

Lift-Effekt auf rote Blutkörperchen und Zellen im Mikrofluss und dessen Anwendung zur Zellsortierung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität Augsburg

von

Thomas M. Geislinger

Juli 2015



Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Franke
Zweitgutachter: Prof. Dr. Malte Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 2015

Inhaltsverzeichnis

1	Das Blut - Aus der Mythologie in die moderne Wissenschaft	1
1.1	Die Humoralpathologie nach Hippokrates und Galen	1
1.2	Die Entdeckung der roten Blutkörperchen	3
1.3	Blut - eine besondere Flüssigkeit	4
1.4	Die Entdeckung der Lift-Kräfte	6
1.5	Mikrofluidik macht's möglich	7
1.6	Überblick	8
2	Kurze Einführung in Hydrodynamik und Mikrofluidik	11
2.1	Die Bewegungsgleichung für Flüssigkeiten	11
2.1.1	Grundlegendes über Strömungen	12
2.1.2	Die Navier-Stokes-Gleichung	15
2.2	Mikrofluidik - Hydrodynamik im Mikrometerbereich	16
3	Zellen im Mikrofluss	19
3.1	Allgemeines zu roten Blutkörperchen	19
3.1.1	Erythropoese und allgemeine Eigenschaften	19
3.1.2	Zytoplasma und Aufbau der Zellmembran roter Blutkörperchen . . .	21
3.1.3	Die Rolle roter Blutkörperchen im Blutfluss	23
3.2	Deformierbarkeit roter Blutkörperchen	26
3.2.1	Einfluss der Zellgeometrie	27
3.2.2	Einfluss des Zytoplasmas	28
3.2.3	Einfluss der mechanischen Eigenschaften der Kompositmembran . .	28
3.2.4	Viskoelastizität roter Blutkörperchen	34
3.3	Dynamik roter Blutkörperchen im Scherfluss	36
3.3.1	Vesikel als Modellsystem für rote Blutkörperchen	37
3.3.2	Dynamische Bewegungsformen von Vesikeln im Scherfluss	37
3.3.3	Dynamische Bewegungsformen roter Blutkörperchen im Scherfluss .	40
3.4	Lift-Effekte auf Zellen im Scherfluss	43
3.4.1	Trägheitsbedingter Lift-Effekt	43
3.4.2	Trägheitsunabhängiger Lift-Effekt	46
3.4.3	Abgrenzung zu anderen Auftriebskräften	51
4	Experimentelle Methoden und Messaufbau	53
4.1	Probenpräparation	53

4.1.1	Vorbereitung der Blutproben	53
4.1.2	Vorbereitung der Probenlösungen	54
4.2	Messaufbau	54
4.2.1	Kanalherstellung	54
4.2.2	Versuchsaufbau	56
5	Experimente zur Dynamik roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss	59
5.1	Versuchsaufbau	59
5.2	Ergebnisse	60
5.2.1	Übergang ins Tank-Treading-Regime	60
5.2.2	Taylor-Deformation	62
5.2.3	Anstellwinkel roter Blutkörperchen im Tank-Treading-Zustand	63
5.3	Diskussion	64
5.3.1	Bewegungsregime und Taylor-Deformation	64
5.3.2	Anstellwinkel im TT-Zustand	66
6	Trägheitsunabhängiger Lift-Effekt auf Blutzellen im Poiseuille-Fluss	69
6.1	Versuchsaufbau und Beispielmessung	69
6.1.1	Versuchsaufbau	69
6.1.2	Beispielmessung	70
6.2	Ergebnisse und Diskussion	72
6.2.1	Steighöhen von roten Blutkörperchen, Blutplättchen und Mikrokugeln	72
6.2.2	Numerische Berechnung der Trajektorien	75
6.3	Zusammenfassung und Ausblick	77
7	Sortierung zirkulierender Tumorzellen	81
7.1	Biologische Grundlagen: Krebs, zirkulierende Tumorzellen und Metastasierung	81
7.2	Überblick: Mikrofluidische Methoden zur Zelltrennung	84
7.2.1	Motivation: Der Weg zum Labor-auf-einem-Chip	84
7.2.2	Charakterisierung von Zelltrennsystemen	86
7.2.3	Aktive, label-basierte Trennmethoden	87
7.2.4	Passive, label-freie Trennmethoden	87
7.3	NILICS - Non-Inertial Lift Induced Cell Sorting	94
7.3.1	Versuchsaufbau	94
7.3.2	Sortierung von MV3-Melanomzellen	98
7.3.3	Sortierung verschiedener Krebszellen aus Vollblut	102
7.3.4	Zusammenfassung und Ausblick	106
8	<i>Plasmodium falciparum</i>-infizierte rote Blutkörperchen im Mikrofluss	109
8.1	Malaria - Ein Überblick	109
8.2	Der Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	110
8.2.1	Merozoiten	112
8.2.2	Die Ring-Form	113
8.2.3	Trophozoiten	115

8.2.4	Schizonten	119
8.3	<i>P. falciparum</i> -infizierte rote Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss	119
8.3.1	Versuchsaufbau	120
8.3.2	Ergebnisse	122
8.3.3	Diskussion	125
8.3.4	Zusammenfassung, Interpretation und Ausblick	130
9	Anreicherung <i>P. falciparum</i>-infizierter roter Blutkörperchen im Ring-Stadium	135
9.1	Versuchsbeschreibung	136
9.1.1	Herstellung der Probenlösungen	136
9.1.2	Versuchsaufbau	136
9.1.3	Auswertung	137
9.2	Ergebnisse	137
9.3	Diskussion	138
9.4	Zusammenfassung und Ausblick	141
10	Zusammenfassung	143
11	Abschließender Ausblick	147
11.1	Dynamik roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss	147
11.2	Trägheitsunabhängiger Lift-Effekt und NILICS	148
A	Zur Dynamik roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss	151
B	Zum trägheitsunabhängigen Lift-Effekt auf Blutzellen im Poiseuille-Fluss	153
C	Zur Sortierung zirkulierender Tumorzellen	155
D	Zur Dynamik <i>Plasmodium falciparum</i>-infizierter RBK im Poiseuille-Fluss	157

Abbildungsverzeichnis

1.1	Herleitung der vier Humore.	2
1.2	Zeichnung roter Blutkörperchen von van Leeuwenhoek.	4
1.3	Ausbildung einer zellfreien Schicht am Rand kleiner Kapillaren.	6
2.1	Lineares Flussfeld zwischen zwei parallelen Platten.	12
2.2	Parabolisches Flussfeld zwischen zwei parallelen Platten.	14
3.1	Kolorierte elektronenmikroskopische Aufnahme von RBK, WBK und BP. . .	20
3.2	Schematischer Aufbau der RBK-Membran und des Zytoskeletts.	22
3.3	Druckabfall, Strömungsgeschwindigkeit und Querschnittsfläche der einzelnen Bereiche des menschlichen Herz-Kreislauf-Systems.	23
3.4	Effektive Viskosität von Blut über der angelegten Scherrate.	25
3.5	Schematische Darstellung der Deformation dünner Platten	30
3.6	Bewegungszustände von Vesikeln in Abhängigkeit von Kapillaritätszahl, Viskositätskontrast und Überschussfläche.	39
3.7	Schematische Darstellung der Rolling, Spinning und Swinging/Tank-Treading-Bewegung.	41
3.8	Trägheitsbedingte Lift-Kräfte und daraus resultierende Gleichgewichtsposition.	44
3.9	Ablösevorgang einer initial adhärenen Vesikel nach Anlegen einer Scherkraft.	47
3.10	Bezeichnung der elliptischen Hauptachsen einer tank-treadenden Vesikel in einem Strömungsfeld.	49
3.11	Abhängigkeit der dimensionslosen Driftgeschwindigkeit U vom Viskositätskontrast.	50
4.1	Soft Lithography-Prozess zur Herstellung von Mikrokanälen.	55
4.2	Messaufbau für die Untersuchungen der Zelldynamik und des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes.	57
4.3	Messaufbau für die Zellsortierung.	57
5.1	Videomikroskopieaufnahmen der verschiedenen Bewegungsformen roter Blutkörperchen.	60
5.2	Bewegungsformen roter Blutkörperchen in Abhängigkeit von der Scherspannung.	61
5.3	Taylor-Deformation und Anstellwinkel gesunder RBK über der Scherspannung.	62

6.1	Messprinzip und Auswertemethodik zum trägheitsunabhängigen Lift-Effekt auf RBK und BP	71
6.2	Höhe von Latex-Mikrokugeln am Kanal Anfang und -ende.	72
6.3	Höhe von RBK, BP und MK bei unterschiedlichen Flussparametern.	73
6.4	Trajektorie von RBK entlang des Kanals und Vergleich mit der Theorie	76
6.5	Sortierung von RBK und BP am Ende des Mikrokanals	80
7.1	Der Prozess der Metastasierung.	83
7.2	Schematische Darstellung der Mikrofiltrationsmechanismen.	88
7.3	Schematische Darstellung der Dean-Wirbel in einem gekrümmten Kanal. . .	92
7.4	NILICS - Trennprinzip für die CTC-Sortierung	95
7.5	Sortiereffizienz bei verschiedenen Hämatokritwerten und Flussratenverhältnissen.	99
7.6	Probenreinheit und Anreicherungsfaktor in Abhängigkeit von Hämatokrit und Flussratenverhältnis.	101
7.7	Sortiereffizienz für MV3-Zellen bei Hct = 40% und verschiedenen Flussratenverhältnissen.	103
7.8	Sortiereffizienz für MV3-, MCF-7- und HEPG2-Zellen bei verschiedenen Hämatokritwerten.	104
7.9	Anreicherungsfaktor und Probenreinheit für MV3-, MCF-7- und HEPG2-Zellen bei verschiedenen Hämatokritwerten.	105
8.1	Entwicklungsstadien im intraerythrozytären Zyklus von <i>P. falciparum</i>	112
8.2	Mikroskopische Abbildung der Entwicklungsstadien im IEZ von <i>P. falciparum</i>	113
8.3	Aufbau eines Parasiten im Ring-Stadium.	114
8.4	Aufbau eines Parasiten im Trophozoiten-Stadium.	116
8.5	Membran eines infizierten RBK.	117
8.6	Aufbau eines Parasiten im Schizonten-Stadium.	119
8.7	Schematische Darstellung des verwendeten Mikrokanals.	121
8.8	Taylor-Deformation und Bewegungszustand von RBK und iRBK über der Scherspannung.	122
8.9	Anstellwinkel von RBK und iRBK im TT-Zustand über der Scherspannung.	123
8.10	Trajektorien von RBK und iRBK entlang des Kanals bei verschiedenen Flussraten.	124
8.11	Experimentell bestimmte und numerisch berechnete Trajektorien für RBK und iRBK.	128
9.1	Trennkanal und -prinzip für die Anreicherung von iRBK im Ring-Stadium. . .	137
9.2	Beispiel-Ergebnis der Zytometrie-Auswertungen.	139
11.1	Steighöhen von WBK und KCL22-Leukämiezellen.	149

Tabellenverzeichnis

3.1	Mittlere Strömungsgeschwindigkeiten und mittlere Drücke im Körpergefäßsystem des Menschen.	36
5.1	Steighöhe, Taylor-Deformation, Anteil der Zellen im TT-Regime und Anstellwinkel roter Blutkörperchen bei verschiedenen Scherspannungen.	63
6.1	Durchschnittliche Steighöhen für RBK, BP und MK	74
6.2	Objekteigenschaften von RBK, BP und MK für die numerische Berechnung	75
6.3	Durchschnittliche Steighöhen für RBK, BP und MK im Vergleich mit den Ergebnissen der numerischen Rechnung	76
7.1	Zusammensetzung der untersuchten Probensuspensionen.	96
7.2	Höhen der Zellpopulationen aus der Beispielmessung.	97
8.1	Übersicht über die fünf für den Menschen infektiösen <i>Plasmodien</i>	111
9.1	Übersicht über die Ergebnisse der Zytometrie-Auswertungen.	140
A.1	Bewegungszustand roter Blutkörperchen bei verschiedenen Scherspannungen.	151
C.1	Übersicht über die Sortierparameter für die Messungen mit MV3-Zellen. . . .	155
C.2	Übersicht über die Sortierparameter für die Messungen mit MCF-7-Zellen. .	156
C.3	Übersicht über die Sortierparameter für die Messungen mit HEPG2-Zellen. .	156
D.1	Höhe von RBK und iRBK am Kanalende mit den zugehörigen Scherraten, -spannungen, der Anzahl der TT-Zellen, des Anstellwinkels und der Taylor-Deformation bei unterschiedlichen Volumenflüssen.	157

1. Das Blut - Aus der Mythologie in die moderne Wissenschaft

„Begin at the beginning,“ the King said, very gravely, „and go on till you come to the end: then stop.“

(Lewis Carroll, Alice's Adventures in Wonderland)

Blut regt schon seit jeher die menschliche Fantasie an und bereits die antiken Hochkulturen hatten die grundlegende Bedeutung von Blut für den Menschen erkannt. Zunächst wurde diese Erkenntnis aber vor einem mythologischen Hintergrund verarbeitet und so betrachteten zum Beispiel die alten Ägypter das Herz als den Sitz der Seele und ein Bad in Blut galt als Jungbrunnen [1]. Einige Jahrhunderte später wird in der griechischen Mythologie erzählt, wie Perseus die Gorgonin Medusa erschlägt und ihren Kopf als Trophäe an Athene überreicht. Als Göttin der Weisheit wusste Athene schon damals, dass Blut nicht gleich Blut ist: Der Sage nach birgt das Blut von der linken Seite des Medusenkopfes die „Geißel der Menschheit“, während das Blut von der rechten Seite das Leben schenken kann. Dieses heilbringende Blut der rechten Seite überreichte sie Asklepios, dem Gott der Medizin, der damit einen Toten auferwecken konnte [1]. Die Mystifizierung von Blut und die Auffassung von Krankheiten als Strafe der Götter waren weit verbreitet und verhinderten lange Zeit eine wissenschaftliche Erforschung des menschlichen Körpers, insbesondere des Blutes.

