grundlage verfolge ich hier den Ansatz, das Auseinanderbrechen von Rosetten entsprechend, wie in Abb. 5.5 dargestellt, als Zweizustandssystem zu beschreiben. Eine intakte Rosette stellt also das Analogon zu einem gefalteten Protein dar, und wird als thermodynamischer Zustand A bezeichnet. Zustand B in diesem Zweizustandssystem bezeichnet demzufolge das entfaltete Protein bzw. die in ihre Einzelteile zerlegte Rosette. Die bereits eingeführte Überlebensrate  $s$  entspricht dann der Besetzung des Zustands A

$$s = \frac{[A]}{[A] + [B]} \tag{5.1}$$

Während die Temperatur  $T$  der relevante Einflussparameter bei der temperaturinduzierten Proteinfaltung ist, wird diese Rolle hier von der inversen Breite  $1/d$  eingenommen. Konsequenterweise nehme ich einen linearen Zusammenhang der Energiedifferenz nach Gibbs  $\Delta G$  zwischen den zwei Zuständen und der inversen Breite  $1/d$  an.

$$\text{Rosette : } \Delta G = G_B - G_A \sim -\frac{1}{d} \quad (\text{Protein : } \Delta G = G_B - G_A \sim T) \tag{5.2}$$

Die Energiebarriere  $\Delta G(d)$  setzt sich folglich aus der Enthalpiedifferenz  $\Delta G_0$  in Ruhe, also ohne Fluss durch eine Engstelle, und einem Term  $-c/d$  zusammen, der über eine Proportionalitätskonstante  $c$  linear von  $1/d$  abhängt.

$$\Delta G(d) = \Delta G_0 - c \frac{1}{d} \quad (5.3)$$

Bezeichnet man die Breite  $d$ , bei der die Zustände A und B im Gleichgewicht sind, als Übergangsbreite  $d^*$ , gilt

$$\Delta G(d^*) = 0 \quad (5.4)$$

und somit

$$c = \Delta G_0 d^*. \quad (5.5)$$

Nimmt man eine Boltzmannverteilung an, erhält man über das Massenwirkungsgesetz für die Überlebensrate  $s$  den Ausdruck

$$s = \frac{[A]}{[A] + [B]} = \frac{1}{1 + [B]/[A]} = \frac{1}{1 + \exp(-\frac{\Delta G}{k_B T})} = \frac{1}{1 + \exp(-\frac{\Delta G_0(1 - \frac{d^*}{d})}{k_B T})}. \quad (5.6)$$

Diese Funktion  $s(1/d)$  dient als Fitfunktion für die Überlebensrate als Funktion der inversen Breite, siehe Abb. 5.6 A. Für jede Rosettenklasse erhält man so die zugehörigen Fitparameter  $\Delta G_0$  und  $d^*$ . Die freie Enthalpie  $\Delta G_0$  liegt im Bereich von  $4 - 6k_B T$ , hängt allerdings recht stark von der Wahl des Ansatzes für  $\Delta G$  ab. Deutlich robuster ist die Übergangsbreite  $d^*$ , vgl. Abb. 5.6 B. Die Übergangsbreite  $d^*$  ist die kritische Breite einer Stenose, bei der 50 % der Rosetten die Passage überstehen.

Abb. 5.6 B zeigt unverkennbar die Korrelation von Rosettengröße und Übergangsbreite  $d^*$ . Der Unterschied zwischen den Blutgruppen ist weniger deutlich. Wie bereits erwähnt, können größere Aggregate durch ihre erhöhte Flexibilität kleinere Engstellen passieren. Folglich sind die höheren Übergangsbreiten für Blutgruppe 0 mit einer erhöhten Stabilität der Rosetten gleicher Größe in Blutgruppe A zu erklären. Die Ergebnisse für  $d^*$  in Klasse 6 folgen nicht derselben Systematik aus den Klassen 2 – 5, allerdings liegen hier die Breiten der 90 % Konfidenzintervalle der Überlebensraten bei sehr hohen Werten von  $\sim 20$  %. Da die Kurven in den Klassen 5 und 6 kaum die 50 % Linie unterschreiten, treten hier auch die größten Unsicherheiten bei der Bestimmung des Fits auf. Außerdem ist zu beachten, dass es sich bei Klasse 5 und 6 um Zellaggregate aus mindestens 7 – 20 Zellen handelt, die wahrscheinlich nicht nur eine infizierte Zelle, sondern zwei oder mehr Zentren aufweisen. Diese teilweise Veränderung der Beschaffenheit der Rosetten beeinträchtigt sicherlich die Klarheit des Ergebnisses.

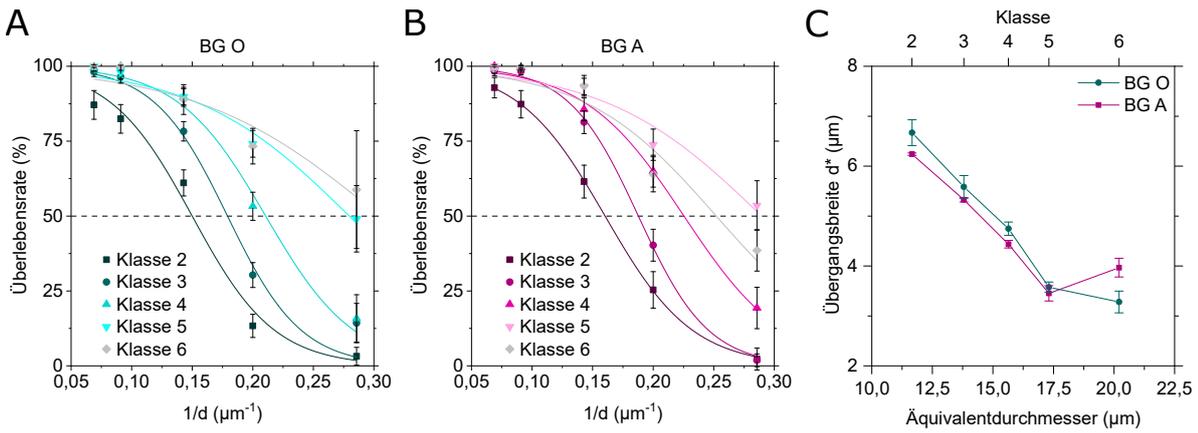
### 5.3.2 Effektive Überlebensrate

Für die Überlebensrate einer Rosettenpopulation spielen zwei Faktoren eine Rolle, die vom Stenosendurchmesser  $d$  und von der Aggregatklasse  $k$  abhängen: Einmal die Überlebensrate  $s(k, d)$  als Funktion von Stenosendurchmesser  $d$  und Klasse  $k$ , und zum Anderen die Häufigkeitsverteilung  $h(k)$  der Rosetten auf die unterschiedlichen Klassen. Diese beiden Faktoren werden durch die „effektive Überlebensrate“  $s_{\text{eff}}$  zusammengefasst ausgedrückt, vgl. Abb. 5.7. Für eine feste Stenosbreite  $d$  ist die effektive Überlebensrate die Summe über die mit den relativen Häufigkeiten  $h(k)$  gewichteten Überlebensraten der einzelnen Klassen  $s(k, d)$

$$s_{\text{eff}}(d) = \sum_{k=2}^6 s(k, d) \cdot h(k). \quad (5.7)$$

Die resultierende effektive Überlebensrate, vgl. Abb. 5.7 C, nimmt mit dem Stenosendurchmesser zu. In Blutgruppe A ergeben sich stets höhere Werte als in Blutgruppe 0. Um den in dieser Darstellung kleinen Unterschied zwischen den Blutgruppen genauer herauszuarbeiten, wird in Abb. 5.7 D die relative Abweichung der effektiven Überlebensrate in Blutgruppe A bezogen auf Blutgruppe 0 betrachtet. In den Randbereichen, in denen die Überlebensrate entweder nahe bei 0 %, für die kleinste Stenose, oder bei knapp 100 %, für die größte Stenose, liegt, fallen die Ergebnisse für die beiden Blutgruppen zusammen. Am deutlichsten dominieren die Rosetten aus Blutgruppe A bei einem Stenosendurchmesser

## 5. Passage unterschiedlicher Stenosen

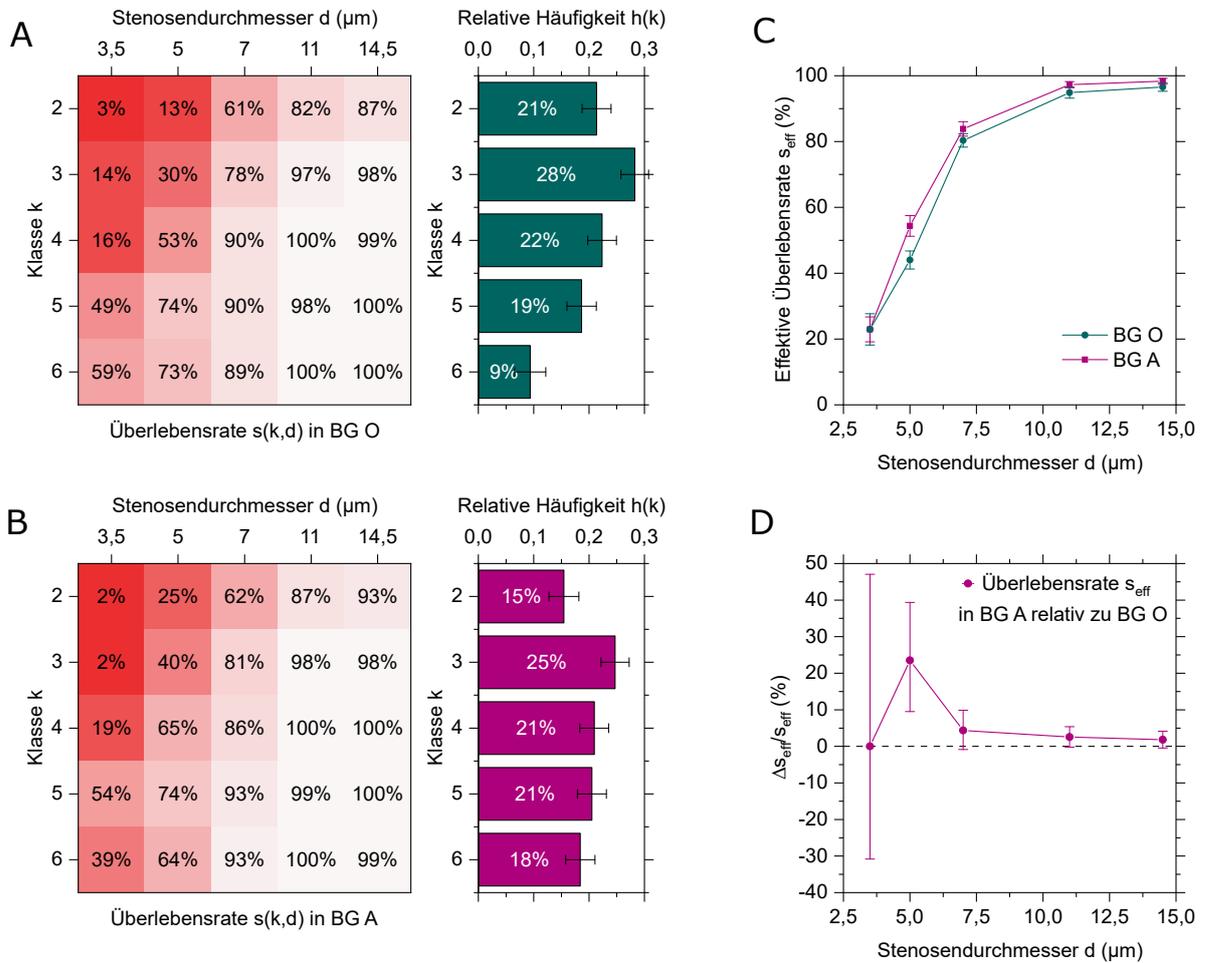


**Abbildung 5.6:** Scherflussinduzierte Zerlegung von Rosetten.

**A)** Überlebensrate für Rosetten der Klassen 2 – 6 als Funktion der inversen Stenosenbreite bei Passage von Einzelstenosen fünf unterschiedlicher Breiten von  $d = 14,5$   $\mu\text{m}$  bis  $d = 3,5$   $\mu\text{m}$  mit Fit nach Gleichung 5.6. Die Werte sind jeweils Mittelwerte aus 2 – 3 unabhängigen Messungen bzw. 50 – 400 Trajektorien. Die Fehlerbalken stellen die 90 % Konfidenzintervalle dar.

**B)** Übergangsbreite  $d^*$ , die sich für jede Klasse aus dem Fit in A) ergibt, als Funktion des Äquivalentdurchmessers (vgl. Abb. 4.10) einer Rosette der entsprechenden Klasse aufgetragen. Die Übergangsbreite  $d^*$  ist die kritische Breite einer Stenose, bei der 50 % der Rosetten die Passage überstehen [4].

von  $d = 5$   $\mu\text{m}$ . Dieser Durchmesser entspricht genau der Übergangsbreite  $d^*$  für mittelgroße Rosetten, vgl. Abb. 5.6 B. Hier könnte genau der ausschlaggebende Grund liegen, warum nicht nur einzelne Rosetten in Blutgruppe A stabiler erscheinen, sondern auch warum Patienten mit Blutgruppe A häufiger einen dramatischen Krankheitsverlauf erleiden.



**Abbildung 5.7:** Effektive Überlebensrate einer Rosettenpopulation in Blutgruppe A im Vergleich zu Blutgruppe 0 [4].

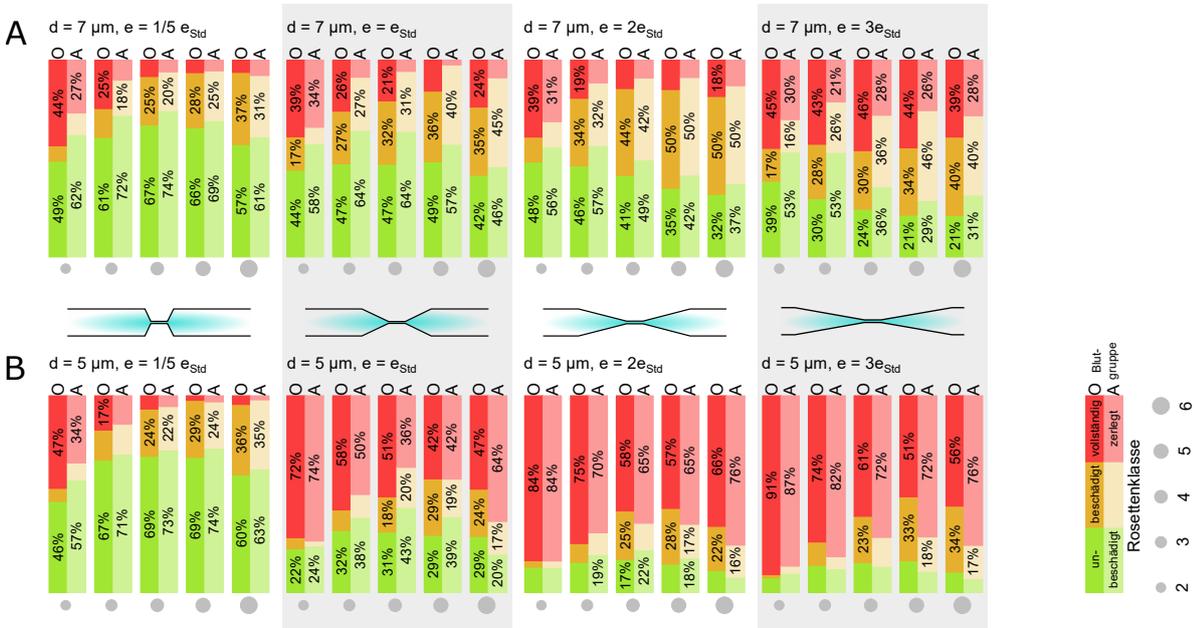
**A)** Überlebensrate  $s(k, d)$  für die Rosettenklassen 2 – 6 und dazugehörige initiale Häufigkeitsverteilung  $h(k)$  für Blutgruppe 0 und **B)** für Blutgruppe A.

**C)** Die effektive Überlebensrate  $s_{\text{eff}}$ , vgl. Gl. 5.7, fasst die größenabhängigen Größen aus A) bzw. B) zu einer Größe zusammen, die die Überlebensrate der ganzen Population beschreibt.  $s_{\text{eff}}$  ist die Summe über die mit den relativen Häufigkeiten  $h(k)$  gewichteten Überlebensraten der einzelnen Klassen  $s(k, d)$  aus Abb. A bzw. B.

**D)** Relativer Unterschied der effektiven Überlebensrate  $\Delta s_{\text{eff}}/s_{\text{eff}} = (s_{\text{eff,BGA}} - s_{\text{eff,BG0}})/s_{\text{eff,BG0}}$  in Blutgruppe A bezogen auf das Ergebnis in Blutgruppe 0.

## 5.4 Einfluss der Elongation

Bei Durchfließen einer Stenose wird ein Objekt nicht nur lateral durch die sich verengenden Wände und Flusslinien komprimiert, sondern auch durch die Beschleunigung in Flussrichtung elongiert. Der Einfluss dieser Elongationskomponente wird hier anhand unterschiedlich steiler Stenosen untersucht. Die Standardlänge beträgt  $e_{Std} = 55 \mu\text{m}$ , dazu kommt eine verkürzte, steilere Stenose mit  $e_{0,2x} = 1/5 e_{Std}$  und zwei flachere, auf das Doppelte mit  $e_{2x} = 2e_{Std}$  und das Dreifache mit  $e_{3x} = 3e_{Std}$  verlängerte Varianten. Die Breite  $d$  wird einmal bei  $d = 5 \mu\text{m}$  und einmal bei  $d = 7 \mu\text{m}$  festgehalten.



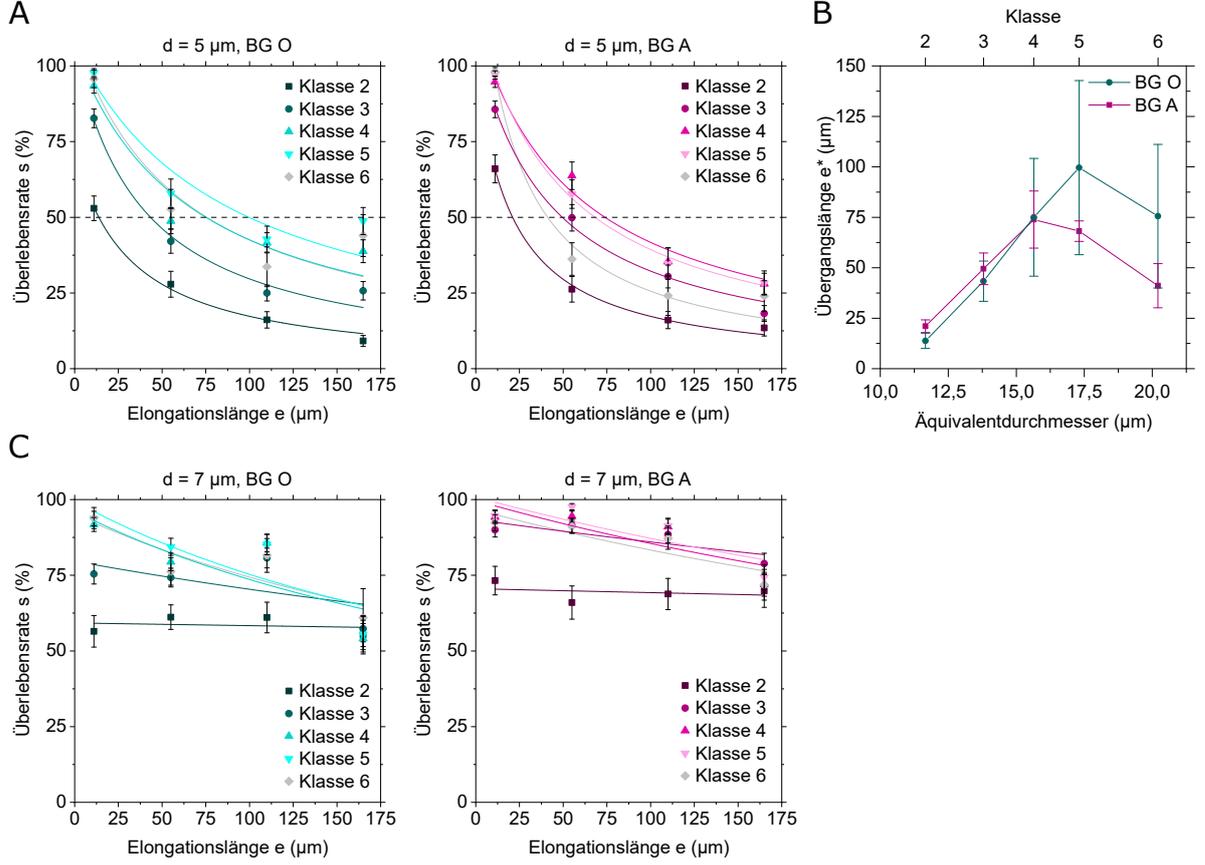
**Abbildung 5.8:** Der Zustand einer Rosette nach Passage einer Stenose ist entweder „unbeschädigt“ (grün), „beschädigt“ (gelb) oder „vollständig zerlegt“ (rot). Hier ist die Verteilung auf diese drei Zustände für Stenosen zwei unterschiedlicher Breiten **A)**  $d = 7 \mu\text{m}$  und **B)**  $d = 5 \mu\text{m}$  und vier unterschiedlicher Elongationslängen dargestellt. Die Standardlänge ist  $e_{Std} = 55 \mu\text{m}$ , dazu kommt eine verkürzte Stenose mit  $e_{0,2x} = 1/5 e_{Std}$  und zwei verlängerte mit  $e_{2x} = 2e_{Std}$  und  $e_{3x} = 3e_{Std}$ . Die Fläche der grauen Kreise unten entspricht jeweils der Größe der Rosetten in der betreffenden Rosettenklasse 2 – 6, wie in Abb. 4.10 eingeführt. Die Ergebnisse in Blutgruppe A und O sind mit A bzw. O gekennzeichnet.

In Abb. 5.8 ist der Anteil der unbeschädigten, der beschädigten und der vollständig zerlegten Rosetten in Form von Balkendiagrammen gezeigt. Hier setzt sich fort, was im vorhergehenden Abschnitt beschrieben wurde, vgl. Abb. 5.4. Der Anteil der vollständig zerlegten Rosetten, dargestellt durch rote Balken, ist stets für kleinere Rosetten größer als für größere, und für die engeren Stenosen mit  $d = 5 \mu\text{m}$  höher als für die breitere mit  $d = 7 \mu\text{m}$ . Der Einfluss des neuen Parameters Elongationslänge ist deutlich. Je länger die Stenose, desto weniger Rosetten überstehen die Passage. Vergleicht man die Überlebensrate, d.h. die Summe aus unbeschädigten und beschädigten Anteilen, für die beiden Durchmesser  $d = 5 \mu\text{m}$  und  $d = 7 \mu\text{m}$ , genauer für ein festes  $e$ , lässt sich bei der steilsten Stenose mit  $e_{0,2x}$  kaum ein Unterschied feststellen, während für die längeren Stenosen die Überlebensrate in der etwas breiteren Stenose jeweils deutlich höher ausfällt. Hier fällt jedoch auf, dass sich bei  $d = 7 \mu\text{m}$  die Änderung der Elongation deutlich schwächer auswirkt. Für alle Werte von  $e$  bewegt sich die Überlebensrate hier im Mittel über alle Klassen zwischen 75 % und 90 %. Für die engere Stenose mit  $d = 5 \mu\text{m}$  decken die Ergebnisse einen deutlich breiteren Bereich von 30 % bis 85 % ab. Je länger die Stenose, desto weniger Rosetten bleiben intakt. Ein abruptes Verengen des Kanals scheint die Rosetten weniger anzugreifen, als das kontinuierliche Auseinanderziehen in den längeren Stenosen. Ursache könnte, zusätzlich zur direkten Streckung, die längere Aufenthaltszeit in einem Abschnitt erhöhter Scherrate in den längeren Stenosen sein. Die Abhängigkeit von der Rosettengröße zeigt die aus Kapitel 5.3 bekannte Charakteristik. Von Klasse 3 aufsteigend zu Klasse 6 nimmt der Anteil der Unbeschädigten ab, der Anteil der Beschädigten jedoch so stark zu, dass die Überlebensrate insgesamt mit der Größe zunimmt. Vergleicht man Rosetten der Blutgruppen O und A, zeigt sich meist wie erwartet eine um 5 – 15 % erhöhte Überlebensrate in Blutgruppe A. Eine Ausnahme bilden die Ergebnisse zur zwei- und dreifachen Elongation bei  $d = 5 \mu\text{m}$ . Hier ist der Anteil der beschädigten

Rosetten in Blutgruppe 0 so hoch, dass die Überlebensrate in Blutgruppe 0 die in Blutgruppe A übersteigt.

### 5.4.1 Kritische Stenosenlänge

Der Einfluss der Elongationslänge auf die Überlebensrate wird nun genauer betrachtet. In Anlehnung an Abb. 5.6 und die dort eingeführte Übergangsbreite  $d^*$  zeigt Abb. 5.9 die Überlebensrate  $s$  als Funktion der Elongationslänge  $e$ . Eine Invertierung der Länge ist hier nicht zielführend. Für die Stenosen mit



**Abbildung 5.9:** Elongationsinduzierte Zerlegung von Rosetten.

**A)** Überlebensrate für Rosetten der Klassen 2 – 6 in Blutgruppe 0 (links) und Blutgruppe A (rechts) als Funktion der Elongationslänge bei Passage von Einzelstenosen vier unterschiedlicher Längen von  $e = e_{0,2x} = 11 \mu\text{m}$  bis  $e = e_{3x} = 165 \mu\text{m}$  und fester Breite  $d = 5 \mu\text{m}$  mit Fit nach Gleichung 5.8. Die Fehlerbalken stellen die 95 % Konfidenzintervalle dar.

**B)** Übergangslänge  $e^*$ , die sich für jede Klasse aus dem Fit in A) mit Gl. 5.9 ergibt, als Funktion des Äquivalentdurchmessers (vgl. Abb. 4.10) einer Rosette der entsprechenden Klasse aufgetragen. Die Übergangslänge  $e^*$  ist die kritische Elongationslänge einer Stenose, bei der 50 % der Rosetten die Passage überstehen.

**C)** Überlebensrate als Funktion der Elongationslänge bei Passage von  $d = 7 \mu\text{m}$  breiten Einzelstenosen. Alle anderen Parameter sind aus A) übernommen. Da die 50 % Marke hier nie unterschritten wird, dient der Fit hier lediglich der Übersichtlichkeit. Eine Übergangslänge wie in B) wird hier nicht angegeben.

$d = 5 \mu\text{m}$ , vgl. Abb. 5.9 A, lassen sich die sich ergebenden Kurven  $s(k, e)$  für jede Klasse  $k$  durch Hyperbeln der Form

$$s(k, e) = \frac{1}{p + qe} \quad (5.8)$$

mit Anpassungsparametern  $p$  und  $q$  näherungsweise beschreiben, ohne dass ein Modell hierfür zugrunde liegt. Analog zur Übergangsbreite  $d^*$  definiere ich hier die Übergangslänge  $e^*$  bei einer Überlebensrate von 50 %. Mit  $s(e^*) = 0,5$  ergibt sich

$$e^* = \frac{1 - 0,5p}{0,5q}. \quad (5.9)$$

Die Parameter der Kurven in Abb. 5.9 A nehmen Werte von  $p \approx 1$  und  $q \approx 0,02$  an, dementsprechend liegen die Übergangslängen mit  $e^* \approx 50 \mu\text{m}$  im experimentell verwendeten Bereich, und nehmen von Klasse 2 bis 5 mit der Aggregatgröße zu, vgl. Abb. 5.9 B. Der Unterschied zwischen den Blutgruppen 0 und A ist hier nicht signifikant. Bei der etwas breiteren Stenose mit  $d = 7 \mu\text{m}$  spielt die Elongationslänge, wie oben bereits erwähnt, im untersuchten Rahmen keine nennenswerte Rolle. Die Hyperbeln in Abb. 5.9 C unterschreiten die 50 % Schranke nie. Aus den Parametern  $p \approx 1$  und  $q \approx 0,002$  ergeben sich hypothetische Übergangslängen von  $e^* \approx 500 \mu\text{m}$ .

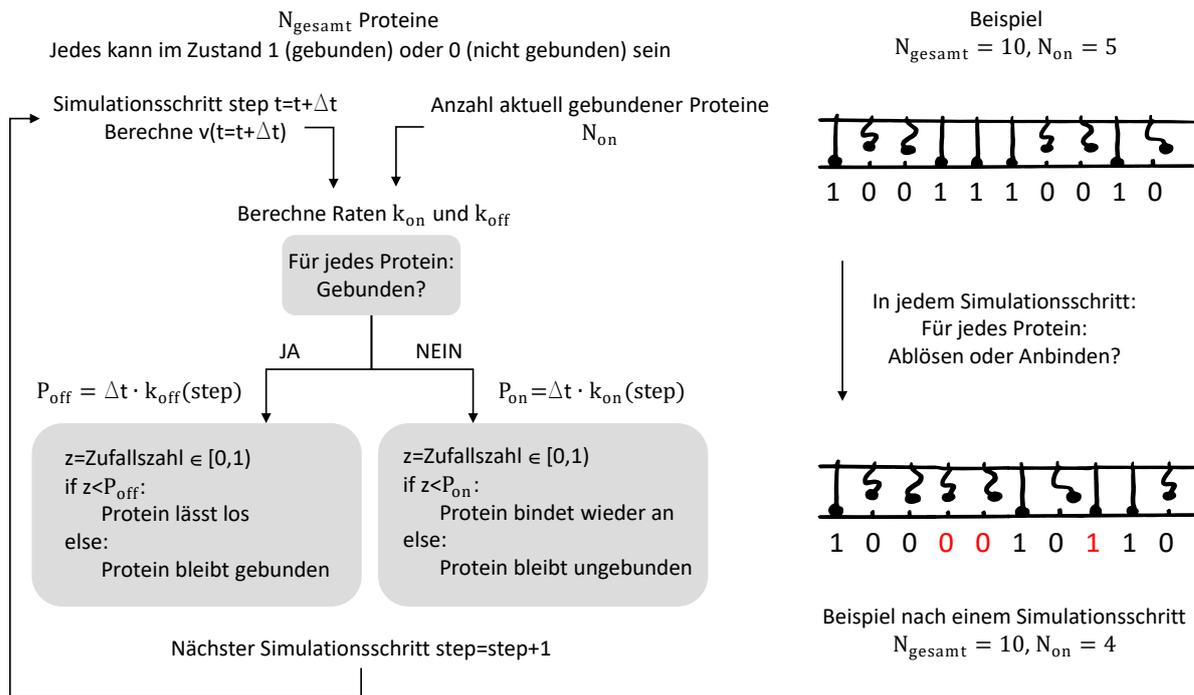
Die Form der Stenose bestimmt also die Passierbarkeit von Rosetten maßgeblich. Dabei ist zunächst der engste Durchmesser  $d$  relevant. Ist dieser eng genug, dass die Rosetten merklich beeinträchtigt werden, spielt zusätzlich die Länge des Zulaufs  $e$  eine Rolle. Eine abrupte Verengung ist weniger fatal als das kontinuierliche Verengen über eine längere Strecke. Ein Material, das einem kurzen Kraftimpuls besser standhält als einer kontinuierlichen Belastung, ist scherverdickend oder viskoelastisch. Vollblut verhält sich zunächst scherverdünnend, da sich die roten Blutkörperchen bei abnehmendem Gefäßdurchmesser geldrollenartig stapeln und somit im Gefäßinneren verdichten, wobei ein zellarmer Randbereich entsteht, der das Blut leichter fließen lässt. Die Viskosität ist dadurch effektiv herabgesetzt. Unterhalb eines Gefäßdurchmessers von  $10 \mu\text{m}$  füllt eine Zelle einen so großen Anteil des Gefäßes aus, dass weder die Geldrollenbildung noch der zellarme Plasmafilm aufrecht erhalten bleiben. Die Viskosität nimmt für kleinere Durchmesser daher wieder zu [153]. Im Experiment wird kein Vollblut verwendet, dennoch könnte das scheinbare Scherverdicken auch hier durch Ausfüllen des Querschnitts durch Zellen auftreten. Außerdem wird die Geldrollenbildung, auf der die Scherverdünnung von Blut beruht, durch das Vorliegen der Zellen in Rosettenform verhindert. Durch die zwei Zeitskalen einer instantanen Verformung der ganzen Rosette und dem räumlichen Rearrangieren der Zellen können die Aggregate viskoelastische Eigenschaften zeigen. Wie stark die Zellen gegeneinander verschoben werden, und ob die Bindungen dies überdauern, hängt vermutlich hauptsächlich mit der Aufenthaltsdauer in und somit der Elongationslänge der Stenose zusammen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wird eine einfache Simulation der Proteinkinetik herangezogen.

### 5.4.2 Simulation der Protein-Bindungskinetik

Da die Haftung der Zellen durch Proteine vermittelt wird, wird im Folgenden ein theoretisches Modell solcher Proteine beschrieben. Zugrunde liegt das Prinzip, dass ein Protein entweder im Zustand gebunden oder abgelöst sein kann, und innerhalb einer Zeitspanne  $\Delta t$  mit einer Wahrscheinlichkeit  $P$ , die sich aus dem Produkt der Ab- bzw. Anbinderate  $k$  und der Zeitspanne  $\Delta t$  zusammensetzt

$$P_{\text{on}} = k_{\text{on}}\Delta t, \quad P_{\text{off}} = k_{\text{off}}\Delta t, \quad (5.10)$$

in den jeweils anderen Zustand übergeht. Für ein einzelnes Protein lässt sich also ein einfaches Zufallsexperiment durchführen, indem pro Zeit- bzw. Simulationsschritt jeweils eine Zufallszahl  $z \in [0, 1)$  bestimmt und mit der Wahrscheinlichkeit  $P$  verglichen wird. Auf diese Weise lässt sich beispielsweise die durchschnittliche Lebensdauer einer Bindung bestimmen. Simuliert man das Verhalten mehrerer solcher Proteine parallel, lässt sich das Modell auf das Lösen bzw. den Zusammenhalt ganzer Zellaggregate übertragen.



**Abbildung 5.10:** Schema Simulation Protein-Bindungskinetik. In jedem Simulationsschritt wird für jedes der  $N_{\text{gesamt}}$  Proteine unter Verwendung einer Zufallszahl und einer von der Kanalgeometrie und der Anzahl der aktuell gebundenen Proteine abhängigen Rate entschieden, ob das Protein seinen Zustand ändert.

Konkret umgesetzt ist die Simulation wie in Abb. 5.10 schematisch dargestellt. Zunächst wird eine intrinsische Ab- und Anbinderate  $k_{\text{on},0}$  und  $k_{\text{off},0}$  festgelegt. Die anfängliche Gleichgewichtskonstante  $K$

$$K = \frac{k_{\text{on},0}}{k_{\text{on},0} + k_{\text{off},0}} \quad (5.11)$$

legt fest, wie viele der  $N_{\text{gesamt}}$  Proteine zu Anfang „gebunden“ sind. Das bedeutet  $N_{\text{on},0} = KN_{\text{gesamt}}$ . Im Beispiel in Abb. 5.10 sind von den  $N_{\text{gesamt}} = 10$  Proteinen zu Anfang  $N_{\text{on},0} = 5$  Proteine im gebundenen Zustand „1“, die übrigen  $N_{\text{gesamt}} - N_{\text{on},0} = 5$  im nicht gebundenen Zustand „0“.

In jedem Simulationsschritt findet nun für jedes Protein ein Zufallsexperiment statt. Hierfür müssen die Raten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  bekannt sein. Allgemein ist die Rate nach Kramers abhängig von der auf das Protein wirkenden Kraft  $F$  und dem Abstand zwischen Ausgangs- und Übergangszustand  $x$ , vgl. Teil I Gleichung 4.4,

$$k \sim \exp\left(\frac{Fx}{k_B T}\right). \quad (5.12)$$

## 5. Passage unterschiedlicher Stenosen

Nach Gleichung 3.37 ist die auf das Aggregat wirkende Kraft abhängig von  $v^2$

$$F_{\text{Stenose}} \sim v^2. \quad (5.13)$$

Um das Experiment der Passage einer Stenose nachzubilden, muss also die Entwicklung der Geschwindigkeit  $v(t)$  in die Berechnung der Rate eingehen. Die Kraft pro Protein lässt sich durch die Anzahl der Proteine auf der Oberfläche eines infizierten roten Blutkörperchens abschätzen. Die Oberfläche weist ca. 1000 *knobs* auf, auf denen jeweils ca. 100 Proteine exprimiert sind [154], das ergibt  $N_{\text{Proteine}} \approx 100.000$ . Der Quotient  $F_{\text{Stenose}}/N_{\text{Proteine}}$  wird durch das Produkt eines konstanten Vorfaktors  $c$  und dem Quadrat der Geschwindigkeit ausgedrückt.

$$k_{\text{on}} = k_{\text{on},0} \exp(-c_{\text{on}}v^2) \quad (5.14)$$

$$k_{\text{off}} = k_{\text{off},0} \exp(c_{\text{off}}v^2) \quad (5.15)$$

Außerdem verteilt sich die Kraft ausschließlich auf die gebundenen Proteine. Die Kraft muss also um den Faktor  $N_{\text{gesamt}}/N_{\text{on}}$  korrigiert werden.

$$k_{\text{on}} = k_{\text{on},0} \exp\left(-\frac{N_{\text{gesamt}}}{N_{\text{on}}}c_{\text{on}}v^2\right) \quad (5.16)$$

$$k_{\text{off}} = k_{\text{off},0} \exp\left(\frac{N_{\text{gesamt}}}{N_{\text{on}}}c_{\text{off}}v^2\right) \quad (5.17)$$

Die festen Parameter  $k_{\text{on},0}$ ,  $k_{\text{off},0}$ ,  $c_{\text{on}}$  und  $c_{\text{off}}$  und damit die Anfangsbedingungen werden folgendermaßen festgelegt:

$$k_{\text{on},0} = 1000 \quad (5.18)$$

$$k_{\text{off},0} = 200 \quad (5.19)$$

$$c_{\text{on}}v^2 = c_{\text{off}}v^2 = \frac{F_{\text{Stenose}}x}{N_{\text{Proteine}}k_B T} = \frac{\frac{1}{2}\rho C_W A_S v^2 x}{k_B T} \quad (5.20)$$

$$\approx \frac{\frac{1}{2}1000 \text{ kg/m}^3 \cdot 24/0,1 \cdot \pi(12 \text{ }\mu\text{m})^2 v^2 \cdot 1 \text{ nm}}{10^5 \cdot 4,11 \cdot 10^{-21} \text{ J}} \quad (5.21)$$

$$\approx 130 \frac{\text{s}^2}{\text{m}^2} v^2 \quad (5.22)$$

Beispielhaft ist hier ein Rosettenradius von  $r = 12 \text{ }\mu\text{m}$  gewählt. Für andere Rosettengrößen ergeben sich entsprechend verschiedene Werte zwischen  $c_{\text{on}} = 90$  für  $r = 10 \text{ }\mu\text{m}$  und  $c_{\text{on}} = 200$  für  $r = 15 \text{ }\mu\text{m}$ . Außerdem hängt der Wert von der Wahl der charakteristischen Bindungslänge  $x = 1 \text{ nm}$  und der Reynoldszahl ab, die hier konstant bei  $Re = 0,1$  gehalten wird.

Um den Geschwindigkeitsverlauf einer Stenose nachzubilden, wird in jedem Zeitschritt mit der aktuellen Geschwindigkeit der zurückgelegte Weg  $\Delta x$  berechnet, und an der neuen Position über den aktuellen Durchmesser  $d$  abhängig von Elongationslänge  $e$  und Länge des engsten Teils der Stenose  $l$  die neue Geschwindigkeit berechnet. Der Durchmesser ist abschnittsweise definiert:

$$d(x = 0) = d_1, \quad v(x = 0) = v_0 \quad (5.23)$$

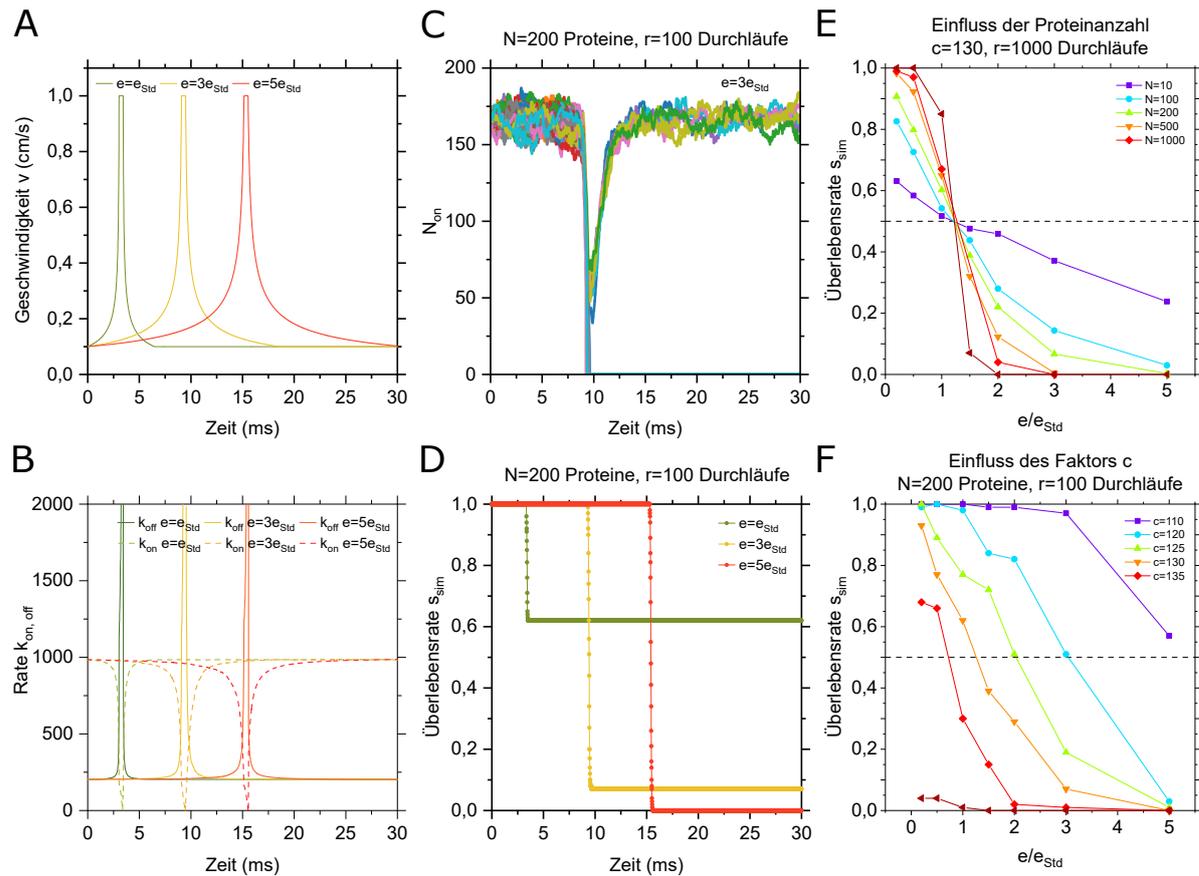
$$d(x < e) = d_1 - \frac{(d_1 - d_2)x}{e}, \quad v(x) = v_0 \frac{d_1}{d(x)} \quad (5.24)$$

$$d(e \leq x \leq e + l) = d_2, \quad v(x) = v_0 \frac{d_1}{d_2} \quad (5.25)$$

$$d(e + l \leq x \leq 2e + l) = d_1 + \frac{(d_1 - d_2)(x - 2e - l)}{e}, \quad v(x) = v_0 \frac{d_1}{d(x)} \quad (5.26)$$

$$d(x > 2e + l) = d_1, \quad v(x) = v_0 \quad (5.27)$$

So lässt sich für jeden Zeitschritt  $\Delta t$  entsprechend die Änderung der Position  $\Delta x(t) = v(x) \cdot \Delta t$  und damit die Geschwindigkeit  $v(t)$  schrittweise über  $v(t + \Delta t) = v(x + \Delta x)$  berechnen. Beispiele für drei unterschiedlich lange Stenosen sind in Abb. 5.11 A zu finden. Die Geschwindigkeit geht dann maßgeblich in die An- und Abbinderaten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  ein, vgl. Abb. 5.11 B.



**Abbildung 5.11:** **A)** Geschwindigkeit und **B)** Ab- und Anbinderaten für drei verschiedene Elongationslängen mit  $N_{\text{gesamt}} = 200$  und  $c = 130$ .

**C)** Simulationsergebnis  $N_{\text{on}}(t)$  für  $N_{\text{gesamt}} = 200$ ,  $e = 3e_{\text{Std}}$  und 100 Durchläufe und **D)** Überlebensrate als Funktion der Zeit für  $e = e_{\text{Std}}$ ,  $e = 3e_{\text{Std}}$  und  $e = 5e_{\text{Std}}$ .

**E)** Simulationsergebnis Überlebensrate als Funktion der Elongationslänge für unterschiedlich viele Proteine  $N_{\text{gesamt}}$ . Jeweils 1000 Durchläufe pro Datenpunkt, für  $N_{\text{gesamt}} = 1000$  sind es 100 Durchläufe.

**F)** Simulationsergebnis Überlebensrate als Funktion der Elongationslänge für  $N_{\text{gesamt}} = 200$  Proteine für verschiedene Werte von  $c$ .

## Überlebensrate für unterschiedliche Stenosen

Ist von den simulierten  $N_{\text{gesamt}}$  „Proteinen“ oder Bindungsstellen nach Passage der „Stenose“ noch mindestens eins gebunden, hat es „überlebt“, und es kann sich wieder das Gleichgewicht  $N_{\text{on},0}$ , das vor der Stenose herrschte, einstellen. Sind zu irgendeinem Zeitpunkt alle Proteine gleichzeitig abgelöst, gilt das Aggregat als aufgelöst, und ein Rückbinden ist nicht mehr möglich. Ein solches Aggregat hat „nicht überlebt“. Für mehrere Durchläufe  $r$  der Simulation mit einer Gruppe von  $N_{\text{gesamt}}$  Proteinen lässt sich anhand der Anzahl der Durchläufe, bei denen die Stenose überstanden wurde  $r(N_{\text{on,Ende}} > 1)$ , und der Gesamtzahl der Durchläufe  $r_{\text{gesamt}}$  eine Überlebensrate  $s_{\text{sim}}$

$$s_{\text{sim}} = \frac{r(N_{\text{on,Ende}} > 1)}{r_{\text{gesamt}}} \quad (5.28)$$

angeben. Diese simulierte Überlebensrate  $s_{\text{sim}}$  soll im Weiteren mit der experimentellen Überlebensrate  $s$  aus Kapitel 5.4 bzw. Abb. 5.9 A verglichen werden.

Zunächst werden Ergebnisse verschiedener Varianten der Simulation vorgestellt. Mit den Parametern  $v_0 = 0.01$  m/s,  $\Delta t = 10$   $\mu$ s,  $k_{\text{on},0} = 1000$  und  $k_{\text{off},0} = 200$  ergibt sich die Überlebensrate als Funktion der Elongationslänge wie in Abb. 5.11 E und F dargestellt. Der Verlauf hängt stark mit der für die Simulation gewählten Anzahl der Proteine und dem Faktor  $c$  zur Berechnung der Rate nach Gleichung 5.17 zusammen. Nach der Abschätzung Gl. 5.22 wurde  $c = 130$  angesetzt. Die Übergangslänge, bei der eine Überlebensrate von 50 % erreicht wird, verschiebt sich mit Erhöhen dieses Faktors  $c$  nach links zu kleineren Werten, vgl. Abb. 5.11 F. Für unterschiedliche Proteinanzahl ist die Übergangslänge konstant, die Kurve wird mit zunehmender Anzahl an simulierten Proteinen jedoch deutlich steiler, vgl. Abb. 5.11 E. Nach Vergleich mit Abb. 5.9 A, entspricht der Verlauf für  $c = 130$  und  $N_{\text{gesamt}} = 200$  Proteine bzw. Bindungsstellen am ehesten dem experimentellen Ergebnis. Auch der Wert der Übergangslänge mit  $e^* \approx 1,25e_{\text{Std}} = 69$   $\mu$ m liegt im Bereich der im Experiment ermittelten Übergangslängen von 50 – 100  $\mu$ m, vgl. Abb. 5.9 B.

Dieses Ergebnis wirft zwei Fragen auf: Warum hängt der Verlauf der Kurve  $s(e)$  so stark von der Wahl der Anzahl der Bindungsstellen ab? Und warum ergibt sich die aus dem Experiment bekannte Kurve gerade für  $N_{\text{gesamt}} = 200$ , wenn sich doch auf einem infizierten roten Blutkörperchen  $\sim 100.000$  Proteine befinden?

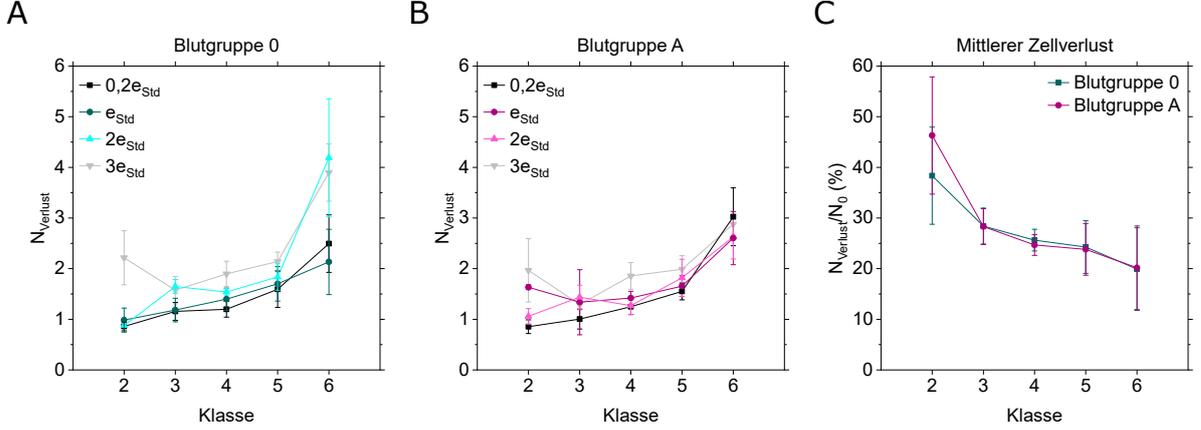
Zunächst greife ich vor zu Kapitel 6.2.2, in dem die Rolle der Belastungsgeschwindigkeit bei der Verformung von Zellaggregaten untersucht wird. Hier wird abgeschätzt, dass ca. 130 *knobs* an der Bindung beteiligt sind. Die Zahl von 100 – 200 Bindungsstellen scheint also tatsächlich plausibel zu sein. Dagegen ist es vermutlich nicht realistisch, die einzelnen, viel zahlreicheren Proteine unabhängig von ihrer unmittelbaren Umgebung zu betrachten. Genauer gesagt, müsste es in der Realität einen Unterschied geben, ob ein gebundenes Protein isoliert oder umgeben von ebenfalls gebundenen Proteinen geschützt ist. Dadurch können kooperative Effekte auftreten, die bewirken, dass sich die Gesamtheit der Bindungsstellen in der Realität eher wie einige hundert unabhängige Einheiten verhält, und nicht wie 100.000. Außerdem wird zu Anfang abgeschätzt, dass sich die Kompressionskraft, die auf das Zellaggregat im Fluss wirkt, auf die 100.000 Bindungsproteine verteilt. Diese Kraft wirkt jedoch nicht nur auf die Bindungen, sondern wird zum Teil auch in die Verformung der Einzelzellen umgesetzt.

Die Reduktion der Absolutwerte von  $k_{\text{on},0}$  und  $k_{\text{off},0}$  bei gleichem Verhältnis erhält im Wesentlichen Lage und Form der Stufe. Lediglich die Rückkehr zum Gleichgewicht läuft mit niedrigeren Absolutwerten langsamer, als während der starken Erhöhung der Werte beim Eingang in die Stenose. Um den Prozess nicht in ein deterministisches Regime zu rücken, muss  $P = k\Delta t$  deutlich kleiner 1 bleiben. Ein Deckeln der Rate mit  $P_{\text{max}} = 0,5$  hat keinen Einfluss auf die Ergebnisse, auch bei  $P_{\text{max}} = 0,1$  ist der Unterschied klein bzw. führt nur bei kurzen Elongationslängen zu höheren Überlebensraten. Auch das Verkürzen der Zeitschritte auf ein Zehntel ergab identische Kurven. Diese Ergebnisse sind hier nicht abgebildet, sie seien hier nur erwähnt, um die Wahl der Länge der Zeitschritte und das Unterlassen der Deckelung der Raten zu begründen.

Die eingangs aufgestellte Hypothese, dass es maßgeblich von der Aufenthaltsdauer in und somit der Elongationslänge der Stenose abhängt, ob die Bindungen die Passage einer Stenose überdauern, wird durch diese Simulationsergebnisse bekräftigt.

## 5.5 Zellverlust der beschädigten Rosetten

Der folgende Abschnitt widmet sich der Frage, wie viele Zellen Rosetten durchschnittlich bei Passage der beschriebenen Stenosen einbüßen. Wie in Kap. 4.5 erläutert, werden die Rosetten nach Schicksal in die Kategorien unbeschädigt, beschädigt und vollständig zerlegt sortiert. Bisher wurde nur die Überlebensrate betrachtet, die den Anteil der Unbeschädigten und der Beschädigten angibt. Nun liegt der Fokus in diesem Abschnitt explizit auf den Beschädigten. Es wird betrachtet, wie viele Zellen im Mittel jeweils abgetrennt werden. Für jede beschädigte Rosette wird zunächst die Verlustfläche aller vor



**Abbildung 5.12:** Im Mittel abgetrennte Zellen pro beschädigter Rosette nach Rosettenklasse bei Passage von Stenosen mit Stenosenbreite  $d = 5 \mu\text{m}$  und Elongationslänge  $e = 0, 2; 1; 2$  und  $3e_{\text{Std}}$  **A)** in Blutgruppe 0 und **B)** in Blutgruppe A.

**C)** Zellverlust bezogen auf die durchschnittliche Anzahl an Zellen einer Rosette der jeweiligen Klasse gemittelt über alle Elongationslängen. Das nach Rosettenanzahl gewichtete Mittel in **C)** über die Messreihen aus **A)** und **B)** ist somit unabhängig von der Elongationslänge.

dem Ende der Stenose registrierten *real rupture* Ereignisse aufsummiert. Die mittlere Verlustfläche aller beschädigten Rosetten innerhalb einer Messung  $A_{\text{Verlust}}$  wird durch die Fläche einer einzelnen Zelle  $A_{\text{RBK}}$  geteilt, um die Anzahl der verlorenen Zellen,  $N_{\text{Verlust}}$ , abzuschätzen

$$N_{\text{Verlust}} = \frac{A_{\text{Verlust}}}{A_{\text{RBK}}}. \quad (5.29)$$

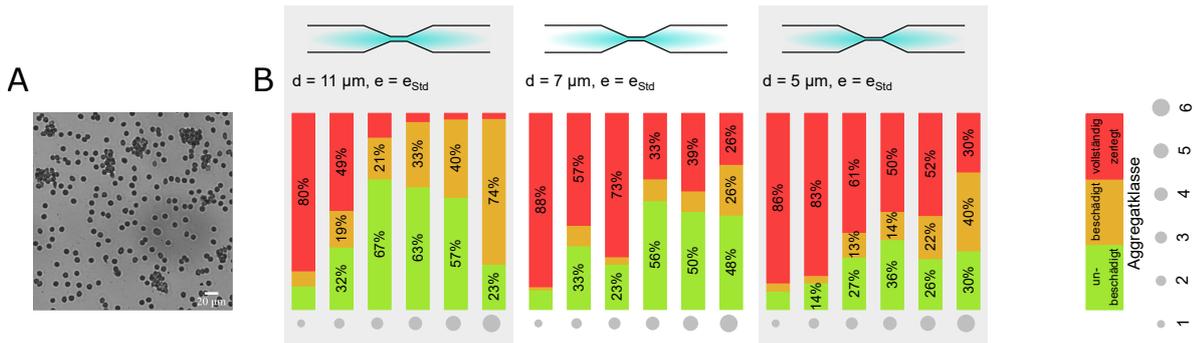
Abbildung 5.12 zeigt den Zellverlust bei Passage von Stenosen mit fester Stenosenbreite  $d = 5 \mu\text{m}$  und vier unterschiedlichen Elongationslängen  $e = 0, 2; 1; 2$  und  $3e_{\text{Std}}$  in Blutgruppe 0 und A. Zusammenfassend verlieren die kleinsten Rosetten ungefähr eine Zelle, die größten ungefähr drei Zellen. Die Messunsicherheit ist für die kleinsten Rosetten am größten, da hier der Fall „beschädigt“ am unwahrscheinlichsten ist. Eine Rosette der Klasse 2, die nur aus 2 – 3 Zellen besteht, kann kaum Zellen verlieren, ohne vollständig zerlegt zu werden. Insgesamt ergeben sich ähnliche Werte für beide Blutgruppen und alle Kanal designs. In der Messreihe für Blutgruppe 0, vgl. Abb. 5.12 A, ist der Zellverlust bei längerer Elongationslänge jedoch leicht erhöht. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen des vorhergehenden Kapitels. In den Abbildungen 5.8 und 5.9 ist zu sehen, dass der Anteil der vollständig zerlegten Rosetten ebenfalls mit der Elongationslänge zunimmt.

Ein höherer Zellverlust zellreicherer Rosetten scheint konsequent. Um zu bewerten, in welchem Verhältnis der zahlenmäßige Zellverlust  $N_{\text{Verlust}}$  zur Rosettengröße steht, wird nun der prozentuale Anteil  $N_{\text{Verlust}}/N_0$  an der für eine Rosette der jeweiligen Klasse mittleren Zellanzahl  $N_0$  betrachtet. Lässt man den Einfluss der Elongationslänge außer Acht, ergibt sich Abbildung 5.12 C. Hier fallen die Ergebnisse für die beiden Blutgruppen zusammen und liegen bei 20 % für die größten Rosetten bis 40 % für die kleinsten Rosetten. Absolut nimmt der Zellverlust mit der Rosettengröße also zu, der prozentuale Zellverlust nimmt dagegen mit der Rosettengröße ab.