1.1. Die Humoralpathologie nach Hippokrates und Galen

Erste Ansätze, Krankheiten nicht als Strafe der Götter anzusehen, sondern ihre Ursache in irdischen Gründen zu suchen, machten die griechischen Naturphilosophen. Sie waren die ersten die begannen, krankheitsbedingte Vorgänge empirisch auszuwerten [2]. Im 6. Jahrhundert v. Chr. lehrte Pythagoras, dass Krankheiten aus einem Ungleichgewicht zwischen Körper und Seele entstünden. Im 5. Jahrhundert v. Chr. etablierte Empedokles die These, dass alles in der Welt als Kombination der vier Elemente Wasser, Luft, Erde und Feuer angesehen werden kann. Aus medizinischer Sicht verstand er Gesundheit und Krankheit deshalb als Gleichgewicht beziehungsweise Ungleichgewicht dieser vier Elemente [2]. In der 2. Hälfte des 5. Jahrhunderts v. Chr. verknüpfte Hippokrates schließlich die vier Elemente mit den vier Körpersäften *cholera* (gelbe Galle), *melancholia* (schwarze Galle), *sanguis* (Blut) und *phlegma* (Schleim).

Eine Vermutung, wie es zu dieser Verknüpfung kam, äußerte Fåhræus [3]. Sie ist in Abb. 1.1 dargestellt. Betrachtet man die Blutprobe eines gesunden Menschen, so gerinnt das Blut, bevor die zellulären Bestandteile absinken können. Als Folge erscheint die Blutprobe

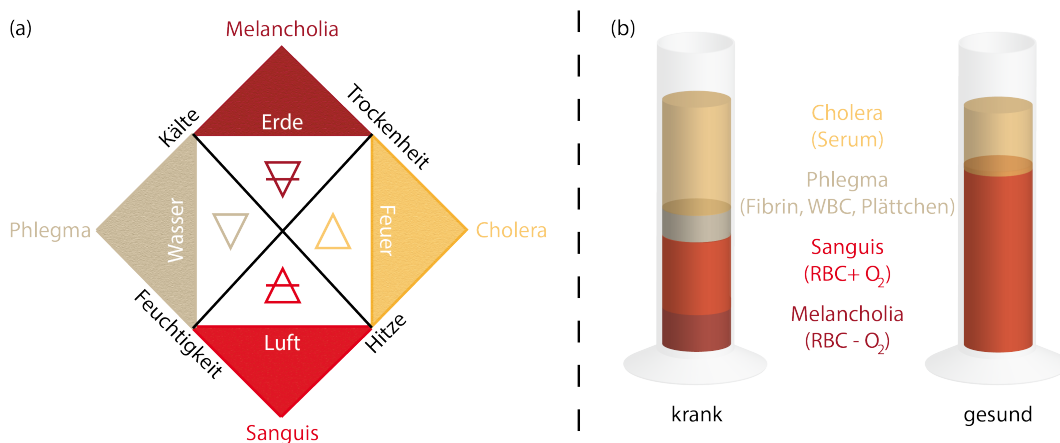


Abbildung 1.1.: Herleitung der vier Humore. (a) Die vier Humore *Melancholia*, *Cholera*, *Sanguis* und *Phlegma* sind nach Hippokrates den entsprechenden Elementen (innen) und Eigenschaften (außen) der damals gängigen Naturphilosophie zugeordnet (Abbildung in Anlehnung an [5]). (b) Vermutliche hat Hippokrates die vier Humore aus der Beobachtung von Blutproben abgeleitet. Entnimmt man Blut eines Patienten mit einer Entzündungskrankheit, so sind nach einiger Zeit vier Phasen zu unterscheiden. In der Blutprobe eines gesunden Patienten jedoch nur zwei (Abbildung in Anlehnung an [4]).

nahezu homogen blutrot, bis auf ein wenig überstehendes Blutserum (vgl. Abb. 1.1). Die Blutprobe eines Patienten mit einer akuten Infektion sieht hingegen anders aus. In dieser bilden sich vier verschiedenfarbige Bereiche: zuoberst eine hellgelbe Schicht, dann ein gräulicher Teil, gefolgt von einem hellroten und einem dunkelroten Bereich. Dieses Phänomen kann, vom heutigen Standpunkt aus, über eine erhöhte Sedimentationsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen erklärt werden [4]. Die Schichten bestehen demnach nicht aus den vier Humoren, sondern aus Serum, einem Gerinnsel aus Fibrinogen, Blutplättchen und weißen Blutkörperchen (engl. *buffy coat*) sowie sauerstoffhaltigen (hellroten) und sauerstoffverarmten (dunkelroten) roten Blutkörperchen [4]. Diese Tatsachen waren damals aber noch nicht bekannt und Hippokrates schloss auf die vier Humore, die perfekt in das damalige Weltbild passten [4].

In dieser Humoralpathologie, auch Viersäftetheorie genannt, führt nach Hippokrates ein Überschuss auch nur einer der Säfte zu Krankheit. Der Körper reagiert auf einen solchen Überschuss, indem er versucht, die Säfte wieder richtig zu mischen, um zurück ins Gleichgewicht zu kommen. Dieser *Kochen* genannte Vorgang geht dabei einher mit Symptomen wie Fieber, Schweißausbrüchen, Übelkeit, etc., die als Anzeichen der baldigen Besserung gedeutet wurden. Zur Genesung mussten allerdings die gekochten Säfte den Körper verlassen, entweder auf natürlichem Wege (Exkremete, Erbrochenes, Abszesse,...), auf künstlich herbeigeführtem Wege (Aderlass) oder durch die Kombination beider Möglichkeiten [1, 2].

Im 2. Jahrhundert n. Chr. wurden die Ideen der Humoralpathologie durch Galen bestätigt und um seine Temperamentenlehre erweitert, welche bis heute in unserem Sprachgebrauch verankert ist. Als wichtigste Krankheitsursache wurde lange ein Überschuss an *phlegma* angesehen, da sich in vielen Blutproben von Patienten das entsprechende gräuliche Gerinnsel ausbildete [3]. Auch Avicenna erweiterte die Lehre der vier Humore Ende des 1. Jahrtausends n. Chr. und, da die Lehrbücher von Galen und Avicenna die medizinischen Standardwerke ihrer Zeit darstellten und lange blieben, hielt sich die Theorie der Humore mit ihren Behandlungsmethoden (wie z.B. Aderlass) bis ins späte 2. Jahrtausend n. Chr. hinein [4].

1.2. Die Entdeckung der roten Blutkörperchen

Der Erfolg der Humoralpathologie hielt an, bis sich zu Beginn des 18. Jahrhunderts die ersten Erkenntnisse aus mikroskopischen Blutuntersuchungen durchsetzen konnten [6]. Nach den lange Zeit unveröffentlichten Beobachtungen von roten Blutkörperchen durch Jan Swammerdam (~1658), stellten die von Antoni van Leeuwenhoek veröffentlichten Ergebnisse seiner mikroskopischen Studien von Blut die Grundlage für weitere Forschungsarbeiten dar. „Er [Antoni van Leeuwenhoek] war ein ganz ungebildeter Mensch, konnte kein Latein und lebte in glücklicher Unwissenheit der großen medizinischen Fachliteratur. Seine Anstellung ließ ihm viel Zeit übrig zu einem Lebensinteresse der ganz besonderen Art, nämlich zum Mikroskopieren: alles Erreichbare wurde mikroskopiert, und beinahe jede Beobachtung entsprach einer Entdeckung“ [6]. Nicht wissenschaftlich gebildet, dafür einfallsreich und wissbegierig beobachtete er mit seinen selbstgebauten Mikroskopen, die bis zu 275-fache Vergrößerungen schafften, bereits 1674, dass sein eigenes Blut aus einer klaren Flüssigkeit und runden, darin schwimmenden, Körperchen besteht (siehe Abb. 1.2). Diese Beobachtungen verfeinerte er noch weiter, bis er 1719 bereits von rundlichen, roten Körperchen schrieb, die eine Einbuchtung aufweisen [7]. In weiteren Untersuchungen von Gefäßen verschiedener Versuchstiere fand van Leeuwenhoek heraus, dass sich die roten Blutkörperchen deformieren müssen, um die dünnsten Blutgefäße durchfließen zu können. Seine Schlussfolgerung war, dass die Blutkörperchen weich sein müssen, um sich entsprechend anpassen zu können. Eine interessante Beobachtung van Leeuwenhoeks war in diesem Zusammenhang auch, dass seine roten Blutkörperchen zu Zeiten einer längeren Erkrankung härter zu sein schienen als zu Zeiten, in denen er sich gesund fühlte [6]. In weiteren Versuchen ließ er rote Blutkörperchen in einer Kapillare absinken und pumpte sie im Anschluss mit Druck wieder nach oben. Dabei fiel ihm auf, dass sich die Blutkörperchen mit dem darüberliegenden Serum wieder vermischten. Dass dieser Effekt auf der Tatsache basiert, dass die Blutkörperchen im druckgetriebenen Fluss in kleinen Kapillaren eine höhere mittlere Geschwindigkeit aufweisen als die sie umgebende Flüssigkeit, wusste van Leeuwenhoek allerdings noch nicht [6]. Trotzdem beschrieb er als erster einige der essentiellen Eigenschaften roter Blutkörperchen und des Blutflusses und ebnete mit seinen Ergebnissen den Weg für weitere Untersuchungen.

Herman Boerhaave (1668-1738), zu seiner Zeit einer der weltweit führenden Mediziner, überprüfte einige Jahre später Leeuwenhoeks Ergebnisse. Er bestätigte sie und stellte zweifelsfrei fest, dass die beiden Blutbestandteile (rote Blutkörperchen und Serum), die im

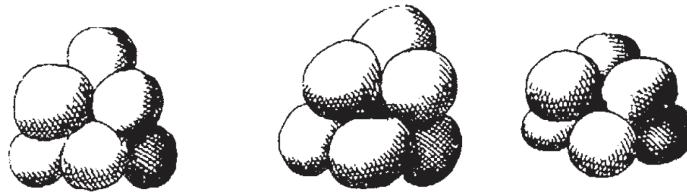


Abbildung 1.2.: Zeichnung roter Blutkörperchen von van Leeuwenhoek. In der Abbildung aus [8] ist eine Zeichnung von roten Blutkörperchen gezeigt, wie sie Leeuwenhoek aufgrund seiner mikroskopischen Beobachtungen im 42. Brief der *Arcana Natura Detecta*, Delphis, Batav, 1695, festgehalten hat.

Herzen noch wohl durchmischt sind, sich in kleineren Adern in einen schnellen Axialstrom aus roten Blutkörperchen und einen langsamen Randstrom aus Blutserum aufteilen [6].

Auch die Entstehung der *crusta inflammatoria*, wie man den *phlegma*-Überschuss in Blutproben von Kranken inzwischen nannte, wurde in der Folgezeit genauer untersucht. Hermann Nasse (1807-1892) konnte das Phänomen 1836 schlussendlich klären [9]: Er beobachtete als erster, dass Aggregate, die aus mehreren roten Blutkörperchen bestehen, schneller absinken als einzelne Zellen. Dass sich solche Aggregate in Patienten mit Entzündungskrankheiten oder Fieber häufiger bilden als in gesunden Patienten, war dabei zu dieser Zeit schon bekannt, nicht jedoch deren Auswirkungen auf die Blutproben. Die schnellere Sedimentationsgeschwindigkeit der Aggregate bewirkt eine Entmischung vor der Koagulation, wodurch sich die gräulich-weiße Schicht bildet, die im Blut von gesunden Patienten unsichtbar bleibt [6].

1.3. Blut - eine besondere Flüssigkeit

Die physikalische Beschreibung der Eigenschaften von Blut wurde maßgeblich von Jean Léonard Marie Poiseuille (1797-1869) begonnen. Im Anschluss an seine Promotion widmete sich dieser der Hämorheologie und untersuchte anhand von Fröschen den Blutfluss in Arterien und Venen. Dort fand er ebenfalls den plasmareichen beziehungsweise zellarmen Randbereich und beobachtete, dass an Verzweigungen hauptsächlich Plasma in die abzweigenden Gefäße gelangt und der Großteil der roten Blutkörperchen im Hauptgefäß verbleibt (engl. *plasma skimming*) [10]. Bei seinen Experimenten kam Poiseuille jedoch zu der Überzeugung, dass er die grundlegenden Gesetze des Blutflusses mit *in vivo* Versuchen nicht würde aufklären können. Er überlegte sich ein Modellsystem aus Druckgefäßen und einer Kapillare und führte seine akribischen Studien über die Einflüsse von Druckdifferenz, Kapillarlänge und -durchmesser sowie der Temperatur auf den Fluss verschiedener Flüssigkeiten in Glaskapillaren durch, die letztendlich 1847 veröffentlicht wurden [10]. Poiseuille fand heraus, dass der Volumenfluss Q durch eine runde Kapillare dem folgenden Zusammenhang für Druck p , Kapillardurchmesser D und Kapillarlänge L gehorcht [10]:

$$Q = \frac{K'' p D^4}{L} \quad (1.1)$$

Die Konstante K'' erkannte Poiseuille als abhängig von der Art der Flüssigkeit und der Temperatur, erst später wurde sie allerdings mit der Viskosität der Flüssigkeit η durch $K'' = \pi / 128 \eta$ verknüpft, wodurch Gleichung (1.1) die Form bekam, unter der sie heute als das Gesetz von Hagen-Poiseuille bekannt ist [10, 11]:

$$Q = \frac{\pi p D^4}{128 \eta L}. \quad (1.2)$$

In den Folgejahren kamen zahlreiche Untersuchungen zu dem Thema, ob Blut dem Poiseuille'schen Gesetz gehorcht oder nicht, zu unterschiedlichen Ergebnissen und machten klar, dass Blut eine etwas besondere Flüssigkeit ist [12]. Die widersprüchlichen Ergebnisse erlaubten keinen klaren Schluss (was im Nachhinein durch die unterschiedlichen Messaufbauten und Parameterräume der durchgeführten Studien erklärt werden kann). 1915 fasste Hess die bis dahin geleisteten Arbeiten zusammen und folgerte in dieser „Metastudie“, dass Blut dem Gesetz von Hagen-Poiseuille nur im Grenzfall hoher Flussraten beziehungsweise hoher Scherraten gehorcht [12]. Davon abweichendes Verhalten schrieb er der Deformierbarkeit der roten Blutkörperchen zu, da ein solches für Suspensionen harter Kugeln nicht in der gleichen Form beobachtbar ist [9, 12].

In diesem Umfeld und von der *crusta inflammatoria* oder zu deutsch Speckhaut inspiriert, begann Robin Fåhræus 1917 seine Arbeiten zur Suspensionsstabilität von Blut [3, 9]. Dabei untersuchte er auch die Verteilung roter Blutkörperchen in druckgetriebenen Strömungen in Glaskapillaren [13]. Es fiel ihm auf, dass sich in Kapillaren mit Durchmessern $D < 300 \mu\text{m}$ die roten Blutkörperchen zur Kapillarmitte hin bewegen und sich ein zellfreier Bereich nahe der Kapillarwand ausbildet (vgl. Abb. 1.3). Diese Beobachtung war an sich nicht neu, jedoch ihre Verknüpfung zu einem weiteren Phänomen: Aufgrund der Konzentration der roten Blutkörperchen in der Kanalmitte und des parabolischen Geschwindigkeitsprofils der Flüssigkeit in solch kleinen Kapillaren (auch Poiseuille-Profil genannt), besitzen die Zellen nämlich eine höhere Durchschnittsgeschwindigkeit als die sie umgebende Flüssigkeit. Dadurch wird die Zellkonzentration in der Kapillare im Vergleich zum Vorratsgefäß effektiv verringert, wobei dieses Verhalten umso stärker ausgeprägt ist, je kleiner die Kapillaren sind [14]. Es kann durch das Verhältnis $c_{\text{Kapillare}}/c_{\text{Vorratsgefäß}}$ beschrieben werden, welches mit zunehmendem Kapillardurchmesser D ansteigt [13, 15]. Diese Beobachtung erklärt einen großen Teil der voneinander abweichenden Studien, die Hess [12] in seiner Arbeit zusammengefasst hatte. In Kapillaren mit Durchmessern $D < 7 \mu\text{m}$ zeigt sich schließlich ein gegenläufiger Effekt. Die Viskosität des Blutes steigt ab diesem Punkt mit weiter abnehmendem Kapillardurchmesser stark an [16].

Die gefundenen Phänomene führen dazu, dass der Begriff „Viskosität“ in seiner ursprünglichen Definition nicht auf Blut anwendbar ist [17–19]. Nach dieser Definition (vgl. Gleichung (2.3) in Kapitel 2) ist die Viskosität nämlich eine, lediglich von der Temperatur abhängige Materialkonstante, was auf Blut gemäß der Ergebnisse von Fåhræus offensichtlich nicht zutrifft. Auch der Versuch, die Viskosität von Blut über die Eigenschaften einer Suspension zu erklären gelingt nicht. Denn nach Einstein müsste die Viskosität einer Suspension η_{susp} kleiner, in einer Flüssigkeit der Viskosität η_{fluid} suspensierter, harter Kugeln mit wachsendem Volumenanteil ϕ unabhängig von der angelegten Scherrate steigen [20]. Die

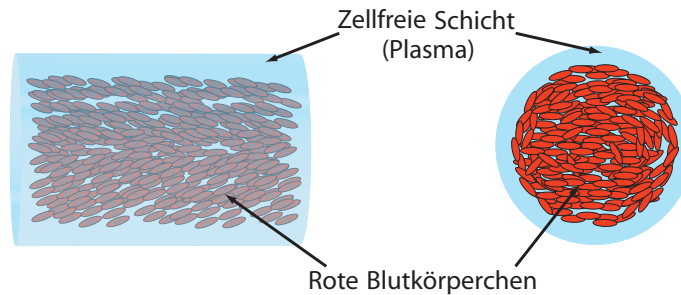


Abbildung 1.3.: Ausbildung einer zellfreien Schicht am Rand kleiner Kapillaren. In Kapillaren mit Durchmessern $D < 300 \mu\text{m}$ kann man die Bildung einer zellfreien Plasmaschicht am Rand der Kapillare und eine Konzentration der roten Blutkörperchen im Bereich der Kapillarmitte beobachten. In Vollblut- oder *in vivo*- Experimenten ist die Plasmaschicht nicht zellfrei, sondern enthält noch weiße Blutkörperchen und Blutplättchen (Abbildung modifiziert aus eigener Veröffentlichung [15]).

von ihm hergeleitete Beziehung

$$\eta_{\text{susp}} = \eta_{\text{fluid}} \cdot (1 + \phi), \quad (1.3)$$

gilt hierbei für stark verdünnte Suspensionen, in denen sich die suspendierten Teilchen nicht gegenseitig beeinflussen. Doch auch für höher konzentrierte Suspensionen bleibt die Viskosität unabhängig von der angelegten Scherrate [21]. Da sich Blut offensichtlich anders verhält und seine Viskosität eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Scherrate hat [14, 16, 17], spricht man bei dessen Beschreibung von „effektiver“ Viskosität, welche die Viskosität von Blut ins Verhältnis zu der von Wasser unter den jeweils gegebenen experimentellen Umständen setzt [17]. Gegebenenfalls reicht zu deren eindeutiger Angabe auch die Berücksichtigung der angelegten Scherrate.

Die Beschreibung des, später zu Ehren ihrer Entdecker, Fåhræus- (Verringerung der Zellkonzentration in der Kapillare im Vergleich zum Vorratsgefäß) und Fåhræus-Lindqvist-Effekt (Abnahme der Viskosität mit der Scherrate in kleinen Kapillaren) benannten Phänomene, weckte in der Folgezeit breites wissenschaftliches Interesse und führte zur Untersuchung der Materie nach modernen wissenschaftlichen Maßstäben. Die Relevanz der Entdeckungen für medizinische und technische Anwendungen bewirkte, dass sich mehrere Gruppen auf die Suche nach den physikalischen Ursachen der Effekte machten.

1.4. Die Entdeckung der Lift-Kräfte

Mit der Entdeckung der zellfreien Schicht und der Abnahme der Zellkonzentration mit abnehmendem Kapillardurchmesser konnte der Fåhræus-Lindqvist Effekt schließlich schlüssig erklärt werden. Der physikalische Ursprung der beiden Effekte (die Migration roter Blutkörperchen zur Kanalmitte hin) blieb jedoch weiterhin ungeklärt [15]. Über drei Jahrzehnte hinweg konnte kein Erklärungsansatz einer genauen Überprüfung standhalten, bis Segré &

Silberberg (vgl. Abschnitt 3.4.1) und Goldsmith & Mason (vgl. Abschnitt 3.4.2) 1961 Kräfte beschrieben, die eine Migration senkrecht zu den Stromlinien ermöglichen [22, 23]. Während die Versuche von Segré & Silberberg bei hohen Reynoldszahlen und mit harten Kugeln als Versuchsobjekten durchgeführt wurden, fanden Goldsmith & Mason in ihren Versuchen bei niedrigen Reynoldszahlen keine laterale Kraft auf harte Kugeln, sondern ausschließlich auf deformierbare Objekte [23].

Bereits vier Jahre später konnte Saffman die theoretisch leichter zu beschreibenden Ergebnisse von Segré & Silberberg erklären und zeigte, dass die laterale Migration der harten Kugeln von Trägheitseffekten der Flüssigkeit hervorgerufen wird, welche die Kugeln umströmt [24].

Die theoretische Erklärung des von Goldsmith & Mason gefundenen Effektes ließ hingegen deutlich länger auf sich warten. Grund dafür sind die wesentlich komplizierteren Randbedingungen, da der Fluss die deformierbaren Objekte ständig verändert und beeinflusst. Das Wissen um diese Wechselwirkungen zwischen weichen Objekten wie Vesikeln, Tröpfchen, Blasen oder Zellen und dem Flussfeld reichte lange Zeit nicht aus, um eine schlüssige Beschreibung zu ermöglichen. Erst gegen Ende des 20. Jahrhunderts ermöglichten neue Untersuchungen zum Verhalten deformierbarer Objekte im Scherfluss eine theoretische Beschreibung des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes, die allerdings weiterhin nicht alle Aspekte dieses Phänomens umfasst [15]. Aus diesem Grund ist das wissenschaftliche Interesse an den Lift-Kräften (vgl. Abschnitt 3.4) weiterhin groß und ihre experimentelle Untersuchung erhielt insbesondere durch die Entwicklung mikrofluidischer Methoden und deren Anwendungen neuen Schwung.

1.5. Mikrofluidik macht's möglich

Eine detailreichere experimentelle Beschreibung der Wechselwirkungen eines Scherflusses mit kleinen Objekten und damit auch eine genauere Untersuchung der Lift-Kräfte wurde durch die Entwicklung neuer, mikrofluidischer Methoden ermöglicht. Der Fachbereich der Mikrofluidik beschäftigt sich ganz allgemein mit hydrodynamischen Systemen mit charakteristischen Größen im Mikrometerbereich [25, 26]. Technisch war die Mikrofluidik zunächst auf das Langziehen von Glaskapillaren zur Herstellung geeigneter Kanäle beschränkt, bis um die Jahrtausendwende das Verfahren der weichen Lithographie (engl. *Soft Lithography*) zur Anwendungsreife gebracht wurde (vgl. Abschnitt 4.2.1). Dieses Verfahren ermöglicht eine einfache, schnelle und verhältnismäßig günstige Herstellung von Kunststoffkanälen mit nahezu beliebiger Geometrie und Strukturdetails in der Größenordnung von Mikrometern [27, 28]. Somit können Flussfelder auf der Größenskala weniger Mikrometer manipuliert werden, was die Mikrofluidik für die Untersuchung von Zellen prädestiniert [29–31].

Die Entwicklung miniaturisierter Bauteile wie Pumpen oder Ventile vereinfacht die Kombination und Integration vieler Prozesse in kleine Bauteile, die gängigerweise als Labor-auf-dem-Chip (engl. *lab-on-a-chip*, LOC) oder *Micro Total Analysis Systems* (μ TAS) bezeichnet werden [32–34]. Sie ermöglichen die Durchführung zahlreicher routinemäßiger Laborprozesse auf einem einzelnen Chip und eröffnen auch neue Möglichkeiten für die Analyse und Synthese verschiedenster Materialien [33, 35, 36]. Allgemeine Vorteile von LOCs sind: gerin-

ger Verbrauch von und somit geringe Kosten für Probenmaterial und Verbrauchsmittel, hohe Sensitivität, gute Automatisierbarkeit, gute Reproduzierbarkeit und kürzere Analysezeiten [26, 29, 33, 37, 38].

Mit der Miniaturisierung von Strömungen ändern sich allerdings auch die physikalischen Rahmenbedingungen [25, 39, 40], was beim Design mikrofluidischer Bauteile beachtet werden muss [41, 42]. Bei solch kleinen Volumina ist zum Beispiel das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis weit zu Gunsten der Oberfläche verschoben und unter Umständen spielt die Trägheit von Flüssigkeiten und Objekten keine Rolle mehr. Um den Einfluss der verschiedenen physikalischen Effekte auf das Verhalten eines Systems abschätzen zu können, wurden dimensionslose Zahlen wie z.B. die Reynoldszahl eingeführt (vgl. Abschnitt 2.2).

Die neuen Methoden gaben auch der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Flussfeldern und weichen Objekten neuen Schwung [43–45] und es konnten zum Beispiel die Bewegungsformen roter Blutkörperchen (vgl. Abschnitt 3.3) und auch die Eigenschaften des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes näher bestimmt werden (vgl. Abschnitt 3.4.2).

Trotz des Zusammenspiels mit der fortlaufend weiter entwickelten Computertechnologie, die immer umfangreichere und detailgetreuere Simulationen der physikalischen Vorgänge ermöglicht, können viele Phänomene immer noch nicht vollständig beschrieben werden. So sind zum Beispiel die Dynamik und der trägheitsunabhängige Lift-Effekt roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss immer noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien sollen zur Beschreibung der Dynamik roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss und dabei speziell des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes auf rote Blutkörperchen beitragen und Möglichkeiten aufzeigen, wie der trägheitsunabhängige Lift-Effekt für die Sortierung von Zellen in einem Mikrokanal eingesetzt werden kann.