Pathophysiologisch hängen diese Ergebnisse vermutlich damit zusammen, dass es für den Parasiten nicht entscheidend ist, wie viele Zellen die infizierte Zelle umgeben, solange eine Mindestgröße von 3 – 4 Zellen nicht unterschritten wird. Ist ein abschirmender Effekt bereits gewährleistet, sind zusätzliche Zellen eventuell nicht mehr förderlich und in engen Gefäßen gut zu entbehren.

## 5.6 Lektin-induzierte Aggregate als Modellsystem

Zur Beurteilung der speziellen Art der Bindung, die Rosetten bei Malariainfektion zusammenhält, und um deren Stabilität einordnen zu können, werden die gleichen Flussexperimente erneut zum Vergleich mit Lektin-induzierten Aggregaten als Modellsystem durchgeführt. Lektine binden an Membranrezeptoren von roten Blutkörperchen und führen so eine Verklumpung herbei, vgl. Kap. 2.4. Im Unterschied zu Rosetten, in denen eine infizierte Zelle das Zentrum bildet, von dem die Adhäsionsmoleküle ausgehen, sind bei Lektin-induzierter Aggregation alle Zellen gleichwertig. In Form und Größe ähneln sich die beiden Arten von Aggregaten jedoch überzeugend, vgl. Abb. 5.13 A [135]. Die Einteilung in Klassen nach Größe erfolgt entsprechend den für Rosetten festgelegten Grenzen. Hier besteht nun kein Anlass, die Klasse 1 zu ignorieren, im Folgenden werden also stets Aggregate der Klassen 1–6 behandelt.



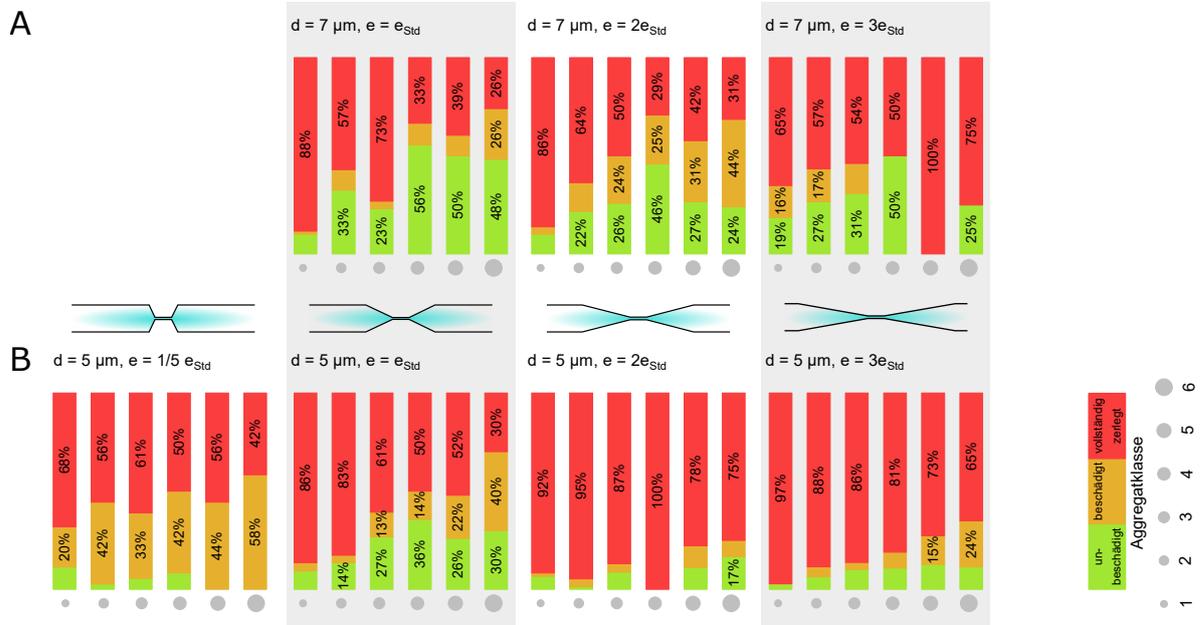
**Abbildung 5.13: A)** Lektin-induzierte Aggregation nach Präparationsprotokoll aus Kap. 2.4.

**B)** Der Zustand eines Lektin-induzierten Aggregats nach Passage einer Stenose ist entweder „unbeschädigt“ (grün), „beschädigt“ (gelb) oder „vollständig zerlegt“ (rot). Hier ist die Verteilung auf diese drei Zustände für Stenosen drei unterschiedlicher Breiten  $d = 11 \mu\text{m}$ ,  $d = 7 \mu\text{m}$  und  $d = 5 \mu\text{m}$  bei Standardelongationslänge  $e_{\text{Std}} = 55 \mu\text{m}$  gezeigt. Die Fläche der grauen Kreise unten entspricht jeweils der Größe der Aggregate in der betreffenden Klasse 1–6, wie in Abb. 4.10 eingeführt.

Betrachten wir wiederum zunächst den Einfluss der maximalen Kompression, also Kanäle unterschiedlicher Breite  $d = 5 \mu\text{m}$ ,  $d = 7 \mu\text{m}$  und  $d = 11 \mu\text{m}$  bei Standardelongation, vgl. Abb. 5.13 B. Die Flussrate  $Q$  liegt stets im Bereich  $7 \mu\text{l/h} < Q < 15 \mu\text{l/h}$ . Der Anteil der unbeschädigten Aggregate (grün) ist in den Klassen 3 und 4 mit bis zu 70 % maximal und übersteigt dabei den Anteil in Klasse 1 um über das Fünffache. Steigt die Aggregatgröße weiter an, so ist ein Rückgang der Rate auf ca. 80 % des Maximums zu erkennen. Der Anteil der beschädigten Aggregate (gelb) erhöht sich dagegen mit zunehmender Aggregatgröße von 5 % auf bis zu 75 %. Hier lässt sich bei einer Stenosenbreite von  $11 \mu\text{m}$  deutlich erkennen, dass die Verengung des Querschnitts nicht mehr ausreicht, um die großen Aggregate zu beeinträchtigen. Dort liegt der Anteil der vollständig Zerlegten bei lediglich 3 %. Bei Verbreiterung der Stenose von  $d = 5 \mu\text{m}$  auf  $d = 11 \mu\text{m}$  steigt die Überlebenswahrscheinlichkeit mit zunehmender Stenosenbreite auf das Doppelte an.

Der Einfluss der Elongationslänge ist in Abb. 5.14 von links nach rechts abzulesen. Wird bei einer Stenosenbreite von  $d = 5 \mu\text{m}$  die Elongationslänge erhöht, so zeigt sich eine starke Abnahme der Überlebensraten, vgl. Abb. 5.14 B. Bei einer Elongation von  $e = 0,2e_{\text{Std}}$  werden fast 70 % der kleinen Aggregate vollständig zerlegt, während ein Anteil von ungefähr 10 % die Stenose unbeschadet passiert. Vergrößern sich die Aggregate, so überstehen bis zu 50 % die Stenose, werden dabei aber deutlich mehr beschädigt, bis in den Klassen 5 und 6 keine unbeschädigten Aggregate mehr existieren. Verlängert sich die Stenose, setzt sich der Trend fort, dass die größeren Aggregate die Stenose deutlich zahlreicher passieren können. Die Standardlänge überstehen in Klasse 1 rund 15 % und in Klasse 6 bereits 70 % der Aggregate, dabei bleiben ca. 10–35 % der Aggregate vollständig intakt. Erhöht man die Elongation auf das zwei- bzw. dreifache, werden in Klasse 1 schon über 90 % zerlegt. Dieser Wert sinkt kontinuierlich mit zunehmender Aggregatgröße, bis in Klasse 6 noch 75 % bzw. 65 % der Aggregate nicht vorhanden bleiben. Die Rate der unbeschädigten Aggregate liegt gleichbleibend ähnlich bei ca. 10 %. Besonders bei der dreifachen Elongation steigt wiederum der Anteil der beschädigten Aggregate von 5 % auf 25 % deutlich an.

Ein ähnliches Verhalten ist auch bei den Kanälen mit einer Stenosenbreite von  $d = 7 \mu\text{m}$  erkennbar, vgl. Abb. 5.14 A. Sowohl bei der Standardelongation als auch bei der zweifachen bzw. dreifachen

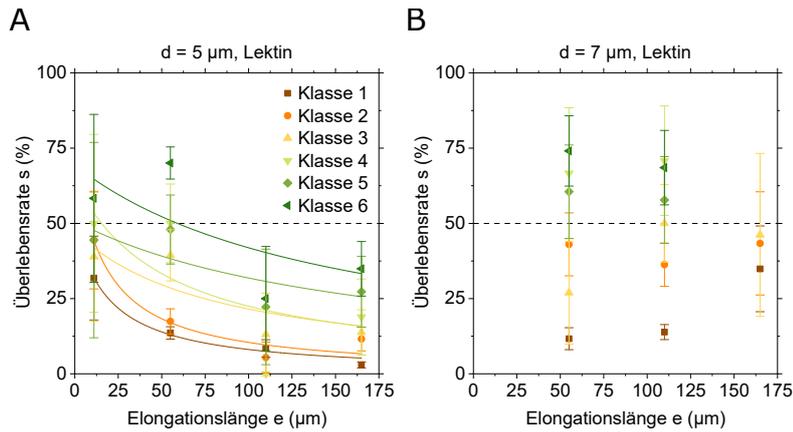


**Abbildung 5.14:** Der Zustand eines Lektin-induzierten Aggregats nach Passage einer Stenose ist entweder „unbeschädigt“ (grün), „beschädigt“ (gelb) oder „vollständig zerlegt“ (rot). Hier ist die Verteilung auf diese drei Zustände für Stenosen zwei unterschiedlicher Breiten **A**)  $d = 7 \mu\text{m}$  und **B**)  $d = 5 \mu\text{m}$  und vier unterschiedlicher Elongationslängen dargestellt. Die Standardlänge ist  $e_{\text{Std}} = 55 \mu\text{m}$ , dazu kommt eine verkürzte Stenose mit  $e_{0,2x} = 1/5 e_{\text{Std}}$  und zwei verlängerte mit  $e_{2x} = 2e_{\text{Std}}$  und  $e_{3x} = 3e_{\text{Std}}$ . Die Fläche der grauen Kreise unten entspricht jeweils der Größe der Aggregate in der betreffenden Klasse 1 – 6, wie in Abb. 4.10 eingeführt.

Länge steigt die Unbeschädigtenrate von ca. 10 % bis hin zu einem lokalen Maximum bei Klasse 4 mit ca. 50 %. Im Standardfall  $e = e_{\text{Std}}$  bleibt dieses Niveau weitestgehend erhalten, bei den längeren Formen fällt dieses zurück auf 25 %. Auch hier nimmt die Rate der beschädigten Aggregate mit der Aggregatgröße wieder erkennbar zu. Anders als bei  $d = 5 \mu\text{m}$  ist diese bei der zweifachen Elongation doppelt so stark ausgeprägt wie bei der Standardform. Lediglich die dreifache Elongation weicht von dieser Tendenz ab, was vermutlich an der spärlichen Datenlage liegt. In den ersten drei Klassen werden von 15 – 40 Aggregaten ca. 15 % beschädigt, bei größeren Aggregaten liegen die Zähler nur bei 2 – 4, folglich verteilen sich diese nicht statistisch signifikant. Für alle anderen Messungen gehen pro Messpunkt, also pro Klasse und Kanalform, die Trajektorien von 50 – 500 Aggregaten ein. In Abb. 5.15 sind die entsprechenden 95 % Konfidenzintervalle eingezeichnet.

Insgesamt finden sich hier die Trends aus Kap. 5.4 wieder, die für Rosetten auftraten. Je enger und desto länger die Stenose, desto mehr Aggregate werden beschädigt oder zerlegt. Um die Stabilität von Rosetten und Lektin-induzierten Aggregaten zu vergleichen, betrachten wir wie in Kap. 5.4 die Überlebensrate  $s$  als Funktion der Elongationslänge, vgl. Abb. 5.9 und 5.15. Auch hier, wie schon für Rosetten beobachtet, fallen die Kurven für die engere Stenose mit  $d = 5 \mu\text{m}$  systematisch ab, während das Niveau bei  $d = 7 \mu\text{m}$  nicht wesentlich von der Elongationslänge abzuhängen scheint.

Für die Ergebnisse der Experimente mit Rosetten ließ sich mit Gleichung 5.9 die Übergangslänge  $e^*$  bei einer Überlebensrate von 50 % bestimmen. Hier, in Abb. 5.15 A, überschreiten die Werte die 50 %-Marke kaum. Die Übergangslänge ist also mit  $e^* < 10 \mu\text{m}$  sehr kurz. Lektin-induzierte Aggregate scheinen also weniger stabil zu sein als Rosetten. Diese Hypothese wird auch durch die Balkendiagramme



**Abbildung 5.15:** Elongationsinduzierte Zerlegung Lektin-induzierter Aggregate. Überlebensrate mit Fit nach Gleichung 5.8 für Aggregate der Klassen 1 – 6 als Funktion der Elongationslänge bei Passage von Einzelstenosen vier unterschiedlicher Längen von  $e = e_{0,2x} = 11 \mu\text{m}$  bis  $e = e_{3x} = 165 \mu\text{m}$  bei fester Breite **A)**  $d = 5 \mu\text{m}$  und **B)**  $d = 7 \mu\text{m}$ . Die Fehlerbalken stellen die 95 % Konfidenzintervalle dar.

gestützt. Für  $d = 7 \mu\text{m}$  werden beispielsweise nur ca. 30 % der Rosetten vollständig zerlegt, vgl. Abb. 5.8 A, aber ca. 60 % der Lektin-induzierten Aggregate, vgl. Abb. 5.14 A. Noch deutlicher verhält es sich für  $d = 5 \mu\text{m}$ . Hier bleiben lediglich 10 – 20 % der Lektin-induzierten Aggregate unbeschädigt, während ca. 90 % vollständig zerlegt werden, vgl. Abb. 5.14 B. Für Rosetten, vgl. Abb. 5.8 B, ergeben sich bei gleichen Bedingungen 20 – 30 % Unbeschädigte und nur ca. 70 % vollständig Zerlegte.

Rosetten und Lektin-induzierte Aggregate verhalten sich also qualitativ ähnlich. Die Zell-Zell-Bindung, die in beiden Fällen eine spezifische Ligand-Rezeptor-Bindung ist, scheint für *PfEMP1* signifikant stabiler zu sein. Arbeitet man mit Lektin-induzierten Aggregaten als Modell, lassen sich Trends gut aufzeigen und nachbilden, für das Vergleichen von Absolutwerten bilden Lektine zu schwache Bindungen aus.

## 5.7 Simulation von Zellaggregaten unter Fluss

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. Timm Krüger an der University of Edinburgh ist es gelungen, die Passage von Rosetten durch Stenosen zu simulieren, vgl. Abb. 5.16. Der folgende Abschnitt fasst die Masterarbeit von Adam Machon zusammen, der dieses gemeinsame Projekt realisierte [155]. Die experimentellen Ergebnisse finden sich hier qualitativ wieder, für eine quantitative Analyse muss das Modell jedoch stark vereinfacht werden, vgl. Abb. 5.18.

### Modell Stenose und elastisches Objekt unter Fluss

In der Literatur ist wenig zur dreidimensionalen Simulation von mehrzelligen Zellaggregaten zu finden. Veröffentlicht sind entweder Aggregate in einfachem Scherfluss in 2D oder Paare roter Blutkörperchen bei Passage von Engstellen in 3D. In diesem Projekt werden Aggregate von bis zu sieben Zellen bei der Passage von Engstellen im Dreidimensionalen simuliert.

Zur Simulation des Fluids wurde die Lattice-Boltzmann-Methode verwendet. Dabei ist der Ortsraum in feste Punkte diskretisiert, an denen jeweils die Geschwindigkeit berechnet wird. Ein Simulationsschritt besteht immer aus einem Kollisions- und einem Strömungsschritt. Im Kollisionsschritt wird die wirkende Kraft an jedem Punkt berechnet, und im Strömungsschritt die entsprechende Verschiebung entlang der Gitterpunkte. Um die Interaktion zwischen umgebendem Fluid und den roten Blutkörperchen zu repräsentieren, wurde die *Immersed Boundary* Methode implementiert. Das bedeutet, die Gitterpunkte, die die Zelloberfläche beschreiben, sind vom Gitter, das das Fluid beschreibt, unabhängig. In jedem Zeitschritt wird die Wirkung des Fluids an den Gitterpunkten der Zelloberfläche berechnet und damit die Verformung und Bewegung des Objekts berechnet. Die Kräfte resultieren aus der Realität nachempfundenen Werten zur Membranspannung in der Oberflächenebene, der Biegeenergie, und der Erhaltung von Oberfläche und Volumen. Das Netz auf der Oberfläche der Blutkörperchen ist ein unstrukturiertes Netz bestehend aus endlich vielen dreieckigen Elementen, die die Membran darstellen. Beginnend bei einer Kugel erhält man über die Gleichung

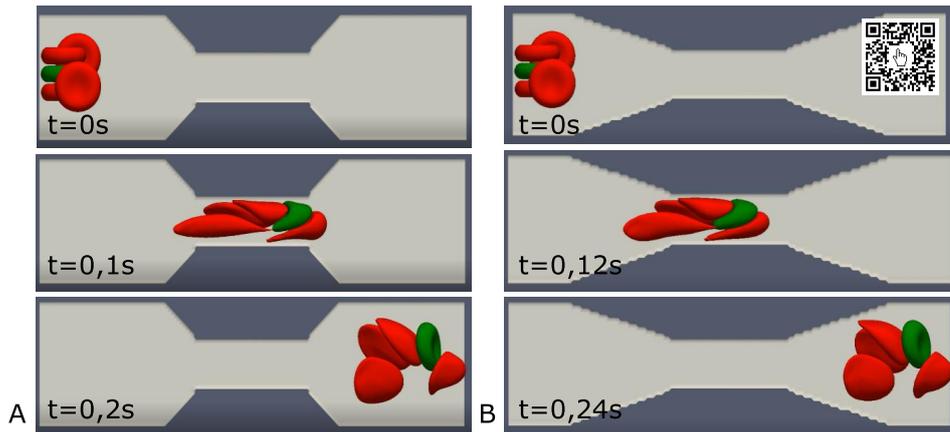
$$z(\rho) = \pm\sqrt{1 - (\rho/r_L)^2}(C_0 + C_2(\rho/r_L)^2 + C_4(\rho/r_L)^4) \text{ mit } \rho = \sqrt{x^2 + y^2} \quad (5.30)$$

die für rote Blutkörperchen typische bikonkave Form mit  $r_L = 3,91 \mu\text{m}$ ,  $C_0 = 0,81 \mu\text{m}$ ,  $C_2 = 7,83 \mu\text{m}$  und  $C_4 = -4,39 \mu\text{m}$ . Die Interaktionen zwischen einem infizierten und einem uninfizierten roten Blutkörperchen werden durch ein Morse-Potential abgebildet. Das Morse-Potential beschreibt eine schwache Attraktion bei großer Entfernung und eine starke Abstoßung bei sehr kleinen Abständen. Dies ist eine einfache Abbildung der empirisch bestimmten Natur der Zell-Zell-Wechselwirkung.

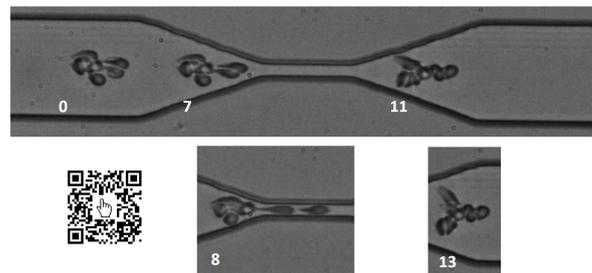
Um die Stärke des Morse-Potentials realistisch zu wählen, wurden zunächst Paare aus einem infizierten und einem uninfizierten roten Blutkörperchen simuliert. Infiziert bedeutet in diesem Fall, dass das Schermodul bzw. die Steifigkeit auf das Zehnfache erhöht ist. Literaturwerte für das Lösen von Zellen von Rosetten liegen bei  $0,5 - 2,5 \text{ Pa}$  bzw.  $1 - 1,6 \text{ Pa}$  [155]. Daher wurde das Morse-Potential so angepasst, dass sich die zwei Zellen unter einer Scherspannung von  $1,2 \text{ Pa}$  innerhalb von  $0,04 \text{ s}$  voneinander lösen.

### Simulation von Aggregaten aus infizierten und gesunden roten Blutkörperchen bei Passage von Stenosen

Auf dieser Grundlage wurden Modelle größerer Zellaggregate aus drei, fünf und sieben Zellen erstellt, und in der Simulation durch Stenosen geführt, die den Mikrofluidikkanälen aus dieser Arbeit nachempfunden waren. Beispielhafte Momentaufnahmen sind in Abb. 5.16 für ein fünfzelliges Aggregat zu sehen. Die Bildebene der Simulationen ist jeweils  $75 \times 21 \mu\text{m}^2$  groß bei einer Tiefe von  $17 \mu\text{m}$ . Die Geometrie der Standardstenose mit Durchmesser  $d = 8 \mu\text{m}$ , Verengungswinkel  $31^\circ$  und  $l = 20 \mu\text{m}$  Länge wurde variiert durch Verengungswinkel von  $19^\circ$  (vgl. Abb. 5.16 A),  $31^\circ$  und  $50^\circ$  (vgl. Abb. 5.16 B) und Durchmesser von  $d = 4, 8$  und  $11 \mu\text{m}$  bei einer Länge des engsten Teils von  $l = 5, 20$  und  $40 \mu\text{m}$ . Für dreizellige Aggregate trat in der längsten Stenose bei  $40 \%$  der simulierten Passagen ein Zellverlust auf, in den kürzeren Stenosen jedoch nie. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass längere Stenosen und weniger steile Verengungswinkel schwerer für die Aggregate zu passieren sind. Dieselbe Tendenz war auch für fünf- und siebenzellige Aggregate zu beobachten, wobei diese in fast keinem Fall intakt blieben. Bei solchen Aggregaten war der Raum innerhalb der Stenose zu einem so großen Anteil mit Objekten gefüllt, dass die Simulation an ihre Grenzen stößt. Außerdem ist die Kontaktfläche der äußeren uninfizierten Zellen mit der infizierten Zelle so klein, dass eine Ablösung begünstigt wird. Unabhängig von der Form der



**Abbildung 5.16:** Fünfzelliges Aggregat bei der Passage einer Stenose mit Standardlänge  $l = 20 \mu\text{m}$  und (A) steilem Winkel von  $50^\circ$  bzw. (B) einer mit flachem  $19^\circ$  Winkel. Das in A) und B) beobachtete Verhalten ist fast identisch.



**Abbildung 5.17:** Beispielhafte Mikroskopaufnahmen eines Aggregats aus Blutgruppe A, das eine Standardstenose mit  $d = 7 \mu\text{m}$ ,  $e = e_{\text{Std}}$  passiert. Die Nummern bezeichnen Zeitschritte, ein Zeitschritt entspricht  $\Delta t = 0,5 \text{ ms}$ .

Stenose ist daher das beobachtete Verhalten für die großen fünf- bzw. siebenzelligen Aggregate stets fast identisch, vgl. Abb. 5.16.

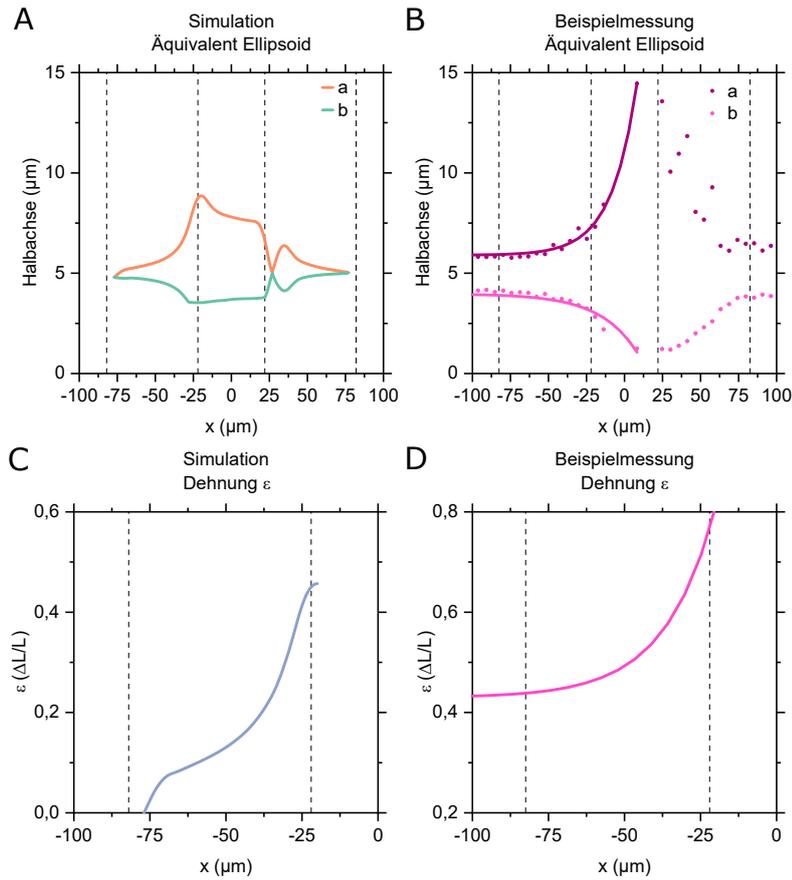
### Simulation einer Kugel bei Passage einer Stenose

Ein Nachteil der eben beschriebenen, detaillierten Nachbildung des Fließverhaltens der Aggregate ist die sich schnell potenzierende Anzahl an Möglichkeiten und daraus resultierende Ohnmacht, genügend Simulationsdurchgänge für ein signifikantes Ergebnis durchzuführen. Für ein Aggregat von nur fünf Zellen gibt es beispielsweise schon einige Möglichkeiten, wie die vier peripheren Zellen um die zentrale Zelle angeordnet sind. Hat man dies festgelegt, kann das Aggregat wiederum unterschiedlich im Kanal orientiert und positioniert sein. Unterschiedliche Flussraten, Geometrien und Bindungsstärken spannen den Parameterraum darüber hinaus unendlich weiter auf. Für eine quantitative Beschreibung der wirkenden Kräfte wird das Aggregat daher nun durch eine Kugel abstrahiert. Grob lässt sich eine Rosette als kugelförmig beschreiben, da die roten Blutkörperchen um eine zentrale, infizierte Zelle herum angeordnet sind. Das simulierte Zellaggregat wird zur Vereinfachung nun durch eine Kugel abstrahiert, die weicher ist, als ein einzelnes rotes Blutkörperchen. Das Ablösen von Zellen lässt sich im Kugelmodell offensichtlich nicht mehr simulieren, aber Absolutwerte wie die effektive Elastizität und die Scherspannung, die an der Aggregatoberfläche angreift, sind so deutlich besser greifbar.

### Gegenüberstellung der Simulation und einer Beispielmessung

Betrachtet man die Passage einer Stenose, sind auf den ersten Blick einige Charakteristika sowohl bei der simulierten Kugel, als auch in Aufnahmen von Rosetten zu sehen, vgl. Abb. 5.18 und Abb. 5.17. Bei Eintritt in die Stenose bildet sich in beiden Fällen eine „Nase“, vgl. Abb. 5.18 6,5 und Abb. 5.17 7, und bei Austritt eine „Rochenform“ mit zwei symmetrischen Auswüchsen hinten, vgl. Abb. 5.18 8,5 und Abb. 5.17 13.





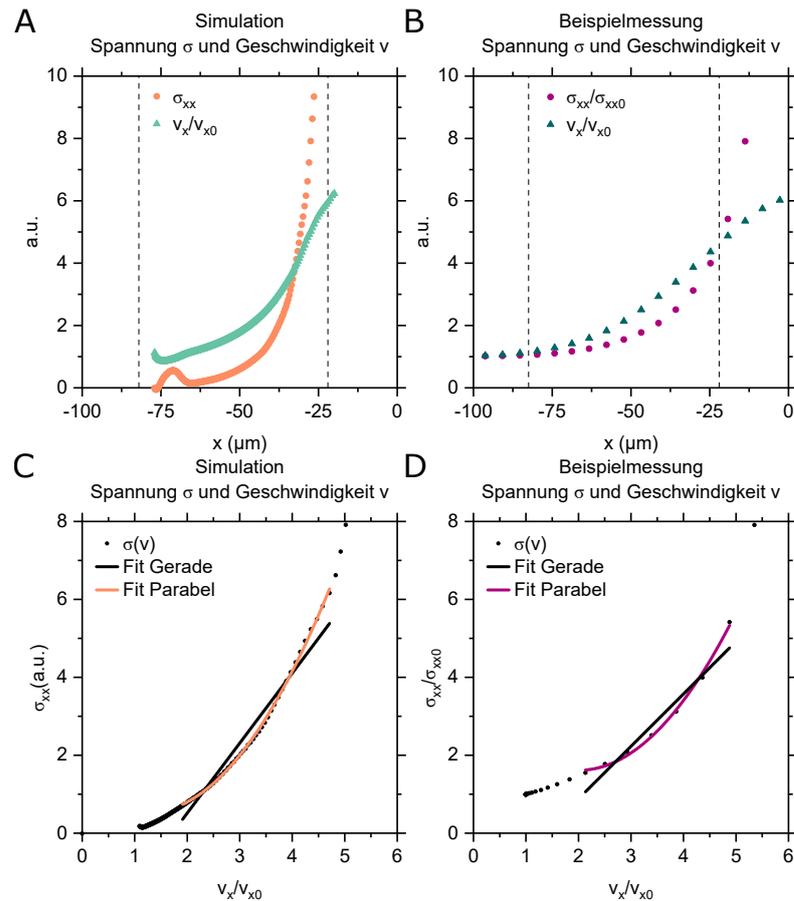
**Abbildung 5.19:** Gegenüberstellung der Ellipsenform in Simulation und einer Beispielmessung mit den Parametern Blutgruppe A,  $d = 7 \mu\text{m}$ ,  $e = e_{\text{Std}}$ , Rosettenklasse 3. Fluss in x-Richtung, Mitte der Stenose bei  $x = 0$ . Die Stenose erstreckt sich über  $-82 \mu\text{m} < x < 82 \mu\text{m}$ , davon macht der engste Teil jeweils den Bereich  $-22 \mu\text{m} < x < 22 \mu\text{m}$  aus.

**Oben:** Lange und kurze Halbachse a und b, **A)** Simulation, **B)** Beispielmessung.

**Unten:** Dehnung  $\epsilon$ , **C)** Simulation, **D)** Beispielmessung.

Versuch, die Simulation flussaufwärts zu verlängern, trat ein Artefakt in Form eines Knicks in der Spannungskurve auf, sobald die Spitze der verformten Kugel nahe an den engsten Teil der Stenose kam, und wurde daher nicht weiter verfolgt. Eine deutlich weichere Kugel sorgt für ein Versagen der Simulation wegen extremer Verformungen.

Trotz der Einschränkungen der Simulation und der starken Abstraktion in Form einer Kugel, lassen sich die Verhältnisse, die im Experiment herrschen, sehr gut nachbilden. Vor allem der Abgleich der Spannungs-Geschwindigkeits-Kurven ist für die Validierung der Herleitung in Kap. 3.4 wertvoll.



**Abbildung 5.20:** Gegenüberstellung von Spannung  $\sigma$  und Geschwindigkeit  $v$  in Simulation und einer Beispielmessung mit den Parametern Blutgruppe A,  $d = 7 \mu\text{m}$ ,  $e = e_{\text{Std}}$ , Rosettenklasse 3. Fluss in  $x$ -Richtung, Mitte der Stenose bei  $x = 0$ . Die Stenose erstreckt sich über  $-82 \mu\text{m} < x < 82 \mu\text{m}$ , davon macht der engste Teil jeweils den Bereich  $-22 \mu\text{m} < x < 22 \mu\text{m}$  aus.

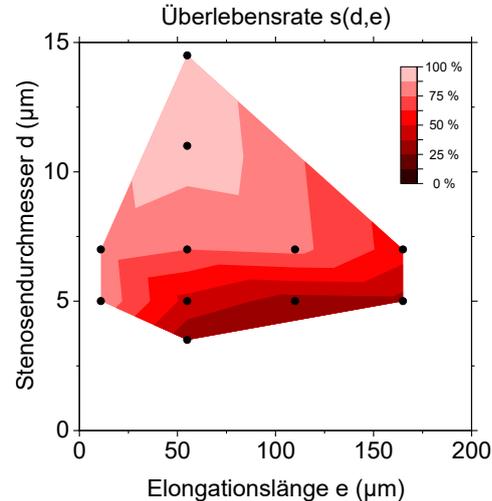
**Oben:**  $\sigma(x)$  und  $v(x)$ , **A)** Simulation, **B)** Beispielmessung.

**Unten:**  $\sigma(v)$ , **C)** Simulation, **D)** Beispielmessung. Nach Gleichung 3.37 setzt sich  $\sigma(v)$  aus einem linearen und einem quadratischen Term zusammen, daher sind ein linearer und ein parabolischer Fit der Form  $y = a + bv + cv^2$  gezeigt.

## Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Stabilität von Rosetten bei Passage unterschiedlicher Stenosen untersucht. Der Fokus lag darauf, welcher Anteil der Rosetten eine bestimmte Stenose unbeschadet bzw. wie stark beschädigt passieren kann, und welchen Einfluss die Größe, die Blutgruppe und die Geometrie der Stenose darauf hat. Die Klassifizierung nach Größe erlaubt die Unterschiede in der Bindungsstärke zwischen Blutgruppe 0 und A herauszuarbeiten. Die beobachteten Trends, dass eine längere Stenose schwerer zu passieren ist und größere Rosetten durch Rearrangieren und höhere Flexibilität eher beständiger sind, spiegelten sich ebenfalls im Modellsystem Lektin-induzierter Aggregate und im simulierten Modell wieder.

**Abbildung 5.21:** Überlebensrate von Rosetten in Blutgruppe 0 im geometrischen Parameterraum von Stenosendurchmesser  $d$  und Elongationslänge  $e$ . Realisierte Wertepaare  $(d, e)$  sind durch schwarze Punkte markiert. Die Farbskala gibt die Überlebensrate  $s(d, e)$  in Prozent an. Diese Abbildung fasst die Ergebnisse zu Einfluss des Stenosendurchmessers aus Abb. 5.4 B und zu Einfluss der Elongationslänge aus Abb. 5.8 zusammen. Mittelwert über alle Klassen 2 – 6.



Mit Bezug auf die anfangs gestellten Fragen lassen sich zusammenfassend folgende Ergebnisse aufführen:

- **Die Größenverteilung der Rosetten am Kanal Anfang sind in Blutgruppe A und 0 verschieden.** In Blutgruppe A sind größere Rosetten zahlreicher vertreten, in Blutgruppe 0 die kleineren Rosetten, vgl. Kap. 5.1.
- **Die Flussgeschwindigkeit entlang der Stenose ähnelt einer Gaußkurve.** Durch die große Ausdehnung der Aggregate im Vergleich zur Geometrie der Stenose, zeigt die Geschwindigkeit der Aggregate bei Passage der Stenose kein Plateau, wie es durch den Kanalquerschnitt und die Kontinuitätsgleichung zu erwarten wäre, sondern nimmt eher gaußförmig zu und wieder ab, vgl. Kap. 5.2.

Je enger und je länger die Stenose, desto schwerer wird sie passierbar. Die Überlebensrate als Funktion des geometrischen Parameterraums ist in Abb. 5.21 zusammengefasst dargestellt.

- Je **kleiner** der Stenosendurchmesser, desto **weniger** Rosetten überstehen die Passage. In Kap. 5.3 wird gezeigt, dass die kritische Stenosenbreite  $d^*$  bei ca.  $5 \mu\text{m}$  liegt. Die effektive Überlebensrate bewegt sich zwischen 20 % für den kleinsten Stenosendurchmesser von  $d = 3,5 \mu\text{m}$  und fast 100 % für den größten Stenosendurchmesser von  $d = 14,5 \mu\text{m}$ .
- Je **größer** die Elongationslänge ist, desto **weniger** Rosetten überstehen die Passage. Die Elongationsraten sind mit Zunahme der Elongationslänge zwar niedriger, sie wirken jedoch für längere Zeitspannen auf das passierende Objekt ein. Ausgehend von einer festen Breite  $d = 5 \mu\text{m}$  und einer Standardelongationslänge mit einer Überlebensrate von ca. 50 % wird die Überlebensrate bei Verkürzen der Stenose auf ein Fünftel der Länge auf ca. 90 % angehoben, während diese bei Verlängern auf das Dreifache auf ca. 25 % abfällt, vgl. Kap. 5.4 bzw. Abb. 5.9.
- **Größere Rosetten passieren die Stenosen öfter unbeschadet.** Dieser Trend zieht sich durch das gesamte Kapitel, vgl. bspw. Abb. 5.6. Das flexible Umorganisieren von Zellen ermöglicht vermutlich bis zu einem gewissen Grad eine leichtere Passage, je mehr Zellen involviert sind.
- **Rote Blutkörperchen der Blutgruppe A bilden stabilere Rosetten als solche der Blutgruppe 0.** Dies äußert sich beispielsweise in der um 20 % erhöhten effektiven Überlebensrate bei Passage einer Stenose mit  $d = 5 \mu\text{m}$ , vgl. Abb. 5.7.

- **Kleinere Rosetten erleiden prozentual größere Zellverluste.** In Absolutzahlen pro Rosette verlieren jedoch größere Rosetten mehr Zellen. In Kap. 5.5 wird vermutet, dass der Vorteil der umgebenden Zellen ab einer gewissen Zellzahl nicht mehr nur ein Vorteil bleibt.

Um das Phänomen *Rosetting* bei Malariainfektion besser einordnen zu können, werden zwei Modellsysteme betrachtet, einmal Lektin-induzierte Aggregate als experimentelles Modell, und eine Finite Elemente Simulation zur analytischen Beschreibung.

- **Lektin-induzierte Aggregate verhalten sich qualitativ ähnlich wie Rosetten.** Quantitativ ist die durch Lektine vermittelte Bindung jedoch signifikant schwächer, als sie in Rosetten auftritt, vgl. Kap. 5.6.
- **Eine Rosette verformt sich in Scher- und Elongationsfluss ähnlich wie eine elastische homogene Kugel.** In Kap. 5.7 wird deutlich, dass sich das Verhalten von Blutzellaggregaten bei Passage einer Stenose gut theoretisch durch eine Kugel beschreiben lässt. Die Ergebnisse der Simulation können herangezogen werden, um die Abschätzung der im Experiment wirkenden Kraft zu validieren.

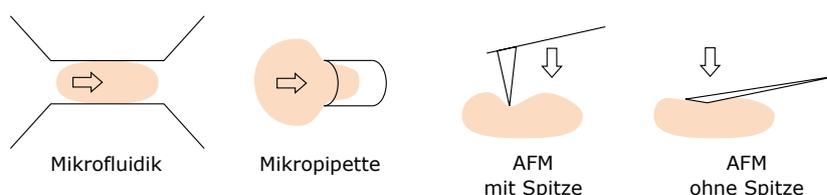
Das folgende Kapitel konzentriert sich auf solche Rosetten, die bei Stenosenpassage keinen Zellverlust erleiden, sondern ihre Größe bewahren und lediglich die Form verändern. Unter der Annahme einer linear elastischen Verformung lassen sich aus Dehnung und Spannung die effektive Elastizität solcher Rosetten bestimmen.



# 6

## Bestimmung der Elastizität durch Verformung unter Fluss

Bei der Passage einer Stenose lässt sich nicht nur feststellen, ob sich die Zellen dabei voneinander lösen oder nicht, es lässt sich auch etwas über deren elastische Eigenschaften lernen. Die Elastizität eines Objekts bestimmt den Grad der Verformung unter Krafteinwirkung. Um die Elastizität kleiner Objekte zu bestimmen, ist die Kraftspektroskopie mit Rasterkraftmikroskopen verbreitet. Hier wird jedoch im Allgemeinen nur punktuell gemessen, was insbesondere für inhomogene Objekte wie Zellen oder gar Zellaggregate zu einer großen Streuung der Ergebnisse führen kann und offen lässt, welche Punkte auf der Zelle für eine Messung optimalerweise gewählt werden. Hier wird eine Methode vorgestellt, um die Elastizität aus der Verformung eines Objekts bei Durchfließen einer Stenose zu bestimmen. Der entscheidende Vorteil ist hier, dass die Belastung nicht punktuell, sondern großflächig auf das Objekt erfolgt, vgl. Abb. 6.1. Der Elastizitätsmodul  $E$  lässt sich berechnen, wenn Spannung  $\sigma$  und Dehnung  $\epsilon$  bekannt sind. Wie die auf das Objekt wirkende Spannung berechnet und dessen Dehnung definiert wird, ist in Kapitel 3.3 und 3.4 beschrieben. In diesem Kapitel werden zunächst Einzelzellen (Melanomzellen) bei Passage einer Stenose und durch Kraftspektroskopie charakterisiert. Diese Messungen dienen unter anderem der Validierung der Methode, um schließlich die effektive Elastizität von Zellaggregaten (Rosetten, Aggregate malarialinfizierter roter Blutkörperchen) unter Fluss zu bestimmen.



**Abbildung 6.1:** Die Elastizität einer Zelle lässt sich aus der Verformung unter Fluss errechnen (Mikrofluidik), oder durch die Aspiration in Mikropipetten und mittels Kraftspektroskopie (AFM) bestimmen. Üblicherweise ist der Cantilever eines AFM mit einer Spitze ausgestattet. Um die Zelle weniger zu punktieren, sondern flächig auf die Zelle zu drücken, werden in dieser Arbeit auch Cantilever ohne Spitze verwendet.

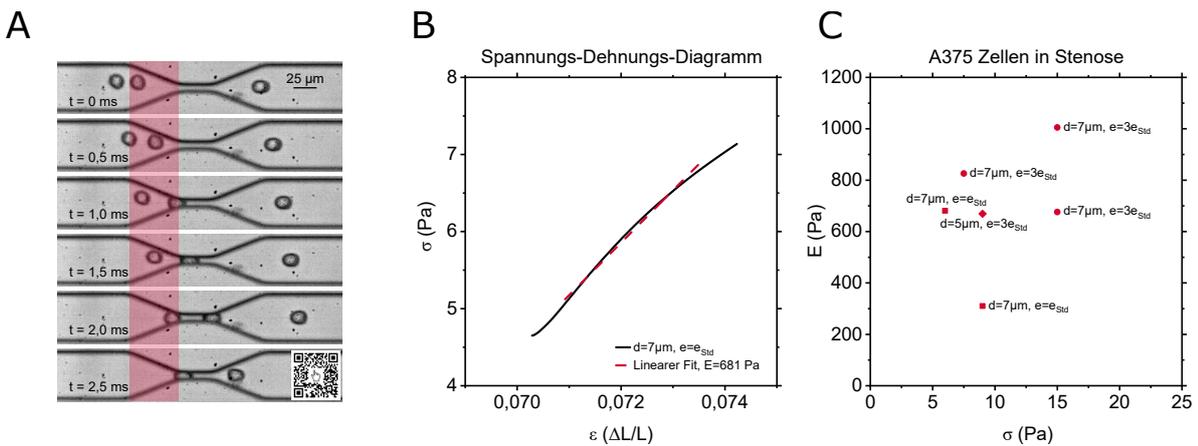
### 6.1 Bestimmung der Elastizität von Melanomzellen

Klinisch von höchstem Interesse ist es, zirkulierende Tumorzellen eines metastasierenden Tumors im Blut zu identifizieren, vom restlichen Blut zu trennen und auf Korrelation der Oberflächenmarker auf weißen Blutkörperchen und zirkulierenden Tumorzellen (CTC) hin zu untersuchen. Die Schwierigkeit liegt zum Einen in der niedrigen Konzentration der Zellen, und zum Anderen in der Ähnlichkeit zu weißen Blutkörperchen. Verschiedene Trennverfahren, wie Filtersysteme oder Sortierkanäle, beruhen auf kleinen Unterschieden in Elastizität und Größe. Um ein solches System zu optimieren, ist es entscheidend, diese Parameter genau zu kennen. Dieses Kapitel konzentriert sich auf die Charakterisierung der Elastizität von

A375 Melanomzellen, eine humane Melanomzelllinie, die schwarzen Hautkrebs ausmacht. Solche A375 Melanomzellen werden zum Einen bei Passage von Stenosen analysiert, und deren Elastizitätsmodul nach Kap. 3.4 und Abb. 6.6 bestimmt, vgl. Kap. 6.1.1. Zum Anderen wird die Elastizität der Zellen durch Kraftspektroskopie ermittelt, vgl. Kap. 6.1.2. Beides dient der Validierung der in Kap. 3.4 eingeführten Methodik.

### 6.1.1 Elastizität von Melanomzellen - Verformung unter Fluss

Der mikrofluidische Aufbau ist dem für die Experimente mit Rosetten identisch, bis auf die Kanalhöhe. Aufgrund des größeren Zelldurchmessers der A375 Zellen von  $d \approx 20 \mu\text{m}$  wurden Kanäle ca. dreifacher Höhe  $h \approx 27 \mu\text{m}$  verwendet. Um ähnliche Flussgeschwindigkeiten zu erreichen, wurde die Flussrate ebenfalls entsprechend erhöht. Es werden Hochgeschwindigkeitsaufnahmen mit 2000 Bildern pro Sekunde und einer Belichtungszeit von  $1/40.000 \text{ s}$  aufgenommen. Beispielhafte Mikroskopaufnahmen finden sich in Abb. 6.2 A.



**Abbildung 6.2:** A) Mikroskopaufnahmen von A375 Zellen bei Passage einer Stenose mit  $d = 7 \mu\text{m}$  und  $e = e_{\text{Std}}$ . Aus den Messwerten im rot hinterlegten Bereich wird das Spannungs-Dehnungs-Diagramm erstellt.

B) Spannungs-Dehnungs-Diagramm für die Beispielmessung mit  $d = 7 \mu\text{m}$  und  $e = e_{\text{Std}}$  aus A). Dieses Diagramm setzt sich aus den Trajektorien von 2500 Zellen zusammen. Die Zellen sind schon im breiten Teil des Kanals nicht ganz rund,  $\sigma(\epsilon)$  schneidet daher nicht den Ursprung. Die Verformung liegt im einstelligen Prozentbereich und nimmt im Elongationsfluss um 0,5 – 1 Prozentpunkte zu. Die Kurve  $\sigma(\epsilon)$  ist daher recht steil. Aus dem linearen Fit nach Gleichung 3.38 folgt der Elastizitätsmodul  $E = 681 \text{ Pa}$ .

C) Elastizitätsmodul von A375 Zellen bei Passage von Stenosen bei unterschiedlicher mittlerer Spannung von  $\sigma \approx 15 \text{ Pa}$ .

Zur Auswertung wird die Software SURF insofern angepasst, dass einzelne Zellen nachverfolgt werden. Im Fall von Rosetten sollen Einzelzellen ignoriert und nur Aggregate registriert werden, hier sind gelegentliche Zell-Zell-Zusammenschlüsse dagegen uninteressant. Das Prinzip bleibt dennoch erhalten. Die Zellen werden am Kanalbeginn registriert und entlang des Kanals verfolgt. Entlang der Trajektorien werden Größe und Form, genauer die kurze und lange Halbachse der die Zellform abstrahierenden Ellipse, aufgezeichnet. Aus den Abmessungen der Ellipse lässt sich die Dehnung  $\epsilon$  nach Gleichung 3.41 bestimmen, und aus Geschwindigkeit, Zellgröße und Kanalgeometrie die wirkende Kraft bzw. Spannung  $\sigma$ , vgl. Kap. 3.4. Auf dieser Grundlage werden Spannung und Dehnung bei Durchfluss des sich verengenden Teils der Stenose berechnet, und zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls gegeneinander aufgetragen. Der für die Spannungs-Dehnungs-Diagramme verwendete Teil des Kanals ist in Abb. 6.2 A rot hinterlegt. Die Zellen sind schon im breiten Teil des Kanals nicht ganz rund,  $\sigma(\epsilon)$  schneidet daher nicht den Ursprung. Die Verformung liegt im einstelligen Prozentbereich und nimmt im Elongationsfluss um 0,5 – 1 Prozentpunkte zu. Die Kurve  $\sigma(\epsilon)$  ist daher recht steil. Eine derart geringe Verformung so genau zu bestimmen, und daraus die elastischen Eigenschaften einer Zelle zu berechnen, ist in der Literatur durchaus verbreitet, bspw. bei Guillou et al. [156].

Die einzelnen Schritte zur Bestimmung eines effektiven Elastizitätsmoduls sind in Abb. 6.6 anhand einer Beispielmessung genauer erläutert. Der Elastizitätsmodul entspricht nun der Steigung des Spannungs-Dehnungs-Diagramms, vgl. Kap. 3.4 und das Beispiel in Abb. 6.2 B. Ein solches Diagramm setzt sich aus den Trajektorien aller Zellen einer Messung zusammen. Üblicherweise handelt es sich dabei

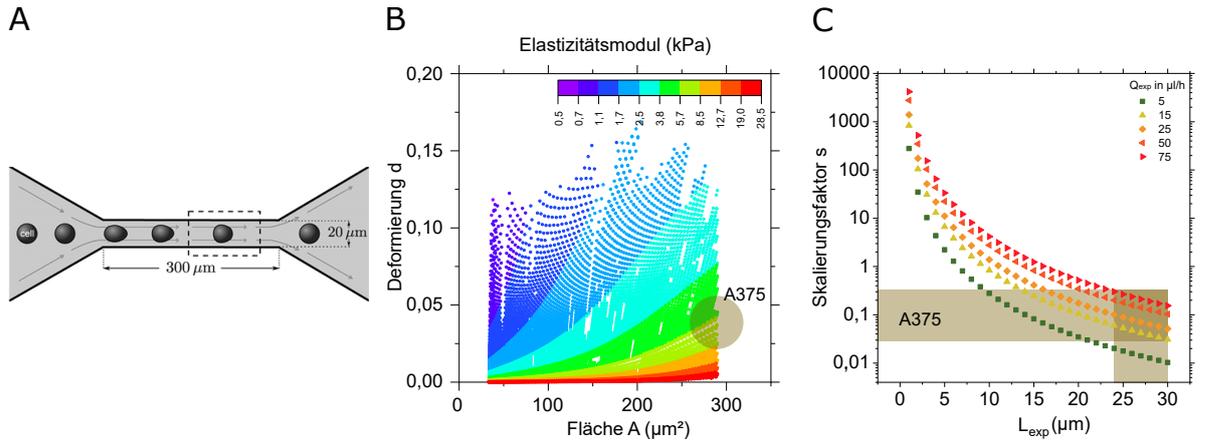
um ca. 3000 Trajektorien. Abb. 6.2 C zeigt die resultierenden Elastizitätsmoduln sechs unabhängiger solcher Messungen. Für die A375 Zellen ergeben sich Werte von  $E = 300 - 1000$  Pa. Zur Einordnung dieses Ergebnisses werden nun Flusszytometriedaten betrachtet [157].

## Validierung des Modells

Das Modell zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls, wie es in dieser Arbeit verwendet wird, ist in zwei Punkten aus einer etwas anderen Situation auf die hier vorliegende übertragen. Erstens handelt es sich in der Literatur um nahezu kugelförmige Objekte, während hier auch Zellaggregate betrachtet werden sollen. Zweitens ist das Verjüngen des Flusses in der Literatur durch eine Kanalkreuzung mit zwei senkrechten Zuflüssen realisiert, während sich die in dieser Arbeit verwendeten Kanäle selbst verjüngen. Dass die Rechnung dennoch sinnvolle Ergebnisse liefert, wird in diesem Unterkapitel durch Messungen an Einzelzellen validiert. Solche Messungen sind weiter verbreitet, und erlauben daher einen Vergleich mit Literaturwerten. Besonders stütze ich mich hier auf den *AcCellerator* der Zellmechanik Dresden Gruppe um Dr. Oliver Otto.

## Flusszytometer *AcCellerator*

Der *AcCellerator* ist ein Zytometer zur mechanischen Zellcharakterisierung durch Messung der Verformung von Zellen im Fluss in Echtzeit. Das Herzstück ist eine Stenose, deren engster Teil einen Querschnitt von  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$  aufweist und  $300 \mu\text{m}$  lang ist, vgl. Abb. 6.3 A. In diesem Kanalabschnitt werden Hochgeschwindigkeitsaufnahmen der durchströmenden Zellen gemacht, und die Deformierung  $d$  der Zellen bestimmt. Der mikrofluidische Aufbau zur Verwendung mit einem invertierten Mikroskop ist käuflich zu erwerben. Zur Auswertung der zytometrischen Daten steht die Python-basierte Software *ShapeOut* zur Verfügung. Der Quellcode der Software ist öffentlich zugänglich. Somit ist die Übertragung auf die Experimente in dieser Arbeit auch ohne die *AcCellerator* Hardware möglich.



**Abbildung 6.3:** **A)** Prinzip des Durchflusszytometers *AcCellerator* nach Mietke et al. [157]. Es werden Hochgeschwindigkeitsaufnahmen von Zellen bei Passage einer Stenose mit  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$  Querschnitt und  $300 \mu\text{m}$  Länge aufgenommen, und im Beobachtungsfenster im engsten Teil der Stenose (gestricheltes Rechteck) Deformierung  $d$ , vgl. Gl. 6.1, und Fläche  $A$  der Zellen bestimmt.

**B)** Tabellarisch hinterlegte Werte für den Elastizitätsmodul als Funktion der Deformierung  $d$  und der Fläche  $A$  in der *AcCellerator* Software *ShapeOut*. Diese Werte gelten für einen Kanaldurchmesser von  $L_{\text{tab}} = 20 \mu\text{m}$  und eine Flussrate von  $Q_{\text{tab}} = 144 \mu\text{l/h}$  [158].

**C)** Skalierungsfaktor  $s$  für den Elastizitätsmodul aus B) zur Übertragung auf andere experimentelle Bedingungen. Für Kanaldurchmesser  $L = 25 - 30 \mu\text{m}$  und Flussrate  $Q = 50 - 75 \mu\text{l/h}$  ist  $s \approx 0, 1$ .

Insbesondere ist der Elastizitätsmodul interessant. Die Werte  $E(A, d)$  sind tabellarisch als Funktion der Deformierung  $d$  und der Zellfläche  $A$  hinterlegt, in Abb. 6.3 B sind sie unverändert dargestellt. Die Deformierung  $d$  ist hier über die Rundheit  $c$  definiert

$$d = 1 - c = 1 - \frac{2\sqrt{\pi A}}{P}, \quad (6.1)$$

$A$  bezeichnet die Fläche und  $P$  den Umfang der Zelle in der Bildebene [157]. Diese Tabelle beruht auf einem analytischen und einem numerischen Modell, die sich gegenseitig ergänzen und validieren. Das

theoretische Modell beschreibt Zellen als linear elastische, isotrope, zunächst kugelförmige Objekte, die sich durch einen zylindrischen Kanal bewegen. Aus der Stokes Gleichung folgt die Beschreibung der Strömungslinien um das runde Objekt, und daraus wiederum die hydrodynamische Spannung auf die Kugeloberfläche. Die aus der Spannung resultierende Verformung der Kugel wird maßgeblich von der Elastizität der Kugel bestimmt. Durch Variation dieses Parameters  $E$  und der Zellgröße  $A$ , und Bestimmung der resultierenden Deformierung  $d$ , lässt sich der Parameterraum  $E(A, d)$  füllen. Demselben Prinzip folgend wurden Finite Elemente Simulationen durchgeführt, um die Ergebnisse des theoretischen Modells zu stützen [158]. Im Rückschluss lässt sich anhand dieser Tabelle  $E(A, d)$  die Elastizität  $E$  von Zellen bestimmen, wenn Fläche  $A$  und Verformung  $d$  aus Mikroskopaufnahmen unter Fluss bekannt sind [157].

Die Werte aus der Tabelle  $E_{\text{tab}}(A, d)$  gelten zunächst nur für eine bestimmte Kanalgeometrie, beschrieben durch eine charakteristische Länge  $L_{\text{tab}}$ , hier der Durchmesser des quadratischen Querschnitts  $L_{\text{tab}} = 20 \mu\text{m}$ , bei einer bestimmten Flussrate  $Q_{\text{tab}} = 144 \mu\text{l/h}$  und Viskosität  $\eta_{\text{tab}}$ . Zur Übertragung auf andere experimentelle Bedingungen müssen die Werte für  $E_{\text{tab}}$  mit einem Skalierungsfaktor  $s$  versehen werden, der von der Scherspannung  $\sigma = \eta Q/L^3$  abhängt.

$$E_{\text{exp}} = sE_{\text{tab}} = \frac{\sigma_{\text{exp}}}{\sigma_{\text{tab}}} E_{\text{tab}} = \frac{\eta_{\text{exp}} Q_{\text{exp}} L_{\text{tab}}^3}{\eta_{\text{tab}} Q_{\text{tab}} L_{\text{exp}}^3} E_{\text{tab}} \quad (6.2)$$

Unter der Annahme, dass die Viskosität  $\eta$  in beiden Fällen vergleichbar ist, kann der Skalierungsfaktor  $s$  auch für moderat variierende Flussraten von  $5 \mu\text{l/h} < Q < 75 \mu\text{l/h}$  und Kanaldurchmesser von  $5 \mu\text{m} < L_{\text{exp}} < 25 \mu\text{m}$  stark unterschiedliche Werte im Bereich von  $0,01 < s < 1000$  annehmen, vgl. Abb. 6.3 C.

Für die hier verwendeten A375 Zellen ergaben sich mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode Werte von  $E = 300 - 1000 \text{ Pa}$ , vgl. Abb. 6.2 C. Zum Vergleich mit den Tabellenwerten aus dem *AcCellerator* muss zunächst der Skalierungsfaktor  $s$  nach Gl. 6.2 bestimmt werden. Für  $L_{\text{exp}} = 25 - 30 \mu\text{m}$  und  $Q_{\text{exp}} = 50 - 75 \mu\text{l/h}$  ist  $s \approx 0,1$ . Die Tabellenwerte für  $A \approx 300 \mu\text{m}^2$  und  $d \approx 0,03$  liegen bei  $E_{\text{tab}} = 5 - 8 \text{ kPa}$ . Durch Skalieren mit  $s$  fällt die Referenz  $E_{\text{exp}} = sE_{\text{tab}} = 500 - 800 \text{ Pa}$  genau in den Bereich der Messergebnisse. Zur weiteren Validierung dieses Werts für die Elastizität werden im Folgenden Kraftspektroskopiemessungen an A375 Zellen beschrieben.

### 6.1.2 Elastizität von Melanomzellen - Kraftspektroskopie

Üblicher als die Mikrofluidikvariante ist es, die Elastizität mittels Kraftspektroskopie zu ermitteln. In Zusammenarbeit mit Simon Neidinger, Arbeitsgruppe Biophysik, wird in diesem Abschnitt der Elastizitätsmodul von A375 Zellen mit einem Rasterkraftmikroskop (AFM) untersucht. Hierfür wird ein *NanoWizard 2* (Firma JPK, Deutschland) verwendet.

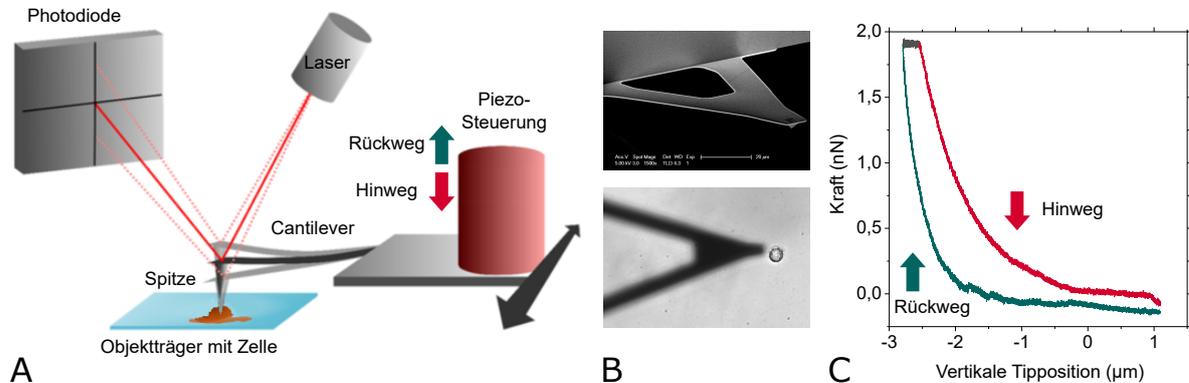
#### Vorbereitung der Zellen auf Glas

Um den Elastizitätsmodul der A375 Zellen mit einem AFM bestimmen zu können, lässt man die Zellen auf einem Glasobjektträger adhären, der mit Poly-L-lysine (PLL) beschichtet ist. Hierzu werden PLL und PBS im Verhältnis 4:996 auf einen Objektträger gegeben. Hier ist zu beachten, dass die Eigenschaften des Substrats Auswirkungen auf die Zelle haben können [159]. Andererseits ist eine gewisse Fixierung der Zelle für eine Messung notwendig. Nach mindestens einer Stunde Einwirkzeit wird die PLL-Lösung abpipettiert, mit PBS gespült und anschließend die Zellsuspension auf das Glas gegeben. Nach wenigen Minuten haften die Zellen bereits zuverlässig auf der Oberfläche und können auch durch die Messspitze des AFMs nicht mehr verschoben werden. Die Messungen finden in Flüssigkeit statt. Hierbei wird entweder reines PBS, reines Medium oder eine Mischung verwendet.

#### Rasterkraftmikroskop - Kraftspektroskopie

Ein Rasterkraftmikroskop (AFM) ist im Prinzip eine empfindliche Spitze, mit der eine Oberfläche abgetastet werden kann [160]. Dabei sind grundsätzlich zwei Anwendungen zu unterscheiden: Erstens das topografische Erfassen einer Probe: hier wird die Probe in x-y-Ebene abgerastert und Punkt für Punkt ein Höhenprofil erstellt, indem z.B. die Kraft zwischen Spitze und Oberfläche durch stetes nachregeln konstant gehalten wird. Die zweite Art der Anwendung und hier für dieses Kapitel relevant ist die Kraftspektroskopie. Hier wird die x-y-Position der Spitze festgehalten, und wie in Abb. 6.4 dargestellt, die Kraft bei Bewegung der Spitze in z-Richtung auf die Oberfläche der Probe zu und von

ihr weg gemessen, um Kraft-Abstands-Kurven aufzunehmen. Für eine solche Messung wird die an der Vorderseite einer Messsonde (Cantilever) befindliche Spitze (Tip) in Kontakt mit der zu untersuchenden Probe gebracht. Ein Laserstrahl leuchtet auf die Rückseite des Cantilevers und wird von dort aus auf eine Vierfeld-Photodiode reflektiert, vgl. Abb. 6.4 A. Sobald die Spitze den Untergrund kontaktiert, kommt es zu einer Krümmung des Cantilevers und somit zu einer Auslenkung des Lasersignals auf der Diode. Nach Kalibrierung kann aus der Auslenkung direkt auf die angelegte Kraft geschlossen werden.



**Abbildung 6.4:** AFM Kraftspektroskopie an einer Zelle.

**A)** Messprinzip eines AFM nach [161]. Der Cantilever mit Messspitze wird durch eine Piezo-Einheit gesteuert, und die Auslenkung durch einen Laser, der am Cantilever reflektiert wird, an einer Vierfeld-Photodiode detektiert. Eine Kraft-Abstands-Kurve wird durch Herunterbewegung der Messspitze auf die Zelle bis zum Eindringen dieser (Hinweg) und anschließendes kontrolliertes Hochfahren der Spitze (Rückweg) aufgenommen. Zelle und Spitze befinden sich in Flüssigkeit.

**B** Oben: Verwendeter Cantilever mit Spitze (MLCT-BIO [162]). Unten: Mikroskopaufnahme einer A375 Zelle und eines Cantilevers ohne Spitze (MLCT-010-D [163]).

**C)** Kraft-Abstands-Kurve für eine Beispielmessung *AFM mit Spitze* mit Cantileverhärte 0,03 N/m, Kraft-Setpoint 2 nN, Anfahrtsgeschwindigkeit 1  $\mu\text{m/s}$  und Anfahrtslänge 5  $\mu\text{m}$ . Zwischen Hin- und Rückweg (rot und grün) liegt eine Pause von 1 sec bei konstanter Kraft (schwarz) [164].

Cantilever und Spitzen gibt es für verschiedene Anwendungen in unterschiedlichen Formen und Härten. Für Messungen an Zellen eignet sich entweder eine runde Messspitze, bspw. in Form einer Kugel [165, 166], oder eine Spitze in Pyramiden- oder Kegelform [167]. Zweitere ermöglichen durch ihre geringere Kontaktfläche zum Objekt eine feinere Ortsauflösung, erhöhen durch die spitzere Form aber auch die Gefahr, die Zellen durch eine große punktuelle Krafteinwirkung zu beschädigen [165]. Für die Messungen in dieser Arbeit wird eine pyramidenförmige Spitze des Typs MLCT-BIO (Firma Bruker, Massachusetts, Vereinigte Staaten) mit ca. 3  $\mu\text{m}$  Kantenlänge, Spitzenradius 20 nm, einem Winkel von  $\alpha = 35^\circ$ , sowie einer Cantileverhärte von 30 mN/m verwendet [162], vgl. Abb. 6.4 B. Außerdem kommen Cantilever mit 20  $\mu\text{m}$  Breite ohne Spitze zum Einsatz (MLCT-010-D, Firma Bruker, Massachusetts, Vereinigte Staaten [163]). Eine Spitze birgt das Risiko, die Zelle zu punktieren und zu beschädigen. Drückt man mit der flachen Seite der 20  $\mu\text{m}$  breiten Cantilever auf die Zelle, misst man nicht nur lokale elastische Eigenschaften, sondern eher die Elastizität der ganzen Zelle als homogenes Objekt.

Für die Kraftspektroskopiemessungen mit und ohne Spitze befindet sich die untersuchte, adhärenente A375 Zelle in Flüssigkeit (PBS und Nährmedium) auf PLL-beschichtetem Glas. Die Messspitze wird mit Hilfe einer Kamera möglichst mittig über der Zelle positioniert, und schließlich über eine Anfahrtslänge von 5  $\mu\text{m}$  mit einer Anfahrtsgeschwindigkeit von 1  $\mu\text{m/s}$  von oben auf die Zelloberfläche zubewegt, dies wird als „Hinweg“ bezeichnet, vgl. Abb. 6.4. Die Zelle wird schließlich berührt und eingedrückt. Die Kraft, die die Spitze ausübt, wird währenddessen als Funktion der z-Position der Messspitze ermittelt, vgl. Beispielmessung in Abb. 6.4 C. Ist der Kraft-Setpoint von 2 nN erreicht, wird die Kraft für eine Sekunde konstant gehalten. Während dieser „Pause“ sinkt die Spitze tiefer in die Zelle ein, bzw. die Zelle gibt der konstanten Krafteinwirkung nach, vgl. Abb. 6.4 C. Die Ausbildung der Hysterese beruht auf den viskosen Eigenschaften der Zelle [168]. Wäre die Zelle rein elastisch, bliebe die Verformung bei einer bestimmten Kraft konstant und der Cantilever würde sich während der Pause nicht weiter bewegen. Es folgt der „Rückweg“, die Spitze wird mit der selben Geschwindigkeit wieder zurück nach oben in die Ausgangsposition bewegt. Ein neuer Scan kann beginnen. Für eine Messung werden üblicherweise mehrere Hundert solcher Scans durchgeführt. Ist das zu vermessende Material so empfindlich, dass es durch das häufige Eindringen beschädigt wird, wird die Zahl der Scans reduziert.

Für diese Arbeit wurden pro Zelle 5 – 10 Messkurven aufgenommen.

Aus den Kraftkurven lässt sich die Elastizität des untersuchten Objekts bestimmen. Nach den Gleichungen 3.38-3.40 hängt der Elastizitätsmodul  $E$

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} = \frac{F/A}{\Delta L/L} \quad (6.3)$$

mit Kraft, Fläche und Verformung zusammen. Im Falle einer AFM-Messung gehen hier die Messgrößen Kraft, Eindringtiefe in die Zelle und Kontaktfläche zwischen AFM-Spitze und Messobjekt ein. Die Eindringtiefe folgt aus der Höhe des z-Piezos, die Kontaktfläche ist über die Spitzengeometrie bekannt. Auf Grundlage des Hertz-Modells, das das Eindringen bei Kontakt zweier Kugeln beschreibt, gibt es für die unterschiedlichen Spitzenformen passende Modelle. Für eine pyramidenförmige Spitze wird die sogenannte Bilodeau-Formel [169, 170]

$$F = 0,7453 \frac{E}{1 - \nu^2} \delta^2 \tan \alpha \quad (6.4)$$

mit der Kraft  $F$ , dem Elastizitätsmodul  $E$ , der Poissonzahl  $\nu = 0,5$ , der Eindringtiefe  $\delta$  und dem Winkel der Pyramide  $\alpha$  als Fitfunktion für den Hinweg der Messkurve  $F(\delta)$  verwendet, um den Elastizitätsmodul zu bestimmen. Beispielhaft ist eine solche Kurve in Abb. 6.4 C zu sehen. Für den 20  $\mu\text{m}$  breiten Cantilever ohne Spitze nehmen wir eine sphärische Form mit Radius  $R_S = 10 \mu\text{m}$  an. Für eine solche Form gilt die Formel

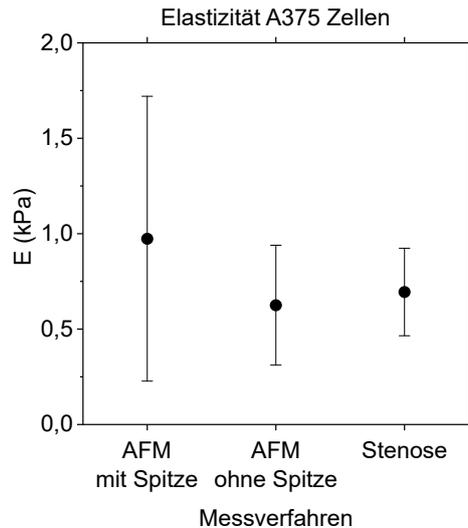
$$F = \frac{E}{1 - \nu^2} \left[ \frac{a^2 + R_S^2}{2} \ln \frac{R_S + a}{R_S - a} - aR_S \right] \quad (6.5)$$

$$\delta = \frac{a}{2} \ln \frac{R_S + a}{R_S - a} \quad (6.6)$$

mit Radius des Kontaktkreises  $a$ . Unabhängig von der Form der Spitze setzt das Hertz-Modell voraus, dass das zu vermessende Objekt unendlich dick, homogen und rein elastisch ist [169]. Dies ist mit Blick auf den Aufbau der Zelle nur eingeschränkt zutreffend. Zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls wird daher empfohlen, nicht mehr als 10 % der Zellhöhe tief in die Zelle einzudringen, um Einflüsse des Substrats vernachlässigbar klein zu halten [168, 169]. Da die Eindringtiefe im vorliegenden Fall teilweise größer ist, wird gegebenenfalls lediglich der erste Mikrometer des Eindringens für den Fit nach Gleichung 6.4 bzw. 6.5 verwendet. Zur Anpassung der Fits sind für jede Kurve Korrekturparameter wie eine Basislinie und die z-Position des Kontaktpunktes zu wählen, die im Laufe einer Messung schwanken können und daher nachkorrigiert werden müssen.

## Elastizität von Melanomzellen - Kraftspektroskopie

Für die drei unterschiedliche Messverfahren *AFM mit Spitze*, *AFM ohne Spitze* und *Stenose* ergeben sich ähnliche, aber nicht gleiche Werte für die Elastizität der A375 Zellen, vgl. Abb. 6.5. Für die AFM Ergebnisse wurden auf jeweils 5 – 10 Zellen je ca. 5 – 10 Kraftkurven nach dem in Abb. 6.4 dargestellten Prinzip aufgenommen. Nicht jede aufgenommene Kurve ist für den Fit geeignet, manche sind artefaktbehaftet und müssen aussortiert werden, nur eine Kurve pro Zelle wäre also zu wenig. Zu häufiges Eindringen der Zelle beschädigt die Zelle allerdings, bei Messung 100 erscheint die Zelle bspw. etwas härter, bei Messung 200 deutlich härter als zu Anfang. Diese Daten sind hier nicht gezeigt. Um die Anzahl der Messkurven auf einer Zelle klein zu halten und gleichzeitig die Qualität des Messwerts durch wiederholen zu sichern, werden 10 Kurven aufgenommen, und davon 5 – 10 ausgewertet, bzw. mehr Kurven aufgenommen und die ersten 10 verwendet, um den Elastizitätsmodul durch Fit nach Gleichung 6.4 (mit Spitze) bzw. 6.5 (ohne Spitze) zu bestimmen und über 5 – 10 Zellen Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Unter *Stenose* sind die Ergebnisse aus den Mikrofluidikmessungen aus Abb. 6.2 C zusammengefasst. Diese ergaben einen Wert von  $E = 695 \text{ Pa} \pm 229 \text{ Pa}$ . Ohne Spitze ergibt sich ein Elastizitätsmodul von  $E = 625 \text{ Pa} \pm 314 \text{ Pa}$ , der nah an dem aus dem mikrofluidischen Verfahren liegt. Mit Spitze ist der Elastizitätsmodul mit  $E = 974 \text{ Pa} \pm 746 \text{ Pa}$  höher, und der Fehlerbalken größer. Dies ist vermutlich mit der Genauigkeit des Experiments zu begründen. Die Position des Cantilevers wird über eine Kamera kontrolliert. Ist das Ende des Cantilevers zentral über einer Zelle, bzw. bei Experimenten ohne Spitze überdeckt das Endstück der Kamera die Zelle ganz, wird die Messung gestartet. Genauer ist nicht zu kontrollieren, ob die Zelle, die ca. 15 – 20  $\mu\text{m}$  im Durchmesser misst, von der 3  $\mu\text{m}$  breiten Pyramide mit 20 nm großer Spitze mittig getroffen wird. Werden eher Randbereiche getroffen, oder die Zelle sogar durchstoßen, können sich höhere Werte ergeben, weil das härtere Substrat



**Abbildung 6.5:** Elastizitätsmodul von A375 Zellen nach Kraftspektroskopie (AFM) und aus Flussmessungen [164], Vergleich der unterschiedlichen Messverfahren.

**AFM:** Das Ergebnis der AFM Messungen mit und ohne Spitze ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus Messungen an 5 – 10 Zellen mit  $\sim 10$  Kraftkurven pro Zelle. Der Cantilever ohne Spitze ist vorne  $20 \mu\text{m}$  breit, der Spitzenradius der hier verwendeten ca.  $3 \mu\text{m}$  langen Spitzen beträgt  $20 \text{ nm}$ .

**Stenose:** Die Elastizität wurde außerdem anhand der Verformung unter Fluss bei Passage einer Stenose bestimmt. Der Wert hier fasst die sechs Werte aus Abb. 6.3 zusammen, in die jeweils Trajektorien von ca. 3000 Zellen eingehen.

mitgemessen wird. Außerdem beeinflusst die Inhomogenität der Zelle bei kleinerer Kontaktfläche das Ergebnis stärker. Insgesamt bestätigen sich die Ergebnisse der drei Messverfahren gegenseitig.

### Einordnung in die Literatur

Zur weiteren Einordnung der Ergebnisse betrachten wir zunächst die Arbeiten von Guillou et al., die bei Durchfluss einer Kanalkreuzung die Verformung von Zellen gegen die anliegende Spannung auftragen, und aus der Steigung deren Elastizität berechnen. Für 3T3 Fibroblasten erhalten sie je nach Zeitkonstante Schermodule zwischen  $G_0(200\text{ms}) = 101 \pm 8 \text{ Pa}$  und  $G_0(5\text{ms}) = 590 \pm 5 \text{ Pa}$ . Zur Validierung zeigen sie Ergebnisse aus Optical Stretcher Experimenten mit Werten von  $70 - 100 \text{ Pa}$ . Für Glioblastom Tumorzellen messen sie mikrofluidisch  $G_0 = 440 \pm 0,03 \text{ Pa}$ , und führen als Referenz AFM Messungen an, die  $800 - 900 \text{ Pa}$  ergaben [156].

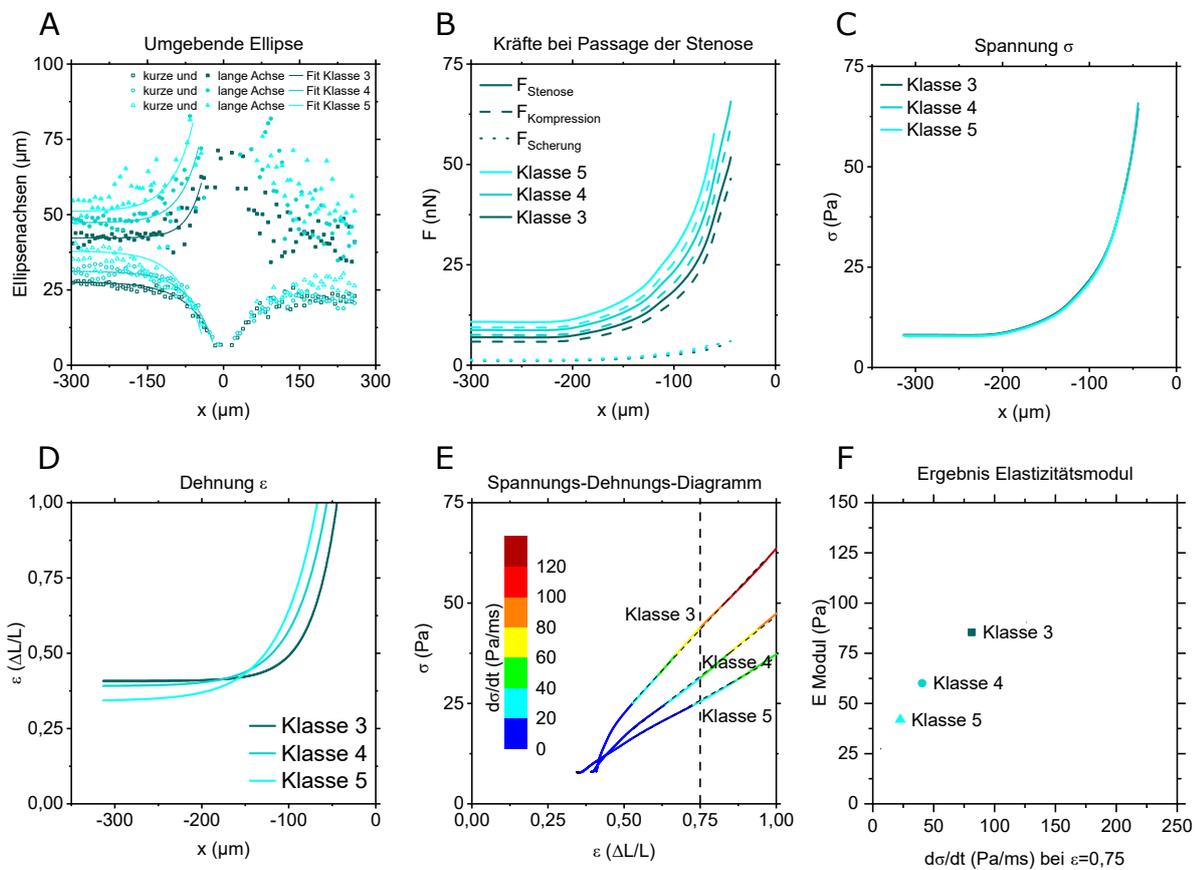
Ein Vergleich von Elastizitätsmoduln, die durch unterschiedliche Techniken bestimmt wurden, ist auch bei Chen et al. zu finden [171], die ebenfalls eine mikrofluidische Methode entwickelt haben. Hier wird eine Zelle durch eine enge Stenose gequetscht und der Druckabfall dabei gemessen. Für K562 Leukämiezellen erhalten sie mikrofluidisch  $64 \text{ Pa}$ , durch Mikropipettenaspiration  $90 \text{ Pa}$  und aus AFM Messungen  $400 \text{ Pa}$ . Diese Systematik setzt sich für Endothelzellen jedoch nicht fort. Hier ergeben sich mikrofluidisch  $383 \text{ Pa}$ , durch Mikropipettenaspiration  $100 - 400 \text{ Pa}$  und aus AFM Messungen  $700 - 3000 \text{ Pa}$ .

Der genaue Zahlenwert des Elastizitätsmoduls hängt also stark von der Messmethode ab. Ein Einordnen in den Bereich passender Größenordnung ist daher ausreichend bzw. zufriedenstellend. Nach somit erfolgter Validierung der mikrofluidischen Methode durch das Vermessen von A375 Zellen wird diese Methode zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls nun auf Rosetten angewandt.

## 6.2 Effektive Elastizität von Zellaggregaten

Nachdem die Methode nun an Melanomzellen getestet und validiert ist, befasst sich das folgende Kapitel mit der Deformierbarkeit von Aggregaten roter Blutkörperchen bei Malariainfektion (Rosetten). Während in Kap. 5 gezeigt wurde, welcher Anteil der Rosetten die Stenose unbeschädigt passiert, geht es hier darum, den Elastizitätsmodul der Unbeschädigten zu berechnen. Die Dehnung der unter Fluss langgezogenen, im Ruhezustand nahezu runden Rosetten wird nach Gleichung 3.41 als Längenänderung im Verhältnis zum runden Zustand definiert, vgl. Abb. 3.5 A. Die Spannung  $\sigma$  ist an jeder Stelle  $x$  im Kanal von der dort herrschenden Kraft  $F_{\text{Stenose}}(x)$  abhängig. Diese Kraft, vgl. Gl. 3.28, setzt sich aus Kompressions- und Scherkomponente zusammen, und wird maßgeblich von der Flussgeschwindigkeit bestimmt, vgl. Gl. 3.25 und 3.27.

### Erstellung des Spannungs-Dehnungs-Diagramms



**Abbildung 6.6:** Schritte zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls für Rosetten der Klassen 3-5 anhand einer Beispielmessung mit  $d = 5 \mu\text{m}$  und  $e = 3e_{\text{Std}}$  in Blutgruppe 0.

**A)** Kurze und lange Achse der Ellipse, die die Form der Rosetten beschreibt, entlang des Kanals. Lange und kurze Achse werden durch die Fitgleichungen Gl. 4.3 und 4.4 angepasst. Mitte der Stenose bei  $x = 0$ .

**B)** Kräfte  $F_{\text{Scherung}}$  nach Gl. 3.27,  $F_{\text{Kompression}}$  nach Gl. 3.25 und  $F_{\text{Stenose}} = F_{\text{Scherung}} + F_{\text{Kompression}}$  nach Gl. 3.28 entlang des Kanals für die Klassen 3 – 5.

**C)** Spannung  $\sigma(x)$  nach Gl. 3.45, die aus der Kraft  $F_{\text{Stenose}}$  in Abb. B folgt.

**D)** Dehnung  $\epsilon$ , vgl. Gl. 3.41 bzw. 4.5 entlang des Kanals.

**E)** Sind  $\sigma(x)$  und  $\epsilon(x)$  aus Abb. C und D bekannt, lässt sich die Spannung  $\sigma(\epsilon)$  als Funktion der Dehnung  $\epsilon$  betrachten. Zusätzlich ist die Belastungsgeschwindigkeit in Falschfarbendarstellung aufgetragen. Die Steigung der linearen Fits ist der gesuchte Elastizitätsmodul E.

**F)** Das Ergebnis für E wird gegen die Belastungsgeschwindigkeit bei  $\epsilon = 0,75$  aufgetragen, vgl. Abb. 6.7.

Neben der Geschwindigkeit und der Kanalgeometrie geht insbesondere die Form der Aggregate in die Berechnung der Kraft  $F_{\text{Stenose}}(x)$  nach Gl. 3.28 bzw. Spannung  $\sigma(x)$  nach Gl. 3.45 ein. Die Form wird durch die umgebende Ellipse abstrahiert. Bei Passage der Stenose wird die Entwicklung der beiden Ellipsenachsen aufgezeichnet. Auf dieser Grundlage werden zunächst die Dehnung  $\epsilon(x)$ ,

vgl. Gl. 4.5, und die Spannung  $\sigma(x)$  berechnet, um schließlich den Elastizitätsmodul  $E$  aus dem Spannungs-Dehnungs-Diagramm zu entnehmen.

Die Schritte zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls sind in Abbildung 6.6 anhand einer Beispielmessung aufgeführt. Zunächst werden die Werte für die Halbachsen der die Rosetten umgebenden Ellipsen für alle Trajektorien einer Messung geplottet, und in 10 Pixel Schritten über alle Trajektorien gemittelt. Diese gemittelten Daten werden durch einen exponentiellen Fit angepasst, vgl. Gl. 4.3 und Abb. 6.6 A. Die Dehnung  $\epsilon$ , vgl. Gl. 3.41 bzw. 4.5 lässt sich aus der langen Halbachse berechnen. Entlang des Kanals ergibt sich  $\epsilon(x)$  in Abb. 6.6 D aus den Fits für  $a(x)$  in Abb. 6.6 A. Für das Berechnen der Kräfte in Abb. 6.6 B werden die Fits für lange und kurze Halbachse nach Gleichungen 4.3 und 4.4 benötigt. Davon ausgehend lässt sich die Spannung  $\sigma$  auf ein Aggregat durch nach örtlichem Durchmesser gewichtete Summierung über dessen Länge nach Gl. 3.45 bestimmen. Sind nun  $\sigma(x)$  und  $\epsilon(x)$  wie in Abb. 6.6 C und D dargestellt bekannt, lässt sich die Spannung  $\sigma(\epsilon)$  als Funktion der Dehnung  $\epsilon$  betrachten. Die Steigung der linearen Fits in Abb. 6.6 E ist der gesuchte Elastizitätsmodul  $E$ . Zusätzlich ist die Belastungsgeschwindigkeit in Falschfarben dargestellt. Bei Verengung der Stenose nimmt die Spannung  $\sigma$  mit der Geschwindigkeit  $\dot{\sigma}$

$$\dot{\sigma} = \frac{d\sigma}{dt} \approx \frac{\Delta\sigma}{\Delta t} \quad (6.7)$$

zu. Je enger der Stenosedurchmesser, desto höhere Werte nimmt  $\Delta\sigma$  an. Außerdem verkürzen sich die Zeitintervalle pro Pixel, da die Flussgeschwindigkeit zunimmt. Die Belastungsgeschwindigkeit variiert also stark entlang der Stenose. Als relevante Größe wird die Belastungsgeschwindigkeit an der Stelle betrachtet, an der die Aggregate auf  $\epsilon = 0,75$  gedehnt sind, da der Fitbereich für  $\sigma(\epsilon)$  zwischen  $\epsilon = 0,5$  und  $\epsilon = 1$  liegt. Daraus ergibt sich der Elastizitätsmodul als Funktion dieser Belastungsgeschwindigkeit  $\dot{\sigma}(\epsilon = 0,75)$ , vgl. Abb. 6.6 F.

In Abb. 6.6 C fällt auf, dass die Spannung  $\sigma$  für alle Aggregatklassen zusammenfällt. Eine Erklärung ist in der Berechnung der Spannung zu finden. Die Spannung beschreibt die Kraft pro Fläche, vgl. Gl. 3.42. Die Gesamtkraft  $F_{\text{Stenose}}$  wird fast ausschließlich von der Kompressionskraft ausgemacht, vgl. Abb. 6.6 B. Die Kompressionskraft hängt wiederum linear von der Aggregatfläche ab. Die Spannung ist damit eine Größe, deren Nenner und Zähler denselben Faktor Aggregatfläche enthalten,  $\sigma \approx F_K/A = c_K A/A$ . Der Vorfaktor  $c_K$  ist größenunabhängig. Der Einfluss des gewichteten Mittels über unterschiedliche Längen nach Gl. 3.45 ist klein.

### 6.2.1 Rosetten der Blutgruppen 0 und A

Auf die in Abb. 6.6 beschriebene Weise bestimmte Elastizitätsmoduln für Rosetten aus Blutgruppe 0 und A aus jeweils ca. 20 Messungen, wobei jede Messung Trajektorien von 150 – 500 Rosetten enthält, sind in Abb. 6.7 zusammengetragen. Obwohl hier Messwerte aus Experimenten mit unterschiedlichen Stenosegeometrien zusammengefasst sind, ist ein systematischer Zusammenhang von Elastizitätsmodul und Belastungsgeschwindigkeit erkenntlich, der sich durch einen linearen Fit beschreiben lässt. Für alle Klassen, vgl. Abb. 6.7 von links nach rechts, als auch für beide Blutgruppen, vgl. Abb. 6.7 erste und zweite Zeile, scheinen höhere Belastungsgeschwindigkeiten höhere Elastizitätsmoduln zu bedingen. Unter schnellerer Belastung erscheinen die Aggregate also härter. Zum Vergleich der unterschiedlich großen Aggregate untereinander wird nun jeweils durch Einsetzen in die entsprechende Fitfunktion der Elastizitätsmodul bei einer festen Belastungsgeschwindigkeit von  $\dot{\sigma} = 100 \text{ Pa/ms}$  berechnet, vgl. Abb. 6.7 G. Es ist zumindest in Blutgruppe 0 ein mit zunehmender Größe abfallender Trend zu erkennen, größere Aggregate scheinen also „weicher“ zu sein. Dies entspricht der bereits angeführten Theorie, dass größere Aggregate durch Rearrangieren flexibler sind. Ob dieser Effekt in Blutgruppe A nicht sichtbar wird, weil er nicht signifikant ist, oder dort durch stärkere Zell-Zell-Bindung nicht auftritt, ist anhand dieser Daten nicht zu entscheiden.



### 6.2.2 Die Rolle der Belastungsgeschwindigkeit

Die Belastungsgeschwindigkeit spielt häufig bei der Belastung von Proteinbindungen eine Rolle. Üblicherweise wird die Krafrate und die zum Bruch der Bindung aufzubringende Kraft betrachtet. Sackmann führt beispielsweise aus, dass eine Bindung höheren Kräften standhalten kann, wenn die Kraft schneller gesteigert wird [83]. Genauer verhält sich der Median der Bruchkräfte  $F_{1/2}$  als Funktion der Krafrate

$$F_{1/2}(\dot{f}) = F_0 \ln\left(1 + \frac{\dot{f}}{k_0 F_0} \ln 2\right) \quad (6.8)$$

logarithmisch. Beispielhaft führt er Messdaten zu Bruchkräften der Bindungen zwischen einem bakteriellen Oberflächenprotein und Antikörpern, mit der Mikropipetten-Aspirationstechnik gemessen, an, vgl. Abb. 6.8 unten. Die Fitparameter sind  $k_0$ , die Dissoziationsrate in Abwesenheit externer Kräfte, und  $F_0$ , eine charakteristische Kraft. Das Produkt  $k_0 F_0$  beschreibt die minimale Kraftsteigerungsrate, bei dem ein Maximum in der Verteilung der Bindungsbrüche bei einer endlichen Kraft sichtbar wird. Die charakteristische Kraft  $F_0$  hängt mit dem räumlichen Abstand  $a$  zwischen Ausgangszustand und Übergangszustand über die Rate des Bindungsbruchs

$$k_F = \tau^{-1} \exp\left(-\frac{G_S - Fa}{k_B T}\right) = k_0 \exp\left(\frac{Fa}{k_B T}\right) = k_0 \exp\left(\frac{F}{F_0}\right) \quad (6.9)$$

zusammen. Für das in Abb. 6.8 unten gezeigte Beispiel ergibt sich dieser Abstand  $a$  zu  $a = k_B T / F_0 = 0,73$  nm mit  $F_0 = 5,6$  pN.

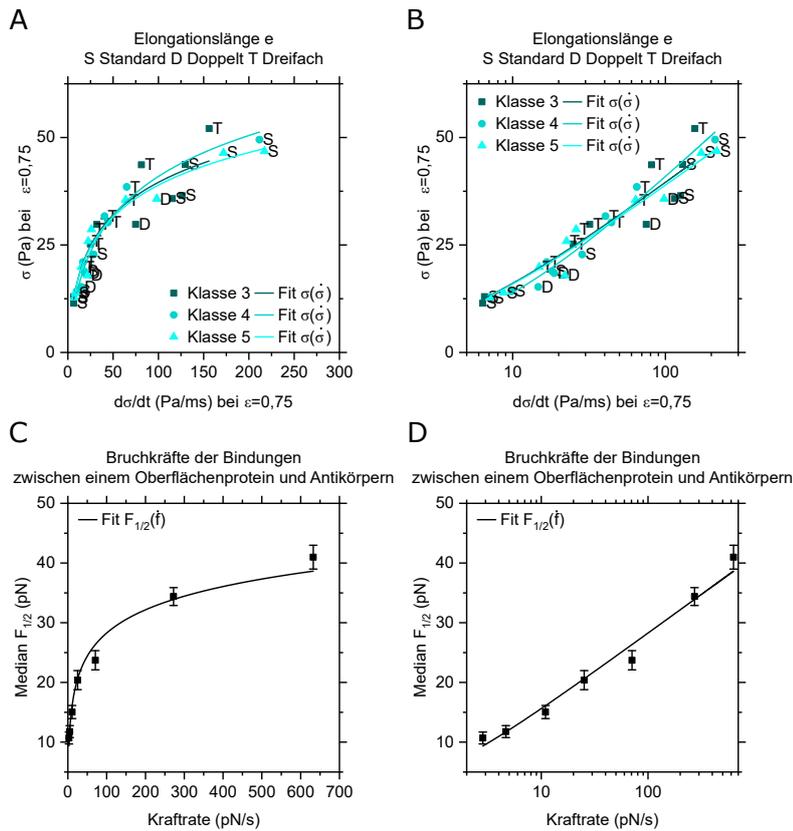
Die Übertragung auf meine Ergebnisse stützt sich darauf, dass die selbe Abhängigkeit, die für den Median gilt, auch für die maximale Kraft gelten soll. Da in meinem Fall nicht bis zum Bruch belastet wird, betrachte ich die Kraft, die zu einer Dehnung von  $\epsilon = 0,75$  führt. Außerdem gehe ich davon aus, dass sich Kraft und Spannung qualitativ gleich verhalten. Analog zum Median der Bruchkräfte wird nun die Spannung  $\sigma$  bei einer Dehnung von  $\epsilon = 0,75$  als Funktion der oben eingeführten Belastungsgeschwindigkeit  $\dot{\sigma}(\epsilon = 0,75)$  betrachtet. In Abb. 6.8 oben ist die selbe Abhängigkeit zu sehen, die Sackmann für das mechanische Brechen spezifischer, proteingestützter Bindungen postuliert. Analog zur Fitfunktion  $F_{1/2}(\dot{f})$  Gl. 6.8 für die Bruchkräfte formuliere ich für die Spannung  $\sigma_{0,75}(\dot{\sigma})$

$$\sigma_{0,75}(\dot{\sigma}) = \sigma_0 \ln(1 + b\dot{\sigma}). \quad (6.10)$$

Statt der charakteristischen Kraft  $F_0$  erhalte ich die charakteristische Spannung  $\sigma_0 \approx 12$  Pa, und eine intrinsische Rate  $k_0 = \ln 2 / b\sigma_0 \approx 0,2$  ms<sup>-1</sup> mit  $b \approx 0,3$  ms/Pa aus den in Abb. 6.8 oben eingezeichneten Fits für die drei Klassen. Die charakteristische Spannung  $\sigma_0$  hängt analog zu  $F_0 = k_B T / a$  mit einem von der Bindung eingenommenen Volumen  $V_b = aA = k_B T / \sigma_0$  zusammen. Für  $\sigma_0 = 12$  Pa ergibt sich  $V_b = 3,3 \times 10^{-22}$  m<sup>3</sup>. Das entspricht einem Würfel von 70 nm Kantenlänge. Die Grundfläche ist ungefähr mit der Fläche eines *knobs* vergleichbar. *Knobs* sind runde Erhebungen auf der Membran infizierter Erythrozyten, an deren Spitze wiederum das Bindungsprotein *PfEMP1* exprimiert wird. Ein solcher *knob* misst 50 – 150 nm im Durchmesser und ca. 3 – 40 nm in der Höhe [154, 172], bzw. ca. 10.000 nm<sup>2</sup> in der Oberfläche. Cluster von *PfEMP1* auf den *knobs* machen die Bindung aus. Diese Fläche als Bindungsfläche zu bezeichnen ist also schlüssig. Die Höhe, also der Bindungsabstand, von 70 nm wirkt allerdings hoch. Üblich sind Bindungslängen in der Größenordnung  $l_b = 0,5$  nm. Betrachtet man also keinen Würfel, sondern ein flaches Bindungsvolumen mit Bindungslänge  $l_b = 0,5$  nm, erhält man die Bindungsfläche  $A_b = V_b / l_b = 6,6 \times 10^{-13}$  m<sup>2</sup>. Geht man davon aus, dass sich diese Bindungsfläche aus vielen Kontaktpunkten zusammensetzt, und jeder Kontaktpunkt die halbe Oberfläche eines *knobs* besitzt, sind nach dieser Rechnung

$$N_b = \frac{0,66 \mu\text{m}^2}{0,5 \times 0,01 \mu\text{m}^2} = 132 \quad (6.11)$$

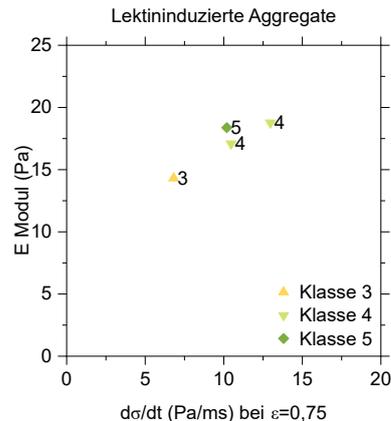
circa 130 *knobs* an der Bindung beteiligt [172]. Auf einem infizierten roten Blutkörperchen befinden sich circa  $N_{knobs} = 136 \mu\text{m}^2 \times 5 \text{ knobs}/\mu\text{m}^2 = 680 \text{ knobs}$  [154]. Nach dieser Abschätzung müssten also 20 % der *knobs* bzw. der Oberfläche des infizierten roten Blutkörperchens an der Bindung beteiligt sein. Betrachtet man Mikroskopaufnahmen beispielhafter Rosetten, vgl. Abb. 4.10, ist diese Abschätzung plausibel. Auch die Simulation der Protein-Bindungskinetik in Kapitel 5.4.2 ergab den experimentellen Ergebnissen ähnliche Kurven unter der Annahme von 100 – 200 Bindungsstellen.



**Abbildung 6.8:** Oben: Spannung als Funktion der Belastungsgeschwindigkeit für den Fall  $\epsilon = 0,75$ , **A)** linear und **B)** logarithmisch dargestellt mit Fit nach Gleichung 6.10.

Unten: Bruchkräfte der Bindungen zwischen einem bakteriellen Oberflächenprotein und Antikörpern mit der Mikropipetten-Aspirationstechnik gemessen. Rekonstruiert aus [83], Kap. 8, Abb. 8.16. Median der Bruchkräfte als Funktion der Rate der Kraftsteigerung, **C)** linear und **D)** logarithmisch dargestellt mit Fit nach Gleichung 6.8.

## 6.2.3 Lektin-induzierte Aggregate



**Abbildung 6.9:** Elastizitätsmodul aus den Spannungs-Dehnungs-Diagrammen Lektin-induzierter Aggregate für die Stenosedurchmesser  $d = 7 \mu\text{m}$  und  $d = 11 \mu\text{m}$  bei Standardelongationslänge als Funktion der Belastungsgeschwindigkeit bei einer Dehnung von  $\epsilon = 0,75$ .

Führt man das Verfahren zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls für Lektin-induzierte Aggregate durch, sorgt das Kriterium, dass nur solche Aggregate ausgewählt werden, die die Stenose unbeschadet passieren, für den Ausschluss fast aller Messreihen. Die lektininduzierten Aggregate sind also viel weniger stabil als Rosetten. Es passieren so wenige die Stenosen unbeschadet, dass eine statistisch signifikante Auswertung nicht möglich ist. Bei sehr niedrigen Belastungsgeschwindigkeiten wie in Abb. 6.9 kann jedoch ein Elastizitätsmodul zwischen  $E = 15 - 20 \text{ Pa}$  ermittelt werden. Bei so niedrigen Werten von  $\dot{\sigma}(\epsilon = 0,75) \approx 10$  sind kaum Vergleichswerte für Rosetten verfügbar, die wenigen liegen in Blutgruppe A bei  $E \approx 25 \text{ Pa}$  und in Blutgruppe 0 bei  $E \approx 20 \text{ Pa}$ . Rosetten und Lektin-induzierte Aggregate verhalten sich in diesem Bereich also ähnlich. Entscheidend ist aber der Unterschied, dass Lektin-induzierte Aggregate deutlich stärker zum Zellverlust tendieren, und ihre elastischen Eigenschaften daher kaum greifbar sind.

### Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde eine Methode validiert und angewandt, aus der optisch erkennbaren Verformung von Objekten unter Fluss deren Elastizität zu bestimmen. Eine solche Methodik bietet den Vorteil, das Objekt weniger zu beeinträchtigen, als es beispielsweise bei Kraftspektroskopie oder Mikropipettenaspiration der Fall ist. Dazu werden zunächst Melanomzellen vermessen, um nah am Modell einer Kugel zu arbeiten und auf einen Literaturvergleich zurückgreifen zu können. Kraftspektroskopie und Flussexperiment ergaben beide Ergebnisse von  $E \approx 700 \text{ Pa}$ . Nach damit erfolgreicher Validation wurde die Methode auf solche Rosetten angewandt, die bei Stenosenpassage keinen Zellverlust erleiden, sondern ihre Größe bewahren und lediglich die Form verändern. Rosetten erschienen dabei mit  $E \approx 75 \text{ Pa}$  deutlich weicher als z.B. Melanomzellen, und wirkten bei schnellerer Belastung härter.

Die Ergebnisse erlauben also eine Beschreibung und Vorhersage des Verhaltens von Rosetten in unterschiedlichen Flusssituationen mit unterschiedlicher maximaler Kompression und Scherung sowie Belastungsgeschwindigkeit. Sie bieten daher eine breite Basis, das Verhalten von Rosetten in anderen Flusssituationen, die nicht genau der hier verwendeten Geometrie entsprechen, sondern beispielsweise näher an der *in vivo* Situation sind, vorherzusagen. Dies birgt großes Potential, die pathophysiologische Bedeutung von Rosetten genauer nachzuvollziehen. Außerdem gibt die Elastizität indirekt Auskunft über die Stabilität der Bindungen, die die Rosette zusammenhalten. Würde man beispielsweise die Elastizität von Rosetten unter Zugabe unterschiedlicher Wirkstoffe messen, würde der Einfluss auf die Bindungsstärke durch das hier vorgestellte Verfahren als Messparameter zugänglich werden, und damit die Forschung zur Bekämpfung von Malaria erheblich unterstützen.



# 7

## Fazit Zell-Zell-Adhäsion

Im ersten Teil der Arbeit wird eine Möglichkeit vorgestellt, die quantitative Korrelation von lokaler Scherspannung und zeitabhängiger Zellablösung aufzuzeigen, um die Schersensitivität beliebiger Zell-Substrat-Kombinationen zu untersuchen. Die derartige Kombination von Mikrofluidik und Zellbiologie erlaubt es, Interaktionen zwischen Biomaterialien und Zellen unter physiologisch relevanten Scherflussbedingungen aufzudecken, und den Schritt von Experimenten *in vitro* zu Versuchen *in vivo* zu erleichtern.

Ein ähnlicher Ansatz wurde im zweiten, größeren Teil der Arbeit verfolgt. Hier wurden Rosetten, Zell-Zell-Aggregate roter Blutkörperchen, die bei Malariainfektion entstehen, bei Passage unterschiedlicher Stenosen untersucht. Im Folgenden werden die Gliederungspunkte aus Kapitel 1 aufgegriffen, um die Ergebnisse des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit zusammenzufassen.

Zunächst wurde ein Algorithmus entwickelt, um Zellaggregate entlang des Mikrofluidikkanals zu verfolgen und beispielsweise bei der Passage von Stenosen zu analysieren. In **Kapitel 4** ist die Funktionalität des Algorithmus **SURF** (**SU**rvival of **R**osettes in **F**low) beschrieben. Darunter fällt

1. Die Erstellung der Trajektorien durch Erkennen der entsprechenden Rosetten auf aufeinanderfolgenden Bildern und deren Nachverfolgung von Bild zu Bild.
2. Die Auswertung entlang der Trajektorien wie z.B. der Flächenänderung oder der Geschwindigkeit der verfolgten Objekte, inklusive der Erkennung von Zellverlustereignissen durch gleichzeitiges Registrieren einer Flächenabnahme und dem Erscheinen zusätzlicher Objekte in der Umgebung.
3. Das Klassifizieren der Rosetten nach ihrer Größe und damit die Möglichkeit beispielsweise gleichgroße Aggregate unterschiedlicher Blutgruppen zu vergleichen, und damit den Einfluss von Rosettengröße und Blutgruppe voneinander getrennt zu betrachten.
4. Das systematische Feststellen des Zustands der Rosetten nach Passage der Stenose ermöglicht die Angabe einer Überlebensrate abhängig von experimentellen Parametern.

Im ersten **Ergebniskapitel 5** ist die **Passage von Stenosen unterschiedlicher Geometrien** beschrieben. Die Hauptergebnisse sind:

1. Je **kleiner** der Stenosendurchmesser, und je **größer** die Elongationslänge ist, desto **weniger** Rosetten überstehen die Passage, vgl. Abb. 5.21.
2. Rosetten der **Blutgruppe A** passieren die Stenosen mit höherer Wahrscheinlichkeit als Rosetten der Blutgruppe 0. Das hängt damit zusammen, dass
  - größere Rosetten die Stenosen öfter unbeschadet passieren,
  - rote Blutkörperchen der Blutgruppe A **größere** und
  - **stabilere** Rosetten als solche der Blutgruppe 0 bilden.

3. Auch vereinfachte Modellsysteme, darunter Lektin-induzierte Aggregate und eine Finite-Elemente-Simulation einer Kugel, zeigen ähnliche Abhängigkeiten von Objektgröße und Kanalgeometrie.

Im zweiten **Ergebniskapitel 6** wurde die **Elastizität** verschiedener Objekte unter Fluss aus deren Verformung bestimmt.

1. Zunächst wird die Methode validiert, indem die Elastizität von Melanomzellen durch Verformung unter Fluss und durch Kraftspektroskopie bestimmt wird. Beide Methoden liefern vergleichbare Ergebnisse.
2. Durch Anwenden der Methode auf Rosetten bei Passage von Stenosen lässt sich eine effektive Elastizität von Zellaggregaten bzw. Rosetten angeben.

Es wurde gezeigt, dass die Größe der Rosette, die Blutgruppe und die Geometrie der Stenose im Zusammenspiel die Stabilität ausmachen. Außerdem sind Rosetten durch ihre Flexibilität deutlich „elastischer“ als Einzelzellen, und erscheinen bei schnellerer Belastung härter.

Am Ende dieser Arbeit möchte ich das Augenmerk darauf legen, wie gewinnbringend ein interdisziplinärer Ansatz ist. In beiden Teilen I und II wurden Mittel aus einer Disziplin mit Fragestellungen einer anderen kombiniert. Wie muss ein Material beschaffen sein, dass es sich gut für ein künstliches Gelenk eignet? Welche Faktoren spielen hier eine Rolle, und wie lässt sich das erklären? Wie stark verklumpen rote Blutkörperchen bei Malaria? Wie stark sind diese Zell-Zell-Bindungen, und welchen Einfluss hat hier beispielsweise die Blutgruppe? Alle diese Themen sind offensichtlich medizinischer Natur. Doch heruntergebrochen auf das eigentliche Phänomen werden die zugehörigen physikalischen Fragestellungen aufgedeckt: z.B. die Bindungsstärke von Zellen an Flächen oder zwischen Zellen, die Elastizität von Zellen, oder die Bestimmung der wirkenden Kräfte unter (Scher-)fluss. Um diesen nachzugehen bietet die Physik Mittel, wie bspw. ein Mikrofluidiklabor, aber auch theoretische Modelle, um die zugrundeliegenden physikalischen Effekte zu messen, auszuwerten, zu erklären und zu verstehen. Die Vernetzung von Disziplinen, wenn Experten unterschiedlicher Spezialgebiete ihre Kompetenzen kombinieren, macht den Fortschritt der Forschung aus.

# Literatur

- [1] Andreas Hartmann u. a. "A novel tool for dynamic cell adhesion studies—the De-Adhesion Number Investigator DANI." In: *Lab on a Chip* 14.3 (Feb. 2014), S. 542–6. ISSN: 1473-0189. DOI: 10.1039/c3lc50916h. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24292668>.
- [2] Melanie E. M. Stamp u. a. "Exploring the Limits of Cell Adhesion under Shear Stress within Physiological Conditions and beyond on a Chip". In: *Diagnostics* 6.4 (2016), S. 38. ISSN: 2075-4418. DOI: 10.3390/diagnostics6040038. URL: <http://www.mdpi.com/2075-4418/6/4/38>.
- [3] Anna M. Jötten u. a. "Correlation of in vitro cell adhesion, local shear flow and cell density". In: *RSC Advances* 9.1 (2019), S. 543–551. ISSN: 20462069. DOI: 10.1039/c8ra07416j.
- [4] Anna M. Jötten u. a. "Blood group and size dependent stability of *P. falciparum* infected red blood cell aggregates in capillaries". In: *Biomicrofluidics* 14.2 (2020), S. 024104.
- [5] Anna M. Jötten u. a. "Deformation of Red Blood Cell Aggregates in Elongational Flow. in preparation". In: (2021).
- [6] Melanie E. M. Stamp. "Entwicklung von Life-on-a-Chip Systemen zur Charakterisierung und Manipulation dynamischer Effekte adhärenter Zellen". Diss. 2017.
- [7] Dieter Meschede. *Gerthsen Physik*. Springer-Verlag, 2015.
- [8] Amelia Ahmad Khalili und Mohd Ridzuan Ahmad. "A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications". In: *International Journal of Molecular Sciences* 16.8 (2015), S. 18149–18184.
- [9] Leonard Weiss. "The measurement of cell adhesion". In: *Experimental Cell Research* 8 (1961), S. 141–153.
- [10] Alexander Fuhrmann und Adam J. Engler. "The cytoskeleton regulates cell attachment strength". In: *Biophysical Journal* 109.1 (2015), S. 57–65.
- [11] Renu Maan u. a. "Modeling cell-substrate de-adhesion dynamics under fluid shear". In: *Physical Biology* 15.4 (2018), S. 046006.
- [12] Catherine D. Reyes und Andrés J. García. "A centrifugation cell adhesion assay for high-throughput screening of biomaterial surfaces". In: *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and The Korean Society for Biomaterials* 67.1 (2003), S. 328–333.
- [13] Shunichi Usami u. a. "Design and construction of a linear shear stress flow chamber". In: *Annals of Biomedical Engineering* 21.1 (1993), S. 77–83.
- [14] Cécile Couzon, Alain Duperray und Claude Verdier. "Critical stresses for cancer cell detachment in microchannels". In: *European Biophysics Journal* 38.8 (2009), S. 1035–1047.
- [15] Luthur Siu Lun Cheung u. a. "Detachment of captured cancer cells under flow acceleration in a bio-functionalized microchannel". In: *Lab on a Chip* 9.12 (2009), S. 1721–1731.
- [16] Hang Lu u. a. "Microfluidic shear devices for quantitative analysis of cell adhesion". In: *Analytical Chemistry* 76.18 (2004), S. 5257–5264.
- [17] Zhonglan Tang u. a. "Shear stress-dependent cell detachment from temperature-responsive cell culture surfaces in a microfluidic device". In: *Biomaterials* 33.30 (2012), S. 7405–7411.
- [18] Adrien Bussonnière u. a. "Cell detachment and label-free cell sorting using modulated surface acoustic waves (SAWs) in droplet-based microfluidics". In: *Lab on a Chip* 14.18 (2014), S. 3556–3563.
- [19] Melanie E. M. Stamp u. a. "Acoustotaxis—in vitro stimulation in a wound healing assay employing surface acoustic waves". In: *Biomaterials Science* 4.7 (2016), S. 1092–1099.
- [20] Ryan J. McCoy und Fergal J. O'Brien. "Influence of shear stress in perfusion bioreactor cultures for the development of three-dimensional bone tissue constructs: a review". In: *Tissue Engineering Part B: Reviews* 16.6 (2010), S. 587–601.
- [21] Sheldon Weinbaum, S. C. Cowin und Yu Zeng. "A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses". In: *Journal of Biomechanics* 27.3 (1994), S. 339–360.
- [22] Claudia Wittkowske u. a. "In vitro bone cell models: impact of fluid shear stress on bone formation". In: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 4 (2016), S. 87.
- [23] Katsuko Sakai Furukawa u. a. "Quantitative analysis of cell detachment by shear stress". In: *Materials Science and Engineering: C* 17.1-2 (2001), S. 55–58.
- [24] Mario Djukelic, Achim Wixforth und Christoph Westerhausen. "Influence of neighboring adherent cells on laminar flow induced shear stress in vitro—A systematic study". In: *Biomicrofluidics* 11.2 (2017), S. 024115.
- [25] Matias Meier. "3D-Bildgebung des lakuno-kanalikulären Netzwerks in Knochen". Mentorierte Arbeit fachwissenschaftliche Vertiefung Lehrdiplom für Maturitätsschulen in Physik. ETH Zürich, 2011.
- [26] Kurt Redlich und Josef Smolen. *Chronische Entzündungen sind Auslöser von Knochenschwund*. Hrsg. von Science-Blog.at. URL: <http://www.science-blog.at/2012/07/chronische-entzundungen-sind-ausloeser-von-knochenschwund/> (besucht am 08.04.2021).
- [27] Gemma Mestres u. a. "Advantages of microfluidic systems for studying cell-biomaterial interactions—focus on bone regeneration applications". In: *Biomedical Physics & Engineering Express* 5.3 (2019), S. 032001.
- [28] Showko Shiokawa und Yoshikazu Matsui. "The dynamics of SAW streaming and its application to fluid devices". In: *Materials Research Society Symposium Proceedings*. Bd. 360. Materials Research Society, 1995, S. 53–53.
- [29] William Thielicke und Eize J. Stamhuis. "PIVlab – Towards User-friendly, Affordable and Accurate Digital Particle Image Velocimetry in MATLAB". In: *Journal of Open Research Software* 2 (2014). ISSN: 2049-9647. DOI: 10.5334/jors.bl.
- [30] George I. Bell. "Models for the specific adhesion of cells to cells". In: *Science* 200.4342 (1978), S. 618–627.
- [31] D. Garrivier u. a. "Peeling model for cell detachment". In: *European Physical Journal E* 8.1 (2002), S. 79–97. ISSN: 12928941. DOI: 10.1140/epje/i2002-10010-8.
- [32] Ulrich S. Schwarz und Samuel A. Safran. "Physics of adherent cells". In: *Reviews of Modern Physics* 85.3 (Aug. 2013), S. 1327–1381. DOI: 10.1103/RevModPhys.85.1327.
- [33] Jan Kierfeld. "Weiche und Biologische Materie". In: *Vorlesungen TU Dortmund* (2018).
- [34] ibidi GmbH. "Application Note 11, Shear Stress and Shear Rates for ibidi  $\mu$ -Slides". In: *ibidi Application Notes* Version 4.1 (2016). URL: [https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AM11\\_Shear\\_stress.pdf](https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AM11_Shear_stress.pdf).
- [35] Emmanuel Décavé u. a. "Shear flow-induced detachment kinetics of Dictyostelium discoideum cells from solid substrate". In: *Biophysical Journal* 82.5 (2002), S. 2383–2395.
- [36] Andrés J. García, Paul Ducheyne und David Boettiger. "Quantification of cell adhesion using a spinning disc device and application to surface-reactive materials". In: *Biomaterials* 18.16 (1997), S. 1091–1098.
- [37] Andreas Fritsche u. a. "Time-dependent adhesive interaction of osteoblastic cells with polished titanium alloyed implant surfaces". In: *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* 11.1 (2013), S. 1–8.
- [38] Despina D. Deligianni u. a. "Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength". In: *Biomaterials* 22.1 (2000), S. 87–96.
- [39] John Y. J. Shyy und Shu Chien. "Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress". In: *Circulation Research* 91.9 (2002), S. 769–775.
- [40] T. G. Van Kooten u. a. "Development and use of a parallel-plate flow chamber for studying cellular adhesion to solid surfaces". In: *Journal of Biomedical Materials Research* 26.6 (1992), S. 725–738.
- [41] Min-Ji Kim u. a. "Cell-matrix adhesion characterization using multiple shear stress zones in single stepwise microchannel". In: *Applied Physics Letters* 105.8 (2014), S. 083701.
- [42] J. Meyle u. a. "Fibroblast anchorage to microtextured surfaces". In: *Journal of Biomedical Materials Research* 27.12 (1993), S. 1553–1557.
- [43] Barbara D. Boyan u. a. "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response". In: *Biomaterials* 17.2 (1996), S. 137–146.
- [44] Keith Burrige u. a. "Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton". In: *Annual Review of Cell Biology* 4.1 (1988), S. 487–525.
- [45] C. Oakley und D. M. Brunette. "The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata". In: *Journal of Cell Science* 106.1 (1993), S. 343–354.
- [46] Anh Tuan Nguyen, Sharvari R Sathe und Evelyn KF Yim. "From nano to micro: topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance". In: *Journal of Physics: Condensed Matter* 28.18 (2016), S. 183001.
- [47] Her-Hsiung Huang u. a. "Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion". In: *Biomolecular Engineering* 21.3-5 (2004), S. 93–97.
- [48] E. T. Den Braber u. a. "Quantitative analysis of cell proliferation and orientation on substrata with uniform parallel surface micro-grooves". In: *Biomaterials* 17.11 (1996), S. 1093–1099.
- [49] Christian Schmidt u. a. "Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins". In: *Journal of Biological Chemistry* 273.9 (1998), S. 5081–5085.
- [50] Elisabetta Ada Cavalcanti-Adam u. a. "Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands". In: *Biophysical Journal* 92.8 (2007), S. 2964–2974.
- [51] Shoucheng Chen u. a. "Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration". In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 164 (2018), S. 58–69.
- [52] Jana Stepanovska u. a. "Treatments for enhancing the biocompatibility of titanium implants." In: *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc* 164.1 (2020).
- [53] Sebastian Angermann. "Einfluss der Zelldichte auf das Adhäsionsverhalten unter Scherfluss auf einem Biochip". Bachelorarbeit. Universität Augsburg, 2017.
- [54] Sascha Buchegger u. a. "Antibacterial metal ion release from diamond-like carbon modified surfaces for novel multifunctional implant materials". In: *Journal of Materials Research* 31.17 (2016), S. 2571–2577.
- [55] Bill Gates. *The World's Deadliest Animals*. 11. Okt. 2016. URL: <https://twitter.com/billgates/status/785836406870532097> (besucht am 08.04.2021).
- [56] Simon I. Hay u. a. "The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future". In: *The Lancet Infectious Diseases* 4.6 (2004), S. 327–336.