1.6. Überblick

In der vorliegenden Arbeit über den „Lift-Effekt auf rote Blutkörperchen und Zellen im Mikrofluss und dessen Anwendung zur Zellsortierung“ sollen zunächst die benötigten Grundlagen der Hydrodynamik (Kapitel 2) und hier speziell einige Besonderheiten mikrofluidischer Systeme skizziert werden (Abschnitt 2.2).

Im Weiteren wird auf das Verhalten von Zellen im Scherfluss eingegangen (Kapitel 3). Hier werden einleitend das Herz-Kreislauf-System des Menschen als relevantes System und das Fachgebiet der Hämorheologie als zugehörige Wissenschaftsdisziplin vorgestellt. Es wird klar, dass der für die rheologischen Eigenschaften von Blut wichtigste zelluläre Bestandteil die roten Blutkörperchen sind. Ihre hohe Deformierbarkeit und Stabilität sind ausschlaggebend für ihre Funktion und werden durch ihren einzigartigen Aufbau bestimmt. Die Zusammenhänge zwischen der Struktur roter Blutkörperchen und ihrer elastischen Eigenschaften wird in Abschnitt 3.1 eingeführt.

Aufbau und Deformierbarkeit roter Blutkörperchen bestimmen ihre dynamische Antwort auf angreifende Scherkräfte. Die als Reaktion auf solche Scherfelder auftretenden Bewegungsformen wurden bei roten Blutkörperchen beobachtet und zunächst anhand von Vesikeln als Modellsystem untersucht (Abschnitt 3.3). Zum Abschluss dieses Abschnittes werden schließlich der trägheitsbedingte (Abschnitt 3.4.1) und der trägheitsunabhängige

(Abschnitt 3.4.2) Lift-Effekt vorgestellt, wobei vor allem letzterer zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist.

Zur Untersuchung roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt. Zunächst werden deshalb die Methoden und Protokolle zur Probenpräparation (Abschnitt 4.1) und der im Allgemeinen verwendete experimentelle Aufbau (Abschnitt 4.2) im Detail beschrieben. Im ersten Schritt werden dann einige Eigenschaften roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss untersucht und die Ergebnisse in die vorhandene Literatur eingeordnet (Kapitel 5). Dazu gehören neben der Charakterisierung des Bewegungszustandes roter Blutkörperchen und ihrer Deformation bei unterschiedlichen Scherspannungen auch der Anstellwinkel in der sogenannten Tank-Treading-Bewegung. Im darauffolgenden Kapitel 5 wird schließlich der trägheitsunabhängige Lift-Effekt auf Blutzellen (rote Blutkörperchen und Blutplättchen) experimentell und durch den Vergleich mit numerischen Berechnungen untersucht (Kapitel 6). Die gewonnenen Erkenntnisse motivieren schließlich die Sortierung von Zellen anhand des unterschiedlich starken, trägheitsunabhängigen Lift-Effektes. Ausschlaggebende Eigenschaften für die Trennung der Zellen sind dabei Größe, Form und Deformierbarkeit.

Als erstes wird die unterschiedliche Größe von zirkulierenden Tumorzellen und roten Blutkörperchen zur hocheffizienten Sortierung der Krebszellen aus verschiedenen konzentrierten Lösungen roter Blutkörperchen genutzt (Kapitel 7). Die Methode erweist sich als sehr robust gegenüber Veränderungen von Flussrate, Hämatokrit der Probenlösung und Ursprungsgewebe sowie Größe der Tumorzellen. Sie somit sogar für die Sortierung zirkulierender Tumorzellen aus Vollblutproben geeignet (Abschnitt 7.3.3).

Plasmodium falciparum-infizierte rote Blutkörperchen weisen im Vergleich zu gesunden roten Blutkörperchen je nach Entwicklungsstadium des Parasiten deutliche Unterschiede in Form und Deformierbarkeit auf. Diese werden in der Einführung von Kapitel 8 ausführlich dargestellt (Abschnitt 8.1 und Abschnitt 8.2) und mittels der bereits in Kapitel 5 angewandten Methoden charakterisiert. Dabei werden die Auswirkungen des Parasiten auf das dynamische Verhalten der roten Blutkörperchen zunächst anhand der Taylor-Deformation, des Bewegungszustandes und des Anstellwinkels im Tank-Treading-Zustand experimentell untersucht. In einem zweiten Schritt wird die Stärke des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes auf gesunde und infizierte rote Blutkörperchen bestimmt und mit der numerischen Rechnung verglichen (Abschnitt 8.3).

Es stellt sich heraus, dass der trägheitsunabhängige Lift-Effekt auf gesunde und infizierte rote Blutkörperchen unterschiedlich stark ist. Obwohl dieser Unterschied deutlich kleiner ist als zwischen roten Blutkörperchen und zirkulierenden Tumorzellen, kann er zur Anreicherung von infizierten roten Blutkörperchen in einem sehr frühen Entwicklungsstadium (Ring-Stadium) genutzt werden (Kapitel 9). Diese Anreicherung basiert, im Gegensatz zur Sortierung von Krebszellen, ausschließlich auf Form- und Deformierbarkeits-Unterschieden zwischen den Zellpopulationen.

Abschließend werden, nach einer kurzen Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit in Kapitel 10, in einem abschließenden Ausblick vorläufige Messdaten präsentiert und darauf basierende Ansatzpunkte für weitere Studien zum Thema diskutiert (Kapitel 11).

2. Kurze Einführung in Hydrodynamik und Mikrofluidik

Man kann nicht zweimal in denselben Fluss steigen.

(Heraklit)

Wirkt eine hinreichend große Kraft auf einen Körper, wird dieser deformiert. Dabei unterscheidet man zwischen volumenerhaltenden (Scherung, Biegung, Drillung) und volumenändernden Deformationen (Kompression, Dilatation) [11]. Feste Körper sind form- und volumenelastisch, das heißt, sie kehren nach einer Deformation in ihre Ausgangsform zurück. Bei ausreichend großen Kräften kommt es hingegen zu einer plastischen Deformation bis hin zum Bruch der Struktur [11]. Flüssigkeiten setzen einer Formänderung hingegen keinen, beziehungsweise nur einen sehr geringen Widerstand entgegen. Ihre Moleküle sind nicht an Gleichgewichtspositionen gebunden und lassen sich sehr leicht gegeneinander verschieben. Dabei ist die Geschwindigkeit der Bewegung unter Berücksichtigung der Reibung proportional zur angelegten Kraft. Eine Änderung des Abstandes zwischen Flüssigkeitsmolekülen erfordert allerdings einen vergleichbaren Kraftaufwand wie in Festkörpern [11]. Außerdem nehmen Flüssigkeiten nach dem Wegfall der deformierenden Kraft wieder ihr ursprüngliches Volumen an (Volumenelastizität). Gase haben ebenfalls keine Form-, aber eine Volumenelastizität. Sie setzen einer Kompression/Dilatation im Vergleich zu Flüssigkeiten und Festkörpern einen deutlich geringeren Widerstand entgegen [11]. Festkörper und Flüssigkeiten werden aufgrund ihrer Eigenschaften oft als kondensierte, Flüssigkeiten und Gase als fluide Materie zusammengefasst [11].

Die Hydrodynamik ist nun das Teilgebiet der Physik, das sich mit dem Verhalten fluider Materie befasst [46]. Durch ihre Bedeutung für Probleme des alltäglichen Lebens erfreut sie sich schon seit langem großen Interesses und stellt ein sehr gut untersuchtes und ausführlich beschriebenes Feld dar. Aus dem sehr weiten Bereich der Hydrodynamik werden in diesem Abschnitt lediglich einige, für die vorliegende Arbeit relevante Themen herausgegriffen und knapp skizziert. Umfassendere Beschreibungen bieten z.B. [46–48], auf die für weitergehende Studien hiermit verwiesen sei. Die Ausführungen im folgenden Abschnitt orientieren sich in ihrer Darstellung an [11, 49, 50].

2.1. Die Bewegungsgleichung für Flüssigkeiten

In vielen Fällen kann in einer strömenden Flüssigkeit die Dichte als konstant angesehen werden, da der Druck nicht ausreichend ist, um dies zu ändern. Somit können strömende Flüssigkeiten oft als inkompressibel und volumenkonstant angesehen werden [11]. Die

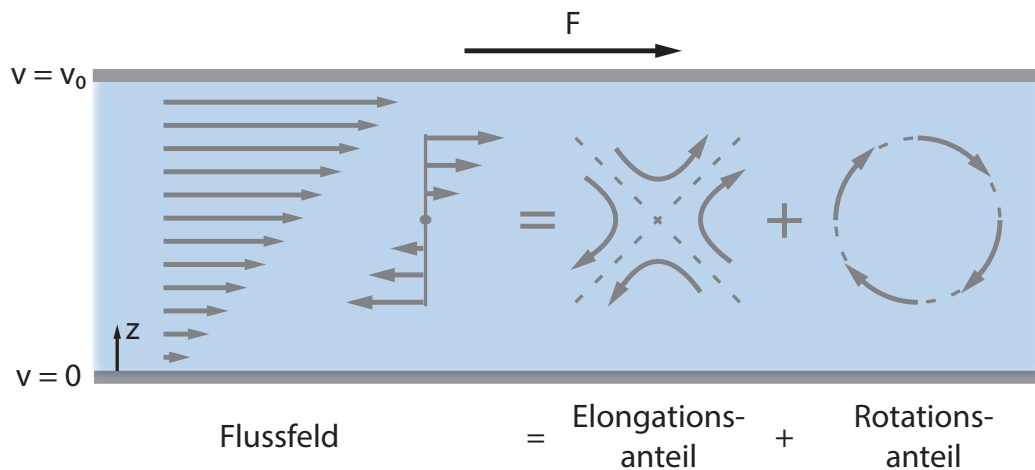


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung eines linearen Flussfeldes zwischen zwei parallelen Platten. Die obere Platte bewegt sich mit der Geschwindigkeit v_0 in x -Richtung und erzeugt somit die lineare Geschwindigkeitszunahme in z -Richtung und die konstante Scherrate $\dot{\gamma} = \frac{dv}{dz}$. In einem beliebigen Punkt innerhalb der Strömung kann ein lineares Scherfeld in einen Elongations- und einen Rotationsanteil aufgeteilt werden.

Strömung einer inkompressiblen Flüssigkeit kann schließlich durch die newtonschen Bewegungsgleichungen in Form der Navier-Stokes-Gleichung beschrieben werden, die nach einer grundlegenden Einführung in die Beschreibung von Strömungen vorgestellt wird.

2.1.1. Grundlegendes über Strömungen

Eine dünne Flüssigkeitsschicht der Dicke $2d$ befindet sich zwischen einer festen und einer bewegten Platte (vgl. Abb. 2.1). Um die Geschwindigkeit v_0 der bewegten Platte mit der Fläche A konstant zu halten, muss eine Kraft F aufgewandt werden, um die innere Reibung der Flüssigkeitsschicht der Höhe z zu kompensieren [11]:

$$F = \eta A \frac{dv_0}{dz} \quad . \quad (2.1)$$

Die innere Reibung der Flüssigkeit geht darin über die Viskosität η ($[\eta] = \text{Ns/m}^2 = \text{Pas}$) ein und stellt in idealen Flüssigkeiten eine ausschließlich temperaturabhängige Materialkonstante dar.

Zwischen den beiden Platten steigt die Strömungsgeschwindigkeit v linear mit dem Abstand von der ruhenden Platte z an. Ein solches Strömungsfeld wird deshalb auch als linear oder als Couette-Fluss bezeichnet. Die Geschwindigkeitsänderung mit der Höhe wird in einem Flussfeld im Allgemeinen als Scherrate $\dot{\gamma}$ bezeichnet

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dz}, \quad [\dot{\gamma}] = s^{-1} \quad (2.2)$$

und ist in einem linearen Strömungsfeld konstant. Ein Strömungsfeld kann stets in einen Elongations- und einen Rotationsanteil aufgespalten werden, wobei im Spezialfall des Couette-Flusses beide Anteile genau gleich groß sind [45].

Für eine hinreichend kleine Fläche kann man die Bewegung der oberen Platte in Abb. 2.1 als Scherung der Flüssigkeitsschicht mit der Scherspannung

$$\tau = \frac{dF}{dA} = \eta \dot{\gamma} \quad \leftrightarrow \quad \eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (2.3)$$

betrachten. Die Scherspannung τ hat dabei die Dimension eines Druckes ($[\tau] = \text{N/m}^2 = \text{Pa}$). Gleichung (2.3) wird auch das *Gesetz von Newton* genannt [51]. Flüssigkeiten, die diesem Gesetz folgen, werden als idealviskose oder newtonsche Flüssigkeiten bezeichnet. Ihre Viskosität ist gemäß Gleichung (2.3) unabhängig von der angelegten Scherrate.

Ändert sich die Viskosität mit der Scherrate, spricht man generell von nicht-newtonischem Fließverhalten. Dabei nimmt die Viskosität mit zunehmender Scherrate entweder ab (scherverdünnend, z.B. Ketchup, Polymerlösungen, Lacke, Blut) oder zu (scherverdickend, z.B. Dispersionen mit hoher Feststoffkonzentration, Speisestärke-Dispersionen) [51]. In solchen Fällen spricht man, wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, von einer *effektiven* Viskosität, die für eine eindeutige Beschreibung zusammen mit der Scherrate angegeben werden muss. Diese Thematik wird in Abschnitt 3.1.3 in Hinblick auf Blut nochmals aufgegriffen. Sofern nicht explizit erwähnt, gelten die weiteren Betrachtungen stets für idealviskose Flüssigkeiten.