- [57] ourworldindata.org. *Previous prevalence of Malaria worldwide*. URL: <https://ourworldindata.org/uploads/2019/04/Previous-prevalence-of-malaria-world-map-800x386.png> (besucht am 07. 04. 2021).
- [58] THE MALARIA ATLAS PROJECT. *Plasmodium falciparum Incidence version 2020*. URL: <https://malariaatlas.org/explorer/#/> (besucht am 07. 04. 2021).
- [59] WHO's Global Health Estimates. *The top 10 causes of death*. WHO. 9. Dez. 2020. URL: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- [60] "Why Malaria Matters". In: *Target Malaria* (2021). URL: <https://targetmalaria.org/why-malaria-matters/>.
- [61] "World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges." In: *Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO* (2020). URL: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2020>.
- [62] Alvaro Baeza Garcia u. a. "Neutralization of the Plasmodium-encoded MIF ortholog confers protective immunity against malaria infection". In: *Nature Communications* 9.1 (2018), S. 1–13.
- [63] First vaccine to fully immunize against malaria builds on pandemic-driven RNA tech. "First vaccine to fully immunize against malaria builds on pandemic-driven RNA tech". In: *The Academic Times* (25. Feb. 2021). URL: [https://academictimes.com/first-vaccine-to-fully-immunize-against-malaria-builds-on-pandemic-driven-rna-tech/?utm\\_source=tldrnewsletter](https://academictimes.com/first-vaccine-to-fully-immunize-against-malaria-builds-on-pandemic-driven-rna-tech/?utm_source=tldrnewsletter) (besucht am 01. 03. 2021).
- [64] Jana Schulze. "Untersuchung der Funktionalität alternativer Plasmodium Export Elemente anhand ausgewählter Proteine des Malariaerregers Plasmodium falciparum (Welch, 1897)". Dissertation. Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky, 2015.
- [65] Alan F. Cowman, Drew Berry und Jake Baum. "The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell". In: *Journal of Cell Biology* 198.6 (2012), S. 961–971.
- [66] Ween-Chyau Lee, Laurent Rénia u. a. "Sticking for a cause: the falciparum malaria parasites cytoadherence paradigm". In: *Frontiers in Immunology* 10 (2019), S. 1444.
- [67] Balasubramania Athreya. "Relation of blood groups to infection . I . A survey and review of data suggesting possible relationship between malaria and blood groups". In: *American Journal of Epidemiology* October (1967). DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120739.
- [68] Christine M. Cserti und Walter H. Dzick. "The ABO blood group system and Plasmodium falciparum malaria". In: *Blood* 110.7 (2007), S. 2250–2258. ISSN: 00064971. DOI: 10.1182/blood-2007-03-077602.
- [69] Geoff Daniels und Marion E. Reid. "Blood groups: The past 50 years". In: *Transfusion* 50.2 (2010), S. 281–289. ISSN: 00411132. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02456.x.
- [70] J. Alexandra Rowe, D. Herbert Opi und Thomas N. Williams. "Blood groups and malaria: Fresh insights into pathogenesis and identification of targets for intervention". In: *Current Opinion in Hematology* 16.6 (2009), S. 480–487. ISSN: 10656251. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3283313d40.
- [71] C. J. Uneke. "Plasmodium falciparum malaria and ABO blood group: Is there any relationship?" In: *Parasitology Research* 100.4 (2007), S. 759–765. ISSN: 09320113. DOI: 10.1007/s00436-006-0342-5.
- [72] Philip R. Fischer und Paul Boone. "Short report: Severe malaria associated with blood group". In: *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58.1 (1998), S. 122–123. ISSN: 00029637. DOI: 10.4269/ajtmh.1998.58.122.
- [73] Bertrand Lell u. a. "The Role of Red Blood Cell Polymorphisms in Resistance and Susceptibility to Malaria". In: *Clinical Infectious Diseases* 28.4 (2007), S. 794–799. ISSN: 1058-4838. DOI: 10.1086/515193.
- [74] S.L. Pathirana u. a. "ABO-blood-group types and protection against severe Plasmodium falciparum malaria". In: *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 99.2 (2005), S. 119–124. ISSN: 0003-4983. DOI: 10.1179/136485905x19946.
- [75] Kirsten Moll u. a. "Evasion of Immunity to Plasmodium falciparum: Rosettes of Blood Group A Impair Recognition of PfEMP1". In: *PLoS one* 10.12 (Dez. 2015). Hrsg. von Érika Martins Braga, e0145120. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0145120.
- [76] J. Alexandra Rowe u. a. "Blood group O protects against severe Plasmodium falciparum malaria through the mechanism of reduced rosetting". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.44 (Okt. 2007), S. 17471–17476. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0705390104. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2077280%7B%5C%7Dtool=pmcentrez%7B%5C%7Drendertype=abstract%20http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0705390104>.
- [77] J. Carlson. "Plasmodium falciparum erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions". In: *Journal of Experimental Medicine* 176.5 (1992), S. 1311–1317. ISSN: 0022-1007. DOI: 10.1084/jem.176.5.1311.
- [78] Suchi Goel u. a. "RIFINs are adhesins implicated in severe Plasmodium falciparum malaria". In: *Nature Medicine* 21.4 (2015), S. 314–317. ISSN: 1078-8956. DOI: 10.1038/nm.3812. URL: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.3812>.
- [79] G. B. Nash u. a. "Rheological properties of rosettes formed by red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum." In: *British Journal of Haematology* 82.4 (1992), S. 757–63. ISSN: 0007-1048. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1992.tb06955.x. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1482664>.
- [80] Y. Chu, T. Haigh und G. B. Nash. "Rheological analysis of the formation of rosettes by red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum." In: *British Journal of Haematology* 99.4 (1997), S. 777–783. ISSN: 0007-1048. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9432021>.
- [81] D. K. Kaul u. a. "Rosetting of Plasmodium falciparum-infected red blood cells with uninfected red blood cells enhances microvascular obstruction under flow conditions." In: *Blood* 78.3 (1991), S. 812–9. ISSN: 0006-4971. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1859893>.
- [82] Yvonne Adams u. a. "Rosetting Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind to human brain microvascular endothelial cells in vitro, demonstrating a dual adhesion phenotype mediated by distinct P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains". In: *Infection and Immunity* 82.3 (2014), S. 949–959. ISSN: 00199567. DOI: 10.1128/IAI.01233-13.
- [83] Erich Sackmann und Rudolf Merkel. *Lehrbuch der Biophysik*. Wiley-VCH, 2010.
- [84] John E. Hall. *Guyton & Hall Physiology Review E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2015.
- [85] Rou Zhang u. a. "Rheopathologic consequence of Plasmodium vivax rosette formation". In: *PLoS neglected tropical diseases* 10.8 (2016), e0004912.
- [86] Liliana Vilas Boas u. a. "Assessment of the deformability and velocity of healthy and artificially impaired red blood cells in narrow polydimethylsiloxane (PDMS) microchannels". In: *Micromachines* 9.8 (2018), S. 384.
- [87] Hedieh Fallahi u. a. "Flexible microfluidics: Fundamentals, recent developments, and applications". In: *Micromachines* 10.12 (2019), S. 830.
- [88] Christopher Arakawa u. a. "Biophysical and biomolecular interactions of malaria-infected erythrocytes in engineered human capillaries". In: *Science Advances* 6.3 (2020), eaay7243.
- [89] Michael R. King u. a. "A physical sciences network characterization of circulating tumor cell aggregate transport". In: *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 308.10 (2015), S. C792–C802.
- [90] Yupeng Hong, Francia Fang und Qi Zhang. "Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect". In: *International Journal of Oncology* 49.6 (2016), S. 2206–2216.
- [91] Hermann Heimpel u. a. *Hämatologie in der Praxis*. Elsevier, München, 1988.
- [92] Florian Lang und Philipp Lang. *Basiswissen Physiologie*. Springer-Verlag, 2007.
- [93] Johann S. Schwegler und Runhild Lucius. *Der Mensch: Anatomie und Physiologie*. Georg Thieme Verlag, 2016.
- [94] J. S. Gibson, A. R. Cossins und J. C. Ellory. "Oxygen-sensitive membrane transporters in vertebrate red cells". In: *Journal of Experimental Biology* 203.9 (2000), S. 1395–1407.
- [95] Cornelia Geers und Gerolf Gros. "Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle". In: *Physiological reviews* 80.2 (2000), S. 681–715.
- [96] Shu Chien. "Red cell deformability and its relevance to blood flow". In: *Annual Review of Physiology* 49.1 (1987), S. 177–192.
- [97] Innocent Safeukui u. a. "Retention of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen". In: *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 112.6 (2008), S. 2520–2528.
- [98] A. M. Dondorp u. a. "Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria." In: *Parasitology today (Personal ed.)* 16.6 (2000), S. 228–232. ISSN: 0169-4758. DOI: 10.1016/S0169-4758(00)01666-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10827427>.
- [99] Robert Koch-Institut. "RKI-Ratgeber Malaria". In: *Epidemiologischer Bulletin* 20/2000 (aktualisiert 2015). URL: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Malaria.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Malaria.html).
- [100] Alan F. Cowman u. a. "Malaria: biology and disease". In: *Cell* 167.3 (2016), S. 610–624.
- [101] imago images. *Protozoan Plasmodium falciparum in the stage of ring form*. 1. Aug. 2020. URL: <https://www.imago-images.de/st/0103882438> (besucht am 09. 04. 2021).
- [102] imago images. *Plasmodium falciparum inside red blood cell*. 1. Aug. 2020. URL: <https://www.imago-images.de/st/0103898723> (besucht am 09. 04. 2021).
- [103] Alexander G. Maier u. a. "Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte". In: *Nature Reviews Microbiology* 7.5 (2009), S. 341–354.
- [104] Yoann Augagneur u. a. "Gene selective mRNA cleavage inhibits the development of Plasmodium falciparum". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.16 (2012), S. 6235–6240.
- [105] Faith Mokobi. *Giemsa Stain- Principle, Procedure, Results, Interpretation*. Hrsg. von Microbe Notes. 2. Feb. 2020. URL: <https://microbenotes.com/giemsa-stain-principle-procedure-results-interpretation/> (besucht am 09. 04. 2021).
- [106] L. H. Bannister u. a. "A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages". In: *Parasitology today* 16.10 (2000), S. 427–433.
- [107] Alessandro Esposito u. a. "Quantitative imaging of human red blood cells infected with Plasmodium falciparum". In: *Biophysical Journal* 99.3 (2010), S. 953–960.
- [108] Fiona K. Glenister u. a. "Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells". In: *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 99.3 (2002), S. 1060–1063.
- [109] Johan Carlson u. a. "Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies". In: *The Lancet* 336.8729 (1990), S. 1457–1460.
- [110] Johan Normark u. a. "PfEMP1-DBL1 $\alpha$  amino acid motifs in severe disease states of Plasmodium falciparum malaria". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.40 (2007), S. 15835–15840.
- [111] Louis H. Miller, Michael F. Good und Genevieve Milon. "Malaria pathogenesis". In: *Science* 264.5167 (1994), S. 1878–1883.
- [112] D.I. Baruch u. a. "Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93.8 (1996), S. 3497–3502.
- [113] Karthick Nambi. *How Colonial Britain fought against Malaria Quinine*. Hrsg. von Medium. 22. Apr. 2020. URL: <https://medium.com/history-in-bytes/how-colonial-britain-fought-against-malaria-quinine-99176af93c4> (besucht am 08. 04. 2021).

- [114] Kirsten Moll u. a. "Methods in Malaria Research". In: *Evaluation* (2008), S. 1–3, 17–21. ISSN: 0018-067X. DOI: 10.1007/s00436-008-0981-9.
- [115] Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG). "S1-Leitlinie 042-001: Diagnostik und Therapie der Malaria". In: *AWMF online, Das Portal der wissenschaftlichen Medizin* (aktualisiert 2016). URL: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/042-001\\_S1\\_Malaria\\_Diagnostik\\_Therapie\\_2016-08\\_verlaengert.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/042-001_S1_Malaria_Diagnostik_Therapie_2016-08_verlaengert.pdf).
- [116] M. A. Ahmed und Janet Cox-Singh. "Plasmodium knowlesi - an emerging pathogen". In: *ISBT Science Series* 10.S1 (2015), S. 134–140.
- [117] Heinz Lüllmann und Klaus Mohr. *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen-Medikamente gezielt einsetzen; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker; 129 Tabellen*. Georg Thieme Verlag, 2006.
- [118] Andrej Trampuz u. a. "Clinical review: Severe malaria". In: *Critical Care* 7.4 (2003), S. 315.
- [119] David Ferguson. *Scanning electron micrograph of malaria rosette formation*. Hrsg. von Medical Images. URL: <https://www.medicalimages.com/stock-photo-image-image14507740.html> (besucht am 09.04.2021).
- [120] I. Vermes und C. Haanen. "Apoptosis and programmed cell death in health and disease." In: *Advances in Clinical Chemistry* 31 (1994), S. 177–246.
- [121] Mark B. Lyles und Ivan L. Cameron. "Interactions of the DNA intercalator acridine orange, with itself, with caffeine, and with double stranded DNA". In: *Biophysical Chemistry* 96.1 (2002), S. 53–76.
- [122] Jan Kapuscinski und Zbigniew Darzynkiewicz. "Interactions of acridine orange with double stranded nucleic acids. Spectral and affinity studies". In: *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 5.1 (1987), S. 127–143.
- [123] Miltenyi Biotec GmbH. "VarioMACS Separator". In: *Resources Data Sheet No. 130-090-282* (). URL: [https://www.miltenyibiotec.com/\\_Resources/Persistent/1d805e452ac344f15936b886fc3fef855ac3a3d/DS130-090-282.pdf](https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/1d805e452ac344f15936b886fc3fef855ac3a3d/DS130-090-282.pdf).
- [124] Tian Fook Kong u. a. "Enhancing malaria diagnosis through microfluidic cell enrichment and magnetic resonance relaxometry detection". In: *Scientific Reports* 5 (2015), S. 11425. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep11425. URL: <http://www.nature.com/doi/10.1038/srep11425>.
- [125] Zhengwen Zhang, Herbert J Meiselman und Björn Neu. "Red blood cell adhesion can be reduced by non-reactive macromolecules". In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 174 (2019), S. 168–173.
- [126] Shu Chien und Lanping Amy Sung. "Physicochemical basis and clinical implications of red cell aggregation". In: *Clinical Hemorheology and Microcirculation* (2016), S. 71–91.
- [127] *Blutersatzflüssigkeit*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. URL: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/blutersatzflüssigkeit/9619>.
- [128] *Dextrane*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. URL: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/dextrane/17708>.
- [129] A. Pribush, D. Zilberman-Kravits und N. Meyerstein. "The mechanism of the dextran-induced red blood cell aggregation". In: *European Biophysics Journal* 36.2 (2007), S. 85–94. ISSN: 01757571. DOI: 10.1007/s00249-006-0107-1.
- [130] J. Carlson. "Erythrocyte rosetting in Plasmodium falciparum malaria—with special reference to the pathogenesis of cerebral malaria". In: *Scandinavian Journal of Infectious Diseases. Supplementum* (1993), S. 1–79.
- [131] Willy J. Peumans und E. J. Van Damme. "Lectins as plant defense proteins." In: *Plant Physiology* 109.2 (1995), S. 347.
- [132] A. E. Bender. "Haemagglutinins (lectins) in beans". In: *Food Chemistry* 11.4 (1983), S. 309–320.
- [133] L. A. Sung, E. A. Kabat und S. Chien. "Interaction energies in lectin-induced erythrocyte aggregation". In: *The Journal of Cell Biology* (1985), S. 652–659.
- [134] Kiran Hasija. "Lectin in agglutination and its role in detection of sugars on the surface of RBC of normal and cancer patients". In: *Indian Journal of Clinical Biochemistry* (1991), S. 89–96.
- [135] Anabelle Schepp. "Lektininduzierte Erythrozytenaggregation im Scher- und Elongationsfluss". Bachelorarbeit. 2019.
- [136] Hansen Bow u. a. "A microfabricated deformability-based flow cytometer with application to malaria." In: *Lab on a Chip* 11.6 (2011), S. 1065–73. ISSN: 1473-0189. DOI: 10.1039/c0lc00472c. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3366288&7B%5C&7Dtool=pmcentrez&7B%5C&7Drendertype=abstract>.
- [137] Marta Urbanska u. a. "A comparison of microfluidic methods for high-throughput cell deformability measurements". In: *Nature Methods* (2020), S. 1–7.
- [138] Salvatore P. Suter und Richard Skalak. "The history of Poiseuille's law". In: *Annual Review of Fluid Mechanics* 25.1 (1993), S. 1–20.
- [139] George A Truskey, Fan Yuan und David F Katz. *Transport phenomena in biological systems*. Pearson/Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, USA: 2004.
- [140] Thomas G Mezger. *Das Rheologie Handbuch: 5. FARBE UND LACK*, 2016.
- [141] Patrick Tabeling. *Introduction to microfluidics*. OUP Oxford, 2005.
- [142] Jun Zhang u. a. "Fundamentals and applications of inertial microfluidics: a review". In: *Lab on a Chip* 16.1 (2016), S. 10–34.
- [143] Amir Hossein Raffiee, Sadegh Dabiri und Arezoo M Ardekani. "Elasto-inertial migration of deformable capsules in a microchannel". In: *Biomicrofluidics* 11.6 (2017), S. 064113.
- [144] Younan Xia und George M. Whitesides. "Soft Lithography". In: *Annual Review of Materials Science* 28.1 (1998), S. 153–184. ISSN: 0084-6600. DOI: 10.1146/annurev.matsci.28.1.153. URL: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.matsci.28.1.153>.
- [145] Jan Roth. "Funktionalisierung von Silikonoberflächen". Dissertation. 2009.
- [146] Jaideep S Dudani u. a. "Pinched-flow hydrodynamic stretching of single-cells". In: *Lab on a Chip* 13.18 (2013), S. 3728–3734.
- [147] Fern J. Armistead u. a. "Cells under stress: an inertial-shear microfluidic determination of cell behavior". In: *Biophysical Journal* 116.6 (2019), S. 1127–1135.
- [148] Phillip P. Brown und Desmond F. Lawler. "Sphere drag and settling velocity revisited". In: *Journal of Environmental Engineering* 129.3 (2003), S. 222–231.
- [149] Emanuele Paci und Martin Karplus. "Unfolding proteins by external forces and temperature: the importance of topology and energetics". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.12 (2000), S. 6521–6526.
- [150] Philip Nelson. *Biological physics*. 3. Aufl. New York: W. H. Freeman, 2004. ISBN: 9781429280754.
- [151] William Stephenson u. a. "Combining temperature and force to study folding of an RNA hairpin". In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 16.3 (2014), S. 906–917. ISSN: 14639076. DOI: 10.1039/c3cp52042k.
- [152] Jan Liphardt u. a. "Reversible Unfolding of Single RNA by Mechanical force". In: 292.April (2001), S. 733–737. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.1058498.
- [153] Timothy W Secomb und Axel R Pries. "Blood viscosity in microvessels: experiment and theory". In: *Comptes Rendus Physique* 14.6 (2013), S. 470–478.
- [154] Katharina A Quadt u. a. "The density of knobs on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes depends on developmental age and varies among isolates". In: *PLoS ONE* 7.9 (2012), e45658.
- [155] Adam Machon. "Simulation of Aggregation of Healthy and Diseased Red Blood Cells". Masterarbeit. University of Edinburgh, 2019.
- [156] Lionel Guillou u. a. "Measuring cell viscoelastic properties using a microfluidic extensional flow device". In: *Biophysical Journal* 111.9 (2016), S. 2039–2050.
- [157] Alexander Mietke u. a. "Extracting cell stiffness from real-time deformability cytometry: theory and experiment". In: *Biophysical Journal* 109.10 (2015), S. 2023–2036.
- [158] M. Mokbel u. a. "Numerical simulation of real-time deformability cytometry to extract cell mechanical properties". In: *ACS Biomaterials Science & Engineering* 3.11 (2017), S. 2962–2973.
- [159] Igor Sokolov, Maxim E. Dokukin und Natalia V. Guz. "Method for quantitative measurements of the elastic modulus of biological cells in AFM indentation experiments". In: *Methods* 60.2 (2013), S. 202–213.
- [160] Peter Eaton und Paul West. *Atomic force microscopy*. Hrsg. von Oxford University Press. 2010.
- [161] Cécile Formosa-Dague u. a. "The Role of Glycans in Bacterial Adhesion to Mucosal Surfaces: How Can Single-Molecule Techniques Advance Our Understanding?" In: *Microorganisms* 6.2 (2018), S. 39.
- [162] Bruker AFM Probes, Hrsg. *MLCT-BIO*. URL: <https://www.brukerafmprobes.com/p-3945-mlct-bio.aspx> (besucht am 02.02.2021).
- [163] Bruker AFM Probes, Hrsg. *MLCT-010-D*. URL: <https://www.brukerafmprobes.com/p-3719-mlct-010.aspx> (besucht am 15.04.2021).
- [164] Simon Neidinger. "Charakterisierung von Größe und Elastizität von A375 Melanomzellen". Fachpraktikum. Universität Augsburg, 2021.
- [165] Chun-Liang Chen u. a. "Single-cell analysis of circulating tumor cells identifies cumulative expression patterns of EMT-related genes in metastatic prostate cancer". In: *The Prostate* 73.8 (2013), S. 813–826.
- [166] A. Jaeschke u. a. "Cancer-associated fibroblasts of the prostate promote a compliant and more invasive phenotype in benign prostate epithelial cells". In: *Materials Today Bio* 8 (2020), S. 100073.
- [167] Anshu Bagga Mathur, George A. Truskey und W. Monty Reichert. "Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells". In: *Biophysical Journal* 78.4 (2000), S. 1725–1735.
- [168] Anshu B. Mathur u. a. "Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy". In: *Journal of Biomechanics* 34.12 (2001), S. 1545–1553.
- [169] JPK Instruments AG, Hrsg. *Data Processing Software Manual*. Version 5.0. 2015. URL: [https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/jpk/manuf-manuals/DPmanual\\_4.2.pdf](https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/jpk/manuf-manuals/DPmanual_4.2.pdf).
- [170] GG Bilodeau. "Regular pyramid punch problem". In: (1992).
- [171] Zhenlin Chen u. a. "Cell elasticity measurement using a microfluidic device with real-time pressure feedback". In: *Lab on a Chip* (2020).
- [172] Lars M. Joergensen u. a. "The kinetics of antibody binding to Plasmodium falciparum VAR2CSA PfEMP1 antigen and modelling of PfEMP1 antigen packing on the membrane knobs". In: *Malaria Journal* 9.1 (2010), S. 1–12.



# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1	Aufbau der Arbeit. <b>Teil I, Zell-Substrat-Adhäsion.</b> Experiment: Mikroflusskammer zur Untersuchung von SaOs-2 Knochenkrebszellen auf dem Implantatmaterial Titan unter Scherfluss. Bildanalyse PIVDAC, Particle Image Velocimetry De-Adhesion Correlation: Superposition der Mikroskopaufnahmen zu Beginn und Ende einer 60-minütigen Messung. Ergebnis: Zellablösung als Funktion der Zeit, Scherspannung und Zelldichte. Modell: Thermodynamische Betrachtung der Zustände A, adhären, und B, abgelöst. <b>Teil II, Zell-Zell-Adhäsion.</b> Experiment: Mikrofluidikkanal mit Stenose zur Untersuchung von Aggregaten roter Blutkörperchen bei Malariainfektion (Rosetten) unter physiologischen Flussbedingungen. Bildanalyse SURF, Survival of Rosettes in Flow: Bild-zu-Bild-Verfolgung von Zellaggregaten. Ergebnis: Überlebensrate der Rosetten abhängig von deren Größe und der Form der Stenose. Elastizität dieser Rosetten aus dem Spannungs-Dehnungs-Diagramm abhängig von der Belastungsgeschwindigkeit. Modell: Thermodynamische Betrachtung der Zustände A, Rosette, und B, keine Rosette. . . . .	iv
1.1	Was bedeutet Scherfluss? <b>A)</b> Eine Scherkraft ist eine Kraft, die tangential an der Oberfläche eines Körpers angreift, und eine Verkipfung der senkrechten Kanten zu einer festen Unterseite bewirkt. Die Scherkraft pro Flächeneinheit wird als Scherspannung $\tau$ bezeichnet. Im Gegensatz dazu greifen Druck- oder Zugkräfte senkrecht an und bewirken eine Stauchung oder Dehnung des Körpers [7]. <b>B)</b> Strömt eine Flüssigkeit über eine ruhende Fläche, wirken zwischen den strömenden Flüssigkeitsschichten ebenfalls Scherkräfte. Die Änderung der Geschwindigkeit $\Delta v$ mit der Höhe $\Delta h$ wird als Scherrate $\dot{\gamma}$ bezeichnet. <b>C)</b> Multipliziert man die Scherrate mit der Viskosität $\eta$ der Flüssigkeit, erhält man einen weiteren Ausdruck für die Scherspannung $\tau$ . Welchen Einfluss ein solcher Scherfluss auf Zellen hat, die an einer festen Fläche angewachsen sind, ist Thema dieser Arbeit. . . . .	3
2.1	Architektur eines Knochens. Knochen bestehen aus einer äußeren harten Schicht (Osteon) und einer inneren schwammartigen Matrix aus Hydroxylapatit und Kollagenfasern. Das Gewebe umschließt durch funktionellen Knochenzellen (Osteozyten) gebildete 20–40 $\mu\text{m}$ dicke Kanäle, die Blutgefäße beinhalten, und das deutlich feinere lakuno-kanalikuläre Netzwerk, das zur Nährstoffversorgung der Knochenzellen mit Flüssigkeit gefüllt ist [25, 26].	5
2.2	Messmethodik Mikroflusskammer [3]. <b>A)</b> Elektronenmikroskopaufnahme von adhären Zellen auf einem Titansubstrat. <b>B)</b> Darstellung des Aufbaus mit zellbewachsenem Titansubstrat an der Oberseite der Kammer. Im Inneren sind die Strömungslinien des <i>acoustic streaming</i> gekennzeichnet, das durch den Interdigital Transducer (IDT, goldene kammartige Struktur) erzeugt wird. Bild von C. Hohmann, NIM. <b>C)</b> Scherkarte berechnet aus einer sPIV Messung für eine RF Leistung von 28 dBm. <b>D)</b> Schematische Seitansicht der Kammer aus Polydimethylsiloxan (PDMS) mit Interdigital Transducer (IDT) auf einem Lithiumniobat-Chip ( $\text{LiNbO}_3$ ) unten und der Titanprobe (Substrat) oben. <b>E)</b> Superposition der Mikroskopaufnahmen zu Beginn und Ende einer 60-minütigen Messung. Der Farbcode visualisiert die möglichen Szenarien: Die dunkelblauen Flächen waren über den gesamten Messzeitraum nicht von Zellen bedeckt. Auf den hellblauen Flächen haben sich Zellen abgelöst, rote Flächen stehen für unveränderte Adhärenz. Flächen die zu Anfang frei waren, aber zu Ende von Zellen bedeckt sind, sind orange eingefärbt. . . . .	6
3.1	Zur Auswertung mit PIVDAC sind zwei unterschiedliche Messungen notwendig. <b>A)</b> Particle Image Velocimetry (PIV) zur Vermessung des Flussfelds. <b>B)</b> Scherkarte berechnet aus einer sPIV Messung für $F_{SAW} = 28$ dBm. <b>C)</b> Einteilung der Scherkarte in vier Zonen abnehmender Scherrate $\dot{\gamma}$ . Zone 1: $\dot{\gamma} = 6122 - 8060 \text{ s}^{-1}$ , Zone 2: $\dot{\gamma} = 4184 - 6122 \text{ s}^{-1}$ , Zone 3: $\dot{\gamma} = 2246 - 4184 \text{ s}^{-1}$ , Zone 4: $\dot{\gamma} = 307 - 2246 \text{ s}^{-1}$ . <b>D)</b> Experiment zur Zelladhäsion bzw. -ablösung. <b>E)</b> Originalbild Fluoreszenzaufnahme. <b>F)</b> Konvertierung von E) in ein 8 Bit Schwarzweißbild, die Zellen sind weiß, der Hintergrund schwarz. <b>Messung und Auswertung mit PIVDAC:</b> <b>G)</b> Fluoreszenzaufnahmen der adhären Zellen werden 60 Minuten lang alle fünf Minuten aufgenommen. <b>H)</b> Es wird von Bild zu Bild verglichen, ob sich Zellen abgelöst haben. Hier ist die Superposition der Mikroskopaufnahmen zu Beginn und Ende einer 60-minütigen Messung abgebildet. Der Farbcode visualisiert die möglichen Szenarien: Die dunkelblauen Flächen waren über den gesamten Messzeitraum nicht von Zellen bedeckt. Auf den hellblauen Flächen haben sich Zellen abgelöst, rote Flächen stehen für unveränderte Adhärenz. Flächen, die zu Anfang frei waren, aber zu Ende von Zellen bedeckt sind, sind orange eingefärbt. <b>I)</b> Particle Image Velocimetry De-Adhesion Correlation (PIVDAC): Die vier Scherratenzonen aus C) werden über die Aufnahmen der Zellen gelegt, um das Ablösen abhängig von der Scherrate auszuwerten. . . . .	10
4.1	Gibbspotential $G$ als Funktion der Reaktionskoordinate $x$ . $G_0$ beschreibt das Potential ohne Fluss, $G_S$ das konstante Potential der Scherkraft. In Summe ergibt sich das effektive Potential unter Fluss $G = G_0 + G_S$ . Die zwei lokalen Minima entsprechen den beiden Zuständen adhären (A) und abgelöst (B) eines Zelladhäsionsmoleküls [3]. . . . .	13
4.2	Aufteilung der Zonen nach der Scherrate $\dot{\gamma}$ und Umrechnung in die Scherspannung $\tau = \eta \dot{\gamma}$ mit einer dynamischen Viskosität des Zellkulturmediums von $\eta = 0,72 \text{ mPas}$ bei $T = 37^\circ \text{ C}$ [34]. . . . .	16
4.3	<b>A)</b> Superposition der Mikroskopaufnahmen zu Beginn und Ende einer 60-minütigen Messung und der vier Scherzonen. Der Farbcode visualisiert die möglichen Szenarien, vgl. Abb. 3.1 H: Die dunkelblauen Flächen waren über den gesamten Messzeitraum nicht von Zellen bedeckt. Auf den hellblauen Flächen haben sich Zellen abgelöst, rote Flächen stehen für unveränderte Adhärenz. Flächen, die zu Anfang frei waren, aber zu Ende von Zellen bedeckt sind, sind orange eingefärbt. <b>B)</b> Mit Zellen bedeckter Anteil der Fläche für jede Zone über den Messzeitraum von $t = 60$ Minuten, Fitfunktion ist Gleichung 4.12. <b>C)</b> Ablöserate $R$ wie eingeführt in Kap. 4.1 mit Fitgleichung 4.7. Die Datenpunkte in B) und C) sind normierte Mittelwerte und deren Standardabweichungen. . . . .	16
4.4	Zelladhäsion auf unterschiedlich rauen Oberflächen [2]. <b>A)</b> Initial bewachsene Fläche $A_{ini}$ zum Startzeitpunkt der Messung. <b>B)</b> Zellbedeckte Fläche $A_{60min}$ nach 60 Minuten Messung unter Einfluss der Strömung. <b>C)</b> Relative Änderung zwischen Anfang und Ende der Messung $A_{rel} = A_{60min}/A_{ini}$ . . . . .	19
4.5	Korrelation zwischen den Dimensionen der Substratopographie und der Größe der Sinnesorgane einer Zelle nach Ngyuen et al. [46].	20
4.6	Variation der Konzentration der Zellen in der Suspension ausgehend von der Standardkonzentration $c_{Standard} = 300.000 \text{ Zellen ml}^{-1}$ . Bei Befüllen der Probenkammer mit 200 $\mu\text{l}$ der jeweiligen Suspension resultiert daraus nach 60 Minuten Inkubationszeit die entsprechende, in der rechten Spalte aufgeführte Zelldichte auf dem Substrat. Für beispielhafte Mikroskopaufnahmen siehe Abb. 4.7 A-C. . . . .	22
4.7	Zelladhäsion bei zunehmend dicht bewachsenen Oberflächen [3]. <b>Oben:</b> Fluoreszenzaufnahmen bei <b>A)</b> niedriger Zelldichte mit 32 Zellen/ $\text{mm}^2$ , <b>B)</b> Standardzelldichte mit 320 Zellen/ $\text{mm}^2$ und <b>C)</b> hoher Zelldichte mit 1600 Zellen/ $\text{mm}^2$ . <b>Mitte:</b> Zellbedeckte Fläche $A(t)$ in den vier Scherzonen bei <b>D)</b> niedriger, <b>E)</b> Standard- und <b>F)</b> hoher Zelldichte. Die Datenpunkte in D-F sind normierte Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten. <b>G)</b> Ablöserate $R$ aus den Fits nach Gleichung 4.12 für die Zelldichten aus Tabelle 4.6, jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. <b>H)</b> Schema des Zellrasters für die Simulation nach Djukelic et al. [24] unter Fluss, Ansicht von Oben. Die markierte Zelle in der Mitte spürt durch die abschirmende Wirkung der umliegenden Zellen geringere Scherkräfte. <b>I)</b> Ergebnis der Simulation ist der Einflussfaktor $\Psi$ für die markierte Zelle in H) als Funktion der Zelldichte. . . . .	23
1.1	Moskitos sorgen weltweit für die meisten Todesfälle durch „Tiere“, mehr als die Hälfte dieser Menschen sterben an Malaria. Abbildung nach einer Aufstellung der tödlichsten Tiere der Welt von Bill Gates [55]. . . . .	29
1.2	Verbreitung von Malaria. <b>Oben:</b> Um 1900 war Malaria auf 53 % der Landfläche der Erde verbreitet. Zwischen 1900 und 2002 reduzierten sich die Malariagebiete flächenmäßig auf die Hälfte [56, 57]. <b>Unten:</b> Verbreitung von <i>Plasmodium falciparum</i> Malaria in Fällen pro 1000 Einwohnern im Jahr 2019 [58]. . . . .	30
1.3	Rosettenbildung bei Malariainfektion. <b>A)</b> Entwicklungsstadien des Erregers <i>Plasmodium falciparum</i> [64, 65]. Im Blutstadium können die Trophozoiten durch Agglomeration mit uninfierten roten Blutkörperchen sogenannte „Rosetten“ bilden. Eine Rosette besteht aus einem infizierten und mindestens zwei uninfierten roten Blutkörperchen. <b>B)</b> Zeichnung einer Rosette © C. Hohmann, NIM. Die zentrale, grün eingefärbte Zelle stellt das infizierte rote Blutkörperchen dar. <b>C)</b> Mikroskopaufnahme teilweise infizierter roter Blutkörperchen in Rosetten. Der Parasit ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff <i>Acridinorange</i> angefarbt. . . . .	31
1.4	Mikrofluidiksystem aus PDMS auf einem Glasobjektträger ( $76 \times 26 \text{ mm}^2$ ) mit Reservoir und Schlauch, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, mit beispielhafter Mikroskopaufnahme. Ein solcher Objektträger trägt 36 Mikrofluidikkanäle, die jeweils einzeln mit Reservoir und Schlauch angeschlossen werden können. Die ausgestanzten Ein- und Auslässe sind zu sehen. Im Bild links ist einer der 36 Kanäle angeschlossen. Der Kanal im Beispielvideo ist 50 $\mu\text{m}$ breit, 8 $\mu\text{m}$ hoch und an der Engstelle 11 $\mu\text{m}$ breit. . . . .	33
2.1	Elektronenmikroskopische Aufnahme der drei Arten von Blutzellen. Rechts rotes Blutkörperchen (rot), oben weißes Blutkörperchen (gelb) und einige Blutplättchen (grün) links (Jürgen Berger, MPI Tübingen). . . . .	37

2.2	Intraerythrozytäre Phase im Blutstadium des Erregers <i>Plasmodium falciparum</i> ab Invasion eines roten Blutkörperchens durch einen Merozoiten (Zeitpunkt 0 h) über das Ringstadium (bis 24 h <i>post invasion</i> ), das Trophozoitenstadium (24 – 40 h <i>post invasion</i> ) und das Schizontenstadium (ab 40 h <i>post invasion</i> ), bis das rote Blutkörperchen nach ca. 48 h <i>post invasion</i> schließlich aufplatzt und neue Merozoiten frei werden. <b>A</b> ) Die Illustrierung links zeigt die typischen morphologischen Merkmale des Ringstadiums [101]. Die Vakuole des Parasiten ist als Ring sichtbar, der mit einem oder, in Kopfblüherkonfiguration, zwei dunklen Chromatinflecken ausgestattet ist. Eine Zelle kann mehr als einen solcher Ringe enthalten. Rechts ist das fortgeschrittene Schizontenstadium dargestellt. Hier hat sich der Parasit stark vermehrt und die Zelle ist mit den Vakuolen dicht gefüllt [102]. <b>B</b> ) Schematische Darstellung der Blutstadien [103]. <b>C</b> ) Mikroskopaufnahmen der unterschiedlichen Stadien im dünnen Blutausschlag nach Giemsa-Färbung [104]. Die Giemsa-Farbstoffmischung wird standardmäßig zur Malaria diagnose eingesetzt [105].	39
2.3	Informationsblatt zu Malaria und der Wirkung von Chinin vom <i>Bureau for Increasing the Use of Quinine</i> aus dem Jahr 1927 [113].	40
2.4	Rosettierende rote Blutkörperchen. <b>A</b> ) Aufnahme einer Rosette aus einem infizierten, zentralen und drei adhärennten, uninfizierten roten Blutkörperchen mit einem Rasterelektronenmikroskop, Vergrößerung 3600fach [119]. <b>B</b> ) Beispiele von Rosetten nach Anfarben mit Acridinorange, Vergrößerung 40fach.	42
2.5	Aufbau eines VarioMACS Separators (Miltenyi Biotec) zur magnetischen Zellsortierung, MACS steht für MAgnetic Cell Sorting [114, 123].	43
2.6	Die Aggregation roter Blutkörperchen (RBK) kann durch Makromoleküle ausgelöst werden. Dabei wird die Haftung entweder dadurch vermittelt, dass an der Zelloberfläche eine Verarmungszone entsteht, wie es bspw. bei Dextranen der Fall ist (links). Handelt es sich allerdings um ein Molekül wie Lektin, das an Rezeptoren auf der Membran des RBKs binden kann, halten die Moleküle die Zellen direkt zusammen (rechts). Schema nach Zhang et al. [125].	44
3.1	<b>A</b> ) Die Viskosität einer Flüssigkeit bestimmt die Scherkraft, die aufgewendet werden muss, um eine Platte mit Geschwindigkeit $v$ über eine ruhende Platte zu ziehen, wenn sich zwischen den beiden Platten diese Flüssigkeit befindet. Der Geschwindigkeitsunterschied $\Delta v$ zweier Schichten, die übereinander gleiten, im Verhältnis zum Abstand $\Delta z$ der beiden Schichten wird als Scherrate $\dot{\gamma} = \frac{dv}{dz}$ bezeichnet. <b>B</b> ) Für sogenannte Newtonsche Flüssigkeiten ist die Viskosität $\eta$ unabhängig von der Scherrate. Die Scherspannung $\tau$ nimmt also linear mit der Scherrate zu, $\tau = \eta\dot{\gamma}$ . Nicht-newtonsche Flüssigkeiten können scherverdickend oder -verdünnend sein. <b>C</b> ) Die Viskosität von Blut nimmt mit abnehmendem Gefäßdurchmesser durch die dort herrschenden höheren Scherraten zunächst ab, verhält sich also scherverdünnend. Werden die Gefäße so klein, dass ihr Durchmesser dem eines roten Blutkörperchens ähnlich wird, kehrt sich das Verhalten um [139].	48
3.2	Bei laminaer Strömung sind die Stromlinien geordnet, parallel und zeitlich unverändert. Solche Verhältnisse niedriger Reynoldszahlen stellen sich ein, wenn die Flüssigkeit sehr viskos (Gletscher) oder das Gefäß sehr schmal ist (Mikrofluidik). Kommen zeitlich veränderliche Wirbel und Störungen hinzu, bspw. durch Steine in einem Bach, spricht man von turbulenter Strömung.	49
3.3	Mikrofluidikaufbau bestehend aus einem Mikrofluidikkanal in PDMS auf einem Glasobjektträger, einer Pipettenspitze als Probenreservoir am Kanaleinlass und einem PTFE Schlauch am Kanalauslass, der mit einer Spritzenpumpe verbunden ist. Die Kanalbreite $w$ wird in den Stenosen auf den Stenosedurchmesser $d$ reduziert. Die Kameraaufnahmen werden mithilfe eines invertierten Mikroskops von unten aufgenommen.	52
3.4	Kanalgeometrie mit Stenose. <b>A</b> ) Schema. Ein gerader Kanal mit Durchmesser $d_1$ verjüngt sich ab einer Stelle $x_s$ über die Elongationslänge $e$ auf die Stenosenbreite $d_2$ . Nach der Länge $l$ des schmalsten Abschnitts verbreitert sich der Durchmesser symmetrisch auf den Ursprünglichen $d_1$ . Die Höhe des Elongationsdreiecks $h_e$ ist ein Hilfsparameter zur Berechnung des Durchmessers $d_e(x)$ entlang der $x$ -Koordinate. Set der verwendeten Stenosen <b>B</b> ) fünf unterschiedlicher Breiten $d$ und <b>C</b> ) vier unterschiedlicher Elongationslängen $e$ . Der Mikrofluidikkanal ist $L = 7$ mm lang und konstant $h = 8$ $\mu$ m hoch. Die Kanalbreite von $d_1 = 50$ $\mu$ m wird in den Stenosen über die Elongationslänge $e$ auf den Stenosedurchmesser $d_2$ reduziert. <b>B</b> ) Der Stenosedurchmesser $d_2 = d$ variiert von $d = 14,5$ $\mu$ m bis $d = 3,5$ $\mu$ m. Rechts beispielhafte Mikroskopaufnahmen von Rosetten bei Passage der jeweiligen Stenosen. <b>C</b> ) Der Zulauf der Stenose wird im Vergleich zur Standardlänge von $e_{Std} = 55$ $\mu$ m einmal verkürzt auf ein Fünftel, und auf das Doppelte bzw. Dreifache verlängert.	54
3.5	Definitionen zur Bestimmung von Dehnung $\epsilon$ und Spannung $\sigma$ . <b>A</b> ) Die Dehnung ist die relative Längenänderung im Verhältnis zum runden Zustand, $\epsilon = \frac{L - 2r_0}{2r_0}$ . <b>B</b> ) Bewegt sich ein Aggregat auf eine Engstelle zu, wirkt an jeder Position $x$ eine andere Spannung $\sigma(x)$ . <b>C</b> ) Koordinatensystem des Aggregats $(\tilde{x}, \tilde{y})$ mit Koordinatenursprung $(\tilde{x} = 0, \tilde{y} = 0)$ im Zentrum der Ellipse mit den Halbachsen $a = L/2$ und $b$ .	57
4.1	Ausschnitte aus der Videoaufnahme, die in diesem Kapitel zur Demonstration der Software SURF dient. Die Flussrichtung ist von links nach rechts. Zu sehen ist eine Rosette bei Passage eines Kaskadenkanals mit drei Stenosen kleiner werdenden Durchmessers von $d = 11$ $\mu$ m, $7$ $\mu$ m und $5$ $\mu$ m.	59
4.2	Das Hintergrundbild wird pixelweise über den Median des Grauwerts der ersten 1000 Bilder eines Videos berechnet.	60
4.3	Für jedes erkannte Objekt werden diese neun Merkmale in neun Spalten in der Textdatei <code>SURF_object_locations.txt</code> abgespeichert. 1) die Nummer des Einzelbildes, 2) die Nummer des Objekts, 3) die $x$ - und 4) die $y$ -Position des Zentrums, 5) die Fläche des Objekts in Pixeln, 6) die große und 7) die kleine Achse, sowie 8) die Exzentrizität und 9) die Orientierung der umgebenden Ellipse.	60
4.4	<b>A</b> ) Resultat der Auswertung des Beispielveideos sind 344 Trajektorien. <b>B</b> ) Beispieltrajektorie Nummer 7 aus der Beispielmessung. Position im Kanal von Start bis Ende mit Markierung der Zellverlustereignisse. <b>C</b> ) Originalmikroskopaufnahmen und binarisierte Bilder der verfolgten Rosette bei Schritt 0, 21, 29, 48 und 58 der Trajektorie. Der Zeitschritt zwischen zwei Bildern beträgt 0,5 ms. <b>D</b> ) Fläche der Rosette in Pixeln als Funktion der $x$ -Koordinate. Die Unterscheidung der Zellverlustereignisse in 1) <i>real rupture</i> und 2) <i>rupture and reconnect</i> erfolgt nachträglich. Die Bezeichnungen der vier möglichen Ereignisse sind in Abbildung 4.7 aufgeführt.	61
4.5	Bild zu Bild Verfolgung. Befindet sich eine Rosette auf Bild $k$ im Startbereich $50 \text{ Pixel} < x < 75 \text{ Pixel}$ , wird eine Trajektorie initiiert. Jeweils auf dem folgenden Bild $k + 1$ wird die passende Rosette identifiziert, um die Trajektorie fortzusetzen.	62
4.6	Aus jedem Schritt jeder Trajektorie lässt sich aus der Differenz der Positionen auf Bild $k$ und Bild $k + 1$ die Geschwindigkeit berechnen. Durch Übereinandersetzen der Geschwindigkeitsvektoren aller Trajektorien ergibt sich das Geschwindigkeitsfeld im Kanal. Die Geschwindigkeit ist in der Beispielmessung wie zu erwarten höher, je enger die Stenose ist.	63
4.7	Kategorisierung der Ereignisse entlang einer Trajektorie in die vier Kategorien <i>real rupture</i> , <i>rupture and reconnect</i> , <i>connect only</i> und <i>pass by</i> .	64
4.8	Registrierte Ereignisse <i>real rupture</i> , <i>rupture and reconnect</i> , <i>connect only</i> und <i>pass by</i> entlang der 344 Trajektorien aus der Beispielmessung und Endpunkte dieser Trajektorien <i>end of trace</i> jeweils mit Markierungen an der Position, an der sich die Rosette zum Zeitpunkt des Ereignisses befindet. Jeweils unterhalb ist die Häufigkeit des jeweiligen Ereignisses (Anzahl Ereignisse pro 500 Trajektorien) entlang des Kanals durch passend skalierte Kreise dargestellt, $x$ -Achse in Pixeln. <i>real rupture</i> : Die Größe der roten Kreise skaliert mit der Fläche, um die die Rosette beim jeweiligen <i>real rupture</i> Ereignis verkleinert wurde. <i>rupture and reconnect</i> : Eine weiße Linie entlang der Trajektorie verbindet ein Zellverlustereignis, mit einem roten Kreuz markiert, bis zu einem darauf folgenden, mit gelbem Kreis markierten, Zellwachstereignis. Solche Zellverlustereignisse sollen erkannt werden, um nicht fälschlicherweise als <i>real rupture</i> gezählt zu werden. <i>connect only</i> : Ein Zellwachstereignis ohne vorangehenden oder nachfolgenden Zellverlust ist mit einem gelben Kreis markiert. <i>pass by</i> : Folgt einem Zellzuwachs ein Zellverlust, verbinden sich Zellen also nur temporär, soll diese Art von Zellverlust ebenfalls nicht fälschlicherweise als <i>real rupture</i> eingeordnet werden. Solche <i>pass by</i> Ereignisse sind hier mit einer grünen Linie entlang der Trajektorie dargestellt, der Zellzuwachs am Anfang in Gelb und der abschließende Zellverlust in Weiß. <i>end of trace</i> : Das Ende jeder Trajektorie ist hier durch ein violettes Kreuz gekennzeichnet. Die Kategorisierung der Ereignisse durch den SURF Algorithmus ist in Abbildung 4.7 dargestellt.	65
4.9	Jede Trajektorie $i$ wird als Textdatei <code>SURF_trace_i.txt</code> exportiert. Die Spalten enthalten von links nach rechts 1) die Nummer der Trajektorie, 2) die Nummer des Einzelbildes, 3) $x$ - und 4) $y$ -Position des Zentrums in Pixel, 5) die Fläche, 6) die große Achse, 7) die kleine Achse, 8) die Exzentrizität der umgebenden Ellipse, 9) die Flächenänderung und 10) die Änderung der $x$ -Position zum folgenden Bild, 11) die Anzahl der umgebenden Objekte, 12) die Anzahl der umgebenden Objekte im folgenden Bild, 13) die Änderung der Anzahl der umgebenden Objekte, 14) die Flächenänderung, falls ein Zellzuwachs- oder Zellverlustereignis vorliegt, 15) Kategorie 1 – 4 des Ereignisses. Hier <code>SURF_trace_7.txt</code> für die Beispieltrajektorie 7.	66
4.10	Klassifizierung von Aggregaten in sechs Klassen aufsteigender Größe. Die Größe wird auf die durchschnittliche Fläche $A_{RBK}$ einer einzelnen Zelle normiert. Der Durchmesser der grauen Kreise ist der Äquivalentdurchmesser für die jeweilige Klasse, also das kreisförmige Flächenäquivalent für ein mittleres Aggregat dieser Klasse, vgl. Gl. 4.1. Aggregate der Klassen 2 – 6 werden als Rosetten bezeichnet.	67
4.11	Der Zustand einer Rosette nach Passage einer Stenose ist entweder „intakt“ (grün), „beschädigt“ (gelb) oder „vollständig zerlegt“ (rot).	68
5.1	Die verwendeten Stenosen unterscheiden sich im Stenosedurchmesser $d$ an der engsten Stelle, und der Länge $e$ des Zulaufs zur Stenose. <b>A</b> ) Zunächst wird die Länge der Stenose bei $e_{Std} = 55$ $\mu$ m festgehalten, und der Durchmesser zwischen $d = 14,5$ $\mu$ m, $11$ $\mu$ m, $7$ $\mu$ m, $5$ $\mu$ m und $3,5$ $\mu$ m variiert. <b>B</b> ) Die Elongation wird variiert, indem die Stenose ausgehend von der Standardausführung mit $e_{Std} = 55$ $\mu$ m auf ein Fünftel verkürzt, bzw. auf das Doppelte und das Dreifache verlängert wird. Diese unterschiedlich langen Stenosen gibt es mit zwei verschiedenen Stenosedurchmessern von $d = 5$ $\mu$ m bzw. $d = 7$ $\mu$ m.	71
5.2	Größenverteilung der Rosetten auf die Klassen 1-6 in Blutgruppe A und 0 zu Kanalbeginn. Die Einordnung in Klassen erfolgt nach der auf die Projektionsfläche eines einzelnen roten Blutkörperchens $A_{RBK}$ normierten Größe.	72
5.3	Geschwindigkeit entlang der Stenose, normiert auf die Anfangsgeschwindigkeit $v_0$ . <b>A</b> ) Theoretischer Verlauf nach Gleichung 3.23. <b>B</b> ) Mittlere Geschwindigkeit berechnet aus den Trajektorien der Rosetten der Klasse 3 aus jeweils einem Beispielerperiment mit $v_0 \approx 1$ cm/s, beschrieben durch eine Gaußkurve. Die Beispielerperimente sind aus dem Datensatz zu Abb. 5.4 B, Blutgruppe 0. Die Fitkurven beruhen auf Gleichung 4.2.	73
5.4	Verteilung auf die drei Zustände „unbeschädigt“ (grün), „beschädigt“ (gelb) und „vollständig zerlegt“ (rot) der Rosetten nach Passage einer Stenose <b>A</b> ) bei kaskadenartig angeordneten, kleiner werdenden Stenosen fünf unterschiedlicher Breiten von $d = 14,5$ $\mu$ m (links) bis $d = 3,5$ $\mu$ m (rechts). Die zugehörige Stenose ist jeweils hellblau im Schema der Kaskade markiert. Da der Bildausschnitt jeweils nur drei Stenosen abdecken kann, sind für diese Ergebnisse die Auswertungen aus Videos übereinandergelagert, die entweder die ersten drei, die mittleren drei oder die letzten drei Stenosen zeigen. Jeder Balken ist ein Mittelwert aus 3 – 4 unabhängigen Messungen bzw. 100 – 500 Trajektorien. <b>B</b> ) Für Einzelstenosen fünf unterschiedlicher Breiten von $d = 14,5$ $\mu$ m (links) bis $d = 3,5$ $\mu$ m (rechts). Jeder Balken ist ein Mittelwert aus 2 – 3 unabhängigen Messungen bzw. 50 – 400 Trajektorien. Die Fläche der grauen Kreise unten entspricht jeweils der Größe der Rosetten in der betreffenden Rosettenklasse 2 – 6, wie in Abb. 4.10 eingeführt. Die Ergebnisse in Blutgruppe A und 0 sind mit A bzw. 0 gekennzeichnet [4]. Oberhalb sind Beispiele für die Passage einer Rosette der jeweiligen Stenose gezeigt.	75
5.5	Zweizustandssystem der Faltung eines Proteins, links [149], bzw. des Aggregationsgrads einer Rosette, rechts. Die Energieniveaus der beiden Zustände (A) gebunden bzw. gefaltet und (B) gelöst bzw. entfaltet unterscheiden sich um die Differenz der Gibbs'schen freien Energie $\Delta G$ .	76

5.6	Scherflussinduzierte Zerlegung von Rosetten. <b>A)</b> Überlebensrate für Rosetten der Klassen 2 – 6 als Funktion der inversen Stenosenbreite bei Passage von Einzelstenosen fünf unterschiedlicher Breiten von $d = 14,5 \mu\text{m}$ bis $d = 3,5 \mu\text{m}$ mit Fit nach Gleichung 5.6. Die Werte sind jeweils Mittelwerte aus 2 – 3 unabhängigen Messungen bzw. 50 – 400 Trajektorien. Die Fehlerbalken stellen die 90 % Konfidenzintervalle dar. <b>B)</b> Übergangsbreite $d^*$ , die sich für jede Klasse aus dem Fit in A) ergibt, als Funktion des Äquivalentdurchmessers (vgl. Abb. 4.10) einer Rosette der entsprechenden Klasse aufgetragen. Die Übergangsbreite $d^*$ ist die kritische Breite einer Stenose, bei der 50 % der Rosetten die Passage überstehen [4]. . . . .	78
5.7	Effektive Überlebensrate einer Rosettenpopulation in Blutgruppe A im Vergleich zu Blutgruppe 0 [4]. <b>A)</b> Überlebensrate $s(k, d)$ für die Rosettenklassen 2 – 6 und dazugehörige initiale Häufigkeitsverteilung $h(k)$ für Blutgruppe 0 und <b>B)</b> für Blutgruppe A. <b>C)</b> Die effektive Überlebensrate $s_{\text{eff}}$ , vgl. Gl. 5.7, fasst die größenabhängigen Größen aus A) bzw. B) zu einer Größe zusammen, die die Überlebensrate der ganzen Population beschreibt. $s_{\text{eff}}$ ist die Summe über die mit den relativen Häufigkeiten $h(k)$ gewichteten Überlebensraten der einzelnen Klassen $s(k, d)$ aus Abb. A bzw. B. <b>D)</b> Relativer Unterschied der effektiven Überlebensrate $\Delta s_{\text{eff}}/s_{\text{eff}} = (s_{\text{eff,BGA}} - s_{\text{eff,BG0}})/s_{\text{eff,BG0}}$ in Blutgruppe A bezogen auf das Ergebnis in Blutgruppe 0. . . . .	79
5.8	Der Zustand einer Rosette nach Passage einer Stenose ist entweder „unbeschädigt“ (grün), „beschädigt“ (gelb) oder „vollständig zerlegt“ (rot). Hier ist die Verteilung auf diese drei Zustände für Stenosen zwei unterschiedlicher Breiten <b>A)</b> $d = 7 \mu\text{m}$ und <b>B)</b> $d = 5 \mu\text{m}$ und vier unterschiedlicher Elongationslängen dargestellt. Die Standardlänge ist $e_{\text{Std}} = 55 \mu\text{m}$ , dazu kommt eine verkürzte Stenose mit $e_{0,2x} = 1/5e_{\text{Std}}$ und zwei verlängerte mit $e_{2x} = 2e_{\text{Std}}$ und $e_{3x} = 3e_{\text{Std}}$ . Die Fläche der grauen Kreise unten entspricht jeweils der Größe der Rosetten in der betreffenden Rosettenklasse 2 – 6, wie in Abb. 4.10 eingeführt. Die Ergebnisse in Blutgruppe A und O sind mit A bzw. O gekennzeichnet. . . . .	80
5.9	Elongationsinduzierte Zerlegung von Rosetten. <b>A)</b> Überlebensrate für Rosetten der Klassen 2 – 6 in Blutgruppe 0 (links) und Blutgruppe A (rechts) als Funktion der Elongationslänge bei Passage von Einzelstenosen vier unterschiedlicher Längen von $e = e_{0,2x} = 11 \mu\text{m}$ bis $e = e_{3x} = 165 \mu\text{m}$ und fester Breite $d = 5 \mu\text{m}$ mit Fit nach Gleichung 5.8. Die Fehlerbalken stellen die 95 % Konfidenzintervalle dar. <b>B)</b> Übergangslänge $e^*$ , die sich für jede Klasse aus dem Fit in A) mit Gl. 5.9 ergibt, als Funktion des Äquivalentdurchmessers (vgl. Abb. 4.10) einer Rosette der entsprechenden Klasse aufgetragen. Die Übergangslänge $e^*$ ist die kritische Elongationslänge einer Stenose, bei der 50 % der Rosetten die Passage überstehen. <b>C)</b> Überlebensrate als Funktion der Elongationslänge bei Passage von $d = 7 \mu\text{m}$ breiten Einzelstenosen. Alle anderen Parameter sind aus A) übernommen. Da die 50 % Marke hier nie unterschritten wird, dient der Fit hier lediglich der Übersichtlichkeit. Eine Übergangslänge wie in B) wird hier nicht angegeben. . . . .	81
5.10	Schema Simulation Protein-Bindungskinetik. In jedem Simulationsschritt wird für jedes der $N_{\text{gesamt}}$ Proteine unter Verwendung einer Zufallszahl und einer von der Kanalgeometrie und der Anzahl der aktuell gebundenen Proteine abhängigen Rate entschieden, ob das Protein seinen Zustand ändert. . . . .	83
5.11	<b>A)</b> Geschwindigkeit und <b>B)</b> Ab- und Anbinderaten für drei verschiedene Elongationslängen mit $N_{\text{gesamt}} = 200$ und $c = 130$ . <b>C)</b> Simulationsergebnis $N_{\text{on}}(t)$ für $N_{\text{gesamt}} = 200$ , $e = 3e_{\text{Std}}$ und 100 Durchläufe und <b>D)</b> Überlebensrate als Funktion der Zeit für $e = e_{\text{Std}}$ , $e = 3e_{\text{Std}}$ und $e = 5e_{\text{Std}}$ . <b>E)</b> Simulationsergebnis Überlebensrate als Funktion der Elongationslänge für unterschiedlich viele Proteine $N_{\text{gesamt}}$ . Jeweils 1000 Durchläufe pro Datenpunkt, für $N_{\text{gesamt}} = 1000$ sind es 100 Durchläufe. <b>F)</b> Simulationsergebnis Überlebensrate als Funktion der Elongationslänge für $N_{\text{gesamt}} = 200$ Proteine für verschiedene Werte von $c$ . . . . .	85
5.12	Im Mittel abgetrennte Zellen pro beschädigter Rosette nach Rosettenklasse bei Passage von Stenosen mit Stenosenbreite $d = 5 \mu\text{m}$ und Elongationslänge $e = 0, 2; 1; 2$ und $3e_{\text{Std}}$ . <b>A)</b> in Blutgruppe 0 und <b>B)</b> in Blutgruppe A. <b>C)</b> Zellverlust bezogen auf die durchschnittliche Anzahl an Zellen einer Rosette der jeweiligen Klasse gemittelt über alle Elongationslängen. Das nach Rosettenanzahl gewichtete Mittel in C) über die Messreihen aus A) und B) ist somit unabhängig von der Elongationslänge. . . . .	87
5.13	<b>A)</b> Lektin-induzierte Aggregation nach Präparationsprotokoll aus Kap. 2.4. <b>B)</b> Der Zustand eines Lektin-induzierten Aggregats nach Passage einer Stenose ist entweder „unbeschädigt“ (grün), „beschädigt“ (gelb) oder „vollständig zerlegt“ (rot). Hier ist die Verteilung auf diese drei Zustände für Stenosen drei unterschiedlicher Breiten $d = 11 \mu\text{m}$ , $d = 7 \mu\text{m}$ und $d = 5 \mu\text{m}$ bei Standardelongationslänge $e_{\text{Std}} = 55 \mu\text{m}$ gezeigt. Die Fläche der grauen Kreise unten entspricht jeweils der Größe der Aggregate in der betreffenden Klasse 1 – 6, wie in Abb. 4.10 eingeführt. . . . .	88
5.14	Der Zustand eines Lektin-induzierten Aggregats nach Passage einer Stenose ist entweder „unbeschädigt“ (grün), „beschädigt“ (gelb) oder „vollständig zerlegt“ (rot). Hier ist die Verteilung auf diese drei Zustände für Stenosen zwei unterschiedlicher Breiten <b>A)</b> $d = 7 \mu\text{m}$ und <b>B)</b> $d = 5 \mu\text{m}$ und vier unterschiedlicher Elongationslängen dargestellt. Die Standardlänge ist $e_{\text{Std}} = 55 \mu\text{m}$ , dazu kommt eine verkürzte Stenose mit $e_{0,2x} = 1/5e_{\text{Std}}$ und zwei verlängerte mit $e_{2x} = 2e_{\text{Std}}$ und $e_{3x} = 3e_{\text{Std}}$ . Die Fläche der grauen Kreise unten entspricht jeweils der Größe der Aggregate in der betreffenden Klasse 1 – 6, wie in Abb. 4.10 eingeführt. . . . .	89
5.15	Elongationsinduzierte Zerlegung Lektin-induzierter Aggregate. Überlebensrate mit Fit nach Gleichung 5.8 für Aggregate der Klassen 1 – 6 als Funktion der Elongationslänge bei Passage von Einzelstenosen vier unterschiedlicher Längen von $e = e_{0,2x} = 11 \mu\text{m}$ bis $e = e_{3x} = 165 \mu\text{m}$ bei fester Breite <b>A)</b> $d = 5 \mu\text{m}$ und <b>B)</b> $d = 7 \mu\text{m}$ . Die Fehlerbalken stellen die 95 % Konfidenzintervalle dar. . . . .	90
5.16	Fünfzelliges Aggregat bei der Passage einer Stenose mit Standardlänge $l = 20 \mu\text{m}$ und <b>(A)</b> steilem Winkel von $50^\circ$ bzw. <b>(B)</b> einer mit flachem $19^\circ$ Winkel. Das in A) und B) beobachtete Verhalten ist fast identisch. . . . .	92
5.17	Beispielhafte Mikroskopaufnahmen eines Aggregats aus Blutgruppe A, das eine Standardstenose mit $d = 7 \mu\text{m}$ , $e = e_{\text{Std}}$ passiert. Die Nummern bezeichnen Zeitschritte, ein Zeitschritt entspricht $\Delta t = 0,5 \text{ ms}$ . . . . .	92
5.18	Abstrahiertes Modell einer Kugel mit Durchmesser $D = 10 \mu\text{m}$ bei Passage einer Stenose mit $d = 7 \mu\text{m}$ Durchmesser und Verengungswinkel von $19,7^\circ$ . Zeitschritte $t = 1$ bis $t = 11$ in dimensionslosen Simulationseinheiten. . . . .	93
5.19	Gegenüberstellung der Ellipsenform in Simulation und einer Beispielmessung mit den Parametern Blutgruppe A, $d = 7 \mu\text{m}$ , $e = e_{\text{Std}}$ . Rosettenklasse 3. Fluss in x-Richtung, Mitte der Stenose bei $x = 0$ . Die Stenose erstreckt sich über $-82 \mu\text{m} < x < 82 \mu\text{m}$ , davon macht der engste Teil jeweils den Bereich $-22 \mu\text{m} < x < 22 \mu\text{m}$ aus. <b>Oben:</b> Lange und kurze Halbachse a und b. <b>A)</b> Simulation, <b>B)</b> Beispielmessung. <b>Unten:</b> Dehnung $\epsilon$ , <b>C)</b> Simulation, <b>D)</b> Beispielmessung. . . . .	94
5.20	Gegenüberstellung von Spannung $\sigma$ und Geschwindigkeit $v$ in Simulation und einer Beispielmessung mit den Parametern Blutgruppe A, $d = 7 \mu\text{m}$ , $e = e_{\text{Std}}$ , Rosettenklasse 3. Fluss in x-Richtung, Mitte der Stenose bei $x = 0$ . Die Stenose erstreckt sich über $-82 \mu\text{m} < x < 82 \mu\text{m}$ , davon macht der engste Teil jeweils den Bereich $-22 \mu\text{m} < x < 22 \mu\text{m}$ aus. <b>Oben:</b> $\sigma(x)$ und $v(x)$ . <b>A)</b> Simulation, <b>B)</b> Beispielmessung. <b>Unten:</b> $\sigma(v)$ , <b>C)</b> Simulation, <b>D)</b> Beispielmessung. Nach Gleichung 3.37 setzt sich $\sigma(v)$ aus einem linearen und einem quadratischen Term zusammen, daher sind ein linearer und ein parabolischer Fit der Form $y = a + bv + cv^2$ gezeigt. . . . .	95
5.21	Überlebensrate von Rosetten in Blutgruppe 0 im geometrischen Parameterraum von Stenosedurchmesser $d$ und Elongationslänge $e$ . Realisierte Wertepaare $(d, e)$ sind durch schwarze Punkte markiert. Die Farbskala gibt die Überlebensrate $s(d, e)$ in Prozent an. Diese Abbildung fasst die Ergebnisse zu Einfluss des Stenosedurchmessers aus Abb. 5.4 B und zu Einfluss der Elongationslänge aus Abb. 5.8 zusammen. Mittelwert über alle Klassen 2 – 6. . . . .	96
6.1	Die Elastizität einer Zelle lässt sich aus der Verformung unter Fluss errechnen (Mikrofluidik), oder durch die Aspiration in Mikropipetten und mittels Kraftspektroskopie (AFM) bestimmen. Üblicherweise ist der Cantilever eines AFM mit einer Spitze ausgestattet. Um die Zelle weniger zu punktieren, sondern flächig auf die Zelle zu drücken, werden in dieser Arbeit auch Cantilever ohne Spitze verwendet. . . . .	99
6.2	<b>A)</b> Mikroskopaufnahmen von A375 Zellen bei Passage einer Stenose mit $d = 7 \mu\text{m}$ und $e = e_{\text{Std}}$ . Aus den Messwerten im rot hinterlegten Bereich wird das Spannungs-Dehnungs-Diagramm erstellt. <b>B)</b> Spannungs-Dehnungs-Diagramm für die Beispielmessung mit $d = 7 \mu\text{m}$ und $e = e_{\text{Std}}$ aus A). Dieses Diagramm setzt sich aus den Trajektorien von 2500 Zellen zusammen. Die Zellen sind schon im breiten Teil des Kanals nicht ganz rund, $\sigma(\epsilon)$ schneidet daher nicht den Ursprung. Die Verformung liegt im einstelligen Prozentbereich und nimmt im Elongationsfluss um 0,5 – 1 Prozentpunkte zu. Die Kurve $\sigma(\epsilon)$ ist daher recht steil. Aus dem linearen Fit nach Gleichung 3.38 folgt der Elastizitätsmodul $E = 681 \text{ Pa}$ . <b>C)</b> Elastizitätsmodul von A375 Zellen bei Passage von Stenosen bei unterschiedlicher mittlerer Spannung von $\sigma \approx 15 \text{ Pa}$ . . . . .	100
6.3	<b>A)</b> Prinzip des Durchflusszytometers <i>AcCelerator</i> nach Mietke et al. [157]. Es werden Hochgeschwindigkeitsaufnahmen von Zellen bei Passage einer Stenose mit $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ Querschnitt und $300 \mu\text{m}$ Länge aufgenommen, und im Beobachtungsfenster im engsten Teil der Stenose (gestricheltes Rechteck) Deformierung $d$ , vgl. Gl. 6.1, und Fläche $A$ der Zellen bestimmt. <b>B)</b> Tabellarisch hinterlegte Werte für den Elastizitätsmodul als Funktion der Deformierung $d$ und der Fläche $A$ in der <i>AcCelerator</i> Software <i>ShapeOut</i> . Diese Werte gelten für einen Kanaldurchmesser von $L_{\text{tab}} = 20 \mu\text{m}$ und eine Flussrate von $Q_{\text{tab}} = 144 \mu\text{l/h}$ [158]. <b>C)</b> Skalierungsfaktor $s$ für den Elastizitätsmodul aus B) zur Übertragung auf andere experimentelle Bedingungen. Für Kanaldurchmesser $L = 25 - 30 \mu\text{m}$ und Flussrate $Q = 50 - 75 \mu\text{l/h}$ ist $s \approx 0,1$ . . . . .	101
6.4	AFM Kraftspektroskopie an einer Zelle. <b>A)</b> Messprinzip eines AFM nach [161]. Der Cantilever mit Messspitze wird durch eine Piezo-Einheit gesteuert, und die Auslenkung durch einen Laser, der am Cantilever reflektiert wird, an einer Vierfeld-Photodiode detektiert. Eine Kraft-Abstands-Kurve wird durch Herunterbewegung der Messspitze auf die Zelle bis zum Eindringen dieser (Hinweg) und anschließendes kontrolliertes Hochfahren der Spitze (Rückweg) aufgenommen. Zelle und Spitze befinden sich in Flüssigkeit. <b>B)</b> Oben: Verwendeter Cantilever mit Spitze (MLCT-BIO [162]). Unten: Mikroskopaufnahme einer A375 Zelle und eines Cantilevers ohne Spitze (MLCT-010-D [163]). <b>C)</b> Kraft-Abstands-Kurve für eine Beispielmessung <i>AFM mit Spitze</i> mit Cantileverhärte $0,03 \text{ N/m}$ , Kraft-Setpoint $2 \text{ nN}$ , Anfahrtschwindigkeit $1 \mu\text{m/s}$ und Anfahrtslänge $5 \mu\text{m}$ . Zwischen Hin- und Rückweg (rot und grün) liegt eine Pause von $1 \text{ sec}$ bei konstanter Kraft (schwarz) [164]. . . . .	103
6.5	Elastizitätsmodul von A375 Zellen nach Kraftspektroskopie (AFM) und aus Flussmessungen [164]. Vergleich der unterschiedlichen Messverfahren. <b>AFM:</b> Das Ergebnis der AFM Messungen mit und ohne Spitze ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus Messungen an 5 – 10 Zellen mit $\sim 10$ Kraftkurven pro Zelle. Der Cantilever ohne Spitze ist vorne $20 \mu\text{m}$ breit, der Spitzenradius der hier verwendeten ca. $3 \mu\text{m}$ langen Spitzen beträgt $20 \text{ nm}$ . <b>Stenose:</b> Die Elastizität wurde außerdem anhand der Verformung unter Fluss bei Passage einer Stenose bestimmt. Der Wert hier fasst die sechs Werte aus Abb. 6.3 zusammen, in die jeweils Trajektorien von ca. 3000 Zellen eingehen. . . . .	105
6.6	Schritte zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls für Rosetten der Klassen 3-5 anhand einer Beispielmessung mit $d = 5 \mu\text{m}$ und $e = 3e_{\text{Std}}$ in Blutgruppe 0. <b>A)</b> Kurze und lange Achse der Ellipse, die die Form der Rosetten beschreibt, entlang des Kanals. Lange und kurze Achse werden durch die Fitgleichungen Gl. 4.3 und 4.4 angepasst. Mitte der Stenose bei $x = 0$ . <b>B)</b> Kräfte $F_{\text{Scherung}}$ nach Gl. 3.27, $F_{\text{Kompression}}$ nach Gl. 3.25 und $F_{\text{Stenose}} = F_{\text{Scherung}} + F_{\text{Kompression}}$ nach Gl. 3.28 entlang des Kanals für die Klassen 3 – 5. <b>C)</b> Spannung $\sigma(x)$ nach Gl. 3.45, die aus der Kraft $F_{\text{Stenose}}$ in Abb. B folgt. <b>D)</b> Dehnung $\epsilon$ , vgl. Gl. 3.41 bzw. 4.5 entlang des Kanals. <b>E)</b> Sind $\sigma(x)$ und $\epsilon(x)$ aus Abb. C und D bekannt, lässt sich die Spannung $\sigma(\epsilon)$ als Funktion der Dehnung $\epsilon$ betrachten. Zusätzlich ist die Belastungsgeschwindigkeit in Falschfarbendarstellung aufgetragen. Die Steigung der linearen Fits ist der gesuchte Elastizitätsmodul $E$ . <b>F)</b> Das Ergebnis für $E$ wird gegen die Belastungsgeschwindigkeit bei $e = 0,75$ aufgetragen, vgl. Abb. 6.7. . . . .	106

# ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

6.7	Elastizitätsmodul aus den Spannungs-Dehnungs-Diagrammen für die Stenosendurchmesser $d = 3, 5 - 5 - 7 - 11 - 14, 5 \mu\text{m}$ bei Standardelongationslänge, und für Stenosendurchmesser $d = 5 \mu\text{m}$ bei Elongationslänge $e = e_{\text{Std}}; 2e_{\text{Std}}; 3e_{\text{Std}}$ , von Rosetten in Blutgruppe 0 ( <b>A-C</b> ) und Blutgruppe A ( <b>D-F</b> ) als Funktion der Belastungsgeschwindigkeit bei einer Dehnung von $\epsilon = 0, 75$ . Von links nach rechts: Klasse 3 (A und D), Klasse 4 (B und E) und Klasse 5 (C und F). <b>G</b> ) Elastizitätsmodul bei einer Belastungsgeschwindigkeit von $\dot{\sigma} = 100 \text{ Pa/ms}$ aus den Kurven in A-F. . . . .	108
6.8	<b>Oben:</b> Spannung als Funktion der Belastungsgeschwindigkeit für den Fall $\epsilon = 0, 75$ , <b>A</b> ) linear und <b>B</b> ) logarithmisch dargestellt mit Fit nach Gleichung 6.10. <b>Unten:</b> Bruchkräfte der Bindungen zwischen einem bakteriellen Oberflächenprotein und Antikörpern mit der Mikropipetten-Aspirationstechnik gemessen. Rekonstruiert aus [83], Kap. 8, Abb. 8.16. Median der Bruchkräfte als Funktion der Rate der Kraftsteigerung, <b>C</b> ) linear und <b>D</b> ) logarithmisch dargestellt mit Fit nach Gleichung 6.8. . . . .	110
6.9	Elastizitätsmodul aus den Spannungs-Dehnungs-Diagrammen Lektin-induzierter Aggregate für die Stenosendurchmesser $d = 7 \mu\text{m}$ und $d = 11 \mu\text{m}$ bei Standardelongationslänge als Funktion der Belastungsgeschwindigkeit bei einer Dehnung von $\epsilon = 0, 75$ . . . . .	111
A.1	Von PIVDAC exportierte Figures (1)-(6), jeweils mit Stelle im Skript und Dateiname. . . . .	124
B.1	Zu Beginn wird der Hintergrund berechnet, vgl. Skript B.2 Figure (1) ab Zeile 27. . . . .	127
B.2	Ein Konturplot erfasst die Konturen der Objekte, vgl. Skript B.2 Figure (2) ab Zeile 49. . . . .	128
B.3	Die erfassten Objekte werden als Textdatei exportiert, vgl. Skript B.2 ab Zeile 88. . . . .	128
B.4	Hier sind die erfassten Trajektorien gezeigt, vgl. Skript B.3 Figure (4) ab Zeile 205. . . . .	129
B.5	Hier sind die erfassten Trajektorien mit Startpunkt (weiß) und Endpunkt (rot) gezeigt. Die Zahlen (meist $\pm 1$ ) geben an, um wie viele Objekte sich die Anzahl der umgebenden Objekte verändert hat, falls sie sich verändert hat, vgl. Skript B.3 Figure (5) ab Zeile 285. . . . .	130
B.6	Hier ist die Geschwindigkeit auf allen erfassten Trajektorien gezeigt, vgl. Skript B.3 Figure (6) und (7) ab Zeile 341. . . . .	130
B.7	Hier ist die Fläche in Pixeln aller erfassten Objekte entlang ihrer Trajektorie gegen die x-Position aufgetragen, vgl. Skript B.3 Figure (8) ab Zeile 440. . . . .	130
B.8	Hier ist die auf die Anfangsfläche normierte Fläche in Pixeln aller erfassten Objekte entlang ihrer Trajektorie gegen die x-Position aufgetragen, vgl. Skript B.3 Figure (9) ab Zeile 460. . . . .	130
B.9	Hier sind die erfassten Trajektorien gezeigt und die Ereignisse markiert, vgl. Skript B.3 Figure (10) ab Zeile 549. Die Zahlen (meist $\pm 1$ ) geben an, um wie viele Objekte sich die Anzahl der umgebenden Objekte verändert hat, falls sich gleichzeitig die Fläche der verfolgten Rosette entsprechend stark verändert hat, und somit ein <i>rupture</i> (grün, +1) oder <i>connect</i> (gelb, -1) Ereignis vorliegt, das Ende der Trajektorie erhält eine pinke Zahl. . . . .	131
B.10	Hier ist die auf die absolute Flächenänderung in Pixeln aller erfassten Objekte entlang ihrer Trajektorie gegen die x-Position aufgetragen, vgl. Skript B.3 Figure (11) ab Zeile 579. . . . .	131
B.11	Für jede Trajektorie wird ein Plot erstellt und exportiert, hier Beispieltrajektorie Nummer 7 aus der Beispielmessung, vgl. Skript B.3 Figure (12) ab Zeile 673. Hier sind die Fläche in Pixeln und die relative Flächenänderung des Objekts, sowie die große und kleine Achse und die Exzentrizität der umgebenden Ellipse als Funktion der x-Position in Pixeln aufgetragen. Außerdem sind die vier möglichen Ereignisse aus Abb. 4.7 mit den Nummern 1 – 4 gekennzeichnet. . . . .	131
B.12	Hier sind alle erfassten Ereignisse entlang aller Trajektorien an der entsprechenden Position markiert, vgl. Skript B.3 Figure (13) ab Zeile 698. . . . .	132
B.13	Hier werden alle erfassten Ereignisse entlang aller Trajektorien an der entsprechenden Position pro Fläche zusammengefasst, die Größen der Symbole sind mit der Anzahl der dort registrierten Ereignisse skaliert, vgl. Skript B.3 Figure (14) ab Zeile 802. . . . .	132
B.14	Hier sind wie in Figure (14), Abb. B.13, alle erfassten Ereignisse entlang aller Trajektorien an der entsprechenden Position pro Fläche zusammengefasst, die Größen der Symbole sind mit der Anzahl der dort registrierten Ereignisse skaliert, vgl. Skript B.3 Figure (15) ab Zeile 1026. . . . .	133
B.15	Hier ist das Gitter aus Figure (14) und (15), Abb. B.13 und B.14, auf eine Dimension reduziert. Alle erfassten Ereignisse entlang aller Trajektorien sind an der entsprechenden Position pro x-Achsenabschnitt zusammengefasst, die Größe der Symbole skaliert mit der Anzahl der dort registrierten Ereignisse, vgl. Skript B.3 Figure (17) ab Zeile 1155. . . . .	133
B.16	Für jede Trajektorie wird eine Textdatei erstellt und exportiert, hier Beispieltrajektorie Nummer 7 aus der Beispielmessung, vgl. Skript B.3 ab Zeile 1279. . . . .	134
B.17	Hier ist nach Rosettengröße sortiert von klein, Klasse 1, oben, erste Zeile, nach groß, Klasse 6, unten, letzte Zeile, das Ende aller Trajektorien an der entsprechenden Position eingezeichnet, vgl. Skript B.4 Figure (1) ab Zeile 47. . . . .	147
B.18	Hier ist nach Rosettengröße sortiert von klein, Klasse 1, oben, erste Zeile, nach groß, Klasse 6, unten, letzte Zeile, die <i>real rupture</i> Ereignisse aller Trajektorien an der entsprechenden Position eingezeichnet, vgl. Skript B.4 Figure (2) ab Zeile 178. Die Größe der Symbole ist mit der verlorenen Fläche skaliert. . . . .	148
B.19	Anteil der unbeschädigten Rosetten nach Rosettengröße sortiert entlang des Kanals, vgl. Skript B.4 Figure (3) ab Zeile 206. . . . .	148
B.20	Häufigkeit der Ereignisse nach Rosettengröße sortiert von klein, Klasse 1, oben, erste Zeile, nach groß, Klasse 6, unten, letzte Zeile, aller Trajektorien an der entsprechenden x-Position, vgl. Skript B.4 Figure (4) ab Zeile 233. Die Größe der Symbole skaliert mit der relativen Häufigkeit. . . . .	149



# PIVDAC - Particle Image Velocimetry DeAdhesion Correlation

## A.1 PIVDAC\_Zoning\_28dBm.m

```
1 %% IMPORT PIV DATA
2 % import a text file and store variables
3 DI_target_file = 'E:\DANI\PIV28dBm.txt';
4 % import data from file
5 DI_meta_data = importdata(DI_target_file, '\t', 5);
6 % extract data to matrix format
7 DI_data_mat = DI_meta_data.data(:,1:8);
8 DI_x_ind_amount = max(DI_data_mat(:,1));
9 % reconstruction of data
10 DI_y_ind_amount = max(DI_data_mat(:,2));
11 DI_data_mat_size = size(DI_data_mat);
12 % preallocating RAM and variables
13 DI_data_cell = cell(DI_data_mat_size(2),1);
14 for DI_counter_01a = 1 : 1 : DI_data_mat_size(2)
15     DI_data_cell{DI_counter_01a,1} = zeros(DI_y_ind_amount, DI_x_ind_amount);
16 end
17
18 for DI_counter_01 = 1 : 1 : DI_data_mat_size(1) %going through every single line
19     DI_mat_ind = [DI_data_mat(DI_counter_01,1), DI_data_mat(DI_counter_01,2)]; % [ind_x, ind_y]
20     for DI_counter_02 = 1 : 1 : DI_data_mat_size(2)
21         DI_data_cell{DI_counter_02,1}(DI_mat_ind(2), DI_mat_ind(1)) = DI_data_mat(DI_counter_01,
22             DI_counter_02);
23     end
24 end
25 %% Results: reconstructed data
26 DI_data_cell{1,1}; % matrix with indices of x-position in matrix (1)
27 DI_data_cell{2,1}; % matrix with indices of y-position in matrix (1)
28 DI_data_cell{3,1}; % matrix of x-position in real space (m)
29 DI_data_cell{4,1}; % matrix of y-position in real space (m)
30 DI_data_cell{5,1}; % matrix of shear rate at each position (1/s)
31 DI_data_cell{6,1}; % matrix of x-velocity at each position (m/s)
32 DI_data_cell{7,1}; % matrix of y-velocity at each position (m/s)
33 DI_data_cell{8,1}; % matrix of z-velocity at each position (m/s)
34
35 figure(1); clf(1); %shear-map-raw.png
36 temp = DI_data_cell{5,1};
37 colormap(jet); pcolor(DI_data_cell{3,1}, DI_data_cell{4,1}, temp); colorbar;
38 title('shear rate to next layer');
39 xlabel('X-Direction (m)');
40 ylabel('Y-Direction (m)');
41 shading flat
42 print('-dpng', '-f1', '-r300', [folder 'shear-map-raw.png']);
43 drawnow;
44 fprintf(1, 'Raw data has been imported successfully. %s \n', '');
45
46 %% PIV DATA: Interpolation and zooming
47 %Cell Bild 3.48mm x 2.65mm, (0,0) linke OBERE Ecke
48 cells_rechtekanteIDTx_pixel=50;
49 cells_mitteIDTy_pixel=546;%muss mindestens 545 sein!!
50 cells_rechtekanteIDTx=cells_rechtekanteIDTx_pixel*0.00259; %Koordinate in Pixel aus ImageJ * 2.59mm pro
    Pixel fuer Einheit mm
51 cells_mitteIDTy=cells_mitteIDTy_pixel*0.00259;
52 %PIV Bild 2.68 x 2.39mm, (0,0) linke UNTERE Ecke
53 %piv_x=3.48-cells_rechtekanteIDTx;
54 piv_x=2.68;
55 piv_mitteIDTy=0.98;
56 piv_mitteIDTy_pixel=round(piv_mitteIDTy/0.00259);
57
58 %x0=piv_x-cells_rechtekanteIDTx;
59 %y0=piv_mitteIDTy-(2.65-cells_mitteIDTy);
60 pixel_x = round(piv_x/0.00259); %Spaltenanzahl Pixel
61 pixel_y = round(2.39/0.00259); %Zeilenanzahl Pixel
62 output_x_range = [0, piv_x]*1E-3;
63 output_y_range = [0, 2.39]*1E-3;
64 output_size = [pixel_x, pixel_y]; %% [1344,1024]
65
66 [output_x, output_y, output_z]=SCM_DB_interpolation_03(DI_data_cell{3,1}, DI_data_cell{4,1}, DI_data_cell
    {5,1}, output_x_range, output_y_range, output_size);
67
```

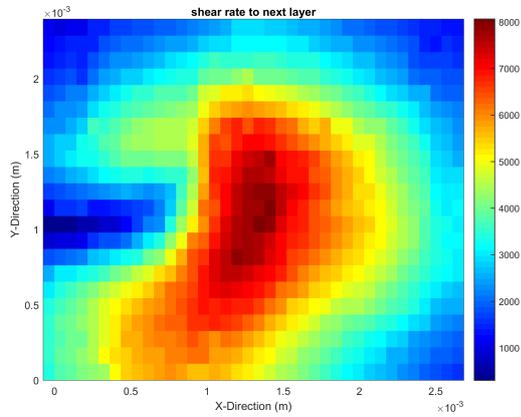


Figure (1), Zeile 35-44  
shear-map-raw.png

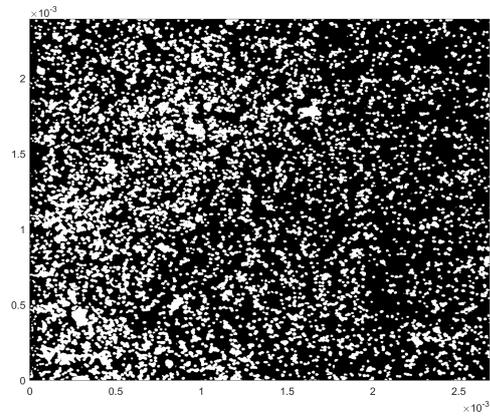


Figure (2), Zeile 92-96  
sample-of-cells-start.png

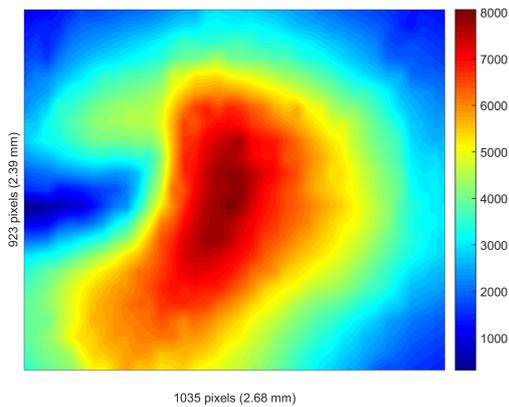


Figure (3), Zeile 98-108  
shear-map-cut-HQ.png

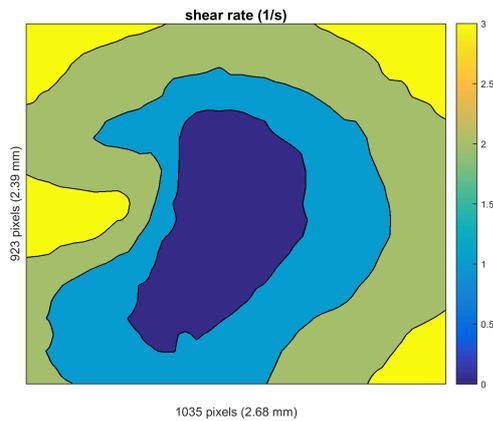


Figure (4), Zeile 166-176  
plain-shear-zones.png

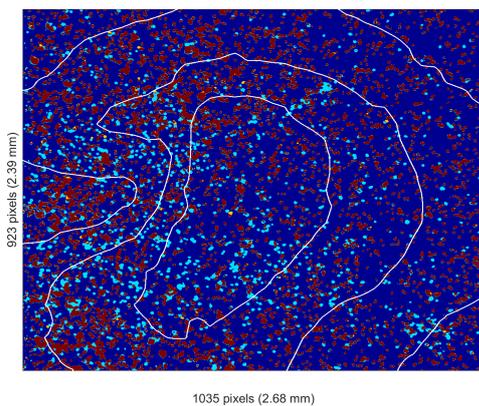


Figure (5), Zeile 180-192  
differential-adhesion-and-zones.png

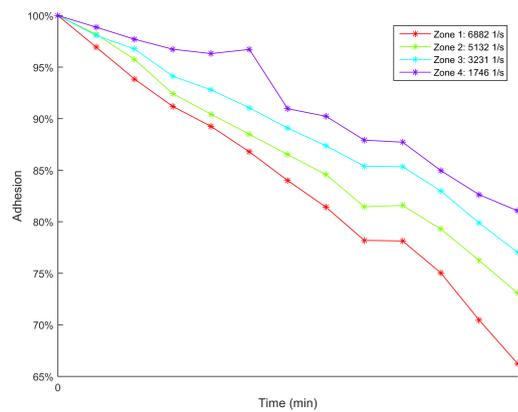


Figure (6), Zeile 215-227  
adhesion-vs-time.png

Abbildung A.1: Von PIVDAC exportierte Figures (1)-(6), jeweils mit Stelle im Skript und Dateiname.

```

68 %% IMPORT DEADHESION DATA
69 % Cell Stack aus DeAdhesion Messung einlesen (bereits konvertiert in Schwarz (0) und Weiss (255) in ImageJ
70 imagelist = dir ('E:\DANI\Auswertung SaOs-2\AuswertungSAOS-2BA\300.000\10.02.300K00*');
71 folder = 'E:\DANI\Auswertung SaOs-2\AuswertungSAOS-2BA\300.000\10.02.300K\';
72 pic_count = numel(imagelist); % Count, Anzahl Bilder im Ordner
73 DATA = cell(pic_count, 1); %Matrix Stack zum Abspeichern der Bilder
74 for i = 1:pic_count
75     image_file_str = [folder imagelist(i).name];
76     DATA{i,1}=imread( image_file_str );
77     DATA{i,1} = DATA{i,1}/255;
78     for x = 1:1:cells_rechtekanteIDTx_pixel
79         DATA{i,1}(:,1) = [];
80     end
81     for x = (1344-cells_rechtekanteIDTx_pixel):-1:(pixel_x+1)
82         DATA{i,1}(:,x) = [];
83     end
84     for y = 1:(cells_mitteIDTy_pixel-pixel_y+piv_mitteIDTy_pixel)
85         DATA{i,1}(1,:) = [];
86     end
87     for y = (1024-(cells_mitteIDTy_pixel-pixel_y+piv_mitteIDTy_pixel)):-1:(pixel_y+1)
88         DATA{i,1}(y,:) = [];
89     end
90 end
91
92 figure(2); clf(2); %sample-of-cells-start.png
93 colormap(gray);
94 pcolor(output_x, output_y, double(DATA{1,1}));
95 shading flat;
96 print('-dpng', '-f5', '-r300', [folder 'sample-of-cells-start.png']);
97
98 figure(3); clf(3); %shear-map-cut-HQ.png
99 colormap(jet);
100 pcolor(output_x, output_y, output_z); colorbar('location','Eastoutside','FontSize',12);
101 xlabel({' ','1035 pixels (2.68 mm)'),'FontSize',12);
102 ylabel('923 pixels (2.39 mm)','FontSize',12);
103 set(gca,'xtick',[])
104 set(gca,'xticklabel',[])
105 set(gca,'ytick',[])
106 set(gca,'yticklabel',[])
107 shading flat;
108 print('-dpng', '-f2', '-r300', [folder 'shear-map-cut-HQ.png']);
109
110 %%Zoning
111 zonen = 4; %ZONENANZAHL FUER LINEARE EINTEILUNG
112 z = output_z;
113 zmax = max(max(z));
114 zmin = min(min(z));
115 grenzen = 0:zonen;
116 for i = 0:zonen
117     grenze = i*(zmax-zmin)/zonen +zmin;
118     grenzen(i+1)=grenze;
119 end
120
121 zones = cell(zonen, 1);
122 shearzones = cell(zonen, 1);
123 einteilung = zeros (pixel_y, pixel_x);
124 pixelgesamt = 1:zonen;
125
126 % entries of zones for statistics
127 zone_entry_counter = zeros(1,zonen);
128 zone_entry_mat = zeros(pixel_x*pixel_y,zonen);
129
130 for j = 1:zonen
131     zone = zeros (pixel_y, pixel_x);
132     for a = 1:(pixel_y)
133         for b = 1:(pixel_x)
134             if (z(a,b) < grenzen(zonen-j+2))
135                 if (z(a,b) >= grenzen(zonen-j+1))
136                     zone(a,b)=1;
137                     einteilung(a,b)=j-1;
138                     zone_entry_counter(1,j) = zone_entry_counter(1,j)+1;
139                     zone_entry_mat(zone_entry_counter(1,j),j)=z(a,b);
140                 end
141             end
142         end
143     end
144     zones{j,1}=zone;
145     shearzones{j,1}=z.*zone;
146     pixelgesamt(j) = sum (zone (:));
147 end
148
149 zone_entry_mat = zone_entry_mat(1:max(zone_entry_counter),:);
150
151 % shear statistics of zones
152 zones_shear_stat = zeros(zonen, 3);
153 zones_shear_stat(:,1) = [1:1:zonen]';
154 for i = 1 : zonen
155     if zone_entry_counter(1,i) == 0
156         zone_entry_counter(1,i) = 1;
157     end
158     shear_entries = zone_entry_mat(1:zone_entry_counter(1,i),i);
159     zones_shear_stat(i,2) = sum(shear_entries)/zone_entry_counter(1,i);
160     [muhat,sigmahat] = normfit(shear_entries);
161     zones_shear_stat(i,3) = sigmahat;
162     clear muhat sigmahat
163 end
164
165 %PLOT ZONEN
166 figure(4); clf(4); %plain-shear-zones.png
167 title('shear rate (1/s)','FontSize',14);
168 colorbar;
169 xlabel({' ','1035 pixels (2.68 mm)'),'FontSize',12);
170 ylabel('923 pixels (2.39 mm)','FontSize',12);
171 set(gca,'xtick',[])
172 set(gca,'xticklabel',[])
173 set(gca,'ytick',[])
174 set(gca,'yticklabel',[])
175 shading flat;
176 print('-dpng', '-f3', '-r300', [folder 'plain-shear-zones.png']);
177
178 %Plot Unterschied mit Zonenlinien
179 mat = double(DATA{2,1}+2*DATA{13,1});
180 figure(5); clf(5); %differential-adhesion-and-zones.png
181 colormap(jet);
182 pcolor(output_x, output_y, mat);
183 shading flat;
184 hold on;
185 contour(output_x, output_y, einteilung, 'w');
186 xlabel({' ','1035 pixels (2.68 mm)'),'FontSize',12);
187 ylabel('923 pixels (2.39 mm)','FontSize',12);
188 set(gca,'xtick',[])

```

## A. PIVDAC - Particle Image Velocimetry DeAdhesion Correlation

```

189 set(gca,'xticklabel',[])
190 set(gca,'ytick',[])
191 set(gca,'yticklabel',[])
192 print('-dpng','-f6','-r300',[folder 'differential-adhesion-and-zones.png']);
193
194 % Weisse Pixel pro Zone
195 Zellen = zeros(pic_count, zonen); %Matrix fuer weisse Pixel pro Bild und Zone
196 for i = 1:pic_count
197     for j = 1:zonen
198         DATAzoned=double(DATA{i,1}).*(zones{j,1}); %Matrix mit Eintraegen fuer Zone j
199         Zellen(i,j)=sum( DATAzoned(:)); %Anzahl weisse Pixel in Zone j
200     end
201 end
202
203
204 %Plots Adhesion gegen Zeit
205 time = 5*60*(0:pic_count-1); %fuer 5 min zwischen den Bildern in sec
206 Adhesion = zeros(pic_count, zonen);
207 for i = 1:zonen
208     for j = 1:(pic_count)
209         normierung = max(Zellen(:,i));
210         Adhesion(j,i) = Zellen(j,i)/normierung;
211         %Anteil noch vorhandener Zellen bezogen auf erstes Bild
212     end
213 end
214
215 figure(6); clf(6); %adhesion-vs-time.png
216 col=hsv(zonen);
217 label = cell(1,zonen);
218 for i = 1:zonen
219     hold; plot(time/60, Adhesion(:,i), 'color',col(i,:), 'Marker','*'); hold;
220     label{1,i}=[ 'Zone ' int2str(i) ': ' num2str(zones_shear_stat(i,2), '%5.0f') ' 1/s'];
221 end
222 legend(label);
223 set(gca, 'YTickLabel', num2str(100.*get(gca, 'YTick')', '%g%%'));
224 set(gca, 'XTick', time);
225 xlabel('Time (min)', 'FontSize', 12);
226 ylabel('Adhesion', 'FontSize', 12);
227 print('-dpng','-f4','-r300',[folder 'adhesion-vs-time.png']);
228
229 %Exporting Data and Zones to *.txt-file
230
231 DE_tar_filename = 'analysis-export.txt';
232 DE_tar_filepath = [folder DE_tar_filename];
233 DE_export_mat = zeros(pic_count, zonen*5 + 2);
234 DE_export_mat(:,1) = [1:1:pic_count]'; % frames
235 DE_export_mat(:,2) = time'; % time in seconds
236
237 for i = 1 : zonen
238     % zonenumber of first zone
239     DE_export_mat(:,(i-1)*5+3) = i*ones(13,1);
240     % black pixel (no Cell is sitting here)
241     DE_export_mat(:,(i-1)*5+4) = pixelgesamt(i)*ones(pic_count,1) - Zellen(:,i);
242     % white pixel (cell is sitting here)
243     DE_export_mat(:,(i-1)*5+5) = Zellen(:,i);
244     % avg shear of first zone
245     DE_export_mat(:,(i-1)*5+6) = zones_shear_stat(i,2)*ones(pic_count,1);
246     % sigma shear of first zone
247     DE_export_mat(:,(i-1)*5+7) = zones_shear_stat(i,3)*ones(pic_count,1);
248 end
249
250
251 DE_formatting = '%4d\t %5.0f\t';
252 DE_header_str_01='Frame      Time      ';
253 DE_header_str_02='f (1)      t (s)      ';
254 DE_header_str_03='=====';
255
256 if zonen >=2
257     for i = 1:1:(zonen-1)
258         DE_formatting = [DE_formatting ' %2d\t %7.0f\t %7.0f\t %7.3f\t %7.3f\t'];
259         DE_header_str_01=[DE_header_str_01 'Zone      BlackPixel      WhitePixel      shearrate      sigmashear
260             '];
261         DE_header_str_02=[DE_header_str_02 '(1)      b (1)      w (1)      s (1/s)      (1/s)
262             '];
263         DE_header_str_03=[DE_header_str_03 '====='];
264     end
265     DE_formatting = [DE_formatting ' %2d\t %7.0f\t %7.0f\t %7.3f\t %7.3f\r\n'];
266     DE_header_str_01=[DE_header_str_01 'Zone      BlackPixel      WhitePixel      shearrate      sigmashear      '];
267     DE_header_str_02=[DE_header_str_02 '(1)      b (1)      w (1)      s (1/s)      (1/s)
268             '];
269     DE_header_str_03=[DE_header_str_03 '====='];
270
271 DE_tar_file_ID = fopen(DE_tar_filepath, 'w');
272 fprintf(DE_tar_file_ID, '%5s\r\n', DE_header_str_01);
273 fprintf(DE_tar_file_ID, '%5s\r\n', DE_header_str_02);
274 fprintf(DE_tar_file_ID, '%5s\r\n', DE_header_str_03);
275 fprintf(DE_tar_file_ID, DE_formatting, DE_export_mat');
276 fclose(DE_tar_file_ID);
277 fprintf(1, 'Data has been exported successfully. %s \n', '');
278 fprintf(1, 'Done.%s \r', '');

```

analysis-export.txt

Frame	Time sec	Zone	BlackPixel	WhitePixel	shearrate 1/sec	sigmashear 1/sec	Zone	...
1	0	1	122775	42046	6882.090	504.899	2	...
2	300	1	124064	40757	6882.090	504.899	2	...
3	600	1	125365	39456	6882.090	504.899	2	...
4	900	1	126482	38339	6882.090	504.899	2	...
5	1200	1	127296	37525	6882.090	504.899	2	...
6	1500	1	128332	36489	6882.090	504.899	2	...
7	1800	1	129503	35318	6882.090	504.899	2	...
8	2100	1	130589	34232	6882.090	504.899	2	...
9	2400	1	131944	32877	6882.090	504.899	2	...
10	2700	1	131966	32855	6882.090	504.899	2	...
11	3000	1	133273	31548	6882.090	504.899	2	...
12	3300	1	135194	29627	6882.090	504.899	2	...
13	3600	1	136963	27858	6882.090	504.899	2	...

# B

## SURF - SURvival of Rosettes in Flow

Der MATLAB Code ist verfügbar unter <https://github.com/anna-joe-0305/SURF>.

### B.1 SURF\_main.m

```
1 directory = 'E:\Stockholm March 2019\BGA\';
2 folders = [ 'BGA 7mm Standard 25mulh_20190318_152513\';
3 'BGA 5mm Standard 25mulh_20190319_133319\';
4 ...
5 'BGA 5mm 3EL 25mulh_20190319_150141\'];
6 video_filenames = [ 'BGA 7mm Standard 25mulh_20190318_152513.avi';
7 'BGA 5mm Standard 25mulh_20190319_133319.avi';
8 ...
9 'BGA 5mm 3EL 25mulh_20190319_150141.avi'];
10
11 for i = 1:size(folders,1)
12 folder =directory + folders(i);
13 folder = char(folder);
14 video_filename = directory + folders(i) + video_filenames(i);
15 video_filename = char(video_filename);
16 t = datetime('now');
17 disp(['## Start Videofile ' num2str(i) ': ' datestr(t)]);
18 disp ([ video_filename ]);
19
20 video_read_successful = SURF_video_reader(folder , video_filename);
21 if(video_read_successful)
22 t = datetime('now');
23 disp(['Videoread successful ' datestr(t)]);
24 end
25 text_read_successful = SURF_textfile_reader(folder , video_filename);
26 if(text_read_successful)
27 t = datetime('now');
28 disp(['Textfileread successful ' datestr(t)]);
29 end
30 close all
31 end
```

### B.2 SURF\_video\_reader.m

```
1 function rosette_tracker_part_1 = SURF_video_reader(folder , video_filename)
2 rosette_tracker_part_1 = 0;
3 Videostored = VideoReader(video_filename );
4 video_filename = Videostored.Name;
5 image_height = Videostored.Height;
6 image_width = Videostored.Width;
7 image_count = Videostored.NumberOfFrames;
8 ImageArray = cell(image_count , 1);
9 for i=1:image_count
10 img_i = read(Videostored,i);
11 ImageArray{i} = img_i;
12 end
13 %%calculate background
14 filecount = 1000; %bei ca. 100.000 frames
15 bg = zeros(image_height , image_width);
16 vals = zeros(1,filecount);
17 for a=1:image_width
18 for b=1:image_height
19 for i=1:filecount
```

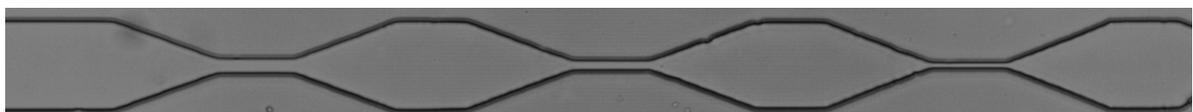


Abbildung B.1: Zu Beginn wird der Hintergrund berechnet, vgl. Skript B.2 Figure (1) ab Zeile 27.

## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow

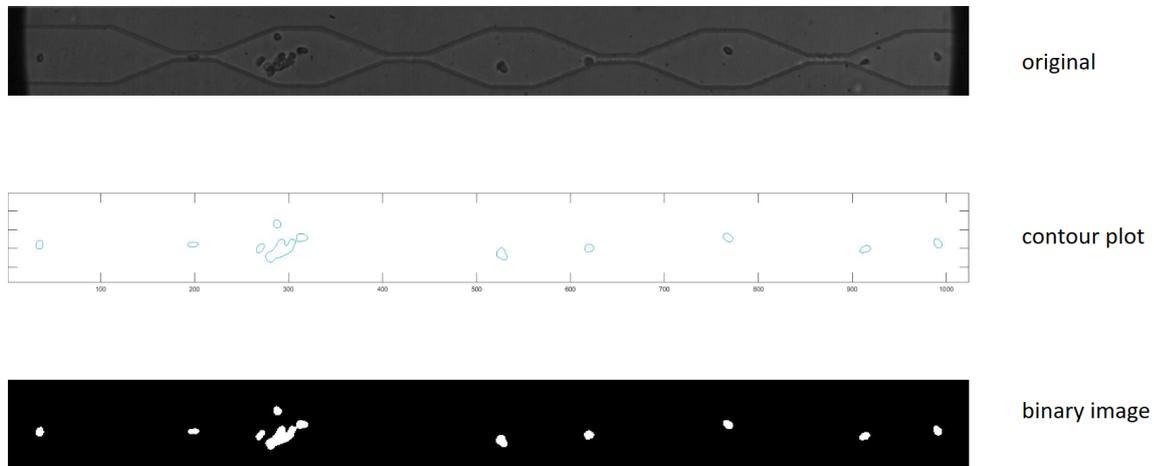


Abbildung B.2: Ein Konturplot erfasst die Konturen der Objekte, vgl. Skript B.2 Figure (2) ab Zeile 49.

SURF\_object\_locations - Editor  
Datei Bearbeiten Format Ansicht Hilfe

```

=====
results SURF  \I:\Stockholm Sept Okt 2018\BGA\20180928 BGA Kanal 4 cascade 10 first three stenoses\BGA 25 mulhr_20180928_155155\BGA 25 mulhr_20180928_155155.avi
=====
#frame #object x Pos (pixel)  y Pos (pixel)  Area      MajorAxisLength MinorAxisLength Eccentricity  Orientation
=====
1      1      17      89      216      20.6002      13.4592      0.75705      34.3026
1      2      52      51      222      17.6332      16.247      0.38865      86.1993
1      3      779     66      212      19.4916      14.0523      0.69299      61.5089
1      4      799     75      228      25.6857      11.6331      0.89156      54.2129
1      5      886     47      201      18.4961      14.2823      0.63541      -71.5301
2      1      22      89      219      20.9432      13.4232      0.7676      31.8978
2      2      58      51      222      17.7113      16.1857      0.40603      86.1193
2      3      788     66      213      19.38      14.1618      0.68265      62.4629
2      4      806     76      226      25.5335      11.5796      0.89125      55.9508
2      5      894     48      208      18.7276      14.5523      0.62943      -78.1575
3      1      28      89      220      20.9879      13.4566      0.76741      33.4513
3      2      64      51      223      17.6706      16.299      0.38629      -77.1965
3      3      796     66      214      19.4497      14.2731      0.67932      64.8112
3      4      814     76      229      25.4736      11.695      0.88838      57.6465
3      5      902     48      206      19.1248      14.162      0.67205      -73.5669
4      1      33      89      218      20.7544      13.4804      0.76034      32.7018
4      2      70      51      224      17.6695      16.3565      0.37828      -80.7045
4      3      804     66      209      19.3039      14.0234      0.68721      67.932
4      4      821     77      228      25.174      11.8108      0.88311      57.3019
4      5      911     50      208      18.5867      14.6374      0.61629      -66.217
5      1      39      89      222      20.9013      13.6248      0.75834      32.7405
...
74531 1      22      67      199      17.3678      14.6594      0.53625      61.0895
74531 2      44      33      207      16.8414      15.7876      0.34817      -22.2545
74531 3      84      97      188      17.2498      13.9594      0.58746      14.2266
74531 4      85      38      211      17.8249      15.1744      0.52467      -49.5882
74531 5      218     57      149      17.881      11.0991      0.78403      -14.4302
74531 6      479     93      165      16.0602      13.1914      0.5704      -0.84516
=====

```

Abbildung B.3: Die erfassten Objekte werden als Textdatei exportiert, vgl. Skript B.2 ab Zeile 88.

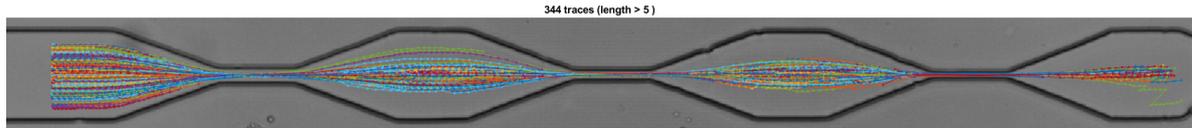


Abbildung B.4: Hier sind die erfassten Trajektorien gezeigt, vgl. Skript B.3 Figure (4) ab Zeile 205.

```

20         vals(i) = ImageArray{i}(b,a);
21     end
22     tmp = sort(vals);
23     bg(b,a) = int8(tmp(int8(filecount/2)));
24 end
25 end
26
27 figure(1)
28 imshow(uint8(bg));
29 outputname = [folder 'BG.png'];
30 imwrite(uint8(bg), outputname);
31 black_bg = zeros(image_height, image_width);
32
33 %% find object locations
34 object_locations = cell(image_count, 1);
35 for n=1:image_count
36     img = round(255*im2double(ImageArray {n}));
37     img_subtr_med = ((img) - (bg)); %subtract background
38     img_rescaled=uint8(abs(img_subtr_med));
39     img_smooth = imguifilter(img_rescaled);
40     ImageArray {n} = img_smooth;
41 end
42
43 %% find tresh value for contour plot
44 tresh_value = 0;
45 for k = 1:10
46     figure(2)
47     [C, h] = imcontour(ImageArray {k}, 1);
48     [x,y,z] = C2xyz(C);
49     tresh_value = tresh_value+z(1);
50 end
51 tresh_value =0.75* tresh_value/10;
52 %% use contour plot to draw binary images and find objects
53 for n = 1:image_count
54     img_bw = black_bg;
55     C = contourc(double(ImageArray {n}), [tresh_value tresh_value]);
56     if ~isempty(C)
57         [x,y,-] = C2xyz(C);
58         for a = 1:size(x,2) %number of contours on image
59             for b = 1:size(x{a},2) %length of contour
60                 img_bw(round(y{a}(b)), round(x{a}(b))) = 255;
61             end
62         end
63     end
64     img_clear = imclearborder(img_bw);
65     img_filled = imfill(img_clear, 'holes');
66     img_removed = bwareaopen(img_filled, 20); %Remove objects containing fewer than 20 pixels using
67         %bwareaopen function.
68     ImageArray {n} = img_removed;
69     s = regionprops(img_removed, 'Area', 'Centroid', 'MajorAxisLength', 'MinorAxisLength', 'Eccentricity',
70         'Orientation');
71     anzahl_objekte_bildi = size(s);
72     for j=1:anzahl_objekte_bildi(1)
73         object_locations{n}(j,1)= n;%Frame
74         object_locations{n}(j,2)= j;%Objektnummer
75         object_locations{n}(j,3)=round(s(j).Centroid(1));%x coordinate
76         object_locations{n}(j,4)=round(s(j).Centroid(2));%y coordinate
77         object_locations{n}(j,5)=s(j).Area;%area in pixels
78         object_locations{n}(j,6)=s(j).MajorAxisLength; %surrounding ellipse
79         object_locations{n}(j,7)=s(j).MinorAxisLength;
80         object_locations{n}(j,8)=s(j).Eccentricity;
81         object_locations{n}(j,9)=s(j).Orientation;
82     end
83 end
84 %% text file object locations
85 ObjectLocationsFileName = [folder 'SURF_object_locations.txt'];
86 fid = fopen(ObjectLocationsFileName, 'w');
87 if fid ~= -1
88     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====' );
89     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'results rosette tracker', folder, video_filename);
90     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====' );
91     fprintf(fid, '%s\t%s\t%s\t%s\t%s\t%s\t%s\t%s\r\n', '#frame', '#object', 'x Pos (pixel)', 'y Pos (pixel)',
92         'Area', 'MajorAxisLength', 'MinorAxisLength', 'Eccentricity', 'Orientation');
93     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====' );
94     for n = 1:image_count
95         for k = 1:(size(object_locations{n}, 1))
96             fprintf(fid, '%s\t%s\t%s\t%s\t%s\t%s\t%s\t%s\t%s\t%s\t%s\r\n', num2str(object_locations{n}(k
97                 ,1)), num2str(object_locations{n}(k,2)), num2str(object_locations{n}(k,3)), num2str(
98                 object_locations{n}(k,4)), num2str(object_locations{n}(k,5)), num2str(object_locations{n}(k
99                 ,6)), num2str(object_locations{n}(k,7)), num2str(object_locations{n}(k,8)), num2str(
100                 object_locations{n}(k,9)));
101         end
102     end
103 end
104 fclose(fid);
105 rosette_tracker_part_1 = 1;

```

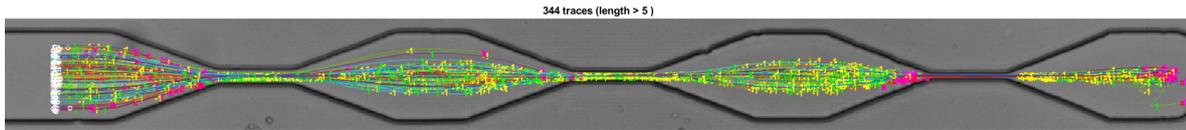
## B.3 SURF\_textfile\_reader.m

```

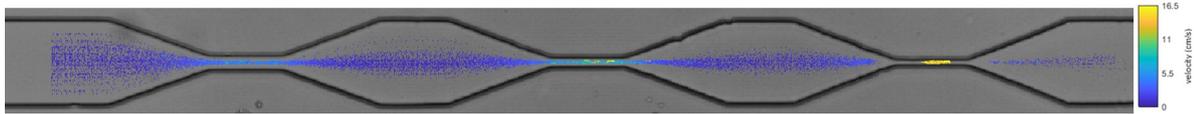
1 function rosette_tracker_part_2 = SURF_textfile_reader(folder, video_filename)
2 rosette_tracker_part_2 = 0;
3 %%read txtfile object locations
4 file_objectlocations = sprintf('%sSURF_object_locations.txt', folder);
5 objectlocations_complete = dlmread(file_objectlocations, ',', 5, 0);
6 nr_of_frames = objectlocations_complete(end,1); %number of current trace
7 object_locations = cell(nr_of_frames, 1);
8 for k = 1:nr_of_frames
9     indexlist_k = find(objectlocations_complete(:,1)==k);
10    if ~isempty(indexlist_k)

```

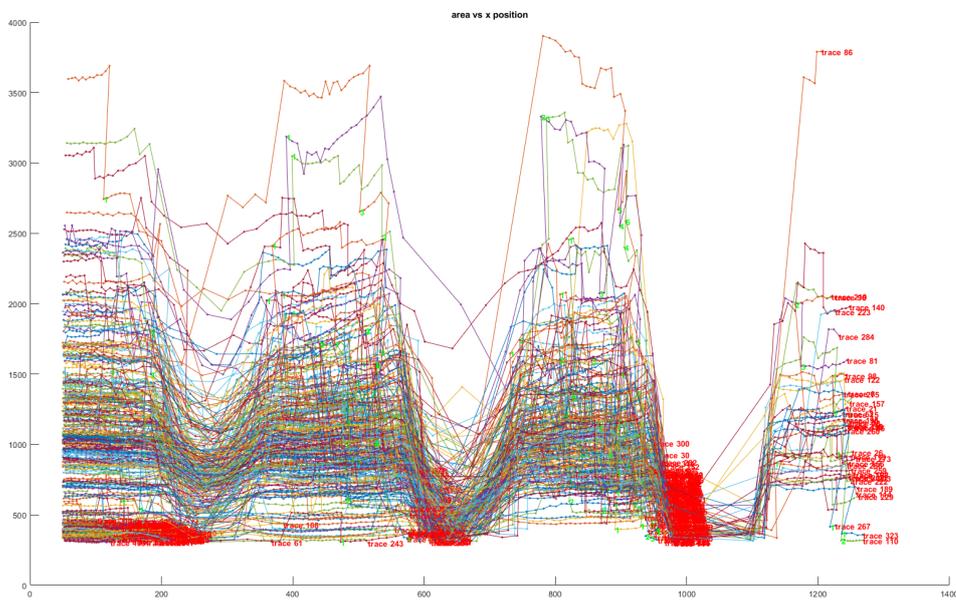
## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow



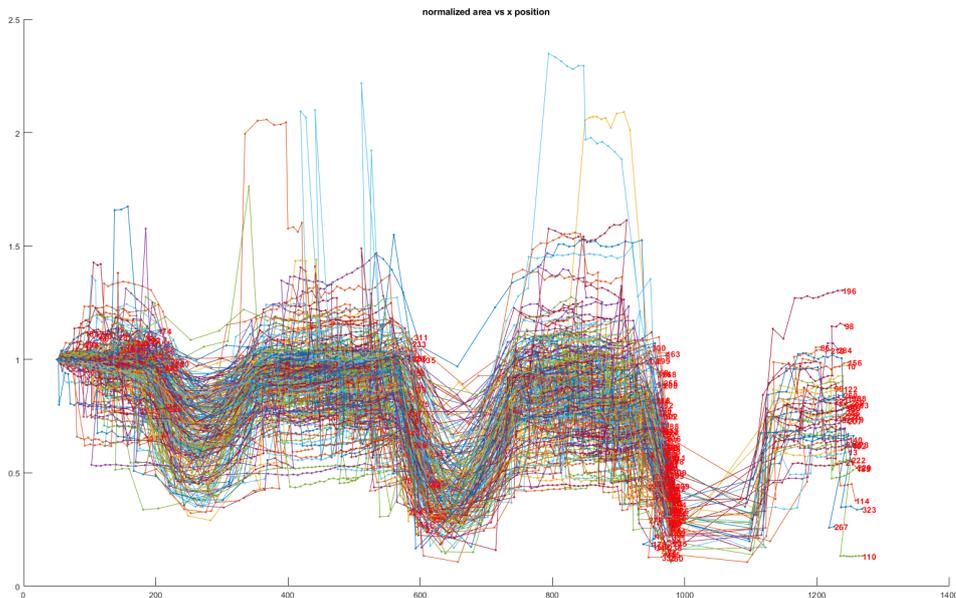
**Abbildung B.5:** Hier sind die erfassten Trajektorien mit Startpunkt (weiß) und Endpunkt (rot) gezeigt. Die Zahlen (meist  $\pm 1$ ) geben an, um wie viele Objekte sich die Anzahl der umgebenden Objekte verändert hat, falls sie sich verändert hat, vgl. Skript B.3 Figure (5) ab Zeile 285.