Eine Strömung, deren Verhalten durch die innere Reibung der Flüssigkeit, sprich ihre Viskosität, bestimmt wird, heißt laminare Strömung [11]. Mit anderen Worten: die Trägheitseffekte werden von viskosen Kräften dominiert. Um die Dominanz von trägen beziehungsweise viskosen Kräften beurteilen zu können, wurde das als Reynoldszahl Re bekannte Verhältnis eingeführt [40, 49]:

$$Re = \frac{\text{Trägheitskraft}}{\text{viskose Kraft}} = \frac{\rho U^2/l}{\eta U/l^2} = \frac{\rho U l}{\eta} \quad (2.4)$$

Hier ist ρ die Dichte der Flüssigkeit, U die charakteristische Geschwindigkeit und l die charakteristische Länge des Systems.

In einer laminaren Strömung ist Re klein (typischerweise $Re \lesssim 1000$) und träge Effekte können vernachlässigt werden [11]. Die Flüssigkeitsschichten gleiten dann glatt übereinander, ohne Verwirbelungen oder Turbulenzen. In einer Strömung zwischen einer festen und einer bewegten Platte (vgl. Abb. 2.1) führt diese Tatsache zu einem konstanten Geschwindigkeitsgradienten, da sich die Geschwindigkeit der Flüssigkeitsschichten stetig ändern muss (von $v = 0$ bis $v = v_0$). Weiterhin ist eine solche Strömung in der Regel stationär, sie hängt also, im Gegensatz zu turbulenten Strömungen, nicht von der Zeit ab [49].

Wird eine Flüssigkeit zwischen zwei ruhenden Platten durch einen Druckunterschied $G = p_1 - p_2$ angetrieben, so führt die Laminarität der Strömung zur Ausbildung eines parabolischen Geschwindigkeitsprofils, des sogenannten Poiseuille-Profiles. Wie in Abb. 2.2 gezeigt, haftet die Flüssigkeit an der Wand ($v = 0$) und strömt in der Mitte mit der Geschwindigkeit $v = v_0$ am schnellsten [11]. Die Geschwindigkeit in einem Punkt dieses

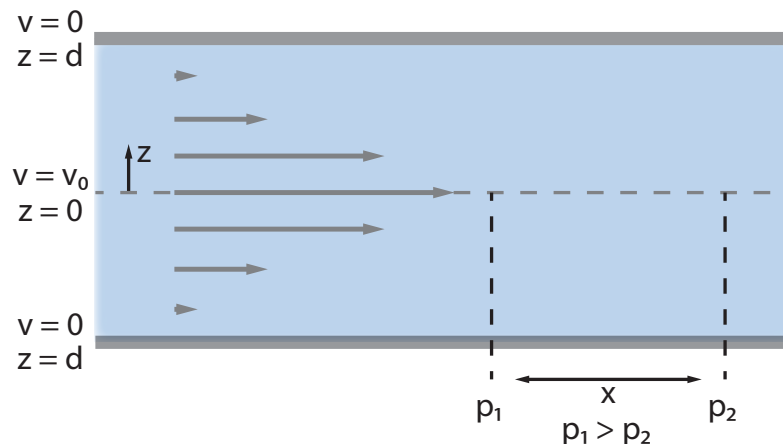


Abbildung 2.2.: Schematische Darstellung eines parabolischen Flussfeldes zwischen zwei parallelen Platten. Die Strömung wird durch den Druckgradienten $\frac{p_1 - p_2}{x}$ angetrieben und besitzt die seine höchste Geschwindigkeit v_0 in der Mitte des Kanals.

Strömungsfeldes kann durch die Gleichung

$$v = v_0 - \frac{p_1 - p_2}{2\eta l} z^2 \quad (2.5)$$

bestimmt werden, die aus einer Betrachtung der Reibungskräfte an einem Volumenelement hergeleitet werden kann (vgl. [11]). Mit der Randbedingung $v = 0$ bei $z = d$ folgt

$$v_0 = \frac{p_1 - p_2}{2\eta l} d^2 \quad (2.6)$$

Strömt eine Flüssigkeit senkrecht durch eine beliebige Fläche A , ergibt sich der Volumenstrom Q als

$$Q = \int_A v dA \quad (2.7)$$

Für einen rechteckigen Kanal der Breite w und der Höhe h mit einer von einem Druckgradienten G getriebenen Strömung in x -Richtung ergibt dies einen Volumenfluss von [25]

$$Q = \frac{8Gb}{\eta w} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{\beta_n^4} \left(1 - \frac{2b \tanh \beta_n}{2\beta_n b}\right), \quad \text{mit } \beta_n = (2n-1)\frac{\pi}{w} \quad (2.8)$$

Eine wesentlich einfachere Form besitzt die Näherungslösung

$$Q \approx \frac{wb^3G}{12\eta} \left(1 - \frac{6 \cdot 2^5 b}{\pi^5 w}\right) \quad \text{für } b \leq w \quad (2.9)$$

In Gleichung (2.9) ist der Druckgradient G über einen Koeffizienten C mit dem Volumenfluss verbunden (vgl. [25]) und für den Fall eines quadratischen Kanalquerschnittes gilt

$$Q = C \frac{Gb^3w}{\eta} \quad \text{mit } C \approx 4 \cdot 10^{-2} \quad (2.10)$$

Zum Abschluss sei noch der Strömungswiderstand einer Kugel mit Radius r erwähnt, die von einem laminaren Fluss der Geschwindigkeit v umströmt wird. Dieser ist durch die Stokes-Reibung gegeben und direkt proportional zur Geschwindigkeit [11]:

$$F_{\text{Stokes}} = 6\pi\eta v r \quad . \quad (2.11)$$

Für Reynoldszahlen $Re \gtrsim 1000$ treten Verwirbelungen auf und die Strömung zeigt scheinbar zufällige, nicht-stationäre Bewegungen [11, 49]. Der Widerstand einer Kugel im turbulenten Fluss entspricht dem Newtonschen Widerstand

$$F_{\text{Newton}} = \frac{1}{2}\rho A v^2 \quad (2.12)$$

und ist proportional zum Quadrat der Geschwindigkeit [11, 49].

2.1.2. Die Navier-Stokes-Gleichung

Überträgt man die allseits bekannte Beziehung Kraft = Masse · Beschleunigung auf ein Teilvolumen eines Fluides, so erhält man unter Einbeziehung der Randbedingung $v = 0$ an der Wand und der Kontinuitätsgleichung die Bewegungsgleichung für Flüssigkeiten, besser bekannt als Navier-Stokes-Gleichung.

Die Kontinuitätsgleichung erwächst aus der Masseerhaltung der Flüssigkeiten. So muss ein Volumen- beziehungsweise Massestrom durch zwei Flächen A_1 und A_2 konstant bleiben, was einer Erhöhung oder Erniedrigung der Geschwindigkeiten v_1 beziehungsweise v_2 entspricht. Dies bedeutet

$$A_1 v_1 = A_2 v_2 \quad \leftrightarrow \quad Q_1 = Q_2 \quad , \quad (2.13)$$

oder für inkompressible Flüssigkeiten $\nabla \cdot \vec{v} = 0$.

Die Bernoulli-Gleichung folgt aus der Energieerhaltung. Der Druck in einer Flüssigkeit lässt sich in eine Komponente parallel zur Flussrichtung (dynamischer Druck oder Staudruck) und eine Komponente senkrecht dazu (statischer Druck) aufteilen. Der Zusammenhang zwischen den beiden Drücken folgt nun aus der Energieerhaltung und wird im Falle einer einheitlichen Höhe des Systems durch die Bernoulli-Gleichung beschrieben [11]:

$$p + \frac{1}{2}\rho v^2 + p_0 = \text{const.} \quad . \quad (2.14)$$

Hier entspricht p_0 dem Druck, der in der ruhenden Flüssigkeit herrschen würde (z.B. Luftdruck plus hydrostatischer Druck $\rho g h$ [11]), p dem statischen Druck und $\frac{1}{2}\rho v^2$ dem dynamischen Druck in einem Fluid der Dichte ρ bei einer Strömungsgeschwindigkeit v .

Weiterhin lassen sich die auf ein Volumenelement $dV = dx dy dz$ einer Flüssigkeit wirkenden Kräfte aufteilen in [11]

- von außen angreifende Volumenkräfte: $d\vec{F}_{\text{ext}} = (\rho dV)\vec{a}_{\text{ext}}$
- auf Druckgefälle zurückzuführende Kräfte $d\vec{F}_p = -\nabla p dV$
- Reibungskräfte $d\vec{F}_r = \eta \Delta \vec{v} dV$ mit dem Laplace-Operator $\Delta = \left(\frac{\delta^2}{\delta x^2} + \frac{\delta^2}{\delta y^2} + \frac{\delta^2}{\delta z^2}\right)$

Fasst man diese Kräfte zusammen und vereinfacht die Darstellung durch die Bedingungen einer konstanten Dichte und der Inkompressibilität der Flüssigkeit, so erhält man die Navier-Stokes-Gleichung [46, 49]

$$\rho \frac{d\vec{v}}{dt} + \rho(\vec{v} \cdot \nabla)\vec{v} = \vec{F}_{\text{ext}} - \nabla p + \eta \Delta \vec{v} \quad . \quad (2.15)$$

Sie beschreibt in dieser Form die Bewegung newtonscher Flüssigkeiten in drei Dimensionen und stellt eine Verallgemeinerung der newtonschen Grundgleichungen für ein Kontinuum dar [49]. Die Navier-Stokes-Gleichung bestimmt im Gegensatz zu Newtons Gesetz allerdings nicht die Position eines Körpers sondern besitzt als Lösung das Geschwindigkeitsfeld des betrachteten Teilvolumens. Wichtige Sonderfälle sind [11]

- die Strömung idealer Flüssigkeiten, in denen Reibungskräfte zu vernachlässigen sind ($\eta \rightarrow 0$ in Gleichung (2.15)) und die Navier-Stokes-Gleichung in die Euler-Gleichung übergeht)
- die laminare Strömung inkompressibler Flüssigkeiten ($\nabla \cdot \vec{v} = 0$)
- stationäre Strömungen ($\nabla \cdot \vec{v} = 0$ und $\frac{d\vec{F}_{\text{ext}}}{dt} = 0$).

Im Falle sehr niedriger Reynoldszahlen befindet sich die laminare Strömung in einem Bereich, in dem die Trägheit der Flüssigkeit gänzlich vernachlässigt werden kann. Die Navier-Stokes-Gleichung vereinfacht sich unter diesen Bedingungen zur Stokes-Gleichung [25]

$$\vec{F}_{\text{ext}} - \nabla p + \eta \Delta \vec{v} = 0 \quad . \quad (2.16)$$

Im durch Gleichung (2.16) beschriebenen Stokes-Regime zeichnet sich die Strömung abseits von Grenzflächen durch eine sehr hohe Symmetrie aus. Besonderheiten der Stokes-Gleichung sind Linearität und Reversibilität in der Geschwindigkeit, ihre Unabhängigkeit von der Zeit sowie ihre eindeutige Lösbarkeit bei geeigneten Randbedingungen [25].

2.2. Mikrofluidik - Hydrodynamik im Mikrometerbereich

Ein neueres Teilgebiet der Hydrodynamik ist die in der Einleitung angesprochene Mikrofluidik. Sie beschreibt Strömungen in der Größenordnung von Mikrometern und erfuhr durch die Entwicklung neuer experimenteller Techniken wie z.B. der *Soft Lithography* (vgl. Abschnitt 4.2.1) um die Jahrtausendwende große Aufmerksamkeit. Auch die Beschreibung der Mikrofluidik soll hier knapp gehalten werden, für ausführlichere Darstellungen sei auf [25, 40, 52] verwiesen.

Mikrofluidische Systeme sind von kleinen Reynoldszahlen geprägt. Wie in Abschnitt 2.1.1 bereits angesprochen, stellt die Reynoldszahl dabei das Verhältnis zwischen trägen und viskosen Kräften im System dar und ist definiert als

$$Re = \frac{\rho U l}{\eta} \quad , \quad (2.17)$$

mit der Dichte ρ , der dynamischen Viskosität η und der charakteristischen Geschwindigkeit U der Flüssigkeit sowie der charakteristischen Länge l des Systems, wobei letztere in der Mikrofluidik maßgeblich für die niedrigen Re verantwortlich ist [25, 40]. Bei kleinen Re überwiegen die viskosen Kräfte und es bildet sich ein laminares Flussregime aus. Mit steigender Re nimmt der Einfluss der Trägheit zu. Erste Trägheitseffekte sind ab $Re \approx 1$ signifikant [53] und führen z.B. zum trägheitsbedingten Lift-Effekt (vgl. Abschnitt 3.4.1), obwohl der Fluss hier noch eindeutig laminar ist. Mit weiter steigender Re nehmen Wirbel und Turbulenzen beständig zu, bis schließlich ab $Re \approx 1000$ der Übergang in das turbulente Regime stattfindet. Es handelt sich hierbei nicht um eine harte Grenze sondern um einen weiten Bereich mit einem kontinuierlichen Übergang. Die Experimente in dieser Arbeit werden ausschließlich für $Re \ll 1$ und damit im Stokes-Regime durchgeführt, in dem Trägheitseffekte gänzlich vernachlässigt werden können. Im menschlichen Blutfluss liegen die Reynoldszahlen zwischen $Re < 0,01$ in Kapillaren bis hin zu $Re \approx 4000$ in der Aorta [54, 55].