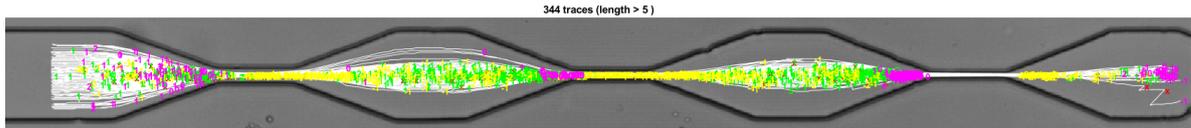
**Abbildung B.6:** Hier ist die Geschwindigkeit auf allen erfassten Trajektorien gezeigt, vgl. Skript B.3 Figure (6) und (7) ab Zeile 341.



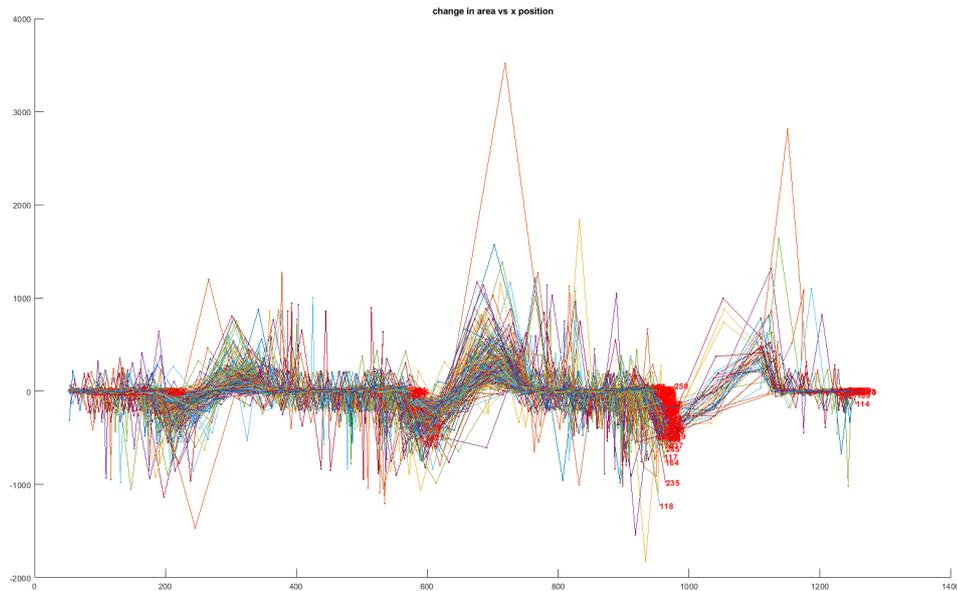
**Abbildung B.7:** Hier ist die Fläche in Pixeln aller erfassten Objekte entlang ihrer Trajektorie gegen die x-Position aufgetragen, vgl. Skript B.3 Figure (8) ab Zeile 440.



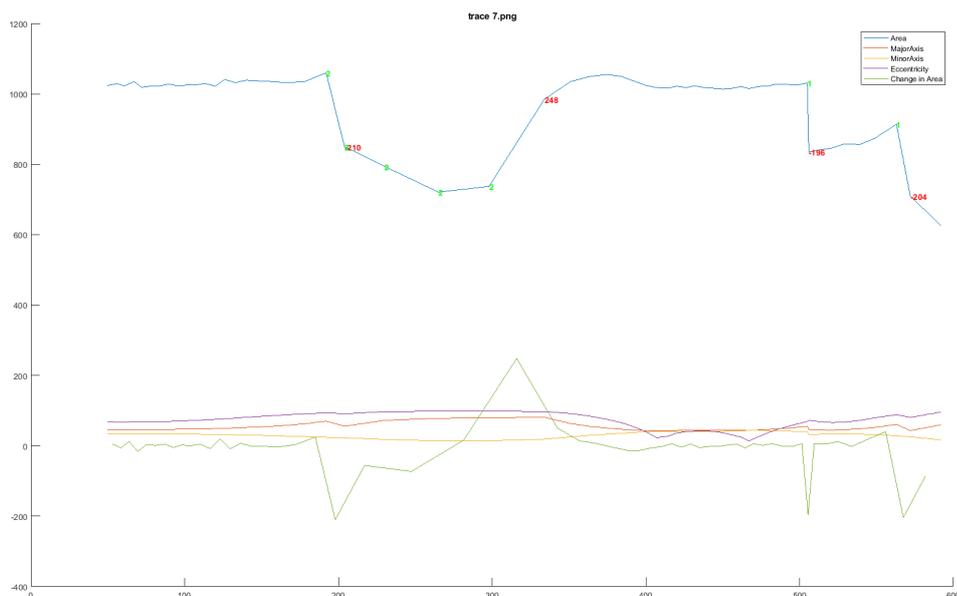
**Abbildung B.8:** Hier ist die auf die Anfangsfläche normierte Fläche in Pixeln aller erfassten Objekte entlang ihrer Trajektorie gegen die x-Position aufgetragen, vgl. Skript B.3 Figure (9) ab Zeile 460.



**Abbildung B.9:** Hier sind die erfassten Trajektorien gezeigt und die Ereignisse markiert, vgl. Skript B.3 Figure (10) ab Zeile 549. Die Zahlen (meist  $\pm 1$ ) geben an, um wie viele Objekte sich die Anzahl der umgebenden Objekte verändert hat, falls sich gleichzeitig die Fläche der verfolgten Rosette entsprechend stark verändert hat, und somit ein *rupture* (grün, +1) oder *connect* (gelb, -1) Ereignis vorliegt, das Ende der Trajektorie erhält eine pinke Zahl.



**Abbildung B.10:** Hier ist die auf die absolute Flächenänderung in Pixeln aller erfassten Objekte entlang ihrer Trajektorie gegen die x-Position aufgetragen, vgl. Skript B.3 Figure (11) ab Zeile 579.



**Abbildung B.11:** Für jede Trajektorie wird ein Plot erstellt und exportiert, hier Beispieltrajektorie Nummer 7 aus der Beispielmessung, vgl. Skript B.3 Figure (12) ab Zeile 673. Hier sind die Fläche in Pixeln und die relative Flächenänderung des Objekts, sowie die große und kleine Achse und die Exzentrizität der umgebenden Ellipse als Funktion der x-Position in Pixeln aufgetragen. Außerdem sind die vier möglichen Ereignisse aus Abb. 4.7 mit den Nummern 1 – 4 gekennzeichnet.

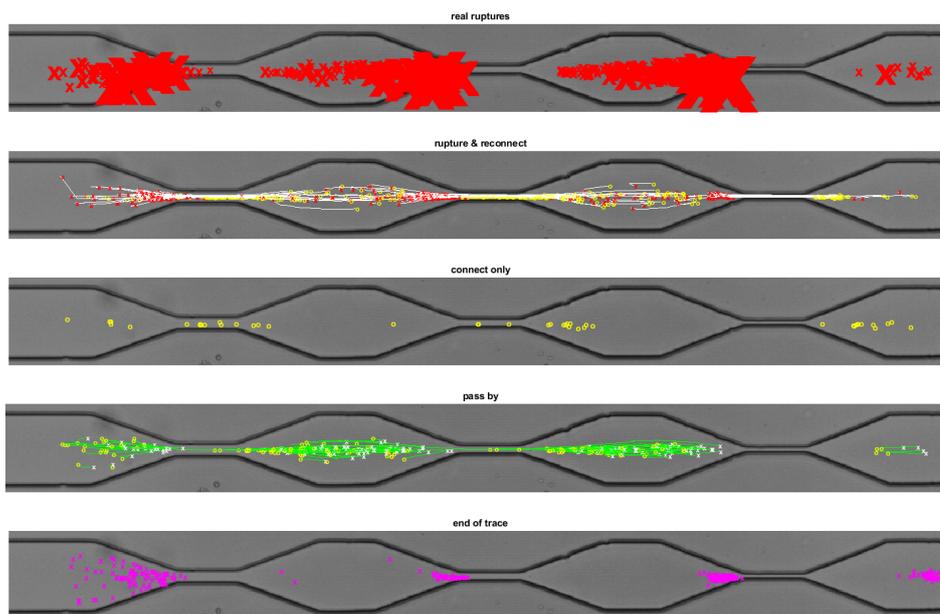


Abbildung B.12: Hier sind alle erfassten Ereignisse entlang aller Trajektorien an der entsprechenden Position markiert, vgl. Skript B.3 Figure (13) ab Zeile 698.

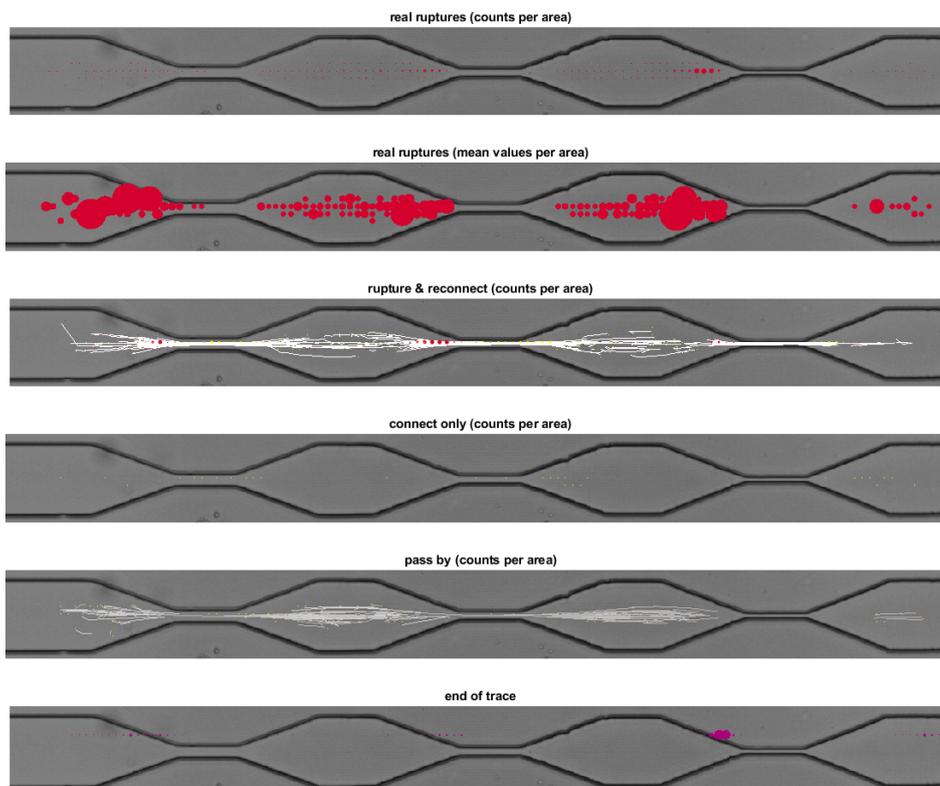
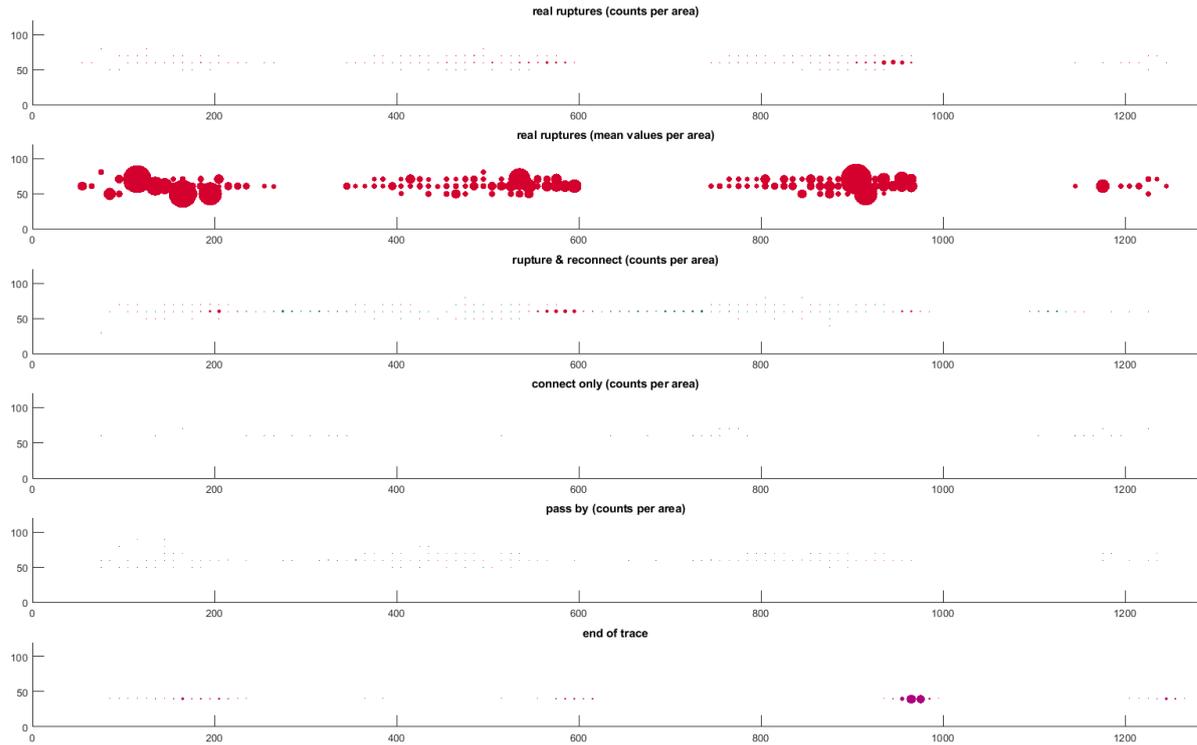


Abbildung B.13: Hier werden alle erfassten Ereignisse entlang aller Trajektorien an der entsprechenden Position pro Fläche zusammengefasst, die Größen der Symbole sind mit der Anzahl der dort registrierten Ereignisse skaliert, vgl. Skript B.3 Figure (14) ab Zeile 802.



**Abbildung B.14:** Hier sind wie in Figure (14), Abb. B.13, alle erfassten Ereignisse entlang aller Trajektorien an der entsprechenden Position pro Fläche zusammengefasst, die Größen der Symbole sind mit der Anzahl der dort registrierten Ereignisse skaliert, vgl. Skript B.3 Figure (15) ab Zeile 1026.



**Abbildung B.15:** Hier ist das Gitter aus Figure (14) und (15), Abb. B.13 und B.14, auf eine Dimension reduziert. Alle erfassten Ereignisse entlang aller Trajektorien sind an der entsprechenden Position pro x-Achsenabschnitt zusammengefasst, die Größe der Symbole skaliert mit der Anzahl der dort registrierten Ereignisse, vgl. Skript B.3 Figure (17) ab Zeile 1155.

## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow

SURF\_trace 7 - Editor

Datei Bearbeiten Format Ansicht Hilfe

results SURF \I:\Stockholm Sept Okt 2018\BGA\20180928 BGA Kanal 4 cascade 10 first three stenoses\BGA 25 mulhr\_20180928\_155155\BGA 25 mulhr\_20180928\_155155.avi

total traces: 344

flow rate (µl/h): 12.3611

#trace	#frame	x Pos (pixel)	y Pos (pixel)	Area	MajorAxis	MinorAxis	Eccentricity	dArea	dx	#sur objects	#sur objects fr+1	diff #objects	event	cat event
7	1209	50	66	1024	46.3438	33.8287	0.6035	5	6	1	1	0	0	0
7	1210	56	66	1029	46.2236	34.0605	0.67604	-6	5	1	1	0	0	0
7	1211	61	66	1023	46.0983	33.92	0.67718	12	6	1	1	0	0	0
7	1212	67	66	1035	46.4285	34.0039	0.68088	-16	5	1	1	0	0	0
7	1213	72	65	1019	46.2234	33.7719	0.68278	3	6	1	1	0	0	0
7	1214	78	65	1022	46.4069	33.7367	0.68666	1	6	1	1	0	0	0
...														
7	1227	166	64	1032	57.9925	27.4813	0.88059	3	12	1	1	0	0	0
7	1228	178	63	1035	62.3799	26.0514	0.90862	25	14	1	1	0	0	0
7	1229	192	63	1060	70.1463	24.153	0.93085	-210	12	1	2	1	-210	2
7	1230	204	62	850	55.6032	22.7241	0.91268	-56	26	2	2	0	0	2
7	1231	230	63	794	72.1863	18.153	0.96786	-73	35	2	2	0	0	2
7	1232	265	62	721	78.0986	13.8073	0.98425	16	33	2	2	0	0	2
7	1233	298	62	737	79.4088	14.2094	0.98306	248	36	2	1	-1	248	2
7	1234	334	63	985	81.0387	18.9475	0.97228	50	17	1	1	0	0	0
7	1235	351	63	1035	63.2891	25.11	0.91793	14	12	1	1	0	0	0
...														
7	1255	492	64	1027	49.9329	41.9374	0.54278	-2	6	1	1	0	0	0
7	1256	498	64	1025	52.355	41.1776	0.61758	6	7	1	1	0	0	0
7	1257	505	64	1031	55.8432	40.3154	0.69196	-196	1	1	2	1	-196	1
7	1258	506	63	835	46.1552	32.0126	0.72037	6	7	2	2	0	0	0
7	1259	513	63	841	45.3395	32.9115	0.68781	5	8	2	2	0	0	0
7	1260	521	63	846	44.8935	33.7792	0.65867	12	8	2	2	0	0	0
7	1261	529	63	858	45.9798	34.0938	0.67096	-2	10	2	2	0	0	0
7	1262	539	63	856	47.9835	33.3131	0.71972	18	10	2	1	-1	0	0
7	1263	549	63	874	52.1517	31.689	0.79431	40	14	1	1	0	0	0
7	1264	563	63	914	60.8725	28.4176	0.88434	-204	9	1	2	1	-204	1
7	1265	572	63	710	43.0346	25.5016	0.80551	-85	20	2	2	0	0	0
7	1266	592	63	625										

Abbildung B.16: Für jede Trajektorie wird eine Textdatei erstellt und exportiert, hier Beispieltrajektorie Nummer 7 aus der Beispielmessung, vgl. Skript B.3 ab Zeile 1279.

```

11         object_locations{k}=objectlocations_complete(indexlist_k(1):indexlist_k(end),1:end);
12     end
13     if isempty(indexlist_k)
14         object_locations{k}=0*objectlocations_complete(1,1:end);
15     end
16 end
17 %%read background image
18 background_filename = sprintf('%sBG.png', folder);
19 bg = imread(background_filename);
20 image_height = size(bg, 1);
21 image_width = size(bg, 2);
22 %%adjust for correct calculation of flow rate
23 dt = 0.0005; %delay between frames (s)
24 canal_depth = 8*10^-6;
25 meter_per_pixel = 0.55*10^-6; %Photron 20x: 90Px = 50µm
26 canal_crosssection = 90*meter_per_pixel*canal_depth;
27
28 %% reduce to large objects (rosettes = >1.5* median_object_area) and define input_delay_x
29 rosette_locations = cell(nr_of_frames, 1);
30 input_delay_x=50;
31 medians_object_area = zeros(nr_of_frames,1);
32 for n=1:nr_of_frames
33     medians_object_area (n) = median(object_locations{n}(:,5));
34 end
35 median_object_area = median (medians_object_area);
36 for n = 1:nr_of_frames
37     rosette_locations{n}(:,1)=object_locations{n}(:,3);
38     rosette_locations{n}(:,2)=object_locations{n}(:,4);
39     rosette_locations{n}(:,3)=object_locations{n}(:,5);
40     rosette_locations{n}(:,4)=object_locations{n}(:,1);
41     objects_before = size (object_locations{n},1);
42     for j=objects_before:-1:1
43         if object_locations{n}(j,5) <= 1.5* median_object_area || object_locations{n}(j,3) < input_delay_x
44             rosette_locations{n}(j,:) = [];
45         end
46     end
47 end
48 end
49
50 %% TRACING
51 traces = cell(nr_of_frames, 1);
52 bridges = cell(nr_of_frames, 1);
53 %target area in flow direction
54 target_dy = 45;
55 target_delay_x = 0; %minimum displacement in x (good for large displacements per frame)
56 max_distance =150; %maximum displacement in x (good for small displacements per frame)
57
58 for rosette_n = 1:(nr_of_frames-10)
59     frame_n = rosette_n;
60     if ~isempty(rosette_locations{frame_n}) %find first object
61         if rosette_locations{frame_n}(1,1) < 1.5*input_delay_x %start of trace always between input_delay_x
62             and 1.5*input_delay_x
63             traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n+1,:) = rosette_locations{frame_n}(1,:); %set first
64                 coordinates
65             else
66                 continue
67             end
68         else
69             continue
70         end
71     if rosette_n > 1
72         %ignore trace if same as previous trace
73         if ~isempty(traces{rosette_n-1})
74             if size(traces{rosette_n-1},1) ==1
75                 continue
76             end
77             if traces{rosette_n}(1,1)==traces{rosette_n-1}(2,1) && traces{rosette_n}(1,2)==traces{rosette_n-1}(2,2)
78                 continue
79             end
80         end
81     while 1
82         if isempty(rosette_locations{frame_n+1}) %break if no rosettes in following frame
83             break
84         end
85         max_x_coord_next_frame_index = size (rosette_locations{frame_n+1},1);
86         max_x_coord_next_frame = rosette_locations{frame_n+1}(max_x_coord_next_frame_index,1);
87         if max_x_coord_next_frame > traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n+1,1)- 2*max_distance %find rosettes
88             in target region
89             rosettes_downstream = rosette_locations{frame_n+1};
90             rosettes_left_downstream = rosette_locations{frame_n+1};

```

```

89 %delete rosettes to the left
90 for k = size(rosettes_downstream,1):-1:1
91 %reduce to rosettes strict downstream
92 if rosettes_downstream(k,1) < (traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n+1,1)+target_delay_x) || (
    rosettes_downstream(k,1) > traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n+1,1) + max_distance)
93     rosettes_downstream(k,:) = [];
94 end
95 end
96 for k = size(rosettes_left_downstream,1):-1:1
97 %reduce to rosettes 2*sqrt(traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n+1,3)/pi()) upstream
98 if (rosettes_left_downstream(k,1) < (traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n+1,1)+target_delay_x
    - 2*sqrt(traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n+1,3)/pi())) || (rosettes_left_downstream
    (k,1) > (traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n+1,1)+target_delay_x ))
99     rosettes_left_downstream(k,:) = [];
100 end
101 end
102 for k = size(rosettes_downstream,1):-1:1
103 if abs(rosettes_downstream(k,2)-traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n+1,2)) > target_dy
104     rosettes_downstream(k,:) = [];
105 end
106 end
107 for k = size(rosettes_left_downstream,1):-1:1
108 if abs(rosettes_left_downstream(k,2)-traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n+1,2)) > target_dy
109     rosettes_left_downstream(k,:) = [];
110 end
111 end
112 distances_downstream = zeros(size(rosettes_downstream,1),1);
113 for i = 1:size(rosettes_downstream,1)
114     distances_downstream(i) = (rosettes_downstream(i,1) - traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n
115     +1,1))^2+(rosettes_downstream(i,2) - traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n+1,2))^2;
116 end
117 [Min_value_downstream, Min_index_downstream] = sort(distances_downstream(distances_downstream>0)
    );
118
119 distances_left_downstream = zeros(size(rosettes_left_downstream,1),1);
120 for i = 1:size(rosettes_left_downstream,1)
121     distances_left_downstream(i) = (rosettes_left_downstream(i,1) - traces{rosette_n}(frame_n-
122     rosette_n+1,1))^2+(rosettes_left_downstream(i,2) - traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n
123     +1,2))^2;
124 end
125 [Min_value_left_downstream, Min_index_left_downstream] = sort(distances_left_downstream);
126
127 areas_left_downstream = zeros(size(rosettes_left_downstream,1),1); %absolute difference of area
128 for i = 1:size(rosettes_left_downstream,1)
129     areas_left_downstream(i) = abs(rosettes_left_downstream(i,3) - traces{rosette_n}(frame_n-
130     rosette_n+1,3))/traces{rosette_n}(frame_n-rosette_n+1,3);
131 end
132 [Min_value_areas, Min_index_areas] = sort(areas_left_downstream);
133 %Min_value too far down stream ?
134 if ~isempty(Min_value_downstream)
135     if Min_value_downstream(1) > max_distance^2
136         %do not lose rosette to the left at end of trace
137         if ~isempty(Min_value_left_downstream)
138             if Min_value_left_downstream > max_distance^2
139                 break
140             end
141         end
142         if ~isempty(Min_index_left_downstream)
143             traces{rosette_n}(frame_n+1-rosette_n+1,:) = rosettes_left_downstream((
144             Min_index_left_downstream(1),:));
145             bridge_n = size(bridges{rosette_n},1)+1;
146             bridges{rosette_n}(bridge_n,:) = rosettes_left_downstream((Min_index_left_downstream
147             (1),:));
148         end
149         if isempty(Min_index_left_downstream)
150             break
151         end
152     end
153 end
154 %matching rosette found >> add to trace:
155 if ~isempty(Min_index_downstream)
156     traces{rosette_n}(frame_n+1-rosette_n+1,:) = rosettes_downstream((Min_index_downstream(1)
157     ,:));
158 end
159 %change in area too big? find bulk rosette instead of offspring
160 %smallest area difference)
161 if ~isempty(Min_value_downstream) && ~isempty(Min_value_left_downstream)
162     if abs(traces{rosette_n}(frame_n+1-rosette_n,3) - rosettes_downstream((Min_index_downstream
163     (1),3)) / traces{rosette_n}(frame_n+1-rosette_n,3)) > 0.5 && Min_value_areas(1) < 0.5
164     traces{rosette_n}(frame_n+1-rosette_n+1,:) = rosettes_left_downstream((Min_index_areas
165     (1),:));
166     bridge_n = size(bridges{rosette_n},1)+1;
167     bridges{rosette_n}(bridge_n,:) = rosettes_left_downstream((Min_index_left_downstream(1)
168     ,:));
169 end
170 end
171 %no rosette found down stream ?
172 if isempty(Min_index_downstream)
173     %do not lose rosette to the left at end of trace
174     if ~isempty(Min_value_left_downstream)
175         if Min_value_left_downstream(1) > max_distance^2
176             break
177         end
178     end
179     if ~isempty(Min_index_left_downstream)
180         traces{rosette_n}(frame_n+1-rosette_n+1,:) = rosettes_left_downstream((
181         Min_index_left_downstream(1),:));
182         bridge_n = size(bridges{rosette_n},1)+1;
183         bridges{rosette_n}(bridge_n,:) = rosettes_left_downstream((Min_index_left_downstream(1)
184         ,:));
185     end
186     if isempty(Min_index_left_downstream)
187         break
188     end
189 end
190 else
191     break
192 end
193 if frame_n == (nr_of_frames-1)
194     break
195 end
196 frame_n = frame_n+1;
197 end
198 end
199 %filter traces
200 min_trace_length = 5; %trace_length > min_trace_length

```

## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow

```
193 number_vel_points = 0;
194 number_filtered_traces = 0;
195 for n = 1:rosette_n
196     if size(traces{n},1)>min_trace_length
197         number_vel_points = number_vel_points + size(traces{n},1) - 1;
198         number_filtered_traces = number_filtered_traces + 1;
199     end
200 end
201 %%velocity matrix
202 vel_points = zeros(number_vel_points, 10);
203
204 %%Output All traces on Background
205 outputname_traces = [folder 'traces.png'];
206 figure (4)
207 clf;
208 imshow(uint8(bg));
209 title(sprintf('%d traces (length > %d)', number_filtered_traces, min_trace_length));
210 hold on
211 for n = 1:rosette_n
212     if size(traces{n},1)>min_trace_length
213         plot(traces{n}(:,1),traces{n}(:,2),'LineStyle','-', 'Marker','.');
214     end
215 end
216 hold off
217 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
218 set(gcf, 'color', 'white')
219 export_fig(outputname_traces);
220
221 traces_filtered = cell(number_filtered_traces, 2);
222 bridges_filtered = cell(number_filtered_traces, 1);
223 k = 1;
224 for n = 1:rosette_n
225     if size(traces{n},1)>min_trace_length
226         traces_filtered{k,1}=traces{n};
227         for j = 1:size(traces{n},1)
228             l = find(object_locations{traces{n}(j,4)}(:,3)==traces{n}(j,1));
229             if size(l,1)==1 %if there is only one object with matching x value
230                 traces_filtered{k,1}(j,5)=object_locations{traces{n}(j,4)}(1,6);
231                 traces_filtered{k,1}(j,6)=object_locations{traces{n}(j,4)}(1,7);
232                 traces_filtered{k,1}(j,7)=object_locations{traces{n}(j,4)}(1,8);
233                 traces_filtered{k,1}(j,8)=object_locations{traces{n}(j,4)}(1,9);
234                 traces_filtered{k,1}(j,9)=0;
235             end
236             if size(l,1)>1 %if there is more than one object with matching x value, check y
237                 for m = 1:size(l,1)
238                     if object_locations{traces{n}(j,4)}(1(m),4)==traces{n}(j,2)
239                         traces_filtered{k,1}(j,5)=object_locations{traces{n}(j,4)}(1(m),6);
240                         traces_filtered{k,1}(j,6)=object_locations{traces{n}(j,4)}(1(m),7);
241                         traces_filtered{k,1}(j,7)=object_locations{traces{n}(j,4)}(1(m),8);
242                         traces_filtered{k,1}(j,8)=object_locations{traces{n}(j,4)}(1(m),9);
243                         traces_filtered{k,1}(j,9)=0;
244                     end
245                 end
246             end
247         end
248         bridges_filtered{k} = bridges{n};
249         k=k+1;
250     end
251 end
252
253 %% neighbouring objects
254 surroundings = cell(number_filtered_traces, 1); %
255 for n = 1:number_filtered_traces
256     end_x = size(traces_filtered{n}, 1);
257     surroundings{n} = zeros(end_x, 5); %matrix to save number of objects in surroundings of rosette now,
258     %previous picture and difference
259     for k = 1:end_x-1
260         %frame traces_filtered{n}(k,4)
261         %x positions column 2 in object_locations{traces_filtered{n}(k,4)}(:,2)
262         deltax = traces_filtered{n}(k+1,1) - traces_filtered{n}(k,1);
263         surroundings{n}(k, 1) = traces_filtered{n}(k,1);
264         surroundings{n}(k, 2) = deltax;
265         radius = 115; %10*(deltax); Breite 'Einheitszelle Kanal' ueber eine Stenose, dickste Stelle bis
266         %dickste Stelle
267         surroundings{n}(k, 3) = size (find ((object_locations{traces_filtered{n}(k,4)}(:,3) >
268             traces_filtered{n}(k,1) - radius) & (object_locations{traces_filtered{n}(k,4)}(:,3) <
269             traces_filtered{n}(k,1) + radius)),1);
270         surroundings{n}(k, 4) = size (find ((object_locations{traces_filtered{n}(k+1,4)}(:,3) >
271             traces_filtered{n}(k+1,1) - radius) & (object_locations{traces_filtered{n}(k+1,4)}(:,3) <
272             traces_filtered{n}(k+1,1) + radius)),1);
273         surroundings{n}(k, 5) = surroundings{n}(k, 4) - surroundings{n}(k, 3);
274     end
275 end
276 %what happens after trace ends
277 if traces_filtered{n}(k,4) == nr_of_frames
278     continue
279 else
280     if traces_filtered{n}(end_x,4) == nr_of_frames
281         continue
282     else
283         surroundings{n}(end_x, 1) = traces_filtered{n}(end_x,1);
284         surroundings{n}(end_x, 2) = deltax;
285         surroundings{n}(end_x, 3) = size (find ((object_locations{traces_filtered{n}(end_x,4)}(:,3) >
286             traces_filtered{n}(end_x,1) - radius) & (object_locations{traces_filtered{n}(end_x,4)}(:,3) <
287             traces_filtered{n}(end_x,1) + radius)),1);
288         surroundings{n}(end_x, 4) = size (find ((object_locations{traces_filtered{n}(end_x,4)+1}(:,3) >
289             traces_filtered{n}(end_x,1) + deltax - radius) & (object_locations{traces_filtered{n}(
290             end_x,4)+1}(:,3) < traces_filtered{n}(end_x,1) + deltax + radius)),1);
291         surroundings{n}(end_x, 5) = surroundings{n}(end_x, 4) - surroundings{n}(end_x, 3);
292     end
293 end
294
295 outputname_traces_endings = [folder 'traces_endings.png'];
296 figure (5)
297 clf;
298 imshow(uint8(bg));
299 title(sprintf('%d traces (length > %d)', number_filtered_traces, min_trace_length));
300 hold on
301 for n = 1:number_filtered_traces
302     plot(traces_filtered{n}(:,1),traces_filtered{n}(:,2),'LineStyle','-',');
303     start_x = 1;
304     last_x = size(traces_filtered{n},1);
305     text(traces_filtered{n}(start_x,1), (traces_filtered{n}(start_x,2)), sprintf('o'), 'Color', 'w', '
306         FontSize', 10, 'FontWeight', 'bold');
307     text(traces_filtered{n}(last_x,1), (traces_filtered{n}(last_x,2)), sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize
308         ', 10, 'FontWeight', 'bold');
309     for k = 1:last_x-1
310         if surroundings{n}(k, 5) > 0
311             text(traces_filtered{n}(k,1), (traces_filtered{n}(k,2)), sprintf('%d', surroundings{n}(k, 5)), '
312                 Color', 'g', 'FontSize', 10, 'FontWeight', 'bold');
```

```

300     end
301     if surroundings{n}(k, 5) < 0
302         text(traces_filtered{n}(k,1), (traces_filtered{n}(k,2)), sprintf('%d', surroundings{n}(k, 5)), '
303             Color', 'y', 'FontSize', 10, 'FontWeight', 'bold');
304     end
305     text(traces_filtered{n}(last_x,1), (traces_filtered{n}(last_x,2)), sprintf('%d', surroundings{n}(last_x,
306         5)), 'Color', 'm', 'FontSize', 10, 'FontWeight', 'bold');
307 hold off
308 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
309 set(gcf, 'color', 'white')
310 export_fig(outputname_traces_endings);
311
312 %%velocity matrix complete
313 j=0;
314 for n = 1:number_filtered_traces
315     for k = 1:(size(traces_filtered{n}, 1)-1)
316         vel_points(j+k, 1) = n; %number of trace
317         vel_points(j+k, 2) = 0.5*(traces_filtered{n}(k,1)+traces_filtered{n}(k+1,1)); % x position between
318             x1 and x2
319         vel_points(j+k, 3) = 0.5*(traces_filtered{n}(k,2)+traces_filtered{n}(k+1,2)); % y position between
320             y1 and y2
321         vel_points(j+k, 4) = (traces_filtered{n}(k+1,1) - traces_filtered{n}(k,1))*meter_per_pixel/dt; % x
322             velocity
323         vel_points(j+k, 5) = (traces_filtered{n}(k+1,2) - traces_filtered{n}(k,2))*meter_per_pixel/dt; % y
324             velocity
325         if ~isempty(bridges_filtered{n})
326             isbridge = find(bridges_filtered{n}(:, 1) == traces_filtered{n}(k+1,1) & bridges_filtered{n}
327                 (:, 2) == traces_filtered{n}(k+1,2) & bridges_filtered{n}(:, 3) == traces_filtered{n}(k
328                     +1,3), 1);
329             if ~isempty(isbridge)
330                 vel_points(j+k, 4) = 0; % x velocity invalid because of bridging
331                 vel_points(j+k, 5) = 0; % y velocity invalid because of bridging
332             end
333         end
334         vel_points(j+k, 6) = sqrt(vel_points(j+k, 4)^2+vel_points(j+k, 5)^2); % absolute velocity
335         vel_points(j+k, 7) = (traces_filtered{n}(k+1,3) - traces_filtered{n}(k,3));
336         vel_points(j+k, 8) = (traces_filtered{n}(k+1,3) - traces_filtered{n}(k,3))/traces_filtered{n}(k,3);
337         % change in area from pos 1 to 2
338         vel_points(j+k, 9) = surroundings{n}(k, 5);
339         if (vel_points(j+k, 7) < 0) && (vel_points(j+k, 7) < -0.75*median_object_area)
340             vel_points(j+k, 10) = surroundings{n}(k, 5);
341         else
342             vel_points(j+k, 10) = 0;
343         end
344     end
345     j=j+(size(traces_filtered{n}, 1)-1);
346 end
347
348 %%mean_velocity = mean(nonzeros(first10vel_points(:,6))); unused, avoid stenosis:
349 %% calculate flowrate ONLY FROM FIRST 10 TRACING STEPS (avoid stenosis)
350 first10vel_points = zeros(10*number_filtered_traces, 6);
351 velocity_avgfirst10 = zeros(number_filtered_traces, 1);
352 j=0;
353 for n = 1:number_filtered_traces
354     for k = 1:(min_trace_length-1)
355         first10vel_points(j+k, 1) = n; %number of trace
356         first10vel_points(j+k, 2) = 0.5*(traces_filtered{n}(k,1)+traces_filtered{n}(k+1,1)); % x position
357             between x1 and x2
358         first10vel_points(j+k, 3) = 0.5*(traces_filtered{n}(k,2)+traces_filtered{n}(k+1,2)); % y position
359             between y1 and y2
360         first10vel_points(j+k, 4) = (traces_filtered{n}(k+1,1) - traces_filtered{n}(k,1)); % x velocity
361         first10vel_points(j+k, 5) = (traces_filtered{n}(k+1,2) - traces_filtered{n}(k,2)); % y velocity
362         if ~isempty(bridges_filtered{n})
363             isbridge = find(bridges_filtered{n}(:, 1) == traces_filtered{n}(k+1,1) & bridges_filtered{n}
364                 (:, 2) == traces_filtered{n}(k+1,2) & bridges_filtered{n}(:, 3) == traces_filtered{n}(k
365                     +1,3), 1);
366             if ~isempty(isbridge)
367                 first10vel_points(j+k, 4) = 0; % x velocity invalid because of bridging
368                 first10vel_points(j+k, 5) = 0; % y velocity invalid because of bridging
369             end
370         end
371         first10vel_points(j+k, 6) = (meter_per_pixel/dt)*sqrt(first10vel_points(j+k, 4)^2+first10vel_points(
372             j+k, 5)^2); % absolute velocity
373     end
374     velocity_avgfirst10(n,1)=(meter_per_pixel/(min_trace_length*dt))*sqrt(((traces_filtered{n}(
375         min_trace_length,1) - traces_filtered{n}(1,1)))^2+((traces_filtered{n}(min_trace_length,2) -
376         traces_filtered{n}(1,2)))^2);
377     j=j+min_trace_length;
378 end
379
380 mean_velocity = mean(velocity_avgfirst10);
381 mean_xdisplacement = mean(nonzeros(first10vel_points(:,4)));
382 flowrate = canal_crosssection*mean_velocity*3600*10^9; %canal_crosssection(m^2)
383 disp([num2str(number_filtered_traces) ' filtered traces, flow rate ' num2str(flowrate) ' mul/h']);
384
385 outputname_vel = [folder 'traces velocities.png'];
386 figure(6)
387 clf;
388 imshow(uint8(bg));
389 title(sprintf('%d traces, flowrate %.4f mul/h', number_filtered_traces, flowrate));
390 hold on
391 quiverc(vel_points(:,2), vel_points(:,3), vel_points(:,4), vel_points(:,5));
392 hold off
393 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
394 set(gcf, 'color', 'white')
395 bar = colorbar;
396 barpos = bar.Position;
397 export_fig(outputname_vel);
398
399 outputname_vel_bar = [folder 'traces velocities bar.png'];
400 figure(7) %vel plot
401 clf;
402 hold on
403 quiverc(vel_points(:,2), vel_points(:,3), vel_points(:,4), vel_points(:,5));
404 hold off
405 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
406 set(gcf, 'color', 'white')
407 vmax = round(max(vel_points(:, 6))*1000)/10; %entspricht 1 im colorbar wegen normierung in quiverc
408 vmax_third = round(max(vel_points(:, 6))*1000/3)/10;
409 vmax_twothird = round(max(vel_points(:, 6))*2000/3)/10;
410 c = colorbar('Ticks',[0,1/3,2/3,1], 'TickLabels',{'0', num2str(vmax_third), num2str(vmax_twothird), num2str(vmax
411     )});
412 c.Label.String = 'velocity (cm/s)';
413 barpos(1)=1.03*barpos(1);
414 set(c, 'position', barpos);
415 export_fig(outputname_vel_bar);
416 %% basic analysis objects size distribution objects (rosettes = >1.5* median_object_area)
417 objects_inlet = objectlocations_complete(:,5); %column 5 = area in pixels

```

## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow

```
403 objects_inlet_foll = objectlocations_complete(:,5);
404 for n = size(objectlocations_complete,1):-1:1
405     if (objectlocations_complete(n,3) < input_delay_x) || (objectlocations_complete(n,3) > input_delay_x+
         mean_xdisplacement)
406         objects_inlet(n,:) = [];
407     end
408     if (objectlocations_complete(n,3) < input_delay_x+mean_xdisplacement) || (objectlocations_complete(n,3)
         > input_delay_x+2*mean_xdisplacement)
409         objects_inlet_foll(n,:) = [];
410     end
411 end
412
413 Xinlet=objects_inlet/median_object_area;
414 Xinletfoll=objects_inlet_foll/median_object_area;
415 hist_edges = [0 1.5 2.22 3.33 4.44 5.56 7.78 30];
416 hist_mitte = hist_edges+0.555;
417 [Ninlet,edgesinlet,bininlet] = histcounts(Xinlet,hist_edges);
418 [Ninletfoll,edgesinletfoll,binfoll] = histcounts(Xinletfoll,hist_edges);
419
420
421 filename_size = sprintf('size_dist.txt');
422 SizeInletName = [folder filename_size];
423 fid = fopen(SizeInletName,'w');
424 if fid ~= -1
425     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
426     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'results SURF', folder);
427     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'total traces: ', num2str(number_filtered_traces));
428     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'flow rate (mul/h): ', num2str(flowrate));
429     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'single cell size (px): ', num2str(median_object_area));
430     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'edges of bins for rosette size (norm): ', num2str(hist_edges));
431     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'counts: ', num2str(Ninlet));
432     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'relative frequencies (counts/counts total): ', num2str(Ninlet/sum(Ninlet)));
433     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'counts: ', num2str(Ninletfoll));
434     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'relative frequencies (counts/counts total): ', num2str(Ninletfoll/sum(Ninletfoll)));
435     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
436 end
437 fclose(fid);
438
439 %%plot area vs x position
440 outputname_area = [folder 'area vs x position.png'];
441 figure (8)
442 clf;
443 title(sprintf('area vs x position'));
444 hold on
445 for n = 1:number_filtered_traces
446     plot(traces_filtered{n}(:,1),traces_filtered{n}(:,3), 'LineStyle', '-', 'Marker', '.');
447     last_x = size(traces_filtered{n},1);
448     text(traces_filtered{n}(last_x,1), traces_filtered{n}(last_x,3), sprintf('trace %d', n), 'Color', 'r', '
         FontSize', 10, 'FontWeight', 'bold');
449     bridges_n = size(bridges_filtered{n},1);
450     for k = 1:bridges_n
451         text(bridges_filtered{n}(k,1),bridges_filtered{n}(k,3), sprintf('%d', k), 'Color', 'g', 'FontSize',
         10, 'FontWeight', 'bold');
452     end
453 end
454 hold off
455 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
456 set(gcf, 'color', 'white')
457 export_fig(outputname_area);
458
459 %%plot normalized area vs x position
460 outputname_normarea = [folder 'norm area vs x position.png'];
461 figure (9)
462 clf;
463 title(sprintf('normalized area vs x position'));
464 hold on
465 for n = 1:number_filtered_traces
466     plot(traces_filtered{n}(:,1),(traces_filtered{n}(:,3)/traces_filtered{n}(1,3)), 'LineStyle', '-', 'Marker
         ', '.');
467     last_x = size(traces_filtered{n},1);
468     text(traces_filtered{n}(last_x,1), (traces_filtered{n}(last_x,3)/traces_filtered{n}(1,3)), sprintf('%d',
         n), 'Color', 'r', 'FontSize', 10, 'FontWeight', 'bold');
469 end
470 hold off
471 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
472 set(gcf, 'color', 'white')
473 export_fig(outputname_normarea);
474
475 %%plot area change vs x position
476 changes_along_traces = cell(number_filtered_traces, 1); %identical values to vel_points, but one matrix for
         each trace
477 for n = 1:number_filtered_traces
478     changes_along_traces{n} = zeros(size(traces_filtered{n}, 1)-1, 6);
479     for k = 1:(size(traces_filtered{n}, 1)-1)
480         changes_along_traces{n}(k, 1) = 0.5*(traces_filtered{n}(k,1)+traces_filtered{n}(k+1,1));
481         changes_along_traces{n}(k, 2) = 0.5*(traces_filtered{n}(k,2)+traces_filtered{n}(k+1,2));
482         changes_along_traces{n}(k, 3) = (traces_filtered{n}(k+1,1) - traces_filtered{n}(k,1))/dt;
483         changes_along_traces{n}(k, 4) = (traces_filtered{n}(k+1,2) - traces_filtered{n}(k,2))/dt;
484         changes_along_traces{n}(k, 5) = sqrt(changes_along_traces{n}(k, 3)^2+changes_along_traces{n}(k, 4)
         ^2);
485         changes_along_traces{n}(k, 6) = (traces_filtered{n}(k+1,3) - traces_filtered{n}(k,3)); %/
         traces_filtered{n}(k,3) %>0 = groesser, <0= kleiner
486     end
487 end
488
489 %%identify events - rupture and connect
490 endings = zeros(number_filtered_traces, 5);
491 end_rupture_events = 0;
492 end_connect_events = 0;
493 event_counter = zeros(number_filtered_traces, 4); %%#trace #ruptures #connects ending
494 connect_counter = 0; %%#trace #frame x y #objdiff
495 rupture_counter = 0;
496
497 for n = 1:number_filtered_traces
498     event_counter(n,1)=n;
499     for k = 1: size(traces_filtered{n}, 1)-1 %trace n, step k in trace and in surroundings
500         current_frame = traces_filtered{n}(k,4); %current_frame in video
501         %rupture event?
502         if surroundings{n}(k, 5) > 0 && changes_along_traces{n}(k, 6) < 0 && abs(changes_along_traces{n}(k,
         6)) > 0.65*median_object_area %%if #objects and area changes along traces
503             event_counter(n,2)=event_counter(n,2)+1;
504             rupture_counter = rupture_counter +1;
505             traces_filtered{n}(k,9)=changes_along_traces{n}(k, 6);
506             ruptures(rupture_counter, 1) = n;
507             ruptures(rupture_counter, 2) = current_frame;
508             ruptures(rupture_counter, 3) = traces_filtered{n}(k,1);
509             ruptures(rupture_counter, 4) = traces_filtered{n}(k,2);
510             ruptures(rupture_counter, 5) = surroundings{n}(k, 5);
511             ruptures(rupture_counter, 6) = changes_along_traces{n}(k, 6);
```

```

512     end
513
514     %connect event?
515     if surroundings{n}(k, 5) < 0 && changes_along_traces{n}(k, 6) > 0 && abs(changes_along_traces{n}(k,
516         6)) > 0.65*median_object_area %if #objects and area changes along traces
517         event_counter(n,3)=event_counter(n,3)+1;
518         connect_counter = connect_counter+1;
519         traces_filtered{n}(k,9)=changes_along_traces{n}(k, 6);
520         connects( connect_counter , 1) = n;
521         connects( connect_counter , 2) = current_frame;
522         connects( connect_counter , 3) = traces_filtered{n}(k,1);
523         connects( connect_counter , 4) = traces_filtered{n}(k,2);
524         connects( connect_counter , 5) = surroundings{n}(k, 5);
525         connects( connect_counter , 6) = changes_along_traces{n}(k, 6) ;
526     end
527
528     %end of trace?
529     k = size( traces_filtered{n}, 1);
530     current_frame = traces_filtered{n}(k,4);
531     endings (n,1) = n;
532     endings (n,2) = current_frame;
533     endings (n,3) = traces_filtered{n}(k,1);
534     endings (n,4) = traces_filtered{n}(k,2);
535     endings (n,5) = surroundings{n}(k, 5);
536     %end of trace rupture event?
537     if surroundings{n}(k, 5) > 0 %if #objects and area changes along traces
538         end_rupture_events = end_rupture_events+1;
539     end
540
541     %end of trace: connect event?
542     if surroundings{n}(k, 5) < 0 %if #objects and area changes along traces
543         end_connect_events = end_connect_events +1;
544     end
545
546     end
547     end_no_events = number_filtered_traces-end_rupture_events- end_connect_events;
548
549     outputname_events = [folder 'events.png'];
550     figure (10)
551     clf;
552     imshow(uint8(bg));
553     title(sprintf('%d traces (length > %d)', number_filtered_traces, min_trace_length));
554     hold on
555     for n = 1:number_filtered_traces
556         plot(traces_filtered{n}(:,1),traces_filtered{n}(:,2),'LineStyle', '-', 'Color', 'w');
557     end
558     for n = 1:number_filtered_traces
559         for k = 1:size(changes_along_traces{n},1)
560             if changes_along_traces{n}(k,6)<-2*median_object_area
561                 text(traces_filtered{n}(k,1), traces_filtered{n}(k,2), sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize',
562                     10, 'FontWeight', 'bold');
563             end
564         end
565     end
566     for i = 1:size(ruptures, 1)
567         text(ruptures(i,3), ruptures(i,4), sprintf('%d', ruptures(i,5)), 'Color', 'g', 'FontSize', 10, '
568             FontWeight', 'bold');
569     end
570     for i = 1:size(connects, 1)
571         text(connects(i,3), connects(i,4), sprintf('%d', connects(i,5)), 'Color', 'y', 'FontSize', 10, '
572             FontWeight', 'bold');
573     end
574     for i = 1:size(endings, 1)
575         text(endings(i,3), endings(i,4), sprintf('%d', endings(i,5)), 'Color', 'm', 'FontSize', 10, '
576             FontWeight', 'bold');
577     end
578     hold off
579     set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
580     set(gcf, 'color', 'white')
581     export_fig(outputname_events);
582
583     outputname_darea = [folder 'change in area vs x position.png'];
584     figure (11)
585     clf;
586     title(sprintf('change in area vs x position'));
587     hold on
588     for n = 1:number_filtered_traces
589         plot( changes_along_traces{n}(:,1), changes_along_traces{n}(:,6),'LineStyle', '-', 'Marker', '.');
590         last_x = size(changes_along_traces{n},1);
591         text(changes_along_traces{n}( last_x,1),changes_along_traces{n}( last_x,6), sprintf('%d', n), 'Color', '
592             r', 'FontSize', 10, 'FontWeight', 'bold');
593     end
594     hold off
595     set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
596     set(gcf, 'color', 'white')
597     export_fig(outputname_darea);
598
599     %% categorize events along traces - real rupture and pass by
600     for n = 1:number_filtered_traces
601         for k = 1:(size( traces_filtered{n}, 1))
602             traces_filtered{n}(k,10) = 0; %clear column
603         end
604     end
605     for n = 1:number_filtered_traces
606         event_column = traces_filtered{n}(:,9);
607         l = find(traces_filtered{n}(:,9));
608         if size(l,1)>1
609             for m = 1:(size(l,1)-1)
610                 if l(m)+1 == l(m+1) && ( event_column(l(m+1)) * event_column(l(m)) > 0) %aufeinanderfolgende
611                     Indizes und selbes Vorzeichen -> wird zusammengefasst
612                     event_column(l(m+1))= event_column(l(m+1)) + event_column(l(m));
613                 end
614             end
615         end
616         ev = find(event_column);
617         while ~isempty(ev)
618             if traces_filtered{n}(ev(1),9)<0 %rupture
619                 if size(ev ,1) == 1
620                     traces_filtered{n}(ev(1),10) = 1; %real rupture
621                     ev(1)=[];
622                     continue;
623                 end
624                 if size(ev ,1) > 1
625                     if (ev(2)-ev(1)) > 25 || traces_filtered{n}(ev(2),9) < 0
626                         traces_filtered{n}(ev(1),10) = 1; %real rupture
627                     end
628                     if (ev(2)-ev(1)) <=25 && traces_filtered{n}(ev(2),9) > 0