Auf spezielle Problemstellungen angepasste, häufig verwendete Varianten von Re sind die Kanal-Reynoldszahl

$$Re_c = \frac{\rho U_{\max} l}{\eta} , \quad (2.18)$$

die mit der maximalen Strömungsgeschwindigkeit im Kanal U_{\max} berechnet wird. Für die mittlere Geschwindigkeit U und die Maximalgeschwindigkeit U_{\max} gilt $U \approx \frac{2}{3} U_{\max}$ und somit $Re \approx \frac{2}{3} Re_c$ [56]. Weiterhin wird die Partikel-Reynoldszahl

$$Re_p = Re_c \cdot \left(\frac{a^2}{D_h} \right) \quad (2.19)$$

verwendet, in deren Berechnung zusätzlich der Partikeldurchmesser a und der hydraulische Durchmesser des Kanals

$$D_h = \frac{2wh}{(w+h)} \quad (2.20)$$

mit der Breite w und Höhe h des Kanals eingehen [53]. Die Partikel-Reynoldszahl ist ein Maß für die Störung des Flussfeldes durch den Partikel (auf den gesamten Kanal bezogen).

Bei hohen Re führen Turbulenzen und Wirbel zu einer ständigen Faltung und Streckung von Fluidschichten, während dies bei kleinen Re nicht der Fall ist. Dies führt dazu, dass in laminaren Strömungen ein Mischvorgang nur aufgrund von Diffusion stattfindet und deshalb wesentlich länger dauert, als eine durch Turbulenzen oder thermische Konvektion hervorgerufene Durchmischung [40]. Ob dies gewünscht ist oder nicht, hängt von der jeweiligen Anwendung ab.

Um nun die Einflüsse von Konvektion und Diffusion gegeneinander abschätzen zu können, wurde die Péclet-Zahl definiert. Für zwei nebeneinander fließende Flüssigkeiten, von denen eine Partikel mit der Diffusionskonstante D enthält, beschreibt die Péclet-Zahl die Anzahl der Kanalbreiten, welche die Flüssigkeiten zurücklegen müssen bis sie vollständig durchmischt sind. Für einen Kanal der Breite w gilt demnach

$$Pe = \frac{Uw}{D} . \quad (2.21)$$

In nicht-mischbaren Flüssigkeiten spielt die Oberflächenspannung eine wichtige Rolle für die Dynamik von Grenzflächen. Ein interessantes Beispiel hierfür ist die Bildung von Öltröpfchen in einer wässrigen Lösung [37]. Treten Grenzflächenkräfte gemeinsam mit viskosen Kräften auf, erkennt man an der Kapillaritätszahl

$$Ca = \frac{\eta U}{\dot{\gamma}} \quad (2.22)$$

die relative Stärke der jeweiligen Effekte [40].

Die Mittel der Mikrofluidik ermöglichen es, Flussfelder in der gleichen Größenordnung zu manipulieren, in der z.B. der Durchmesser biologischer Zellen liegt. Zusammen mit modernen Methoden, wie etwa der Hochgeschwindigkeitsvideomikroskopie, bieten sich somit neue experimentelle Möglichkeiten zur Untersuchung des Verhaltens verschiedener Objekte in klar definierten Flussfeldern. Ein trotz oder gerade wegen seiner langen Geschichte immer noch hochinteressantes Forschungsobjekt stellt dabei das Verhalten von Blutzellen im menschlichen Herz-Kreislauf-System dar. Bevor in dieser Arbeit ein Beitrag zu diesem Forschungsgebiet geleistet wird, sollen im nächsten Abschnitt einige Grundlagen zum Blutfluss sowie dem Aufbau und dem dynamischen Verhalten von roten Blutkörperchen in Scherfeldern zusammengefasst werden.

3. Zellen im Mikrofluss

Blood stains the roofs and the palm trees of Venice.

(The Doors, Peace Frog)

Ein Musterbeispiel für ein System, in dem Zellen einem Scherfluss ausgesetzt sind, ist der Blutkreislauf. Die Untersuchung von Blutzellen in Scherfeldern und damit zusammenhängender physikalischer Phänomene ist deshalb offensichtlich nicht nur für die Physik von Interesse, die daraus Erkenntnisse über das Verhalten von weichen Objekten in Scherflüssen gewinnt. Sie hilft außerdem der Biologie beim Verständnis des Organismus, der Medizin bei Diagnose, Therapie und Prognose von Krankheiten sowie der Pharmazie beim Design neuer Medikamente, die über den Blutkreislauf zu ihrem Ziel gelangen sollen. Die Deformierbarkeit der zellulären Blutbestandteile, vor allem der roten Blutkörperchen (RBK), macht Zellen im Scherfluss allerdings zu einem hochkomplexen System und eine Modellierung und Analyse der auftretenden Effekte ist deshalb alles andere als trivial.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit RBK in parabolischen Flussprofilen als Modellsystem der Mikrozirkulation. Deshalb wird nun zunächst ein grober Überblick über RBK und ihre Rolle im Blutfluss gegeben. Dabei wird deutlich, dass die Deformierbarkeit roter Blutkörperchen bestimmend für ihre rheologischen Eigenschaften ist und die Ursprünge und Auswirkungen dieser Deformierbarkeit, insbesondere die Dynamik roter Blutkörperchen in Scherfeldern, werden im Detail vorgestellt. Neben den Bewegungszuständen der RBK gehören dazu insbesondere der trägheitsbedingte und der trägheitsunabhängige Lift-Effekt.

3.1. Allgemeines zu roten Blutkörperchen

Blut besteht in etwa zur Hälfte seines Volumens aus zellulären Bestandteilen. Von diesen stellen wiederum RBK die mit Abstand größte Fraktion dar ($\sim 5 \cdot 10^{12}$ Zellen/Liter und damit über 99% des zellulären Volumens in Blut), während weiße Blutkörperchen (WBK) ($\sim 5 - 8 \cdot 10^9$ Zellen/Liter) und Blutplättchen (BP) ($\sim 2 - 3 \cdot 10^{11}$ Zellen/Liter) nur wenig Volumenanteil haben [57–60]. Eine Vorstellung der Morphologie dieser drei Blutzelltypen gibt die elektronenmikroskopische Aufnahme in Abb. 3.1.

3.1.1. Erythropoese und allgemeine Eigenschaften

Aus physiologischer Sicht besteht die Hauptaufgabe roter Blutkörperchen darin, Sauerstoff zum Gewebe und Kohlendioxid zurück zur Lunge zu transportieren [61, 62]. Erst vor Kurzem

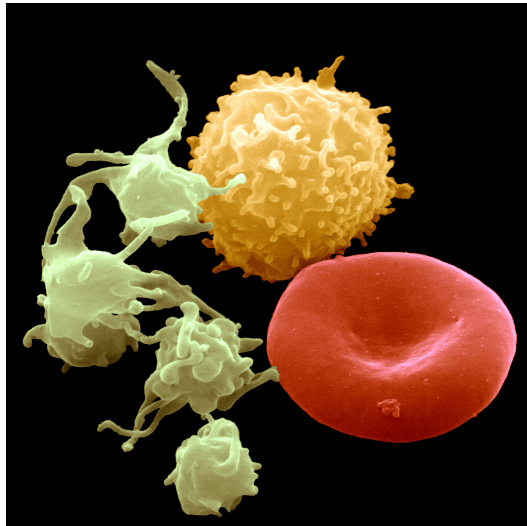


Abbildung 3.1.: Nachträglich kolorierte, elektronenmikroskopische Aufnahme eines roten Blutkörperchens (rot), eines weißen Blutkörperchens (gelb) und einiger Blutplättchen (grün) (mit freundlicher Genehmigung von Jürgen Berger, MPI Tübingen).

wurden zusätzliche Funktionen von RBK bekannt, wie etwa die Regulierung des Blutdrucks und ihre Funktion als pH- und Sauerstoffsensoren im Blut [49, 63–65].

Rote Blutkörperchen gehören zu den einfachsten Zellen in unserem Körper. Streng genommen sind sie nicht einmal Zellen, da sie kein Erbgut und keinen Zellkern besitzen und somit auch keine Proteinsynthese betreiben können [57]. RBKs enthalten lediglich einige Enzyme, die z.B. für den Abbau von Glukose zu Adenosintriphosphat (ATP) oder den Abbau schädlicher Oxidationsprodukte verantwortlich sind. Sie bestehen somit nahezu ausschließlich aus einer Hämoglobinlösung als Zytoplasma, einem Zytoskelett und einer Plasmamembran und stellen somit ein sehr gutes, wenn auch vereinfachtes Modell für komplexere Zellen dar.

Ihren Ursprung haben rote Blutkörperchen im Knochenmark, in dem sich ihre Vorläufer, die sogenannten Erythroblasten, durch Knospung entwickeln. Sie synthetisieren sehr viel Hämoglobin, Spektrin, Aktin und andere Proteine, die für das spätere Überleben des RBK und die Bildung der RBK-Membran von Bedeutung sind [57]. Bei der Abspaltung von der Mutterzelle stößt der Erythroblast dann seinen Zellkern ab und wird zum Reticulozyten. Reticulozyten reifen über 24 Stunden hinweg und bilden in dieser Zeit, z.B. über Selbstorganisation, das Spektrin-Aktin-Netzwerk des Zytoskeletts aus [57].

Nach insgesamt etwa 48 Stunden ist der Entwicklungsprozess abgeschlossen und die RBK liegen in ihrer charakteristischen, diskozytischen Form vor [57]. Diese Form besteht aus einer bikonkaven Scheibe mit einem Durchmesser von etwa 7 - 8 μm und einer Höhe von etwa 2 μm [57, 59]. Sie sind $\sim 3 \cdot 10^{-11}$ g schwer, besitzen ein mittleres Volumen von $\sim 80 - 96 \mu\text{m}^3 = 80 - 96 \text{ fl}$ (engl. *mean corpuscular volume*, MCV) und eine Oberfläche von $\sim 140 \mu\text{m}^2$, die somit beträchtlich größer ist als die Oberfläche einer Kugel mit dem gleichen Volumen ($\sim 97 \mu\text{m}^2$) (vgl. Abschnitt 3.2 und [19, 57, 58]). Diese Überschussfläche

(engl. *excess area*) ist sehr wichtig für die Fähigkeit von RBK, sich ohne Änderung von Oberfläche oder Volumen verformen zu können [19].

Während ihrer Lebensdauer im Blutkreislauf von circa 120 Tagen legen RBK eine Strecke von ~ 400 km zurück, bevor sie schließlich in der roten Pulpa der Milz aufgrund ihrer verringerten Deformierbarkeit aussortiert werden [66]. Auf ihrem Weg durch den Körper müssen die RBK in der Mikrozirkulation regelmäßig Kapillaren passieren, die einen wesentlich kleineren Durchmesser haben als sie selbst. Dies können RBK nur aufgrund der außerordentlichen Strapazierfähigkeit und der elastischen Eigenschaften ihrer Membran [57].

3.1.2. Zytoplasma und Aufbau der Zellmembran roter Blutkörperchen

Aufgrund des Fehlens intrazellulärer Strukturen werden Form und Deformierbarkeit roter Blutkörperchen nahezu ausschließlich durch die Viskosität des Zytoplasmas und die mechanischen Eigenschaften der Kompositmembran bestimmt [67].

Das Zytoplasma roter Blutkörperchen besteht aus einer wässrigen Hämoglobinslösung. Seine Viskosität wird maßgeblich von der Konzentration und den physikochemischen Eigenschaften von Hämoglobin bestimmt [19] und hängt nicht-linear von der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration (engl. *mean corpuscular haemoglobin concentration*, MCHC) beziehungsweise vom mittleren korpuskulären Hämoglobin (engl. *mean corpuscular haemoglobin*, MCH, früher auch MbE) ab. Der Normalwert des MCHC liegt zwischen $\sim 30 - 36$ g/dl [19, 58] mit einem Durchschnittswert von ~ 32 g/dl [19], der MCH hat seinen Normalbereich bei $\sim 28 - 34$ pg mit einem Durchschnitt von ~ 32 pg [58]. Letzteres ist der durchschnittliche Hämoglobingehalt eines einzelnen RBK, während der MCHC die in 100 ml dicht gepackter RBK enthaltene Hämoglobinmasse angibt.

Das Zytoplasma wird von der Zellmembran umhüllt und davon gegen die Umgebung abgegrenzt. Die Membran fungiert als selektiver Filter, stabilisiert die Zellform und bietet Raum für zahlreiche biochemische Prozesse [67]. Bei RBK besteht die Membran, wie dies bei sehr vielen Zellen der Fall ist, aus drei Schichten: (i) der Glykokalix, (ii) der Lipid-Protein-Doppelschicht (auch Plasmamembran genannt) und (iii) dem Zytoskelett [49, 68]. Ihre Masse teilt sich bei RBK auf in 52% Proteine, 40% Lipide und 8% Kohlenhydrate [69]. Der Membranaufbau ist in Abb. 3.2 links schematisch dargestellt.

In Abb. 3.2 ist die etwa 4 nm dicke Plasmamembran zu erkennen, welche die eigentliche Grenzschicht zwischen Zytoplasma und extrazellulärem Raum bildet. Sie besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die verschiedene gesättigte und ungesättigte Phospholipide sowie Cholesterin und Proteine enthält [49]. Die Lipide können dabei als zweidimensionale Flüssigkeit aus kooperativen Untereinheiten betrachtet werden, in der sich die Proteine bewegen können [71].