```

## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow

```

626         for p = ev(1):ev(2)
627             traces_filtered{n}(p,10) = 2; %connect after rupture
628         end
629         ev(2) = [];
630     end
631     ev(1) = [];
632     continue
633 end
634 end
635 if traces_filtered{n}(ev(1),9)>0 %connect
636     if size(ev ,1) == 1
637         traces_filtered{n}(ev(1),10) = 3; %connect only
638         ev(1) = [];
639         continue
640     end
641     if size(ev ,1) > 1
642         if (ev(2)-ev(1)) > 25 || traces_filtered{n}(ev(2),9) > 0
643             traces_filtered{n}(ev(1),10) = 3; %connect only
644         end
645         if (ev(2)-ev(1)) <=25 && traces_filtered{n}(ev(2),9) < 0
646             for p = ev(1):ev(2)
647                 traces_filtered{n}(p,10) = 4; %pass by
648             end
649             ev(2) = [];
650         end
651         ev(1) = [];
652         continue
653     end
654 end
655 end
656 end
657
658 %%Farben Uni Augsburg
659 uni_gruen = [0 101/255 97/255];
660 uni_lila = [173/255 0 124/255]; %RGB: R:173 G:0 B:124
661 uni_gelb = [246/255 168/255 0]; %R:246 G:168 B:0
662 uni_orange = [ 235/255 105/255 11/255]; %R:235 G:105 B:11
663 uni_rot = [ 212/255 0 45/255];%R:212 G:0 B:45
664 uni_hellblau =[0 174/255 207/255];% R:0 G:174 B:207
665 uni_dunkelblau =[21/255 85/255 129/255];%R:21 G:85 B:129
666 uni_hellgruen = [72/255 147/255 36/255];%R:72 G:147 B:36
667 uni_grau = [179/255 179/255 179/255];%R:179 G:179 B:179
668
669 %%Plots
670 %one for each trace
671 for n = 1:number_filtered_traces
672     filename = sprintf('trace %d.png', n);
673     outputname_trace = [folder filename];
674     figure (12)
675     clf
676     hold on
677     title(sprintf('trace %d.png', n));
678     plot(traces_filtered{n}(:,1),traces_filtered{n}(:,3),traces_filtered{n}(:,1),traces_filtered{n}(:,5),
679         traces_filtered{n}(:,1),traces_filtered{n}(:,6), traces_filtered{n}(:,1),100*traces_filtered{n}
680         )(:,7), 'changes_along_traces{n}(:,1)', 'changes_along_traces{n}(:,6)');
681     legend('Area', 'MajorAxis', 'MinorAxis', 'Eccentricity', 'Change in Area');
682     for j = 1:size(changes_along_traces{n},1)
683         if traces_filtered{n}(j,9) ~= 0
684             text( traces_filtered{n}(j+1,1),traces_filtered{n}(j+1,3), sprintf('%d', traces_filtered{n}(j,9)
685                 ), 'Color', 'r', 'FontSize', 10 , 'FontWeight', 'bold');
686         end
687     end
688     if size(traces_filtered{n},2)==10
689         for j =1:(size(traces_filtered{n},1)-1)
690             if traces_filtered{n}(j,10) ~= 0
691                 text( traces_filtered{n}(j,1),traces_filtered{n}(j,3), sprintf('%d', traces_filtered{n}(j
692                     ),10)), 'Color', 'g', 'FontSize', 10 , 'FontWeight', 'bold');
693             end
694         end
695     end
696     hold off
697     set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
698     set(gcf, 'color','white')
699     export_fig(outputname_trace);
700 end
701
702 %%one subplot for each event category
703 figure (13)
704 clf;
705 filename = sprintf('categorized events along traces.png');
706 outputname_cat_events = [folder filename];
707 hold on
708 subplot(5, 1, 1);
709 imshow(uint8(bg));
710 title(sprintf('real ruptures'));
711 for n = 1:30:number_filtered_traces
712     realruptures = find(traces_filtered{n}(:,10)==1);
713     if ~isempty(realruptures)
714         for r = 1:size(realruptures)
715             rel_fontsize = round(-0.1*traces_filtered{n}(realruptures(r),9));
716             text(traces_filtered{n}(realruptures(r),1), (traces_filtered{n}(realruptures(r),2)), sprintf('x'
717                 ), 'Color', 'r', 'FontSize', rel_fontsize , 'FontWeight', 'bold');
718         end
719     end
720 end
721 subplot(5, 1, 2);
722 imshow(uint8(bg));
723 title(sprintf('rupture & reconnect'));
724 for n = 1:30:number_filtered_traces
725     reconnects = find(traces_filtered{n}(:,10)==2);
726     if ~isempty(reconnects)
727         plotstartvalues = 0*reconnects;
728         for x = 1:(size(reconnects,1)-1)
729             if reconnects(x+1)==reconnects(x)+1
730                 plotstartvalues(x+1)=1;
731             end
732         end
733         plotstartvalues = find(plotstartvalues==0);
734         hold on
735         for r = 1:(size(plotstartvalues,1)-1)
736             plot(traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)):reconnects(plotstartvalues(r+1)-1),1), (
737                 traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)):reconnects(plotstartvalues(r+1)-1),2)),
738                 'Color', 'w');
739             text(traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)),1), (traces_filtered{n}(reconnects(
740                 plotstartvalues(r),2)), sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize', 8 , 'FontWeight', 'bold');
741             text(traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r+1)-1),1), (traces_filtered{n}(reconnects(
742                 plotstartvalues(r+1)-1),2)), sprintf('o'), 'Color', 'y', 'FontSize', 8 , 'FontWeight', '
743                 bold');
744         end
745     end
746     r = size(plotstartvalues,1);
747 end

```

```

736     plot(traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)):reconnects(size(reconnects)),1), (
737         traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)):reconnects(size(reconnects)),2)), 'Color', '
738         w');
739     text(traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)),1), (traces_filtered{n}(reconnects(
740         plotstartvalues(r),2)), sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize', 8, 'FontWeight', 'bold');
741     text(traces_filtered{n}(reconnects(size(reconnects),1),1), (traces_filtered{n}(reconnects(size(
742         reconnects),1),2)), sprintf('o'), 'Color', 'y', 'FontSize', 8, 'FontWeight', 'bold');
743     hold off
744     end
745 end
746 subplot(5, 1, 3);
747 imshow(uint8(bg));
748 title(sprintf('connect only'));
749 for n = 1:30%number_filtered_traces
750     connectonly = find(traces_filtered{n}(:,10)==3);
751     if ~isempty(connectonly)
752         for r = 1:size(connectonly)
753             text(traces_filtered{n}(connectonly(r),1), (traces_filtered{n}(connectonly(r),2)), sprintf('o'
754                 ), 'Color', 'y', 'FontSize', 10, 'FontWeight', 'bold');
755         end
756     end
757 end
758 subplot(5, 1, 4);
759 imshow(uint8(bg));
760 title(sprintf('pass by'));
761 for n = 1:30%number_filtered_traces
762     passby = find(traces_filtered{n}(:,10)==4);
763     if ~isempty(passby)
764         plotstartvalues = 0*passby;
765         for x = 1:(size(passby,1)-1)
766             if passby(x+1)==passby(x)+1
767                 plotstartvalues(x+1)=1;
768             end
769         end
770         plotstartvalues = find(plotstartvalues==0);
771         hold on
772         if size(plotstartvalues,1)>1
773             for r = 1:(size(plotstartvalues,1)-1)
774                 plot(traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r)):passby(plotstartvalues(r+1)-1),1), (
775                     traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r)):passby(plotstartvalues(r+1)-1),2)), '
776                     Color', 'g');
777                 text(traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r)),1), (traces_filtered{n}(passby(
778                     plotstartvalues(r),2)), sprintf('o'), 'Color', 'y', 'FontSize', 8, 'FontWeight', '
779                     bold');
780                 text(traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r+1)-1),1), (traces_filtered{n}(passby(
781                     plotstartvalues(r+1)-1),2)), sprintf('x'), 'Color', 'w', 'FontSize', 8, 'FontWeight',
782                     'bold');
783             end
784         end
785         r = size(plotstartvalues,1);
786         plot(traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r)):passby(size(passby,1)),1), (traces_filtered{n}(
787             passby(plotstartvalues(r)):passby(size(passby,1)),2)), 'Color', 'g');
788         text(traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r)),1), (traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r)
789             ),2)), sprintf('o'), 'Color', 'y', 'FontSize', 8, 'FontWeight', 'bold');
790         text(traces_filtered{n}(passby(size(passby,1)),1), (traces_filtered{n}(passby(size(passby,1)),2)),
791             sprintf('x'), 'Color', 'w', 'FontSize', 8, 'FontWeight', 'bold');
792         hold off
793     end
794 end
795 subplot(5, 1, 5);
796 imshow(uint8(bg));
797 title(sprintf('end of trace'));
798 for n = 1:30%number_filtered_traces
799     endxv = size(traces_filtered{n},1);
800     text(traces_filtered{n}(endxv,1), (traces_filtered{n}(endxv,2)), sprintf('x'), 'Color', 'm', 'FontSize',
801         10, 'FontWeight', 'bold');
802 end
803 hold off
804 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
805 set(gcf, 'color', 'white');
806 export_fig(outputname_cat_events);
807 %grid to plot categorized events along traces per area
808 x_steps = input_delay_x:10:image_width;
809 x_steps_center = x_steps+5;
810 x_steps_center(:,size(x_steps,2))=[];
811 y_steps = -5:10:image_height;
812 y_steps_center = y_steps+5;
813 y_steps_center(:,size(y_steps,2))=[];
814 grid = zeros(size(y_steps_center,2),size(x_steps_center,2));
815 figure (14)
816 clf;
817 filename = sprintf('categorized events along traces per area.png');
818 outputname_cat_area = [folder filename];
819 hold on
820 counter_realruptures = grid;
821 sum_realruptures = grid;
822 means_realruptures = grid;
823 for n = 1:number_filtered_traces
824     realruptures = find(traces_filtered{n}(:,10)==1);
825     if ~isempty(realruptures)
826         for r = 1:size(realruptures)
827             i = find(abs(traces_filtered{n}(realruptures(r),1) - x_steps_center(1, :)) <=5);
828             i = i(1,1); %falls x wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er links eingeordnet
829             - rechte Kante gehoert zum Feld
830             j = find(abs(traces_filtered{n}(realruptures(r),2) - y_steps_center(1, :)) <=5);
831             j = j(1,1); %falls y wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er oben eingeordnet -
832             untere Kante gehoert zum Feld
833             counter_realruptures(j,i)=counter_realruptures(j,i)+1;
834             sum_realruptures(j,i)=sum_realruptures(j,i)+traces_filtered{n}(realruptures(r),9);
835         end
836     end
837 end
838 subplot(6, 1, 1);
839 imshow(uint8(bg));
840 title(sprintf('real ruptures (counts per area)'));
841 hold on
842 for i = 1:size(grid,2)
843     for j = 1:size(grid,1)
844         if counter_realruptures(j,i)>0
845             means_realruptures(j,i) = sum_realruptures(j,i)/counter_realruptures(j,i);
846             rel_fontsize = round(0.5*counter_realruptures(j,i));
847             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
848                 Color', uni_rot);
849             %text(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize',
850                 rel_fontsize, 'FontWeight', 'bold');
851         end
852     end
853 end

```

## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow

```

837     end
838 end
839 hold off
840
841 subplot(6, 1, 2);
842 imshow(uint8(bg));
843 title(sprintf('real ruptures (mean values per area)'));
844 hold on
845 for i = 1:size(grid,2)
846     for j = 1:size(grid,1)
847         if counter_realruptures(j,i)>0
848             rel_fontsize = round(-0.1*means_realruptures(j,i));
849             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
            Color', uni_rot);
850         end
851     end
852 end
853 hold off
854
855 counter_ruptures = grid;
856 counter_reconnects = grid;
857 subplot(6, 1, 3);
858 imshow(uint8(bg));
859 title(sprintf('rupture & reconnect (counts per area)'));
860 hold on
861 for n = 1:number_filtered_traces
862     reconnects = find(traces_filtered{n}(:,10)==2);
863     if ~isempty(reconnects)
864         plotstartvalues = 0*reconnects;
865         for x = 1:(size(reconnects,1)-1)
866             if reconnects(x+1)==reconnects(x)+1
867                 plotstartvalues(x+1)=1;
868             end
869         end
870         plotstartvalues = find(plotstartvalues==0);
871     end
872     for r = 1:(size(plotstartvalues,1)-1)
873         plot(traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)):reconnects(plotstartvalues(r+1)-1),1), (
            traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)):reconnects(plotstartvalues(r+1)-1),2)), '
            Color', 'w');
874         i = find(abs(traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)),1) - x_steps_center(1, :)) <=5);
875         i = i(1,1); %falls x wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er links eingeordnet -
            rechte Kante gehoert zum Feld
876         j = find(abs(traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)),2) - y_steps_center(1, :)) <=5);
877         j = j(1,1); %falls y wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er oben eingeordnet -
            untere Kante gehoert zum Feld
878         counter_ruptures(j,i)=counter_ruptures(j,i)+1;
879         ii = find(abs(traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r+1)-1),1) - x_steps_center(1, :))
            <=5);
880         ii = ii(1,1); %falls x wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er links
            eingeordnet - rechte Kante gehoert zum Feld
881         jj = find(abs(traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r+1)-1),2) - y_steps_center(1, :))
            <=5);
882         jj = jj(1,1); %falls y wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er oben eingeordnet -
            untere Kante gehoert zum Feld
883         counter_reconnects(jj,ii)=counter_reconnects(jj,ii)+1;
884     end
885     r = size(plotstartvalues,1);
886     plot(traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)):reconnects(size(reconnects)),1), (
            traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)):reconnects(size(reconnects)),2)), 'Color', '
            w');
887     i = find(abs(traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)),1) - x_steps_center(1, :)) <=5);
888     i = i(1,1); %falls x wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er links eingeordnet -
            rechte Kante gehoert zum Feld
889     j = find(abs(traces_filtered{n}(reconnects(plotstartvalues(r)),2) - y_steps_center(1, :)) <=5);
890     j = j(1,1); %falls y wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er oben eingeordnet -
            untere Kante gehoert zum Feld
891     counter_ruptures(j,i)=counter_ruptures(j,i)+1;
892     ii = find(abs(traces_filtered{n}(reconnects(size(reconnects,1)),1) - x_steps_center(1, :)) <=5);
893     ii = ii(1,1); %falls x wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er links eingeordnet -
            rechte Kante gehoert zum Feld
894     jj = find(abs(traces_filtered{n}(reconnects(size(reconnects,1)),2) - y_steps_center(1, :)) <=5);
895     jj = jj(1,1); %falls y wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er oben eingeordnet -
            untere Kante gehoert zum Feld
896     counter_reconnects(jj,ii)=counter_reconnects(jj,ii)+1;
897 end
898 end
899 end
900 for i = 1:size(grid,2)
901     for j = 1:size(grid,1)
902         if counter_ruptures(j,i)>0
903             rel_fontsize = round(0.5*counter_ruptures(j,i));
904             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
            Color', uni_rot);
905             %text(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize',
            rel_fontsize, 'FontWeight', 'bold');
906         end
907         if counter_reconnects(j,i)>0
908             rel_fontsize = round(0.5*counter_reconnects(j,i));
909             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
            Color', 'y');
910             %text(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize',
            rel_fontsize, 'FontWeight', 'bold');
911         end
912     end
913 end
914 hold off
915 counter_connects = grid;
916 for n = 1:number_filtered_traces
917     connectonly = find(traces_filtered{n}(:,10)==3);
918     if ~isempty(connectonly)
919         for r = 1:size(connectonly)
920             i = find(abs(traces_filtered{n}(connectonly(r),1) - x_steps_center(1, :)) <=5);
921             i = i(1,1); %falls x wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er links eingeordnet -
            rechte Kante gehoert zum Feld
922             j = find(abs(traces_filtered{n}(connectonly(r),2) - y_steps_center(1, :)) <=5);
923             j = j(1,1); %falls y wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er oben eingeordnet -
            untere Kante gehoert zum Feld
924             counter_connects(j,i)=counter_connects(j,i)+1;
925         end
926     end
927 end
928 subplot(6, 1, 4);
929 imshow(uint8(bg));
930 title(sprintf('connect only (counts per area)'));
931 hold on
932 for i = 1:size(grid,2)
933     for j = 1:size(grid,1)
934         if counter_connects(j,i)>0
935             rel_fontsize = round(0.5*counter_connects(j,i));

```

```

936     plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
          Color', 'y');
937     %text(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize',
          rel_fontsize, 'FontWeight', 'bold');
938     end
939 end
940 hold off
941 hold off
942
943 counter_passbystart = grid;
944 counter_passbyend = grid;
945 subplot(6, 1, 5);
946 imshow(uint8(bg));
947 title(sprintf('pass by (counts per area)'));
948 hold on
949 for n = 1:number_filtered_traces
950     passby = find(traces_filtered{n}(:,10)==4);
951     if ~isempty(passby)
952         plotstartvalues = 0*passby;
953         for x = 1:(size(passby,1)-1)
954             if passby(x+1)==passby(x)+1
955                 plotstartvalues(x+1)=1;
956             end
957         end
958         plotstartvalues = find(plotstartvalues==0);
959         if size(plotstartvalues,1)>1
960             for r = 1:(size(plotstartvalues,1)-1)
961                 plot(traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r)):passby(plotstartvalues(r+1)-1),1), (
          traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r)):passby(plotstartvalues(r+1)-1),2)), '
          Color', [0.8 0.8 0.8]);
962                 i = find(abs(traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r)),1) - x_steps_center(1, :)) <=5);
963                 i = i(1,1); %falls x wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er links
          eingeordnet - rechte Kante gehoert zum Feld
964                 j = find(abs(traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r)),2) - y_steps_center(1, :)) <=5);
965                 j = j(1,1); %falls y wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er oben
          eingeordnet - untere Kante gehoert zum Feld
966                 counter_passbystart(j,i)=counter_passbystart(j,i)+1;
967                 ii = find(abs(traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r+1)-1),1) - x_steps_center(1, :))
          <=5);
968                 ii = ii(1,1); %falls x wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er links
          eingeordnet - rechte Kante gehoert zum Feld
969                 jj = find(abs(traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r+1)-1),2) - y_steps_center(1, :))
          <=5);
970                 jj = jj(1,1); %falls y wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er oben
          eingeordnet - untere Kante gehoert zum Feld
971                 counter_passbyend(jj,ii)=counter_passbyend(jj,ii)+1;
972             end
973         end
974         r = size(plotstartvalues,1);
975         plot(traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r)):passby(size(passby,1)),1), (traces_filtered{n}(
          passby(plotstartvalues(r)):passby(size(passby,1)),2)), 'Color', uni_grau);
976         i = find(abs(traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r)),1) - x_steps_center(1, :)) <=5);
977         i = i(1,1); %falls x wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er links eingeordnet -
          rechte Kante gehoert zum Feld
978         j = find(abs(traces_filtered{n}(passby(plotstartvalues(r)),2) - y_steps_center(1, :)) <=5);
979         j = j(1,1); %falls y wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er oben eingeordnet -
          untere Kante gehoert zum Feld
980         counter_passbystart(j,i)=counter_passbystart(j,i)+1;
981         ii = find(abs(traces_filtered{n}(passby(size(passby,1)),1) - x_steps_center(1, :)) <=5);
982         ii = ii(1,1); %falls x wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er links eingeordnet -
          rechte Kante gehoert zum Feld
983         jj = find(abs(traces_filtered{n}(passby(size(passby,1)),2) - y_steps_center(1, :)) <=5);
984         jj = jj(1,1); %falls y wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er oben eingeordnet -
          untere Kante gehoert zum Feld
985         counter_passbyend(jj,ii)= counter_passbyend(jj,ii)+1;
986     end
987 end
988 for i = 1:size(grid,2)
989     for j = 1:size(grid,1)
990         if counter_passbystart(j,i)>0
991             rel_fontsize = round(0.5*counter_passbystart(j,i));
992             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
          Color', 'y');
993             %text(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize',
          rel_fontsize, 'FontWeight', 'bold');
994         end
995         if counter_passbyend(j,i)>0
996             rel_fontsize = round(0.5*counter_passbyend(j,i));
997             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
          Color', uni_orange);
998             %text(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize',
          rel_fontsize, 'FontWeight', 'bold');
999         end
1000     end
1001 end
1002 hold off
1003
1004 counter_endings = grid(1,:);
1005 j=1;
1006 for n = 1:number_filtered_traces
1007     endxv = size(traces_filtered{n},1);
1008     i = find(abs(traces_filtered{n}(endxv,1) - x_steps_center(1, :)) <=5);
1009     i = i(1,1); %falls x wert in zwei Felder faellt (auf der Kante liegt) wird er links eingeordnet - rechte
          Kante gehoert zum Feld
1010     counter_endings(j,i)=counter_endings(j,i)+1;
1011 end
1012 subplot(6, 1, 6);
1013 imshow(uint8(bg));
1014 title(sprintf('end of trace'));
1015 hold on
1016 for i = 1:size(grid,2)
1017     if counter_endings(j,i)>0
1018         rel_fontsize = round(0.5*counter_endings(j,i));
1019         plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, 5), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, 'Color'
          , uni_lila);
1020     end
1021 end
1022 hold off
1023 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
1024 set(gcf, 'color', 'white');
1025 export_fig(outputname_cat_area);
1026
1027 figure(15)
1028 clf;
1029 filename = sprintf('categorized events over area.png');
1030 outputname_cat_x = [folder filename];
1031 hold on
1032 subplot(6, 1, 1);
1033 title(sprintf('real ruptures (counts per area)'));
1034 hold on

```

## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow

```

1035 for i = 1:size(grid,2)
1036     for j = 1:size(grid,1)
1037         if counter_rearuptures(j,i)>0
1038             rel_fontsize = round(0.5*counter_rearuptures(j,i));
1039             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
1040                 Color', uni_rot);
1041             xlim([0 image_width]);
1042             ylim([0 image_height]);
1043         end
1044     end
1045 hold off
1046 subplot(6, 1, 2);
1047 title(sprintf('real ruptures (mean values per area)'));
1048 hold on
1049 for i = 1:size(grid,2)
1050     for j = 1:size(grid,1)
1051         if counter_rearuptures(j,i)>0
1052             rel_fontsize = round(-0.1*means_rearuptures(j,i));
1053             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
1054                 Color', uni_rot);
1055             xlim([0 image_width]);
1056             ylim([0 image_height]);
1057         end
1058     end
1059 end
1060 hold off
1061 subplot(6, 1, 3);
1062 title(sprintf('rupture & reconnect (counts per area)'));
1063 hold on
1064 for i = 1:size(grid,2)
1065     for j = 1:size(grid,1)
1066         if counter_ruptures(j,i)>0
1067             rel_fontsize = round(0.5*counter_ruptures(j,i));
1068             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
1069                 Color', uni_rot);
1070             xlim([0 image_width]);
1071             ylim([0 image_height]);
1072         end
1073         if counter_reconnects(j,i)>0
1074             rel_fontsize = round(0.5*counter_reconnects(j,i));
1075             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
1076                 Color', uni_gruen);
1077             xlim([0 image_width]);
1078             ylim([0 image_height]);
1079         end
1080     end
1081 end
1082 hold off
1083 subplot(6, 1, 4);
1084 title(sprintf('connect only (counts per area)'));
1085 hold on
1086 for i = 1:size(grid,2)
1087     for j = 1:size(grid,1)
1088         if counter_connects(j,i)>0
1089             rel_fontsize = round(0.5*counter_connects(j,i));
1090             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
1091                 Color', uni_gruen);
1092             xlim([0 image_width]);
1093             ylim([0 image_height]);
1094         end
1095     end
1096 end
1097 hold off
1098 subplot(6, 1, 5);
1099 title(sprintf('pass by (counts per area)'));
1100 hold on
1101 for i = 1:size(grid,2)
1102     for j = 1:size(grid,1)
1103         if counter_passbystart(j,i)>0
1104             rel_fontsize = round(0.5*counter_passbystart(j,i));
1105             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
1106                 Color', uni_gruen);
1107             xlim([0 image_width]);
1108             ylim([0 image_height]);
1109         end
1110         if counter_passbyend(j,i)>0
1111             rel_fontsize = round(0.5*counter_passbyend(j,i));
1112             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
1113                 Color', uni_orange);
1114             xlim([0 image_width]);
1115             ylim([0 image_height]);
1116         end
1117     end
1118 end
1119 hold off
1120 subplot(6, 1, 6);
1121 title(sprintf('end of trace'));
1122 hold on
1123 for i = 1:size(grid,2)
1124     if counter_endings(1,i)>0
1125         rel_fontsize = round(0.5*counter_endings(1,i));
1126         plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, 5), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, 'Color'
1127             , uni_lila);
1128         xlim([0 image_width]);
1129         ylim([0 image_height]);
1130     end
1131 end
1132 hold off
1133 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
1134 set(gcf, 'color', 'white')
1135 export_fig (outputname_cat_x);
1136 %% legende
1137 figure (16)
1138 clf;
1139 filename = sprintf('legend norm 500.png');
1140 outputname_legend = [folder filename];
1141 subplot(6, 1, 1);
1142 title(sprintf('bullet size corresponding to counts per 500 traces'));
1143 bullets=[5 25 50 100];
1144 y_bullets = [0.75 0.25 -0.25 -0.85];
1145 hold on
1146 for i = 1:size(bullets,2)
1147     rel_fontsize = round(bullets(i));
1148     plot((image_width/2)-10,y_bullets(i), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, 'Color', 'k');
1149     text((image_width/2)+10,y_bullets(i), num2str(bullets(i)), 'FontSize', 10, 'FontWeight', 'bold');
1150 end
1151 xlim([0 image_width]);

```

```

1146 ylim([-1 1]);
1147 set(gca, 'ytick', []);
1148 set(gca, 'ycolor', [1 1 1]);
1149 set(gca, 'xtick', []);
1150 set(gca, 'xcolor', [1 1 1]);
1151 hold off
1152 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
1153 set(gcf, 'color', 'white')
1154 export_fig (outputname_legend);
1155 %grid reduced to one dimension: categorized events along flow direction
1156 figure (17)
1157 clf;
1158 filename = sprintf('categorized_events_along_flow_direction.png');
1159 outputname_cat_vs_x = [folder filename];
1160 hold on
1161 subplot(6, 1, 1);
1162 title(sprintf('real ruptures (counts)'));
1163 xcounter_realruptures=sum(counter_realruptures);
1164 hold on
1165 for i = 1:size(grid,2)
1166     if xcounter_realruptures(1,i)>0
1167         rel_fontsize = round(500/number_filtered_traces*xcounter_realruptures(1,i));%statt 0.5 mult mit 500/
1168         number_fil_rel_fontsize = round(0.5*xcounter_realruptures(1,i));
1169         if rel_fontsize>0
1170             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, 1), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
1171                 Color', uni_rot);
1172         end
1173     end
1174 end
1175 xlim([0 image_width]);
1176 ylim([-1 1]);
1177 set(gca, 'ytick', []);
1178 set(gca, 'ycolor', [1 1 1]);
1179 hold off
1180 subplot(6, 1, 2);
1181 title(sprintf('real ruptures (mean values area change)'));
1182 xmean_realruptures = sum(means_realruptures);
1183 hold on
1184 for i = 1:size(grid,2)
1185     if xcounter_realruptures(1,i)>0
1186         rel_fontsize = round(-0.1*xmean_realruptures(1,i));
1187         if rel_fontsize>0
1188             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, 1), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
1189                 Color', uni_rot);
1190         end
1191     end
1192 end
1193 xlim([0 image_width]);
1194 ylim([-1 1]);
1195 set(gca, 'ytick', []);
1196 set(gca, 'ycolor', [1 1 1]);
1197 hold off
1198 subplot(6, 1, 3);
1199 title(sprintf('catch up (counts rupture (red) and reconnect (green))'));
1200 xcounter_ruptures = sum(counter_ruptures);
1201 xcounter_reconnects = sum(counter_reconnects);
1202 hold on
1203 for i = 1:size(grid,2)
1204     if xcounter_ruptures(1,i)>0
1205         rel_fontsize = round(500/number_filtered_traces*xcounter_ruptures(1,i));
1206         if rel_fontsize>0
1207             plot(x_steps_center(1, i), 0.25, 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, 'Color', uni_rot);
1208         end
1209     end
1210     if xcounter_reconnects(1,i)>0
1211         rel_fontsize = round(500/number_filtered_traces*xcounter_reconnects(1,i));
1212         if rel_fontsize>0
1213             plot(x_steps_center(1, i), -0.25, 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, 'Color', uni_gruen
1214                 );
1215         end
1216     end
1217 end
1218 end
1219 xlim([0 image_width]);
1220 ylim([-1 1]);
1221 set(gca, 'ytick', []);
1222 set(gca, 'ycolor', [1 1 1]);
1223 hold off
1224 subplot(6, 1, 4);
1225 title(sprintf('connect only (counts)'));
1226 xcounter_connects = sum(counter_connects);
1227 hold on
1228 for i = 1:size(grid,2)
1229     if xcounter_connects(1,i)>0
1230         rel_fontsize = round(500/number_filtered_traces*xcounter_connects(1,i));
1231         if rel_fontsize>0
1232             plot(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, 1), 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, '
1233                 Color', uni_gruen);
1234         end
1235     end
1236 end
1237 end
1238 xlim([0 image_width]);
1239 ylim([-1 1]);
1240 set(gca, 'ytick', []);
1241 set(gca, 'ycolor', [1 1 1]);
1242 hold off
1243 subplot(6, 1, 5);
1244 title(sprintf('pass by (counts start (green) and end (orange))'));
1245 xcounter_passbystart = sum(counter_passbystart);
1246 xcounter_passbyend = sum(counter_passbyend);
1247 hold on
1248 for i = 1:size(grid,2)
1249     if xcounter_passbystart(1,i)>0
1250         rel_fontsize = round(500/number_filtered_traces*xcounter_passbystart(1,i));
1251         if rel_fontsize>0
1252             plot(x_steps_center(1, i), 0.25, 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, 'Color', uni_gruen)
1253         end
1254     end
1255     if xcounter_passbyend(1,i)>0
1256         rel_fontsize = round(500/number_filtered_traces*xcounter_passbyend(1,i));
1257         if rel_fontsize>0
1258             plot(x_steps_center(1, i), -0.25, 'Marker', '.', 'MarkerSize', rel_fontsize, 'Color',
1259                 uni_orange);
1260         end
1261     end
1262 end
1263 end
1264 xlim([0 image_width]);
1265 ylim([-1 1]);
1266 set(gca, 'ytick', []);

```



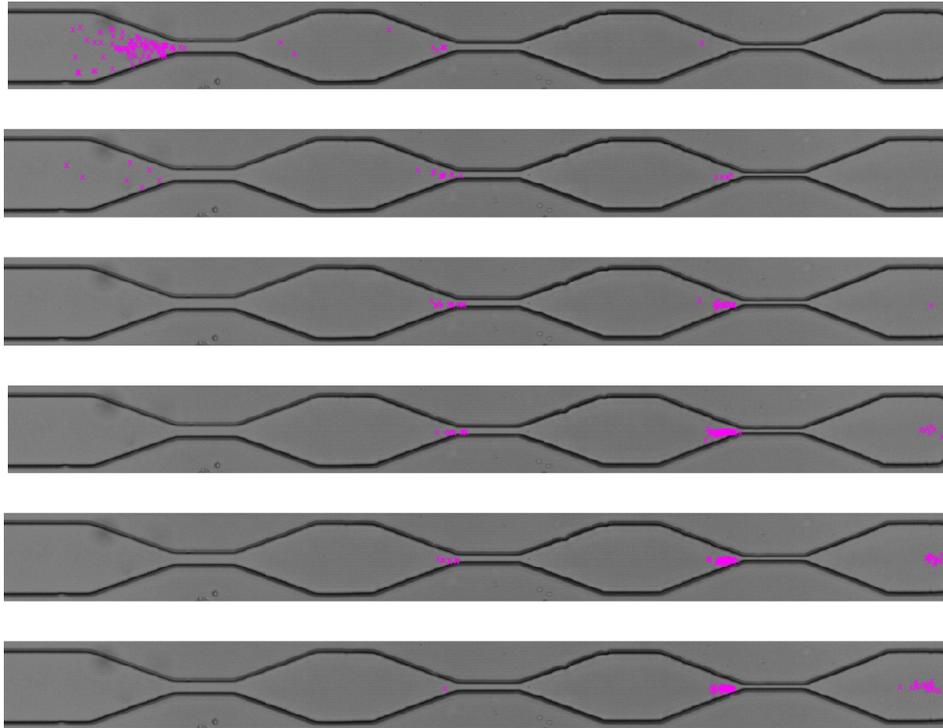


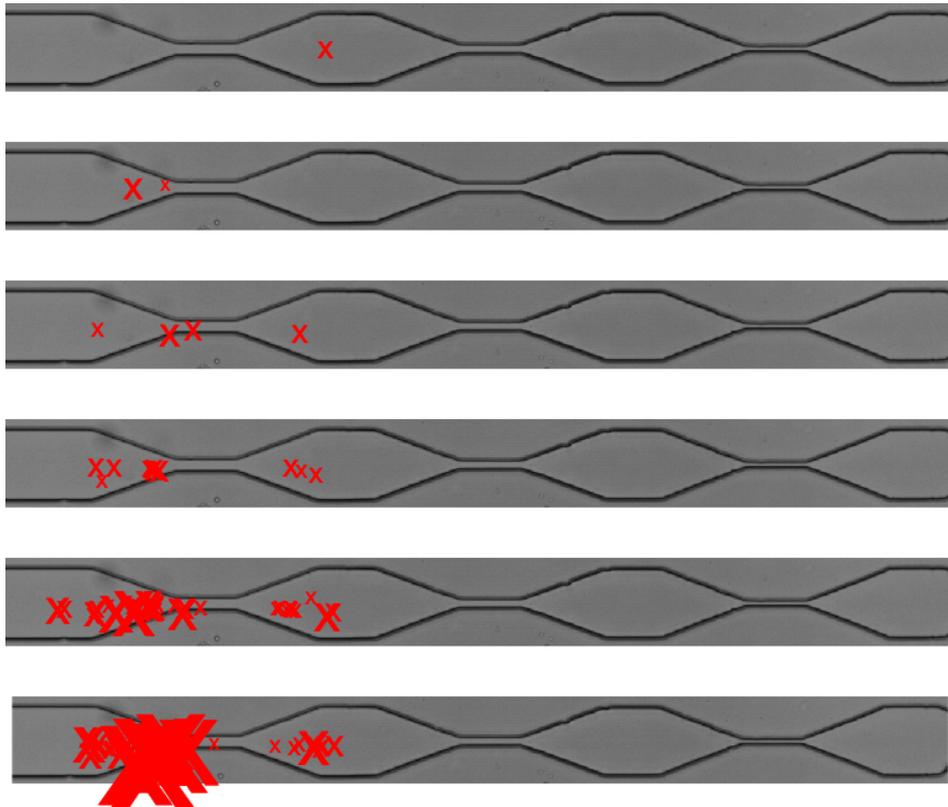
Abbildung B.17: Hier ist nach Rosettengröße sortiert von klein, Klasse 1, oben, erste Zeile, nach groß, Klasse 6, unten, letzte Zeile, das Ende aller Trajektorien an der entsprechenden Position eingezeichnet, vgl. Skript B.4 Figure (1) ab Zeile 47.

## B.4 SURF\_sort\_traces\_by\_rosette\_size.m

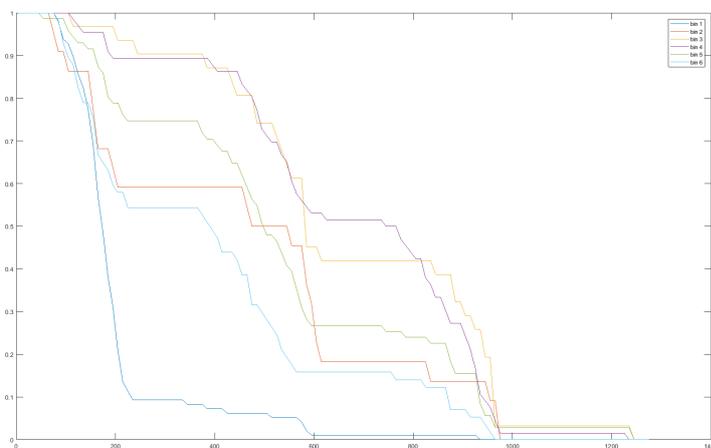
```

1  directory = 'E:\Stockholm March 2019\BGA\';
2  folders = [ 'BGA 7mm Standard 25mulh_20190318_152513\';
3            'BGA 5mm Standard 25mulh_20190319_133319\';
4            ...
5            'BGA 5mm 3EL 25mulh_20190319_150141\'];
6
7  for z=1:size(folders,1)
8      folder = directory + folders(z);
9      t = datetime('now');
10     disp(['## Start Folder ' num2str(z) ': ' datestr(t)]);
11     disp([ folder ]);
12     filename_eventgrid = sprintf('%sevent_counter_grid.txt', folder);
13     fid = fopen(filename_eventgrid);
14     firstline = fgetl(fid);
15     secline = fgetl(fid);
16     thirdline = fgetl(fid);
17     meanx = fgetl(fid);
18     flowrate = fgetl(fid); %preliminary flowrate from textreader
19     flowrate = erase(flowrate, 'flow rate (mul/h): ');
20     flowrate = str2num(flowrate);
21     single_cell_size = fgetl(fid); % [5 1 5 2]
22     single_cell_size = erase(single_cell_size, 'single cell size (px): ');
23     single_cell_size = str2num(single_cell_size);
24     fclose(fid);
25
26     %%read tracing files
27     file_dir = char(folder + 'SURF_trace*.txt');
28     txt_trace_list = dir(file_dir);
29     nr_of_traces = numel(txt_trace_list); % Count, Anzahl Bilder im Ordner
30     rosettes = zeros(nr_of_traces,3);
31     rosettes_sorted = cell(6, 1);
32     trace_imported = cell(nr_of_traces,1);
33     for t = 1:nr_of_traces
34         filename_trace_t = sprintf('%sSURF_trace %d.txt', folder, t);
35         trace_imported{t} = dlmread(filename_trace_t, ',', 7, 0);
36         rosettes(t,1) = trace_imported{t}(1,5)/single_cell_size; %area
37         rosettes(t,2) = trace_imported{t}(end,3); %end x
38         rosettes(t,3) = trace_imported{t}(end,4); %end y
39     end
40
41     %%categorize rosettes by size in classes 1-6
42     X=rosettes(:,1);
43     hist_edges = [1.11 2.22 3.33 4.44 5.56 7.78 30];
44     hist_mitte = hist_edges+0.555;
45     [N,edges,bin] = histcounts(X,hist_edges);
46
47     background_filename = sprintf('%sBG.png', folder);
48     bg = imread(background_filename);
49
50     figure(1)
51     clf;
52     filename = char(folder + 'ends cat rosette size.png');
53     hold on
54     for bin_nr = 1:6
55         subplot(6, 1, bin_nr);
56         imshow(uint8(bg));
57         bin_indices = find(bin == bin_nr); % bin index = row in rosettes = nr of trace
58         if ~isempty(bin_indices)
59             for r = 1:size(bin_indices)

```



**Abbildung B.18:** Hier ist nach Rosettengröße sortiert von klein, Klasse 1, oben, erste Zeile, nach groß, Klasse 6, unten, letzte Zeile, die *real rupture* Ereignisse aller Trajektorien an der entsprechenden Position eingezeichnet, vgl. Skript B.4 Figure (2) ab Zeile 178. Die Größe der Symbole ist mit der verlorenen Fläche skaliert.



**Abbildung B.19:** Anteil der unbeschädigten Rosetten nach Rosettengröße sortiert entlang des Kanals, vgl. Skript B.4 Figure (3) ab Zeile 206.

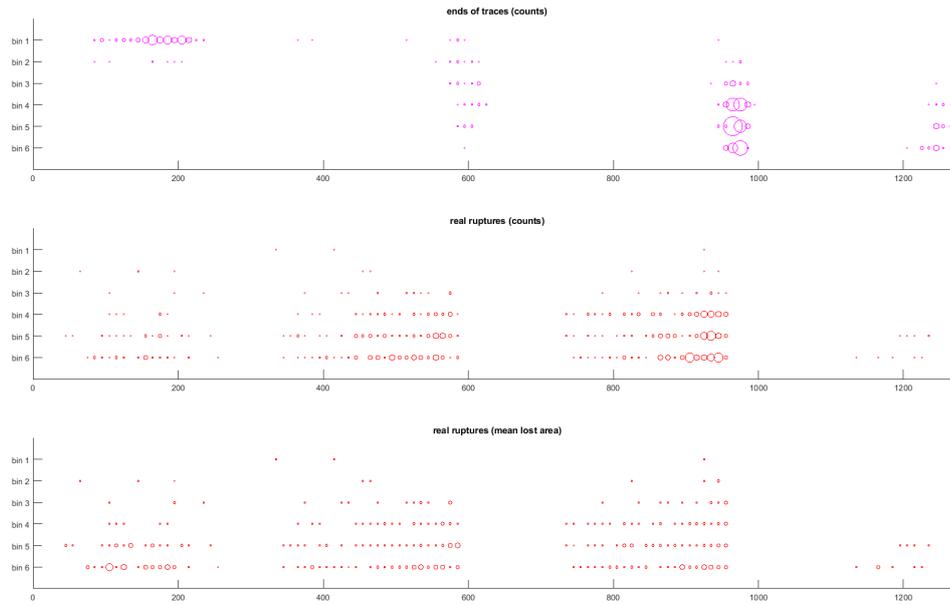


Abbildung B.20: Häufigkeit der Ereignisse nach Rosettengröße sortiert von klein, Klasse 1, oben, erste Zeile, nach groß, Klasse 6, unten, letzte Zeile, aller Trajektorien an der entsprechenden x-Position, vgl. Skript B.4 Figure (4) ab Zeile 233. Die Größe der Symbole skaliert mit der relativen Häufigkeit.

```

60         text(rosettes(bin_indices(r),2), rosettes(bin_indices(r),3), sprintf('x'), 'Color', 'm', '
61             FontSize', 10, 'FontWeight', 'normal');
62         rosettes_sorted{bin_nr}(r,1)=bin_indices(r);
63         rosettes_sorted{bin_nr}(r,2:4)=rosettes(bin_indices(r),:);
64     end
65 end
66 hold off
67 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
68 set(gcf, 'color', 'white');
69 export_fig(filename);
70
71 %%calculate flowrate in each class
72 dt = 0.0005; %delay frames (s)
73 canal_depth = 8*10^-6;
74 meter_per_pixel = 0.55*10^-6;
75 canal_crosssection = 90*meter_per_pixel*canal_depth;
76 flowrates = zeros(nr_of_traces,6);
77 for t = 1:nr_of_traces
78     flowrates(t,1)=t;
79     flowrates(t,2)=bin(t);
80     if size(trace_imported{t,1},1) > 9 %at least 10 tracing steps
81         step = 2;
82         dx = 0;
83         while dx < 200 && size(trace_imported{t,1},1) > step %find first 200 pixels of trace
84             dx = trace_imported{t,1}(step,3)-trace_imported{t,1}(1,3); %letzter x-wert - erster x wert
85             step = step+1;
86         end
87         flowrates(t,3)=dx;
88         dy = trace_imported{t,1}(step,4)-trace_imported{t,1}(1,4); %letzter y wert - erster y wert
89         flowrates(t,4)=dy;
90         velocity = (meter_per_pixel/((step-1)*dt))*sqrt(dx^2+dy^2);
91         flowrates(t,5)=velocity;
92         flowrate = canal_crosssection*velocity*3600*10^9;
93         flowrates(t,6)=flowrate;
94     end
95 end
96 counter_flow = zeros(1,6);
97 medians_flow = zeros(1,6);
98 for bin_nr = 2:6
99     bin_indices = find(bin == bin_nr); % bin index = row in rosettes = nr of trace
100    if ~isempty(bin_indices)
101        for r = 1:size(bin_indices)
102            if flowrates(bin_indices(r),6) ~= 0
103                counter_flow(1,bin_nr) = counter_flow(1,bin_nr)+1;
104                medians_flow(1,bin_nr) = medians_flow(1,bin_nr)+flowrates(bin_indices(r),6);
105            end
106        end
107    end
108 end
109 total_median_flow = sum(medians_flow)/sum(counter_flow);
110 median_2and3 = (medians_flow(2)+medians_flow(3))/(counter_flow(2)+counter_flow(3));
111 medians_flow = medians_flow./counter_flow;
112
113
114 SizeFileName = folder + 'flowrates_by_size.txt';
115 fid = fopen(SizeFileName, 'w');
116 if fid == -1
117     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
118     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'results SURF', folder);
119     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'total traces: ', num2str(nr_of_traces));
120     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'flow rate median (mul/h): ', num2str(total_median_flow));
121     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'flow rate class 2 and 3 (mul/h): ', num2str(median_2and3));
122     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'single cell size (px): ', num2str(single_cell_size));
123     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'edges of bins for rosette size (norm): ', num2str(hist_edges));
124     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'counts: ', num2str(N));
125     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'relative frequencies (counts/counts total): ', num2str(N/sum(N)));
126     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'counts (length>9): ', num2str(counter_flow));
127     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'medians flow: ', num2str(medians_flow));
128     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
129     fprintf(fid, '%s\r\n', 'trace class dx dy velo flowrate');
130 end
131 fclose(fid);

```

## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow

```

132 dlmwrite(SizeFileName, flowrates, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
133
134 %%export rosettes sorted by size
135
136 rosettes_sorted_columns = NaN (max(N), 6);
137 for bin_nr = 1:6
138     if N(bin_nr) > 0
139         rosettes_sorted_columns(1:N(bin_nr), bin_nr) = rosettes_sorted{bin_nr}(:, 2);
140     end
141 end
142 SizeFileName = folder + 'rosettes_by_size.txt';
143 fid = fopen(SizeFileName, 'w');
144 if fid ~= -1
145     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====' );
146     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'results SURF', folder );
147     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'total traces: ', num2str(nr_of_traces) );
148     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'flow rate (mul/h): ', num2str(flowrate) );
149     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'single cell size (px): ', num2str(single_cell_size) );
150     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'edges of bins for rosette size (norm): ', num2str(hist_edges) );
151     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'counts: ', num2str(N) );
152     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'relative frequencies (counts/counts total): ', num2str(N/sum(N)) );
153     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====' );
154 end
155 fclose(fid);
156 dlmwrite(SizeFileName, rosettes_sorted_columns, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
157
158
159
160 %%count events for each rosette size
161 x_steps = 0:10: size(bg, 2);
162 x_steps_center = x_steps + 5;
163 x_steps_center(:, size(x_steps, 2)) = [];
164 grid = zeros(6, size(x_steps_center, 2)); %6 lines for 6 bins
165 counter_endings = grid;
166 for bin_nr = 1:6
167     if isempty(rosettes_sorted{bin_nr})
168         X = rosettes_sorted{bin_nr}(:, 3);
169         [counter_endings_binnr, edgesends, binends] = histcounts(X, x_steps);
170         counter_endings(bin_nr, :) = counter_endings_binnr;
171     end
172 end
173
174 %%real ruptures
175 counter_realruptures = grid;
176 sum_area_realruptures = grid;
177 mean_area_realruptures = grid;
178
179
180 figure(2)
181 clf;
182 filenamerupt = char(folder + 'real rupt cat rosette size.png');
183 hold on
184 for bin_nr = 1:6
185     subplot(6, 1, bin_nr);
186     imshow(uint8(bg));
187     for r = 1: size(rosettes_sorted{bin_nr}, 1)
188         rr_ind = find(trace_imported{rosettes_sorted{bin_nr}(r, 1)}(:, 15) == 1); %column 15 = cat event,
189             '1' = real rupture
190         if isempty(rr_ind)
191             for s = 1: size(rr_ind)
192                 x_koor = trace_imported{rosettes_sorted{bin_nr}(r, 1)}(rr_ind(s), 3);
193                 y_koor = trace_imported{rosettes_sorted{bin_nr}(r, 1)}(rr_ind(s), 4);
194                 lost = - trace_imported{rosettes_sorted{bin_nr}(r, 1)}(rr_ind(s), 14); %column 14 = area
195                     lost in pixels
196                 text(x_koor, y_koor, sprintf('x', 'Color', 'r', 'FontSize', lost/10, 'FontWeight', '
197                     normal'));
198                 counter_realruptures(bin_nr, floor(x_koor/10)) = counter_realruptures(bin_nr, floor(
199                     x_koor/10)) + 1;
200                 sum_area_realruptures(bin_nr, floor(x_koor/10)) = sum_area_realruptures(bin_nr, floor(
201                     x_koor/10)) + lost;
202             end
203         end
204     end
205 hold off
206 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
207 set(gcf, 'color', 'white')
208 export_fig(filenamerupt);
209
210 counter_undamaged = grid;
211 relfreq_undamaged = grid;
212 figure(3)
213 clf;
214 filenameund = char(folder + 'undamaged cat rosette size.png');
215 for bin_nr = 1:6
216     for r = 1: size(rosettes_sorted{bin_nr}, 1)
217         rr_ind = find(trace_imported{rosettes_sorted{bin_nr}(r, 1)}(:, 15) == 1, 1); %first rupture, column
218             15 = cat event, '1' = real rupture
219         if isempty(rr_ind)
220             rr_ind = size(trace_imported{rosettes_sorted{bin_nr}(r, 1)});
221         end
222         x_koor = trace_imported{rosettes_sorted{bin_nr}(r, 1)}(rr_ind(1), 3);
223         und_vector = grid(1, :);
224         und_vector(:, 1: floor(x_koor/10)) = 1; %value 1 as long as undamaged, then 0
225         counter_undamaged(bin_nr, :) = counter_undamaged(bin_nr, :) + und_vector;
226     end
227 end
228 relfreq_undamaged(bin_nr, :) = counter_undamaged(bin_nr, :) / N(bin_nr);
229
230 plot(x_steps_center, relfreq_undamaged);
231 legend('bin 1', 'bin 2', 'bin 3', 'bin 4', 'bin 5', 'bin 6')
232 %%plot matrix zeilenweise undamaged
233 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
234 set(gcf, 'color', 'white')
235 export_fig(filenameund);
236
237 %%plots event counts
238 figure(4)
239 clf;
240 filenameevents = char(folder + 'event counts cat rosette size.png');
241 subplot(3, 1, 1);
242 title(sprintf('ends of traces (counts)'));
243 hold on
244 for i = 1: size(grid, 2)
245     for j = 1: size(grid, 1)
246         if counter_endings(j, i) > 0
247             rel_fontsize = round(counter_endings(j, i));
248             plot(x_steps_center(1, i), -j, 'Marker', 'o', 'MarkerSize', rel_fontsize, 'Color', 'm');

```

```

246         %text(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize',
247             rel_fontsize, 'FontWeight', 'bold');
248     end
249 end
250 xlim([0 size(bg,2)]);
251 ylim([-7 0]);
252 set(gca, 'ytick', [-6 -5 -4 -3 -2 -1]);
253 set(gca, 'yticklabels', {'bin 6', 'bin 5', 'bin 4', 'bin 3', 'bin 2', 'bin 1'});
254 hold off
255
256 subplot(3, 1, 2);
257 title(sprintf('real ruptures (counts)'));
258 hold on
259 for i = 1:size(grid,2)
260     for j = 1:size(grid,1)
261         if counter_rearuptures(j,i)>0
262             mean_area_rearuptures(j,i) = sum_area_rearuptures(j,i)/counter_rearuptures(j,i);
263             rel_fontsize = round(counter_rearuptures(j,i));
264             plot(x_steps_center(1, i), -j, 'Marker', 'o', 'MarkerSize', rel_fontsize, 'Color', 'r');
265             %text(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize',
266                 rel_fontsize, 'FontWeight', 'bold');
267         end
268     end
269
270 xlim([0 size(bg,2)]);
271 ylim([-7 0]);
272 set(gca, 'ytick', [-6 -5 -4 -3 -2 -1]);
273 set(gca, 'yticklabels', {'bin 6', 'bin 5', 'bin 4', 'bin 3', 'bin 2', 'bin 1'});
274 hold off
275
276 subplot(3, 1, 3);
277 title(sprintf('real ruptures (mean lost area)'));
278 hold on
279 for i = 1:size(grid,2)
280     for j = 1:size(grid,1)
281         if mean_area_rearuptures(j,i) > 0
282             rel_fontsize = round(0.01*mean_area_rearuptures(j,i));
283             plot(x_steps_center(1, i), -j, 'Marker', 'o', 'MarkerSize', rel_fontsize, 'Color', 'r');
284             %text(x_steps_center(1, i), y_steps_center(1, j), sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize',
285                 rel_fontsize, 'FontWeight', 'bold');
286         end
287     end
288
289 xlim([0 size(bg,2)]);
290 ylim([-7 0]);
291 set(gca, 'ytick', [-6 -5 -4 -3 -2 -1]);
292 set(gca, 'yticklabels', {'bin 6', 'bin 5', 'bin 4', 'bin 3', 'bin 2', 'bin 1'});
293 hold off
294 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
295 set(gcf, 'color', 'white');
296 export_fig (filenameevents);
297
298 EventFileName = folder + 'event_grid_by_size.txt';
299 fid = fopen(EventFileName, 'w');
300 if fid == -1
301     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
302     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'results SURF', folder);
303     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'total traces:', num2str(nr_of_traces));
304     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'flow rate (mul/h):', num2str(flowrate));
305     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'single cell size (px):', num2str(single_cell_size));
306     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'edges of bins for rosette size (norm):', num2str(hist_edges));
307     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'counts:', num2str(N));
308     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'relative frequencies (counts/counts total):', num2str(N/sum(N)));
309     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
310 end
311 fclose(fid);
312 dlmwrite(EventFileName, counter_endings, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
313 dlmwrite(EventFileName, counter_rearuptures, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
314 dlmwrite(EventFileName, mean_area_rearuptures, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
315 dlmwrite(EventFileName, relfreq_undamaged, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
316 close all
317 end

```

## B.5 SURF\_sort\_traces\_by\_rosette\_fate.m

```

1 directory = 'E:\Stockholm Marz 2019\';
2 folders = [ 'BGA\BGA 5mm Standard 25mulh_20190319_133319\';
3             'BGA\BGA 5mm 2EL 25mulh_20190319_143028\';
4             'BGA\BGA 5mm 3EL 25mulh_20190319_150141\'];
5 stenosis_end_x = [725;% 'BGA\BGA 5mm Standard 25mulh_20190319_133319\';
6                   925;% 'BGA\BGA 5mm 2EL 25mulh_20190319_143028\';
7                   1035;% 'BGA\BGA 5mm 3EL 25mulh_20190319_150141\'];
8
9 for z=1:size(folders,1)
10     folder = directory + folders(z);
11     t = datetime('now');
12     disp(['## Start Folder ' num2str(z) ': ' datestr(t)]);
13     disp([ folder ]);
14     filename_eventgrid = sprintf('%sevent_counter_grid.txt', folder);
15     fid = fopen(filename_eventgrid);
16     firstline = fgetl(fid);
17     secline = fgetl(fid);
18     thirdline = fgetl(fid);
19     meanx = fgetl(fid);
20     flowrate = fgetl(fid);
21     flowrate = erase(flowrate, 'flow rate (mul/h): ');
22     flowrate = str2num(flowrate);
23     single_cell_size = fgetl(fid);
24     single_cell_size = erase(single_cell_size, 'single cell size (px): ');
25     single_cell_size = str2num(single_cell_size);
26     fclose(fid);
27
28 %read tracing files
29 file_dir = char(folder + 'SURF_traces*.txt');
30 txt_trace_list = dir(file_dir);
31 nr_of_traces = numel(txt_trace_list); % Count, Anzahl trace*.txt im Ordner
32 rosettes = zeros(nr_of_traces,3); %matrix mit allen getrackten rosetten, spalten: rosettenflaeche, end x,
33     end y
34 rosettes_sorted_bin = cell(6,1); %cell mit matrix pro bin, spalten: #trace, ros_area, end x, end y, 1 or
35     0 (1=survived, 0=trace too short)
36 rosettes_sorted_undamaged = cell(6,1);
37 trace_imported = cell(nr_of_traces,1); %cell mit kompletten traces aus den txt files
38 counter_fate_traces = zeros(6,4); %Zeilen: Bins. Spalten: #all traces #survival #damaged #undamaged
39

```

## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow

```

38 for t = 1:nr_of_traces
39     filename_trace_t = sprintf('%sSURF_trace %d.txt', folder, t);
40     trace_imported{t} = dlmread(filename_trace_t, '', 7, 0);
41     rosettes(t,1) = trace_imported{t}(1,5)/single_cell_size; %area
42     rosettes(t,2) = trace_imported{t}(end,3);%end x
43     rosettes(t,3) = trace_imported{t}(end,4);%end y
44 end
45
46 %%categorize rosettes by size
47 X=rosettes(:,1);
48 %hist_edges=[200, 400, 600, 800, 1000, 1400, 5000];
49 hist_edges = [1.11 2.22 3.33 4.44 5.56 7.78 30];
50 hist_mitte = hist_edges+0.555;
51 [N,edges,bin] = histcounts(X,hist_edges);
52
53 background_filename = sprintf('%sBG.png', folder);
54 bg = imread(background_filename);
55
56 figure(1)
57 clf;
58 filename = char(folder + 'ends rosette size.png');
59 hold on
60 for bin_nr = 1:6
61     subplot(6, 1, bin_nr);
62     imshow(uint8(bg));
63     bin_indices = find(bin == bin_nr); % bin index = row in rosettes = nr of trace
64     if ~isempty(bin_indices)
65         for r = 1:size(bin_indices)
66             text(rosettes(bin_indices(r),2), rosettes(bin_indices(r),3), sprintf('x'), 'Color', 'm', '
67                 'FontSize', 10, 'FontWeight', 'normal');
68             rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)=bin_indices(r);
69             rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,2:4)=rosettes(bin_indices(r),:);
70             counter_fate_traces(bin_nr,1)=counter_fate_traces(bin_nr,1)+1; %count all
71             rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,5)=0;
72             if rosettes(bin_indices(r),2) > stenosis_end_x(z) %trace longer than stenosis?
73                 rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,5)=1;
74                 counter_fate_traces(bin_nr,2)=counter_fate_traces(bin_nr,2)+1; %count survival
75             end
76             %rosettes_sorted (#trace area/single_cell_size end_x end_y)
77         end
78     end
79 hold off
80 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
81 set(gcf, 'color', 'white');
82 export_fig(filename);
83
84 %%count events for each rosette size
85 x_steps = 0:10:size(bg,2);
86 x_steps_center = x_steps+5;
87 x_steps_center(:,size(x_steps,2))=[];
88 grid = zeros(6,size(x_steps_center,2)); %6 Zeilen fuer 6 bins
89 counter_endings = grid;
90 for bin_nr = 1:6
91     if ~isempty(rosettes_sorted_bin{bin_nr})
92         X=rosettes_sorted_bin{bin_nr}(:,3);
93         [counter_endings_binnr, edgesends, binends] = histcounts(X,x_steps);
94         counter_endings(bin_nr,:)=counter_endings_binnr;
95     end
96 end
97
98 %%real ruptures
99 counter_rearuptures_dam = grid;
100 sum_area_rearuptures_dam = grid;
101 counter_rearuptures = grid;
102 sum_area_rearuptures = grid;
103 mean_area_rearuptures = grid;
104 counter_undamaged = grid;
105 relfreq_undamaged = grid;
106 damaged_area = zeros(6,1);
107
108 figure(2)
109 clf;
110 filename_rupt = char(folder + 'real rupt cat rosette size.png');
111 hold on
112 for bin_nr = 1:6
113     subplot(6, 1, bin_nr);
114     imshow(uint8(bg));
115     for r = 1:size(rosettes_sorted_bin{bin_nr}, 1)
116         endstenosisline = find(trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(:,3) > stenosis_end_x(z)
117             , 1);
118         rr_ind = find(trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(1:endstenosisline,15)==1); %
119             column 15 = cat event, '1' = real rupture
120         if ~isempty(rr_ind)
121             for s=1:size(rr_ind)
122                 x_koor = trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(s),3);
123                 y_koor = trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(s),4);
124                 lost = - trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(s),14); %column 14 =
125                     area lost in pixels
126                 text(x_koor, y_koor, sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize', lost/10, 'FontWeight', '
127                     normal');
128                 counter_rearuptures(bin_nr, floor(x_koor/10))=counter_rearuptures_dam(bin_nr, floor(
129                     x_koor/10))+1;
130                 sum_area_rearuptures(bin_nr, floor(x_koor/10))=sum_area_rearuptures_dam(bin_nr, floor(
131                     x_koor/10))+lost;
132             end
133         end
134         if rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,5)==1
135             rr_ind = find(trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(1:endstenosisline,15)==1); %
136                 column 15 = cat event, '1' = real rupture
137             if ~isempty(rr_ind)
138                 for s=1:size(rr_ind)
139                     x_koor = trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(s),3);
140                     y_koor = trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(s),4);
141                     lost = - trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(s),14); %column 14 =
142                         area lost in pixels
143                     text(x_koor, y_koor, sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize', lost/10, 'FontWeight', '
144                         normal');
145                     counter_rearuptures_dam(bin_nr, floor(x_koor/10))=counter_rearuptures_dam(bin_nr,
146                         floor(x_koor/10))+1;
147                     sum_area_rearuptures_dam(bin_nr, floor(x_koor/10))=sum_area_rearuptures_dam(bin_nr
148                         , floor(x_koor/10))+lost;
149                     %
150                     %lost_area = trace_imported{rosettes_sorted{bin_nr}(r,1)}(1,5)-trace_imported{
151                         rosettes_sorted{bin_nr}(r,1)}(endstenosisline,5);
152                     if x_koor < stenosis_end_x(z)
153                         damaged_area(bin_nr) = damaged_area(bin_nr) + lost;
154                     end
155                 end
156             end
157         end
158     end
159 end