Mit der Membran sind eine Vielzahl peripherer (nur auf einer Membranseite verankerter) und transmembraner (die Membran vollständig durchdringender) Proteine assoziiert. Diese dienen der Regulierung des Stoffaustausches (z.B. Bande 3: Anionentransport oder *Rhesus-associated glycoprotein*, RhAG: Gasaustausch, vermutlich von CO_2) oder der Kommunikation mit der Umgebung (z.B. *intercellular adhesion molecule 4*, ICAM-4 zur Kommunikation mit anderen RBK oder Glykophorin A, Rhesusfaktor (Rh), Kell zur Ausbildung der Blutgruppen [70]). Letztere ragen bis zu 40 nm in den extrazellulären Raum hinein und sind

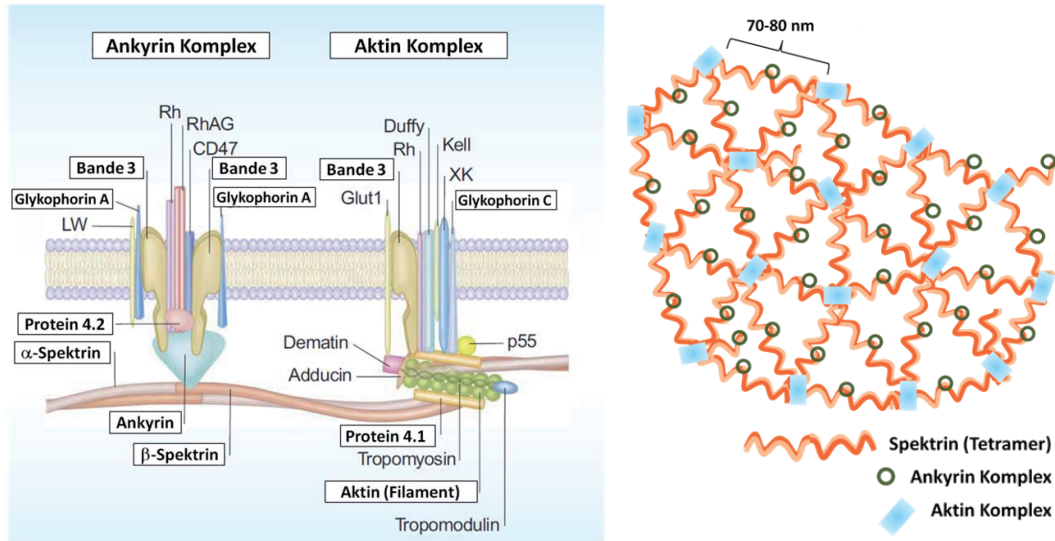


Abbildung 3.2.: Schematischer Aufbau der RBK-Membran und des Zytoskeletts. Links: Seitenansicht der Kompositmembran mit Glykokalix, Plasmamembran und den Verbindungspunkten zum Zytoskelett (Abb. aus [49], Original in [70]). Rechts: Draufsicht auf das Zytoskelett. Das hexagonale Spektrin-Netzwerk ist über die Ankyrin- beziehungsweise die Aktin/Bande 4.1R-Komplexe an die Plasmamembran gebunden (Abb. modifiziert aus [49]).

Bestandteil der Glykokalix, in welcher die Blutgruppenmerkmale enthalten sind und die auch dem Schutz der Zelle dient [49, 72]. Eine ausführlichere Betrachtung der Membranproteine und ihrer Funktionen bieten diverse Übersichtsartikel [73–76].

Auch die Verankerung des Zytoskeletts in der Plasmamembran wird von Proteinen vermittelt, wobei zwei makromolekulare Komplexe von besonderer Bedeutung sind [70]: Der Ankyrin- und der Bande 4.1R-Komplex. Ankyrin verbindet das Zytoskelett über Wechselwirkungen mit den zytoplasmischen Enden von Bande 3 und RhAG mit der Plasmamembran, während Glykophorin C, XK, Rh und Duffy an Bande 4.1R binden (vgl. Abb. 3.2) [70].

Das über Ankyrin und Bande 4.1R in einem Abstand von circa 30 - 50 nm von innen an die Plasmamembran gekoppelte Zytoskelett selbst besteht aus einem elastischen, etwa 50 - 100 nm dicken Proteinnetzwerk [49, 67]. Dieses ist wiederum ein loses, hexagonales Netzwerk aus Spektrin-Tetrameren und enthält zahlreiche Defekte und lose Enden, wie in Abb. 3.2 rechts schematisch dargestellt ist [69]. Die etwa 70 - 80 nm langen Spektrintetramere sind an den Knotenpunkten über Ankyrin- oder über Aktin/Bande 4.1R-Komplexe an die Plasmamembran gebunden. Da sich diese Komplexe in der Lipiddoppelschicht relativ gut bewegen können, sind Zytoskelett und Plasmamembran gegeneinander verschiebbar, solange ihre Konturen einander entsprechen [49]. Durch das Zytoskelett erhält das RBK eine hohe Scherelastizität und durch die Plasmamembran eine Biegesteifigkeit und Stabilität gegenüber Flächendehnungen. Auf diese mechanischen und viskoelastischen Eigenschaften von RBK-Membranen wird in Abschnitt 3.2 näher eingegangen.

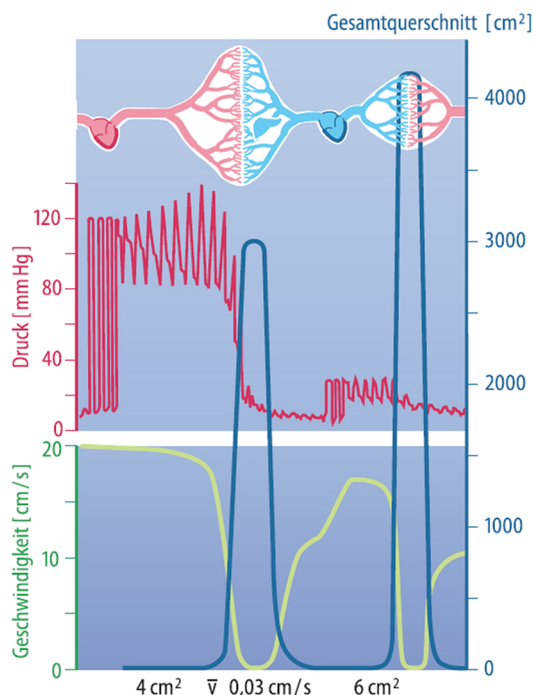


Abbildung 3.3.: Druckabfall, Strömungsgeschwindigkeit und Querschnittsfläche der einzelnen Bereiche des im oberen Bereich der Abbildung skizzierten, menschlichen Herz-Kreislauf-Systems. Es ist deutlich zu erkennen, dass die kleinsten Gefäße im Körperkreislauf insgesamt die größte Querschnittsfläche besitzen und in ihnen der meiste Druck abfällt ($100 \text{ mbar} \approx 75 \text{ mmHg}$, Abb. aus [59], mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags, ©Springer 2007).

3.1.3. Die Rolle roter Blutkörperchen im Blutfluss

Das Herz-Kreislauf-System

Eine der Grundfunktionen des Herz-Kreislauf-Systems besteht im Transport von Stoffen durch den menschlichen Körper. Gewebe und Organe müssen z.B. mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und die Stoffwechselprodukte abtransportiert werden. Dazu werden die Stoffe im Blut gelöst durch die größeren Blutgefäße (Makrozirkulation, z.B. Aorta, große Arterien) mit hohem Druck und hoher Geschwindigkeit vom Herzen aus im Körper verteilt [59, 77]. An den Organen angekommen, strömt das Blut in die kleineren, darin eingebetteten Blutgefäße, um möglichst nahe an das zu versorgende Gewebe zu gelangen. Bei niedrigem Druck und kleinen Strömungsgeschwindigkeiten findet in den Kapillaren dann der eigentliche Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut statt. Um diese Kapillaren mit Durchmessern von $D \approx 4 - 8 \mu\text{m}$ zu passieren, müssen sich die Blutzellen teils stark deformieren. Dadurch werden z.B. kleinstmögliche Diffusionswege für den Gasaustausch im Gewebe beziehungsweise der Lunge gewährleistet [77].

Zusammen mit Arteriolen und Venen mit Durchmessern $D \lesssim 100 \mu\text{m}$ bilden die Kapilla-

ren die sogenannte Mikrozirkulation [77]. Die Mikrozirkulation ist so weit verzweigt, dass kaum eine Zelle im Körper weiter als 20 – 30 μm von einem Kapillargefäß entfernt ist [49, 78]. Durch die dafür notwendige, enorme Anzahl an Gefäßen steigt der Druck, mit dem das Blut gepumpt werden muss, stark an. Wie wichtig die Mikrozirkulation für den Blutkreislauf ist wird deutlich, wenn man bedenkt, dass über 80% des gesamten Blutdrucks darin abfallen [77]. Einen Überblick über die einzelnen Bereiche des Herz-Kreislauf-Systems und dem jeweils darin abfallenden Druck zusammen mit der Gesamtquerschnittsfläche des Zirkulationsbereiches und der darin vorherrschenden Strömungsgeschwindigkeit gibt Abb. 3.3. Die Größe der Gesamtquerschnittsfläche und des Druckabfalls in den Bereichen von Gewebe und Lunge zeigen, wie bestimmend die Mikrozirkulation für das gesamte System ist.

Blut selbst ist eine konzentrierte Suspension aus Blutplasma und Blutzellen. Knapp die Hälfte ($\sim 45\%$) des Volumens wird von zellulären Bestandteilen wie roten Blutkörperchen (Erythrozyten, RBK), weißen Blutkörperchen (Leukozyten, WBK) und Blutplättchen (Thrombozyten, BP) eingenommen, während die andere Hälfte ($\sim 55\%$) aus Blutplasma besteht. Blutplasma ist eine wässrige Lösung, die verschiedenste chemische Stoffe enthält, von einfachen Ionen wie Na^+ , K^+ oder Ca^{2+} bis hin zu langkettigen Makromolekülen mit mehreren hundert Kilodalton Molekulargewicht [77].

Blut ist somit eine Suspension mit einer komplexen Zusammensetzung aus Lösungsmittel und „Feststoffen“ verschiedenster Größe. Dies führt zu einem vielfältigen Verhalten des Fluides Blut im Herz-Kreislauf-System, welches von großem Interesse für Biologie und Medizin ist und zur Ausprägung einer eigenen Wissenschaftsdisziplin führte, der Hämorheologie. Diese „Wissenschaft des Blutflusses“ beschäftigt sich konsequenterweise mit dem Flussverhalten von Blut und seiner festen Bestandteile [77].

Hämorheologie

Zum Feld der Hämorheologie gehören neben der direkten Untersuchung der Flusseigenschaften von Blut durch viskosimetrische Analysen makroskopischer Proben auch die Erforschung der mikroskopischen Eigenschaften der einzelnen Blutbestandteile (Mikrohämorheologie) *in vitro* und *in vivo* [77]. Die Darstellung in diesem Abschnitt orientiert sich an [50], einen tiefergehenden Einblick erhält man z.B. durch die interessanten Übersichtsartikel von Popel & Johnson [77] oder Lipowsky [79].

Wie bereits in Kapitel 2 angesprochen, versteht man unter einem Fluid einen Stoff, der sich beim Anlegen einer Kraft kontinuierlich verformt, oder anders ausgedrückt, fließt. Betrachtet man ein einzelnes Flüssigkeitselement, so bewirkt das Anlegen einer Kraft an einer Seitenfläche eine Scherung des Volumenelements und das Verhältnis zwischen angelegter Scherspannung und der resultierenden Scherrate entspricht der in Kapitel 2 eingeführten „Viskosität“. Diese hängt bei newtonschen Flüssigkeiten nur von der Temperatur und den Materialeigenschaften, nicht aber von den Flussbedingungen ab und lässt sich durch den linearen Zusammenhang in Gleichung (2.3) ausdrücken. Als gängige Einheiten für die Viskosität haben sich Pascalsekunden (Pas) und Centipoise (cP, veraltet) etabliert, wobei Wasser bei $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$ eine Viskosität von $\eta = 1,0\text{ mPas} = 1,0\text{ cP}$ besitzt.

Blut zählt aber zu den nicht-newtonschen Flüssigkeiten mit scherverdünnendem Verhalten, da seine Viskosität mit Erhöhung der angelegten Scherrate abnimmt. Weil dieses Verhalten

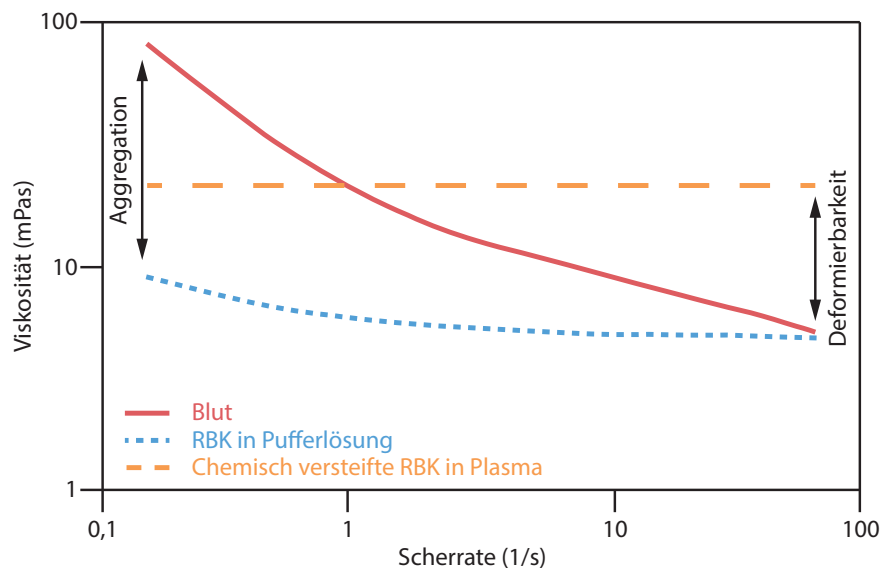


Abbildung 3.4.: Schematische Darstellung der effektiven Viskosität von Blut über der angelegten Scherrate. Der starke Abfall bei niedrigen Scherraten ist auf die Bildung von Geldrollen zurückzuführen, die durch Plasmaproteine begünstigt wird und deshalb für RBK in einer proteinfreien Pufferlösung deutlich geringer ausfällt. Bei höheren Scherraten kommt es nach der Auflösung der Geldrollen zu einer weiteren Abnahme der effektiven Viskosität, die ihren Ursprung in der Deformierbarkeit der RBK hat, was durch den Vergleich mit chemisch versteiften RBK deutlich wird (Abb. adaptiert aus [50])

von der ursprünglichen Definition der Viskosität nicht erfasst wird, spricht man hier von einer effektiven Viskosität (vgl. Kapitel 1 und [17–19]).