```

```

145     counter_fate_traces (bin_nr,3)=counter_fate_traces (bin_nr,3)+1;%counter damaged
146
147     end
148     if isempty(rr_ind)
149         rr_ind = size(trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)});
150         counter_fate_traces (bin_nr,4)=counter_fate_traces (bin_nr,4)+1;%counter undamaged
151     end
152     x_koor = trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(1),3);
153     und_vector = grid(1,:);
154     und_vector(:,1:floor(x_koor/10))=1;%value 1 as long as undamaged, then 0
155     counter_undamaged(bin_nr,:)=counter_undamaged(bin_nr,:)+und_vector;
156     %Liste der Nummern von undamaged traces je bin:
157     rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}=[rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}; rosettes_sorted_bin{
        bin_nr}(r,1)];
158     %max(counter_fate_traces(:,4)){bin_nr}(:,size(rosettes_undamaged{bin_nr},2)+1)=
        trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(:,10);
159     end
160 end
161 end
162 hold off
163 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
164 set(gcf, 'color', 'white')
165 export_fig (filenamerupt);
166 %cells for undamaged: v and epsilon
167 rosettes_undamaged_epsilon = cell(6, max(counter_fate_traces(:,4))">%pro bin eine cell fuer undamaged, v
        und epsilon
168 longest_trace = 10;
169
170 for bin_nr = 1:6
171     for rose_nr = 1:size(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr},1)%wie viele rosetten in diesem bin undamaged
172         rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}=trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(
            rose_nr,1)}(:,3);%3: x koordinate
173         rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(:,2)=trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}
            (rose_nr,1)}(:,10);%10: dx, 6:major, 7:minor
174
175         major = trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(rose_nr,1)}(:,6);
176         minor = trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(rose_nr,1)}(:,7);
177         rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(:,3)=major;
178         rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(:,4)=minor;
179         rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(:,5)=(major-minor)./(major+minor);
180         %rupture and reconnect aussortieren
181         for zeile = 2:size(rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr},1)
182             if trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(rose_nr,1)}(zeile,15) ==2 &&
                trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(rose_nr,1)}(zeile-1,15) ==2
183                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,2)=0;
184                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,3)=0;
185                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,4)=0;
186                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,5)=0;
187             end
188         end
189         if size(rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr},1)>longest_trace
190             longest_trace = size(rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr},1);
191         end
192     end
193 end
194 velocities = cell(6,1);
195 epsilons = cell(6,1);
196 velocities_list = cell(6,1);
197 velocities_sorted = cell(6,2);%(cell(:,1)=velocities_list_sorted, cell(:,2)=without duplicates
198 epsilons_list = cell(6,1);
199 epsilons_sorted = cell(6,2);
200
201 for bin_nr = 1:6
202     relfreq_undamaged(bin_nr,:) = counter_undamaged(bin_nr,:)/N(bin_nr);
203 end
204
205 lost_cells = sum_area_rearuptures./counter_rearuptures/single_cell_size;
206 lost_cells_dam = sum_area_rearuptures_dam./counter_rearuptures_dam/single_cell_size;
207
208 figure(3), clf;
209 for bin_nr = 1:6
210     subplot(6, 1, bin_nr);
211     bar(x_steps_center, lost_cells_dam(bin_nr,:));
212     text(stenosis_end_x(z), 0, sprintf('I'), 'Color', 'r', 'FontSize', 20, 'FontWeight', 'normal');
213     legend_entry = sprintf('bin %d', bin_nr);
214     legend(legend_entry)
215 end
216 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
217 set(gcf, 'color', 'white')
218
219 cells_lost_per_damaged_trace = damaged_area./counter_fate_traces(:,3)/single_cell_size;
220 FateFileName = folder + 'damaged_area.txt';
221 fid = fopen(FateFileName, 'w');%w=write=overwrite existing file
222 if fid == -1
223     fprintf(fid, '%s\r\n', '====');
224     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'results SURF', folder);
225     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'total traces:', num2str(nr_of_traces));
226     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'flow rate (mul/h):', num2str(flowrate));
227     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'single cell size (px):', num2str(single_cell_size));
228     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'edges of bins for rosette size (norm):', num2str(hist_edges));
229     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'counts:', num2str(N));
230     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'relative frequencies (counts/counts total):', num2str(N/sum(N)));
231     fprintf(fid, '%s\r\n', '====');
232     fprintf(fid, '%s\r\n', 'Zeilen: Bins. Spalten: #all traces #survival #damaged #undamaged');
233 end
234 fclose(fid);
235 dlmwrite(FateFileName, counter_fate_traces, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
236 fid = fopen(FateFileName, 'a');%a=append
237 if fid == -1
238     fprintf(fid, '%s\r\n', '====');
239     fprintf(fid, '%s\r\n', 'cells lost per damaged trace');
240 end
241 fclose(fid);
242 dlmwrite(FateFileName, cells_lost_per_damaged_trace, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset',
        1);
243
244 figure(4), clf;
245 filenameund = char(folder + 'undamaged_cat_rosette_size.png');
246 plot(x_steps_center, relfreq_undamaged);
247 legend('bin 1', 'bin 2', 'bin 3', 'bin 4', 'bin 5', 'bin 6')
248 %plot matrix zeilenweise undamaged
249 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
250 set(gcf, 'color', 'white')
251 export_fig (filenameund);
252
253
254
255
256
257 cells_lost_per_damaged_trace = damaged_area./counter_fate_traces(:,3)/single_cell_size;
258 FateFileName = folder + 'epsilon_fit_results.txt';

```

## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow

```
259 fid = fopen(FateFileName, 'w'); %w=write=overwrite existing file
260 if fid == -1
261     fprintf(fid, '%s\r\n', '====');
262     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'results SURF', folder);
263     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'total traces: ', num2str(nr_of_traces));
264     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'flow rate (mul/h): ', num2str(flowrate));
265     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'single cell size (px): ', num2str(single_cell_size));
266     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'edges of bins for rosette size (norm): ', num2str(hist_edges));
267     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'counts: ', num2str(N));
268     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'relative frequencies (counts/counts total): ', num2str(N/sum(N)));
269     fprintf(fid, '%s\r\n', '====');
270     fprintf(fid, '%s\r\n', 'Zeilen: Bins. Spalten: #all traces #survival #damaged #undamaged');
271 end
272 fclose(fid);
273 dlmwrite(FateFileName, counter_fate_traces, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
274 fid = fopen(FateFileName, 'a'); %a=append
275 if fid == -1
276     fprintf(fid, '%s\r\n', '====');
277     fprintf(fid, '%s\r\n', 'cells lost per damaged trace');
278 end
279 fclose(fid);
280 dlmwrite(FateFileName, cells_lost_per_damaged_trace, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
281
282
283 end
```

## B.6 SURF\_elastic\_modulus.m

```
1 directory = 'E:\Stockholm Marz 2019\';
2 folders = [ 'BGA\BGA 5mm Standard 25mulh_20190319_133319\';
3 'BGA\BGA 5mm 2EL 25mulh_20190319_143028\';
4 'BGA\BGA 5mm 3EL 25mulh_20190319_150141\'];
5 stenosis_end_x = [725; % 'BGA\BGA 5mm Standard 25mulh_20190319_133319\';
6 925; % 'BGA\BGA 5mm 2EL 25mulh_20190319_143028\';
7 1035]; % 'BGA\BGA 5mm 3EL 25mulh_20190319_150141\';
8
9 %%adjust length and width of stenosis
10 EL = 108; %Standard Elongationslaenge 108 Pixel
11 d1 = 88; %Breite Kanal in Pixel
12 d2 = 14; %Breite Stenose in Pixel
13
14 %%Farben Uni Augsburg
15 uni_gruen = [0 101/255 97/255];
16 uni_lila = [173/255 0 124/255]; %RGB: R:173 G:0 B:124
17 uni_gelb = [246/255 168/255 0]; %R:246 G:168 B:0
18 uni_orange = [ 235/255 105/255 11/255]; %R:235 G:105 B:11
19 uni_rot = [ 212/255 0 45/255]; %R:212 G:0 B:45
20 uni_hellblau = [0 174/255 207/255]; %R:0 G:174 B:207
21 uni_dunkelblau = [21/255 85/255 129/255]; %R:21 G:85 B:129
22 uni_hellgruen = [72/255 147/255 36/255]; %R:72 G:147 B:36
23 uni_grau = [179/255 179/255 179/255]; %R:179 G:179 B:179
24
25 for z=1:size(folders, 1)
26     close all
27     folder = directory + folders(z);
28     t = datetime('now');
29     disp(['## Start Folder ' num2str(z) ': ' datestr(t)]);
30     disp([ folder ]);
31     filename_eventgrid = sprintf('%sevent_counter_grid.txt', folder);
32     fid = fopen(filename_eventgrid);
33     firstline = fgetl(fid);
34     secline = fgetl(fid);
35     thirdline = fgetl(fid);
36     meanx = fgetl(fid);
37     flowrate = fgetl(fid);
38     flowrate = erase(flowrate, 'flow rate (mul/h): ');
39     flowrate = str2num(flowrate);
40     single_cell_size = fgetl(fid);
41     single_cell_size = erase(single_cell_size, 'single cell size (px): ');
42     single_cell_size = str2num(single_cell_size);
43     fclose(fid);
44
45 %%read tracing files
46 file_dir = char(folder + 'SURF_trace*.txt');
47 txt_trace_list = dir(file_dir);
48 nr_of_traces = numel(txt_trace_list); % Count, Anzahl trace*.txt im Ordner
49 rosettes = zeros(nr_of_traces, 3); %matrix mit allen getrackten rosetten, spalten: rosettenflaeche, end x,
50     end y
51     rosettes_sorted_bin = cell(6, 1); %cell mit matrix pro bin, spalten: #trace, ros_area, end x, end y, 1 or
52     0 (1=survived, 0=trace too short)
53     rosettes_sorted_undamaged = cell(6, 1);
54     trace_imported = cell(nr_of_traces, 1); %cell mit kompletten traces aus den txt files
55     counter_fate_traces = zeros(6, 4); %Zeilen: Bins. Spalten: #all traces #survival #damaged #undamaged
56
57 for t = 1:nr_of_traces
58     filename_trace_t = sprintf('%sSURF_trace %d.txt', folder, t);
59     trace_imported{t} = dlmread(filename_trace_t, '\t', 7, 0);
60     rosettes(t, 1) = trace_imported{t}(1,5)/single_cell_size; %area
61     rosettes(t, 2) = trace_imported{t}(end, 3); %end x
62     rosettes(t, 3) = trace_imported{t}(end, 4); %end y
63 end
64
65 %%categorize rosettes by size
66 X=rosettes(:, 1);
67 hist_edges = [1.11 2.22 3.33 4.44 5.56 7.78 30];
68 hist_mitte = [1.86, 2.775, 3.885, 5, 6.67, 9];
69 Apixel=hist_mitte*single_cell_size;
70 rpixel=round(sqrt(Apixel/pi));
71 [N, edges, bin] = histcounts(X, hist_edges);
72
73 background_filename = sprintf('%sBG.png', folder);
74 bg = imread(background_filename);
75
76 figure(1)
77 clf;
78 filename = char(folder + 'ends rosette size.png');
79 hold on
80 for bin_nr = 1:6
81     subplot(6, 1, bin_nr);
82     imshow(uint8(bg));
83     bin_indices = find(bin == bin_nr); % bin index = row in rosettes = nr of trace
84     if ~isempty(bin_indices)
85         for r = 1:size(bin_indices)
86             text(rosettes(bin_indices(r), 2), rosettes(bin_indices(r), 3), sprintf('x'), 'Color', 'm', 'FontSize', 10, 'FontWeight', 'normal');
```

```

85         rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)=bin_indices(r);
86         rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,2:4)=rosettes(bin_indices(r),:);
87         counter_fate_traces (bin_nr,1)= counter_fate_traces (bin_nr,1)+1; %count all
88         rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,5)=0;
89         if rosettes(bin_indices(r),2) > stenosis_end_x(z) %trace longer than stenosis?
90             rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,5)=1;
91             counter_fate_traces (bin_nr,2)= counter_fate_traces (bin_nr,2)+1; %count survival
92         end
93         %rosettes_sorted (#trace area/single_cell_size end_x end_y)
94     end
95 end
96 hold off
97 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
98 set(gcf, 'color', 'white');
99 % export_fig (filename);
100
101 %%count events for each rosette size
102 x_steps = 0:10:size(bg,2);
103 x_steps_center = x_steps+5;
104 x_steps_center (:, size(x_steps,2))=[];
105 grid = zeros(6, size(x_steps_center,2)); %6 Zeilen fuer 6 bins
106 counter_endings = grid;
107 for bin_nr = 1:6
108     if ~isempty (rosettes_sorted_bin{bin_nr})
109         X=rosettes_sorted_bin{bin_nr}(:,3);
110         [counter_endings_binnr, edgesends, binends] = histcounts(X,x_steps);
111         counter_endings(bin_nr,:)=counter_endings_binnr;
112     end
113 end
114
115 %%real ruptures
116 counter_rearuptures_dam = grid;
117 sum_area_rearuptures_dam = grid;
118 counter_rearuptures= grid;
119 sum_area_rearuptures= grid;
120 mean_area_rearuptures = grid;
121 counter_undamaged = grid;
122 relfreq_undamaged = grid;
123 damaged_area = zeros(6,1);
124
125 figure(2)
126 clf;
127 filenamerupt = char(folder + 'real rupt cat rosette size.png');
128 hold on
129 for bin_nr = 1:6
130     subplot(6, 1, bin_nr);
131     imshow(uint8(bg));
132     for r = 1:size(rosettes_sorted_bin{bin_nr}, 1)
133         endstenosisline = find( trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(:,3) > stenosis_end_x(z)
134             , 1 );
135         rr_ind = find (trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(1:endstenosisline,15)==1); %
136             column 15 = cat event, '1' = real rupture
137         if ~isempty(rr_ind)
138             for s=1:size(rr_ind)
139                 x_koor = trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(s),3);
140                 y_koor = trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(s),4);
141                 lost = - trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(s),14); %column 14 =
142                     area lost in pixels
143                 text(x_koor, y_koor, sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize', lost/10 , 'FontWeight', '
144                     normal');
145                 counter_rearuptures (bin_nr, floor(x_koor/10))=counter_rearuptures_dam(bin_nr, floor(
146                     x_koor/10))+1;
147                 sum_area_rearuptures(bin_nr, floor(x_koor/10))=sum_area_rearuptures_dam(bin_nr, floor(
148                     x_koor/10))+lost;
149             end
150         if rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,5)==1
151             rr_ind = find (trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(1:endstenosisline,15)==1); %
152             column 15 = cat event, '1' = real rupture
153             if ~isempty(rr_ind)
154                 for s=1:size(rr_ind)
155                     x_koor = trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(s),3);
156                     y_koor = trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(s),4);
157                     lost = - trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(s),14); %column 14 =
158                         area lost in pixels
159                     text(x_koor, y_koor, sprintf('x'), 'Color', 'r', 'FontSize', lost/10 , 'FontWeight', '
160                         normal');
161                     counter_rearuptures_dam (bin_nr, floor(x_koor/10))=counter_rearuptures_dam(bin_nr,
162                         floor(x_koor/10))+1;
163                     sum_area_rearuptures_dam(bin_nr, floor(x_koor/10))=sum_area_rearuptures_dam(bin_nr
164                         , floor(x_koor/10))+lost;
165                     if x_koor < stenosis_end_x(z)
166                         damaged_area(bin_nr) = damaged_area(bin_nr) + lost;
167                     end
168                 end
169             counter_fate_traces (bin_nr,3)=counter_fate_traces (bin_nr,3)+1;%counter damaged
170         end
171         if isempty(rr_ind)
172             rr_ind = size(trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)});
173             counter_fate_traces (bin_nr,4)=counter_fate_traces (bin_nr,4)+1;%counter undamaged
174         end
175         x_koor = trace_imported{rosettes_sorted_bin{bin_nr}(r,1)}(rr_ind(1),3);
176         und_vector = grid(1,:);
177         und_vector (:,1:floor(x_koor/10))=1;%value 1 as long as undamaged, then 0
178         counter_undamaged(bin_nr,:)=counter_undamaged(bin_nr,:)+und_vector;
179         %Liste der Nummern von undamaged traces je bin:
180         rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}=[rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}; rosettes_sorted_bin{
181             bin_nr}(r,1)];
182     end
183 end
184 hold off
185 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
186 set(gcf, 'color', 'white')
187 export_fig (filenamerupt);
188
189 %%cell rosettes undamaged: v and epsilon
190 rosettes_undamaged_epsilon = cell(6, max(counter_fate_traces(:,4))); %pro bin eine cell fuer undamaged, v
191 und epsilon
192 longest_trace = 10;
193 for bin_nr = 1:6
194     for rose_nr = 1:size(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr},1)%wie viele rosetten in diesem bin undamaged
195         rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}=trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(
196             rose_nr,1)}(:,3); %3: x koordinate
197         rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(:,2)=trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}
198             }(rose_nr,1)}(:,10); %10: dx, 6:major, 7:minor
199     %area? fuer r0 zeile auswaehlen die am naechsten am stenosenstart ist.

```

## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow

```

189 startstenosisline = find(trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(rose_nr,1)}(:,3)>
190     stenosis_end_x(z)-2*EL-75-100, 1 );
191 area = trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(rose_nr,1)}(startstenosisline,5);
192 r0=sqrt(area/pi);
193 major = trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(rose_nr,1)}(:,6);
194 minor = trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(rose_nr,1)}(:,7);
195 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(:,3)=major;
196 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(:,4)=minor;
197 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(:,5)=(major-2*r0)/(2*r0);
198 %rupture and reconnect aussortieren
199 for zeile = 2:size(rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr},1)
200     if trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(rose_nr,1)}(zeile,15) ==2 &&
201         trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(rose_nr,1)}(zeile-1,15) ==2
202             rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,2)=0;
203             rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,3)=0;
204             rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,4)=0;
205             rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,5)=0;
206         elseif trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(rose_nr,1)}(zeile,15) ==4 &&
207             trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(rose_nr,1)}(zeile-1,15) ==4
208                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,2)=0;
209                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,3)=0;
210                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,4)=0;
211                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,5)=0;
212             elseif trace_imported{rosettes_sorted_undamaged{bin_nr}(rose_nr,1)}(zeile,15) ==3
213                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,2)=0;
214                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,3)=0;
215                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,4)=0;
216                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(zeile,5)=0;
217             end
218         end
219     if size(rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr},1)>longest_trace
220         longest_trace = size(rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr},1);
221     end
222 end
223 velocities = cell(6,1);
224 epsilons = cell(6,1);
225 velocities_list = cell(6,1);
226 velocities_sorted = cell(6,2);%(cell(:,1)=velocities_list_sorted, cell(:,2)=without duplicates
227 epsilons_list = cell(6,1);
228 epsilons_sorted =cell(6,2);
229 minor_list = cell(6,1);
230 minor_sorted =cell(6,2);
231 major_list = cell(6,1);
232 major_sorted =cell(6,2);
233 for bin_nr = 1:6
234     relfreq_undamaged(bin_nr,:) = counter_undamaged(bin_nr,:)/N(bin_nr);
235 end
236 lost_cells =sum_area_realruptures./counter_realruptures/single_cell_size ;
237 lost_cells_dam =sum_area_realruptures_dam./counter_realruptures_dam/single_cell_size ;
238 gauss = @(x, xdata)x(1)+x(4)/(x(3)*sqrt(pi/2))*exp(-2 * ((xdata - x(2))/x(3)).^ 2) ;
239 x_initvel = [5, 300, 100, 8000];
240 figure(4)
241 clf;
242 filenamevelo = char(folder + 'velocitiesneu.png');
243 for bin_nr = 2:6
244     subplot(2, 5, bin_nr-1);
245     for rose_nr = 1:size(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr},1)
246         plot(rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(:,1),rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}
247             }(:,2), 'x');
248         hold on;
249     end
250     legend_entry = sprintf('bin %d',bin_nr);
251     legend(legend_entry)
252     axis([0 1500 0 120])
253     title('single rosettes');
254     xlabel('x (pixel)');
255     ylabel('velocity (pixel/0.5ms)');
256 end
257 for bin_nr = 2:6
258     subplot(2, 5, bin_nr+4);
259     if ~isempty(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr})
260         for rose_nr = 1:size(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr},1)
261             %letzte Zeile weglassen, v nicht moeglich
262             %x berechnen =zwischenwert zwischen Bildern
263             x_vel = rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(1:end-1,1)+0.5*
264                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(1:end-1,2);
265             vel_list_here = [x_vel rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(1:end-1,2)];
266             for zeile = size(vel_list_here,1):-1:1
267                 if vel_list_here(zeile, 2)<=0 || vel_list_here(zeile, 1)>1100
268                     vel_list_here(zeile, :) = [];
269                 end
270             end
271             velocities_list{bin_nr} = [ velocities_list{bin_nr}; vel_list_here];
272         end
273         velocities_sorted{bin_nr,1} = sortrows(velocities_list{bin_nr,1});
274         velocities_sorted{bin_nr,2}(:,1) = [50:10:1090].'+5;
275         for k=1:size(velocities_sorted{bin_nr,2},1)
276             m = find ((velocities_sorted{bin_nr,1}(:,1))>=velocities_sorted{bin_nr,2}(k,1)-5);
277             l=find(velocities_sorted{bin_nr,1}(:,1)<=velocities_sorted{bin_nr,2}(k,1)+4);
278             g=intersect(m,l);
279             if ~isempty(g)
280                 velocities_sorted{bin_nr,2}(k,2)=mean(velocities_sorted{bin_nr,1}(g(1):g(end),2));
281             else
282                 velocities_sorted{bin_nr,2}(k,2)=NaN;
283             end
284         end
285         plot(velocities_sorted{bin_nr,2}(:,1), velocities_sorted{bin_nr,2}(:,2), 'x', 'Color', uni_gruen)
286         hold on;
287         legend_entry = sprintf('bin %d',bin_nr);
288         legend(legend_entry)
289         axis([0 1500 0 120])
290         title('smoothed curve');
291         xlabel('x (pixel)');
292         ylabel('velocity (pixel/0.5ms)');
293     end
294 end
295 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
296 set(gcf, 'color', 'white')
297 export_fig(filenamevelo);
298 counter_eps = zeros(6,1);
299 figure(5)
300 clf;
301 filenameepsi = char(folder + 'epsilons.png');
302 for bin_nr = 2:6

```

```

303     subplot(2,5,bin_nr-1);
304     if ~isempty(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr})
305         for rose_nr = 1:size(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr},1)
306             plot(rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(:,1),rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr,
307                 rose_nr}(:,5), '.');
308             hold on;
309             counter_eps(bin_nr,1)= counter_eps(bin_nr,1)+1;
310         end
311         legend_entry = sprintf('bin %d',bin_nr);
312         legend(legend_entry)
313         axis([0 1500 0 4])
314         title('single rosettes');
315         xlabel('x (pixel)');
316         ylabel('strain');
317     end
318     for bin_nr = 2:6
319         subplot(2,5,bin_nr+4);
320         if ~isempty(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr})
321             for rose_nr = 1:size(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr},1)
322                 eps_list_here = [rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(1:end-1,1)
323                     rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(1:end-1,5)];
324                 for zeile = size(eps_list_here,1):-1:1
325                     if eps_list_here(zeile, 2)<=0 || eps_list_here(zeile, 1)>1100
326                         eps_list_here(zeile, :)=[];
327                     end
328                 end
329                 epsilons_list{bin_nr}= [ epsilons_list{bin_nr}; eps_list_here];
330             end
331             epsilons_sorted{bin_nr,1} = sortrows(epsilons_list{bin_nr,1});
332             epsilons_sorted{bin_nr,2}(:,1) = [50:10:1090].'+5;
333             for k=1:size(epsilons_sorted{bin_nr,2},1)
334                 m = find ((epsilons_sorted{bin_nr,1}(:,1))>=epsilons_sorted{bin_nr,2}(k,1)-5));
335                 l=find(epsilons_sorted{bin_nr,1}(:,1)<=epsilons_sorted{bin_nr,2}(k,1)+4);
336                 g=intersect(m,l);
337                 if ~isempty(g)
338                     epsilons_sorted{bin_nr,2}(k,2)=mean(epsilons_sorted{bin_nr,1}(g(1):g(end),2));
339                 else
340                     epsilons_sorted{bin_nr,2}(k,2)=NaN;
341                 end
342             end
343             plot(epsilons_sorted{bin_nr,2}(:,1),epsilons_sorted{bin_nr,2}(:,2),'x', 'Color', uni_grau), hold
344                 on;
345             for zeile = size(epsilons_sorted{bin_nr,2},1):-1:1
346                 if epsilons_sorted{bin_nr,2}(zeile, 2)<0.1
347                     epsilons_sorted{bin_nr,2}(zeile, 2)=NaN;
348                 end
349             end
350             plot(epsilons_sorted{bin_nr,2}(:,1),epsilons_sorted{bin_nr,2}(:,2),'x', 'Color', uni_gruen)
351             hold on;
352             legend_entry = sprintf('bin %d',bin_nr);
353             legend(legend_entry)
354             axis([0 1500 0 4])
355             title('smoothed curve');
356             xlabel('x (pixel)');
357             ylabel('strain');
358         end
359     end
360     set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
361     set(gcf,'color','white');
362     export_fig(filenameepsi);
363     funcexpminor =@(x, xdata)-exp(x(2)*(xdata-x(1)))+x(3);
364     funcexpmajor =@(x, xdata)exp(x(2)*(xdata-x(1)))+x(3);
365     x_initdefvxs=[4*10^-6, 0.02, 0.2];
366     x_initrelaxvsx=[3*10^8, -0.02, 0.2];
367     xevenly=0.5:1000;
368     fitpara_vel = zeros(6,4);
369     xvelexp = zeros(6,3);
370     xvaluesvel = cell(6,1);
371     fitpara_eps = zeros(6,3);
372     fitpara_minor = zeros(6,3);
373     fitpara_major = zeros(6,3);
374     xvaluesdef=cell(6,1);
375     xrelaxvsx = zeros(6,3);
376     xvaluesrelax=cell(6,1);
377     velok=zeros(6,1);
378     velmax_x=zeros(6,1);
379     %r=[9, 11.7, 13.8, 15.6,18.1, 27]*0.5*10^-6;%m
380     v_results=zeros(105,30);
381     eps_results=zeros(105, 40);
382     figure(6)
383     clf;
384     filenamevfits = char(folder +'velocityvxs.png');
385     for bin_nr = 2:6
386         subplot(2,5,bin_nr-1);
387         if ~isempty(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr})
388             velocities_forfit =velocities_sorted{bin_nr,2};
389             for zeile = size(velocities_forfit,1):-1:1
390                 if isnan(velocities_forfit(zeile, 2))
391                     velocities_forfit(zeile, :)=[];
392                 end
393             end
394             plot(velocities_forfit(:,1),velocities_forfit(:,2), 'x-', 'Color', uni_grau);
395             hold on;
396             [m,mind]=min(abs(stenosis_end_x(z)-(velocities_forfit(:,1))));
397             [maxv,maxind]=max(velocities_forfit(1:mind,2));
398             x_initvel(2)=velocities_forfit(maxind,1);
399             x_initvel(1)=mean(velocities_forfit(1:5,2));
400             lb = [x_initvel(1),0.9*x_initvel(2),0,10^-3];
401             ub = [x_initvel(1),1.1*x_initvel(2),300,10^5];
402             fitpara_vel(bin_nr, :) = lsqcurvefit(gauss,x_initvel,velocities_forfit(1:mind,1),
403                 velocities_forfit(1:mind,2), lb, ub);
404             plot(xevenly,gauss(fitpara_vel(bin_nr,:),xevenly),'.', 'Color', uni_lila);
405             ydatavel = smoothdata(velocities_forfit(:, 2),'movmean',5);
406             plot(velocities_forfit(:, 1),ydatavel, '.','Color', uni_dunkelblau);
407             [maxv,maxind]=max(gauss(fitpara_vel(bin_nr,:),xevenly));
408             if maxv>(0.5*d1/d2)* median(gauss(fitpara_vel(bin_nr,:),xevenly))
409                 velok(bin_nr, 1) = 1;
410                 legend_entry = 'velocity ok';
411                 velmax_x(bin_nr, 1) = xevenly(maxind);
412             else
413                 legend_entry = 'velocity fail';
414             end
415             axis([0 1500 0 150])
416             legend(legend_entry);
417             title( num2str(bin_nr));

```

## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow

```

418     xlabel('x (pixel)');
419     ylabel('velocity (pixel/0.5ms)');
420     v_results(:, (bin_nr-2)*6+1)=velocities_sorted{bin_nr,2}(:,1);
421     v_results(:, (bin_nr-2)*6+2)=velocities_sorted{bin_nr,2}(:,2);
422     v_results(:, (bin_nr-2)*6+3)=gauss(fitpara_vel(bin_nr,:), velocities_sorted{bin_nr,2}(:,1));
423     [maxv, maxvind]= max(v_results(:, (bin_nr-2)*3+3));
424     v_results(:, (bin_nr-2)*6+4)=v_results(:, (bin_nr-2)*3+1)-v_results(maxvind, (bin_nr-2)*3+1);
425     v_baseline=mode(v_results(1:size(velocities_sorted{bin_nr,2}(:,1),1), (bin_nr-2)*3+3));
426     v_results(:, (bin_nr-2)*6+5)=v_results(:, (bin_nr-2)*3+2)/v_baseline;
427     v_results(:, (bin_nr-2)*6+6)=v_results(:, (bin_nr-2)*3+3)/v_baseline;
428     end
429 end
430 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
431 set(gcf, 'color', 'white');
432 export_fig(filename_vfits);
433 %%major and minor fits
434 counter_eps = zeros(6,1);
435 figure(7)
436 clf;
437 filenameminor = char(folder + 'minor.png');
438 for bin_nr = 2:6
439     subplot(2,5,bin_nr-1);
440     if ~isempty(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr})
441         for rose_nr = 1:size(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr},1)
442             plot(rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(:,1), rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr,
443                 rose_nr}(:,4), 'x');
444             hold on;
445             counter_eps(bin_nr,1)= counter_eps(bin_nr,1)+1;
446         end
447         legend_entry = sprintf('bin %d',bin_nr);
448         legend(legend_entry)
449         title('single rosettes');
450         xlabel('x (pixel)');
451         ylabel('minor');
452     end
453 end
454 for bin_nr = 2:6
455     subplot(2,5,bin_nr+4);
456     if ~isempty(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr})
457         for rose_nr = 1:size(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr},1)
458             minor_list_here = [rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(1:end-1,1)
459                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(1:end-1,4)];
460             for zeile = size(minor_list_here,1):-1:1
461                 if minor_list_here(zeile, 2)<=0 || minor_list_here(zeile, 1)>1100
462                     minor_list_here(zeile, :)=[];
463                 end
464             end
465             minor_list{bin_nr}= [ minor_list{bin_nr}; minor_list_here];
466         end
467         minor_sorted{bin_nr,1} = sortrows(minor_list{bin_nr,1});
468         minor_sorted{bin_nr,2}(:,1) = [50:10:1090].'+5;
469         for k=1:size(minor_sorted{bin_nr,2},1)
470             m = find ((minor_sorted{bin_nr,1}(:,1))>=minor_sorted{bin_nr,2}(k,1)-5);
471             l=find (minor_sorted{bin_nr,1}(:,1)<=minor_sorted{bin_nr,2}(k,1)+4);
472             g=intersect(m,l);
473             if ~isempty(g)
474                 minor_sorted{bin_nr,2}(k,2)=mean(minor_sorted{bin_nr,1}(g(1):g(end),2));
475             else
476                 minor_sorted{bin_nr,2}(k,2)=NaN;
477             end
478         end
479         plot(minor_sorted{bin_nr,2}(:,1), minor_sorted{bin_nr,2}(:,2), 'x', 'Color', uni_grau, hold on);
480         plot(minor_sorted{bin_nr,2}(:,1), minor_sorted{bin_nr,2}(:,2), 'x', 'Color', uni_gruen);
481         hold on;
482         legend_entry = sprintf('bin %d',bin_nr);
483         legend(legend_entry)
484         title('smoothed curve');
485         xlabel('x (pixel)');
486         ylabel('minor');
487     end
488 end
489 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
490 set(gcf, 'color', 'white');
491 export_fig(filenameminor);
492 counter_eps = zeros(6,1);
493 figure(8)
494 clf;
495 filenamemajor = char(folder + 'major.png');
496 for bin_nr = 2:6
497     subplot(2,5,bin_nr-1);
498     if ~isempty(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr})
499         for rose_nr = 1:size(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr},1)
500             plot(rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(:,1), rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr,
501                 rose_nr}(:,3), 'x'); %3=major, 4=minor, 5=epsilon
502             hold on;
503             counter_eps(bin_nr,1)= counter_eps(bin_nr,1)+1;
504         end
505         legend_entry = sprintf('bin %d',bin_nr);
506         legend(legend_entry)
507         title('single rosettes');
508         xlabel('x (pixel)');
509         ylabel('major');
510     end
511 end
512 for bin_nr = 2:6
513     subplot(2,5,bin_nr+4);
514     if ~isempty(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr})
515         for rose_nr = 1:size(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr},1)
516             major_list_here = [rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(1:end-1,1)
517                 rosettes_undamaged_epsilon{bin_nr, rose_nr}(1:end-1,3)];
518             for zeile = size(major_list_here,1):-1:1
519                 if major_list_here(zeile, 2)<=0 || major_list_here(zeile, 1)>1100
520                     major_list_here(zeile, :)=[];
521                 end
522             end
523             major_list{bin_nr}= [ major_list{bin_nr}; major_list_here];
524         end
525         major_sorted{bin_nr,1} = sortrows(major_list{bin_nr,1});
526         major_sorted{bin_nr,2}(:,1) = [50:10:1090].'+5;
527         for k=1:size(major_sorted{bin_nr,2},1)
528             m = find ((major_sorted{bin_nr,1}(:,1))>=major_sorted{bin_nr,2}(k,1)-5);
529             l=find (major_sorted{bin_nr,1}(:,1)<=major_sorted{bin_nr,2}(k,1)+4);
530             g=intersect(m,l);
531             if ~isempty(g)
532                 major_sorted{bin_nr,2}(k,2)=mean(major_sorted{bin_nr,1}(g(1):g(end),2));
533             else

```

```

533         major_sorted{bin_nr,2}(k,2)=NaN;
534     end
535
536     plot(major_sorted{bin_nr,2}(:,1),major_sorted{bin_nr,2}(:,2),'x','Color',uni_grau), hold on;
537     plot(major_sorted{bin_nr,2}(:,1),major_sorted{bin_nr,2}(:,2),'x','Color',uni_gruen)
538     hold on;
539     legend_entry = sprintf('bin %d',bin_nr);
540     legend(legend_entry)
541     title('smoothed curve');
542     xlabel('x (pixel)');
543     ylabel('major');
544 end
545
546 end
547 set(gcf,'Position',get(0,'Screensize'));
548 set(gcf,'color','white');
549 export_fig(filenameemajor);
550
551 %%
552 figure(9)
553 clf;
554 filenameellipsefits = char(folder+'ellipsevsx.png');
555 for bin_nr = 3:6
556     subplot(2,5,bin_nr-1);
557     if velok(bin_nr) &&~isempty(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr})
558         plot(minor_sorted{bin_nr,2}(:,1),minor_sorted{bin_nr,2}(:,2) ,'.','Color',uni_grau);
559         hold on;
560         %DEFORMATION FIT MINOR AXIS
561         minoraxisvsx = minor_sorted{bin_nr,2};
562         for zeile = size(minoraxisvsx,1):-1:1
563             if isnan(minoraxisvsx(zeile, 2))
564                 minoraxisvsx(zeile, :)=[];
565             end
566         end
567         [m,mind]=min(abs(stenosis_end_x(z)-(minoraxisvsx(:,1))));%values until stenosis end
568         [mindef, Mdef_idx]=min(minoraxisvsx(1:mind,2));
569         Mdef_idx=Mdef_idx-1;
570         if minoraxisvsx(Mdef_idx,1)-minoraxisvsx(Mdef_idx-1,1)>20
571             Mdef_idx=Mdef_idx-1;
572         end
573         Mdef =minoraxisvsx(Mdef_idx,2);
574         med_def= mean(minoraxisvsx(1:5,2));
575         xlinks = minoraxisvsx(1:Mdef_idx, 1);
576         x_initdefvst=[minoraxisvsx(Mdef_idx, 1),0.01, med_def];
577         [m,mind]=min(abs(stenosis_end_x(z)-75-50-2*EL-(minoraxisvsx(:,1))));
578         Bdef_idx=mind;
579         Bdef =minoraxisvsx(Bdef_idx,2);
580         xdatadef = minoraxisvsx(Bdef_idx:Mdef_idx, 1);%vs x
581         xvaluesdef{bin_nr}=xdatadef;
582         ydatadef = minoraxisvsx(Bdef_idx:Mdef_idx, 2);
583
584         lb = [0.5*x_initdefvst(1),0,med_def];
585         ub = [1.5*x_initdefvst(1),0.2,med_def];
586         fitpara_minor(bin_nr, :) = lsqcurvefit(funcexpminor,x_initdefvst, xdatadef,ydatadef, lb, ub);
587         plot(minoraxisvsx(1:Mdef_idx, 1),funcexpminor(fitpara_minor(bin_nr, :),minoraxisvsx(1:Mdef_idx,
588             1)),'-', 'Color', uni_gruen);
589         plot(xlinks,funcexpminor(x_initdefvst,xlinks),'-k');
590         plot(minoraxisvsx(Mdef_idx,1),minoraxisvsx(Mdef_idx,2) , 'xk');
591         plot(minoraxisvsx(Bdef_idx,1),minoraxisvsx(Bdef_idx,2) , 'xk');
592
593         legend_entry = sprintf('smoothed curve');
594         legend_def = ['$m_0$', num2str(fitpara_minor(bin_nr, 3)) ,'; \tau_{def}=',num2str(1/
595             fitpara_minor(bin_nr, 2)),$'];
596         legend({legend_entry, legend_def}, 'Interpreter', 'Latex','Location', 'northoutside');
597         titlebin =sprintf('class %d',bin_nr);
598         title(titlebin);
599         axis([0 800 0 50])
600         xlabel('x (pixel)');
601         ylabel('minor axis');
602         eps_results(:, (bin_nr-2)*6+1)=minor_sorted{bin_nr,2}(:,1);%ersatz fuer oben
603         eps_results(:, (bin_nr-2)*6+2)=minor_sorted{bin_nr,2}(:,2);
604         xvaluesminorfit=[55:10:minoraxisvsx(Mdef_idx, 1) ,'];
605         eps_results(1:size(xvaluesminorfit,1), (bin_nr-2)*6+3)=funcexpminor(fitpara_minor(bin_nr, :),
606             xvaluesminorfit);
607         subplot(2,5,bin_nr+4);
608         plot(major_sorted{bin_nr,2}(:,1),major_sorted{bin_nr,2}(:,2) ,'.','Color',uni_grau);
609         hold on;
610         %DEFORMATION FIT MAJOR AXIS
611         majoraxisvsx = major_sorted{bin_nr,2};
612         for zeile = size(majoraxisvsx,1):-1:1
613             if isnan(majoraxisvsx(zeile, 2))
614                 majoraxisvsx(zeile, :)=[];
615             end
616         end
617         [maxdef, Mdef_idx]=max(majoraxisvsx(1:Mdef_idx,2));
618         Mdefmajor =majoraxisvsx(Mdef_idx,2);
619         med_defmajor= mean(majoraxisvsx(1:5,2));
620         xlinks = majoraxisvsx(1:Mdef_idx, 1);
621         x_initdefvst=[majoraxisvsx(Mdef_idx, 1),0.01, med_defmajor];
622         Bdef =majoraxisvsx(Bdef_idx,2);
623         xdatadef = majoraxisvsx(Bdef_idx:Mdef_idx, 1);%vs x
624         ydatadef = majoraxisvsx(Bdef_idx:Mdef_idx, 2);
625
626         lb = [0.5*x_initdefvst(1),0,med_defmajor];
627         ub = [1.5*x_initdefvst(1),0.2,med_defmajor];
628         fitpara_major(bin_nr, :) = lsqcurvefit(funcexpmajor,x_initdefvst, xdatadef,ydatadef, lb, ub);
629         plot(majoraxisvsx(1:Mdef_idx, 1),funcexpmajor(fitpara_major(bin_nr, :),majoraxisvsx(1:Mdef_idx,
630             1)),'-', 'Color', uni_gruen);
631         plot(xlinks,funcexpmajor(x_initdefvst,xlinks),'-k');
632         plot(majoraxisvsx(Mdef_idx,1),majoraxisvsx(Mdef_idx,2) , 'xk');
633         plot(majoraxisvsx(Bdef_idx,1),majoraxisvsx(Bdef_idx,2) , 'xk');
634
635         legend_entry = sprintf('smoothed curve');
636         legend_def = ['$m_0$', num2str(fitpara_major(bin_nr, 3)) ,'; \tau_{def}=',num2str(1/
637             fitpara_major(bin_nr, 2)),$'];
638         legend({legend_entry, legend_def}, 'Interpreter', 'Latex','Location', 'northoutside');
639         titlebin =sprintf('class %d',bin_nr);
640         title(titlebin);
641         axis([0 800 0 100])
642         xlabel('x (pixel)');
643         ylabel('major axis');
644         eps_results(:, (bin_nr-2)*6+4)=major_sorted{bin_nr,2}(:,1);
645         xvaluesmajorfit=[55:10:majoraxisvsx(Mdef_idx, 1) ,'];
646         eps_results(1:size(xvaluesmajorfit,1), (bin_nr-2)*6+5)=funcexpmajor(fitpara_major(bin_nr, :),
647             xvaluesmajorfit);
648         eps_results(1:size(xvaluesmajorfit,1), (bin_nr-2)*6+6)= (eps_results(1:size(xvaluesmajorfit,1),
649             (bin_nr-2)*6+5)-2*rpixel(bin_nr))./(2*rpixel(bin_nr));
650
651 end
652 end
653 set(gcf,'Position',get(0,'Screensize'));
654

```

## B. SURF - SURvival of Rosettes in Flow

```
645 set(gcf,'color','white')
646 export_fig( filenameellipsefits);
647
648 %% SPANNUNGS_DEHNUNGS_DIAGRAMM
649 Lkanal = 1100;
650 xraster=1:1:Lkanal ;
651 L=80; %Stenosenlaenge
652 Lgesamt =2*EL+L;
653 FS=0*xraster; %Scherkraft
654 FC=0*xraster; %Stromungswiderstandskraft
655 mu=0.001; %pas
656 r=rpixel*0.55E-6;
657 Ap=pi()*r.^2;
658 Re=0*xraster; %Reynoldszahl
659 h=8*10^-6;
660 rho=1;
661 FTepsresults=zeros(500,30);
662 RateResults=zeros(6,6);
663 tkomp=zeros(1,6);
664 dsigmatd05=zeros(1,6);
665 dsigmatd075=zeros(1,6);
666 dsigmatdmax=zeros(1,6);
667 %Geschwindigkeit aus bin 3 bzw. kleinstmoeglicher bin, schoenste Kurve, kleinster Fehler, fuer
        Bestimmung der Kraft F Stenose
668 bin_nr=3;
669 while ~velok(bin_nr) || isempty(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr})
670     bin_nr=bin_nr+1;
671 end
672 velocities_smooth =velocities_sorted{bin_nr,2};
673 for zeile = size(velocities_smooth,1):-1:1
674     if isnan(velocities_smooth(zeile, 2))
675         velocities_smooth(zeile, :)=[];
676     end
677 end
678 velocities_smooth(:, 2)= smoothdata(velocities_smooth(:, 2), 'movmedian',5);
679 velocities_smooth(:, 2)= smoothdata(velocities_smooth(:, 2), 'movmean',5);
680 vpixel=interp1(velocities_smooth(:,1), velocities_smooth(:, 2),xraster, 'spline');
681 vpixel= smoothdata(vpixel, 'movmean',25);
682
683 v=vpixel*0.55*10^-6*2000;%pixel/0.5ms in m pro s
684 vpixelgauss=gauss(fitpara_vel(bin_nr,:),xraster);
685 [max_v, max_vidx] = max(vpixelgauss);
686 RateResults(bin_nr,1)=fitpara_vel(bin_nr,1)*0.55*10^-6*2000;
687 RateResults(bin_nr,2)=max_v;
688 mitte=max_vidx;
689
690 %% Kraft vs x und Spannungs-Dehnungs-Diagramm
691 for bin_nr=3:5
692     if velok(bin_nr) && ~isempty(rosettes_sorted_undamaged{bin_nr})
693         startEL=mitte-round(0.5*Lgesamt);
694         endEL = startEL+EL;
695         deltat=1./v(startEL:endEL);%pixel/m/s
696         tkomp(bin_nr)=sum(deltat)*0.55*10^-6;
697         d=0*xraster+d1;
698         for idx = startEL:endEL
699             d(idx)=d1-(xraster(idx)-startEL)*(d1-d2)/EL;
700             d(startEL+Lgesamt-(idx-startEL))=d(idx);
701         end
702         for idx = (endEL+1):(endEL+L-1)
703             d(idx)=d2;
704         end
705         dmum=d*0.55*10^-6;
706
707         for idx=1:size(xraster,2)
708             FS(idx)=2*pi()*v(idx)*mu*r(bin_nr);
709             Re(idx)=(4/3)*v(idx)*(rho/mu)*dmum(idx)*h/(dmum(idx)+h);
710             CD=(24/Re(idx))*(1+0.15*Re(idx)^0.681)+0.407/(1+(8710/Re(idx)));
711             FC(idx)=0.5*rho*(v(idx)^2)*CD*Ap(bin_nr);
712         end
713         FT=FC+FS;
714
715         filename=sprintf('HysteresisClass%d.png',bin_nr);
716         filename=char(folder +filename);
717         figure,
718         subplot(3, 4,1);
719         plot(xraster, dmum, '.');
720         xlim([startEL-50 startEL+Lgesamt+50]);
721         legend('d(x) in m');
722         subplot(3, 4,5);
723         plot(xraster, v, '.');
724         xlim([startEL-50 startEL+Lgesamt+50]);
725         legend('v(x) in m/s');
726         subplot(3, 4,2);
727         plot(xraster, FS, '.');
728         xlim([startEL-50 startEL+Lgesamt+50]);
729         legend('FShear(x)');
730         subplot(3, 4,9);
731         plot(xraster, Re, '.');
732         xlim([startEL-50 startEL+Lgesamt+50]);
733         legend('Re(x)');
734         subplot(3, 4,6);
735         plot(xraster, FC, '.');
736         xlim([startEL-50 startEL+Lgesamt+50]);
737         legend('FCcompressive(x)');
738         subplot(3,4,10);
739         plot(xraster, FT, '.');
740         xlim([startEL-50 startEL+Lgesamt+50]);
741         legend('FTTotal(x)');
742         epsfromfit= nonzeros(eps_results(:, (bin_nr-2)*6+6));
743         xdefevenly=eps_results(1, (bin_nr-2)*6+1):1:eps_results(size(epsfromfit), (bin_nr-2)*6+1);
744         subplot(3,4,3);
745         epsilondef=(funcexpmajor(fitpara_major(bin_nr, :), xdefevenly)-2*rpixel(bin_nr))./(2*rpixel(
            bin_nr));
746         plot(xdefevenly, epsilondef, '.', 'Color', uni_gruen); hold on;
747         legend('epsilon(x)')
748         xlabel('x(pixel)');
749         subplot(3,4,7);
750         sigmadef=0*epsilondef;
751         for i=1:size(epsilondef,2)
752             ahalbeAggr = 0.5*funcexpmajor(fitpara_major(bin_nr, :), xdefevenly(i));
753             bhalbeAggr = 0.5*funcexpminor(fitpara_minor(bin_nr, :), xdefevenly(i));
754             sigmasum=0;
755             ysum=0;
756             for xstep= round(ahalbeAggr)+1:1: round(ahalbeAggr)-1
757                 y= bhalbeAggr*sqrt(1-((xstep/ahalbeAggr)^2));
758                 sigmasum=sigmasum+FT((xdefevenly(i)+xstep))/(4*Ap(bin_nr))*y;%faktor 4 weil Flaeche
                    Kugel
759                 ysum=ysum+y;
760             end
761             sigmadef(i)=sigmasum/ysum;
```

```

762     end
763     plot(xdefevenly, sigmadef, '.', 'Color', uni_gruen); hold on;
764     legend('sigma(x)');
765     xlabel('x(pixel)');
766     subplot(3,4,4);
767     plot(epsilon_def, sigmadef, '.', 'Color', uni_gruen); hold on;
768     ylabel('sigma');
769     xlabel('epsilon');
770     legend_entry = sprintf('Class %d', bin_nr);
771     legend(legend_entry)
772     subplot(3,4,8);
773     deltat=(0.55E-6)./v(xdefevenly(1:end-1));
774     dsigmatd=diff(sigmadef)./deltat;
775     taxis=cumsum(deltat);
776     plot(taxis, dsigmatd); hold on;
777     [eps05, eps05ind]=min(abs(0.5-epsilon_def));%
778     dsigmatd05(bin_nr)=dsigmatd(eps05ind);
779     [eps075, eps075ind]=min(abs(0.75-epsilon_def));%
780     [dsigmatdmax(bin_nr), maxind]=max(dsigmatd);
781     if eps075ind <= size(dsigmatd, 2)
782         dsigmatd075(bin_nr)=dsigmatd(eps075ind);
783     elseif eps075ind > size(dsigmatd, 2)
784         dsigmatd075(bin_nr)=max(dsigmatd);
785     else
786         eps075ind=maxind;
787     end
788     plot(taxis(eps05ind), dsigmatd(eps05ind), 'x', 'Color', uni_gruen);
789     plot(taxis(eps075ind), dsigmatd075(bin_nr), 'x', 'Color', uni_hellblau);
790     plot(taxis(maxind), dsigmatdmax(bin_nr), 'x', 'Color', uni_rot);
791     FTepsresults(1:size(xdefevenly, 2), (bin_nr-2)*6+1)=xdefevenly;
792     FTepsresults(1:size(xdefevenly, 2), (bin_nr-2)*6+2)=FC(xdefevenly);
793     FTepsresults(1:size(xdefevenly, 2), (bin_nr-2)*6+3)=FS(xdefevenly);
794     FTepsresults(1:size(xdefevenly, 2), (bin_nr-2)*6+4)=FT(xdefevenly);
795     FTepsresults(1:size(xdefevenly, 2), (bin_nr-2)*6+5)=epsilon_def;
796     FTepsresults(1:size(xdefevenly, 2), (bin_nr-2)*6+6)=sigmadef;
797     set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
798     set(gcf, 'color', 'white');
799     export_fig(filename);
800 end
801
802 %% Export Ergebnisse
803 FTFileName = folder + 'FT_vs_epsilon.txt';
804 fid = fopen(FTFileName, 'w'); %w=write=overwrite existing file
805 if fid == -1
806     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
807     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'results SURF', folder);
808     fprintf(fid, '%s\r\n', 'Spalte 1-6: Class 2, Spalte 7-12: Class 3, ...');
809     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
810     fprintf(fid, '%s\r\n', 'Spalten: #x #FC #FS #FT #epsilon #sigma');
811 end
812 fclose(fid);
813 dlmwrite(FTFileName, FTepsresults, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
814
815 ExpFileName = folder + 'velocity_vs_x.txt';
816 fid = fopen(ExpFileName, 'w'); %w=write=overwrite existing file
817 if fid == -1
818     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
819     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'results SURF', folder);
820     fprintf(fid, '%s\r\n', 'FITS VELOCITY');
821     fprintf(fid, '%s\r\n', 'gauss = @(x, xdata)x(1)+x(4)/(x(3)*sqrt(pi/2))*exp(-2 * ((xdata - x(2))/x(3))^2)');
822     fprintf(fid, '%s\r\n', 'Zeile = Class, Spalten: x(1) x(2) x(3) x(4)');
823 end
824 fclose(fid);
825 dlmwrite(ExpFileName, fitpara_vel, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
826 fid = fopen(ExpFileName, 'a'); %w=write=overwrite existing file
827 if fid == -1
828     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
829     fprintf(fid, '%s\r\n', 'KOMPRIMIERUNGSZEIT');
830     fprintf(fid, '%s\r\n', 'Spalte = Class');
831 end
832 fclose(fid);
833 dlmwrite(ExpFileName, tkomp, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
834 fid = fopen(ExpFileName, 'a'); %w=write=overwrite existing file
835 if fid == -1
836     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
837     fprintf(fid, '%s\r\n', 'Spalten: #v_exp #v_fit #xnorm #v_expnorm #v_fitnorm');
838     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
839     fprintf(fid, '%s\r\n', 'Spalte 1-6: Class 2, Spalte 7-12: Class 3, Spalte 13-18: Class 4, ...');
840 end
841 fclose(fid);
842 dlmwrite(ExpFileName, v_results, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
843
844 ExpFileName = folder + 'epsilon_vs_x.txt';
845 fid = fopen(ExpFileName, 'w'); %w=write=overwrite existing file
846 if fid == -1
847     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
848     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'results SURF', folder);
849     fprintf(fid, '%s\r\n', 'FITS DEFORMATION MINOR');
850     fprintf(fid, '%s\r\n', 'funcexpminor = @(x, xdata)-exp(x(2)*(xdata-x(1)))+x(3)');
851     fprintf(fid, '%s\r\n', 'Zeile = Class, Spalten: x(1) x(2) x(3)');
852 end
853 fclose(fid);
854 dlmwrite(ExpFileName, fitpara_minor, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
855 fid = fopen(ExpFileName, 'a'); %w=write=overwrite existing file
856 if fid == -1
857     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
858     fprintf(fid, '%s\t%s\r\n', 'results SURF', folder);
859     fprintf(fid, '%s\r\n', 'FITS DEFORMATION MAJOR');
860     fprintf(fid, '%s\r\n', 'funcexpmajor = @(x, xdata)exp(x(2)*(xdata-x(1)))+x(3)');
861     fprintf(fid, '%s\r\n', 'Zeile = Class, Spalten: x(1) x(2) x(3)');
862 end
863 fclose(fid);
864 dlmwrite(ExpFileName, fitpara_major, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
865
866 fid = fopen(ExpFileName, 'a'); %w=write=overwrite existing file
867 if fid == -1
868     fprintf(fid, '%s\r\n', 'Spalte 1-6: Class 2, Spalte 7-12: Class 3, Spalte 13-18: Class 4, ...');
869     fprintf(fid, '%s\r\n', '=====');
870     fprintf(fid, '%s\r\n', 'Spalten: #x #minor_exp #minor_fit #major_exp #major_fit #eps');
871 end
872 fclose(fid);
873 dlmwrite(ExpFileName, eps_results, '-append', 'delimiter', '\t', 'newline', 'pc', 'roffset', 1);
874
875 end

```



## Danksagung

Am Ende meiner wunderbaren Zeit am Lehrstuhl für Experimentalphysik I möchte ich Danke sagen für fast sieben bunte Jahre, seit ich im Herbst 2014 mit der Projektarbeit in der Arbeitsgruppe für Biophysik angefangen habe.

Danke Christoph Westerhausen für die Betreuung, die Begleitung im ganzen Prozess, das Fördern und Machen lassen, das Vertrauen, die Diskussionen und den fachlichen Austausch. Danke für das Ermöglichen der vielen Dienstreisen, nicht nur die Aufenthalte in Stockholm, auch die vielen Konferenzen und natürlich den Austausch mit der UCSB in Kalifornien, und danke, dass du mit Micha auch fünf Wochen mit mir in Stockholm warst.

Danke Achim Wixforth für die Unterstützung, das uneingeschränkte Glauben an mich und die Anerkennung meiner Eignung für die wissenschaftliche Welt.

Danke Mats Wahlgren und besonders Kirsten Moll vom Karolinska Institut für die jahrelange Zusammenarbeit, du hast die vielen Forschungsaufenthalte möglich und angenehm gemacht, auf dich konnte man sich immer 100 % verlassen.

Danke Melanie Stamp für den Einstieg in die Biophysikgruppe und die schöne Zusammenarbeit, die jetzt Teil I meiner Doktorarbeit ausmacht. Und vor allem natürlich für die Venedigfahrten!

Danke Thomas Geislinger für den Kontakt zum Karolinska Institut und die Idee für das Projekt.

Danke Patrick Kudella für den Kontakt an die LMU zur Belichtung der Wafer mit dem ProtoLaser.

Danke für das Zuarbeiten an meine Schützlinge Jonas Reitler, Marie-Theres Gistel, Ahmed Mokhtar und Sophie Mauritz, sowie besonders Sebastian Angermann, Anabelle Schepp und Simon Neidinger, deren Arbeiten in diese Doktorarbeit eingeflossen sind.

Danke an Timm Krüger mit Adam Machon und Charles Zhou von der University of Edinburgh für das gemeinsame Simulationsprojekt, nachdem wir uns 2017 auf der EBSA in Edinburgh an meinem Poster kennengelernt hatten.

Thank you Prof. István Kézsmárki, for bringing Malaria research to Augsburg and being part of my exam committee as second examiner.

Danke an Alexander Hupfer und Sidi Lieber für die viele, schnelle Hilfe bei technischen Fragen und Equipment bis über Landesgrenzen hinaus.

Ich bin dankbar und glücklich, dass ich mit so vielen schönen Erinnerungen an Lehrstuhlseminare, Konferenzreisen, Retreats und einfach die Zeit im Büro mit gemeinsamen Feierabenden und so guten Freundschaften zurückblicken darf. Danke dafür an meine Bürojungs in 305 Andrej Kamenac, Max Gnedel, Max Sonner, Lukas Schnitzler, Matthias Küß, Alex Reiner, Nico Färber und Tobi Petzak, an Lisa Janker, Emeline Nysten und Matthias Weiß, und an Manuel Brugger.