Eine genauere Betrachtung des nicht-newtonschen Verhaltens von Blut mit Hilfe von Abb. 3.4 zeigt, dass dessen effektive Viskosität bei niedrigen Scherraten hoch ist und mit zunehmender Scherspannung abnimmt, bis sie sich bei sehr hohen Scherraten ($\dot{\gamma} \gtrsim 100 \text{ s}^{-1}$) einem Minimum von etwa 4 - 5 mPas nähert (bei $T = 37 \text{ °C}$) [50]. Weitere Werte für die Viskosität bei $T = 37 \text{ °C}$ in Abhängigkeit von der Scherrate sind $\sim 10 \text{ mPas}$ bei 10 s^{-1} , $\sim 20 \text{ mPas}$ bei 1 s^{-1} und $\sim 100 \text{ mPas}$ bei $0,1 \text{ s}^{-1}$ [80].

Um dieses Verhalten besser verstehen zu können, muss Blut als Suspension aus einer festen Phase (zelluläre Bestandteile) und einer flüssigen Phase (Plasma) betrachtet werden. Die effektive Viskosität kann dann näherungsweise als Kombination der Fließeigenschaften der beiden Komponenten beschrieben werden. In sehr kleinen Gefäßen müssen zusätzlich die Wechselwirkungen der Zellen mit dem Endothel berücksichtigt werden, wie sie z.B. bei der Adhäsion von WBK auftreten [79, 81].

„Reines“ Blutplasma ist eine newtonsche Flüssigkeit [50] mit $\eta_{\text{Plasma}} \approx 1,4 \text{ mPas}$ bei $T = 37 \text{ °C}$ [50, 80]. Eine höhere Plasmaviskosität entsteht durch einen erhöhten Proteingehalt z.B. bei verschiedenen Krankheiten oder bei Gewebeerkrankungen.

Der Einfluss der im Plasma suspendierten Blutzellen führt zunächst zu einem nicht-linearen Anstieg der effektiven Viskosität der Suspension mit steigendem Hämatokrit. Bei physiologischen Werten kann dabei grob von einem Viskositätsanstieg von $\sim 4\%$ pro Hämatokritprozent ausgegangen werden [50]. Bei niedrigen Scherraten gilt diese Faustregel jedoch nicht, da die RBK hier zu verstärkter Aggregation neigen, was zusätzliche Effekte hervorruft und einen nahezu exponentiellen Anstieg mit kleiner werdender Scherrate hervorruft (vgl. Abb. 3.4). Dieser Anstieg wird durch eine Erhöhung der effektiven Partikelgröße hervorgerufen und darf nicht mit dem inversen Fåhræus-Lindqvist-Effekt verwechselt werden, der den Anstieg der Gesamtviskosität von Blut in Kapillaren mit Durchmessern $\lesssim 4\mu\text{m}$ beschreibt [16]. Die Aggregatbildung von RBK wird dabei nicht nur durch niedrige Scherraten, sondern auch durch langkettige Plasmaproteine wie z.B. Fibrinogen und erhöhte Temperaturen begünstigt. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit gestapelten Geldmünzen werden die RBK-Aggregate auch Geldrollen (engl. *rouleaux*) genannt [3, 82, 83]. Sie entstehen, indem sich die RBK mit ihren flachen Seiten aneinander lagern. In der Bildung von Geldrollen findet sich auch die Erklärung für die in Kapitel 1 geschilderten Beobachtungen, die zur Theorie der vier Humore geführt haben: Bei Entzündungskrankheiten steigt die Fibrinkonzentration, was zur verstärkten Bildung von Geldrollen führt, welche in einer Blutprobe aufgrund ihrer Größe schneller absinken als einzelne RBK.

Bei größeren Scherraten lösen sich die Geldrollen schließlich auf, wodurch die Viskosität stark abnimmt. Mit weiter steigender Scherrate nimmt die Viskosität als Folge des in Abschnitt 1.3 vorgestellten Fåhræus-Lindqvist-Effekts langsamer aber beständig ab. Bei hohen Scherraten ist die effektive Viskosität schließlich deutlich geringer als die einer vergleichbaren Suspension harter Objekte. Dass die Deformierbarkeit der RBK für den Viskositätsunterschied verantwortlich ist, kann durch den Vergleich mit einer Lösung chemisch versteifter RBK gezeigt werden (vgl. Abb. 3.4).

Aus den angeführten Betrachtungen wird ersichtlich, dass die hohe Deformierbarkeit roter Blutkörperchen von großer Bedeutung für ihre rheologischen Eigenschaften sowie für die Erfüllung ihrer biologischen Aufgaben (z.B. Gastransport und Regulierung des Blutdrucks) ist.

3.2. Deformierbarkeit roter Blutkörperchen

„Deformierbarkeit“ ist ein recht allgemeiner Begriff, der die Fähigkeit eines Körpers beschreibt, sich als Antwort auf eine angelegte Kraft zu verformen. Wie „deformierbar“ ein Körper ist, kann dabei auf unterschiedliche Eigenschaften zurückgeführt werden. So wird z.B. die Deformierbarkeit roter Blutkörperchen durch

1. ihre geometrischen Eigenschaften (Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis),
2. die rheologischen Eigenschaften des Zytoplasmas (Viskosität)
3. die mechanischen Eigenschaften der Kompositmembran (Schermodul, Biegemodul, Viskosität)

bestimmt [19]. Die einzelnen Größen werden in diesem Abschnitt im Detail vorgestellt und ihre Bedeutung für die Deformierbarkeit von RBK erläutert.

3.2.1. Einfluss der Zellgeometrie

Die bestimmende geometrische Eigenschaft für die Deformierbarkeit roter Blutkörperchen ist ihr Überschuss an Oberfläche S im Vergleich zu der Oberfläche einer Kugel mit dem gleichen Volumeninhalt [19]. Die größere Fläche wird deutlich, wenn man den Radius R einer Kugel berechnet, die das gleiche Volumen wie ein RBK ($V_{\text{RBK}} \approx 90 \mu\text{m}^3$) hat, mit diesem Radius dann die Oberfläche der zugehörigen Kugel bestimmt und diese mit der Oberfläche eines RBK vergleicht:

$$V_{\text{Kugel}} = \frac{4}{3}\pi R^3 = V_{\text{RBK}} \approx 90 \mu\text{m}^3 \quad (3.1)$$

$$S_{\text{Kugel}} = 4\pi R^2 = 97 \mu\text{m}^2 \quad (3.2)$$

$$S_{\text{RBK}} \approx 140 \mu\text{m}^2 \quad . \quad (3.3)$$

Somit ergibt sich für RBK ein großes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis (engl. *surface-to-volume-ratio*, $\frac{S}{V}$) von

$$\frac{S_{\text{RBK}}}{V_{\text{RBK}}} \approx 1,6 \mu\text{m}^{-1} \quad , \quad (3.4)$$

während das einer Kugel nur

$$\frac{S_{\text{Kugel}}}{V_{\text{Kugel}}} \approx 1,1 \mu\text{m}^{-1} \quad (3.5)$$

beträgt. Die Oberfläche eines RBK kann in sehr guter Näherung als konstant angesehen werden, da sich die Plasmamembran in der Regel wie ein zweidimensionales, inkompressibles Fluid verhält.

Für theoretische Betrachtungen werden meist dimensionslose Parameter verwendet, um den Oberflächenüberschuss von RBK zu beschreiben. Dazu werden zunächst die charakteristischen Radien aus dem Zellvolumen beziehungsweise der Zelloberfläche bestimmt [84]:

$$R_V = \left(\frac{3V}{4\pi}\right)^{\frac{1}{3}} \quad (3.6)$$

$$R_S = \left(\frac{S}{4\pi}\right)^{\frac{1}{2}} \quad .$$

Somit ergibt sich mit $S_{R_S} = S_{R_V} + \Delta$ die Überschussfläche Δ zu

$$\Delta = \frac{S}{R_V^2} - 4\pi \quad (3.7)$$

Stattdessen können R_S und R_V auch dazu verwendet werden, das reduzierte Volumen V^* zu berechnen. Dies ist gegeben durch

$$V^* = \frac{V_{R_V}}{V_{R_S}} = \left(\frac{R_V}{R_S}\right)^3 \quad (3.8)$$

$$= \frac{3V}{4\pi R_S^3}$$

und hängt mit der Überschussfläche Δ zusammen wie [84]

$$V^* = \left(\frac{1 + \Delta}{4\pi}\right)^{-\frac{3}{2}}. \quad (3.9)$$

Im Grenzfall einer Kugel gilt $\Delta_{\text{Kugel}} = 0$ und $V_{\text{Kugel}}^* = 1$. Für ein RBK ergeben sich mit $V \approx 90 \mu\text{m}^3$ und $S \approx 140 \mu\text{m}^2$:

$$\begin{aligned} R_V &\approx 2,78 \mu\text{m} \\ R_S &\approx 3,34 \mu\text{m} \end{aligned} \quad (3.10)$$

und somit für die Überschussfläche und das reduzierte Volumen

$$\begin{aligned} \Delta_{\text{RBK}} &\approx 5,5 \\ V_{\text{RBK}}^* &\approx 0,58 \end{aligned} \quad (3.11)$$

Die große Überschussfläche ermöglicht es den RBK, sich ohne Änderung von Volumen oder Fläche stark zu deformieren, was z.B. für die Passage der sinusoiden Spalten der roten Pulpa der Milz zwingend notwendig ist. Mit zunehmendem Lebensalter eines RBK reduziert sich dessen Überschussfläche durch den stückweisen Verlust von Plasmamembranmasse, bis das RBK die Sinusoide schließlich nicht mehr passieren kann und dort platzt [19, 85]. Eine Abnahme der Überschussfläche kann auch bei verschiedenen Krankheiten, wie z.B. einer Malaria-Infektion beobachtet werden und bedeutet im Allgemeinen eine Abnahme der Deformierbarkeit [85, 86].

3.2.2. Einfluss des Zytoplasmas

Wie in Abschnitt 3.1.2 bereits ausgeführt, besteht das Zytoplasma roter Blutkörperchen aus einer Hämoglobinlösung ohne weitere zelluläre Bestandteile. Der Einfluss des Zytoplasmas auf die Deformierbarkeit roter Blutkörperchen kann über die Viskosität η_{in} der Hämoglobinlösung angegeben werden, wobei eine niedrigere Viskosität eine bessere Deformierbarkeit zur Folge hat.

Bei Körpertemperatur ($T \approx 37 \text{ }^\circ\text{C}$) beträgt die Viskosität des Zytoplasmas $\eta_{in} \approx 7 \text{ mPa s}$ [19]. Bei Raumtemperatur ($T \approx 25 \text{ }^\circ\text{C}$) steigt dieser Wert auf $\eta_{in} \approx 10 \text{ mPa s}$ an [87–90]. Die Viskosität steigt auch mit dem MCHC stark an. Erhöht sich dieser von seinem Mittelwert ($\sim 32 \text{ g/dl}$) auf $\sim 40 \text{ g/dl}$, so gilt für die Viskosität: $\eta_{40\text{g/dl}} \approx \eta_{32\text{g/dl}}^4$ [19].

3.2.3. Einfluss der mechanischen Eigenschaften der Kompositmembran

Zur physikalischen Beschreibung der mechanischen Eigenschaften der Kompositmembran roter Blutkörperchen, kann diese als eine, aus einem idealen Körper bestehende, dünne Schale behandelt werden [67]. Eine Schale ist eine stark gebogene, geschlossene Platte, wobei die Betrachtung als idealer Körper für kleine und mittlere Deformationen ihre Gültigkeit behält (nur bei sehr starken Deformationen treten zusätzliche Effekte auf) [67]. Die mechanischen Eigenschaften der RBK-Membran können deshalb gut mit physikalischen Konzepten zur Elastizität weicher Schalen beschrieben werden, deren wichtigste Grundzüge in diesem

Abschnitt dargestellt werden. Die Ausarbeitung orientiert sich an [11, 49, 57, 67, 91], worauf auch für zusätzliche Informationen zum Thema verwiesen sei.

Die Deformation einer dünnen Platte, deren Dicke d_m klein gegenüber ihrer lateralen Ausdehnung ist, kann durch drei Deformationstypen beschrieben werden [57, 67]:

- isotrope Kompression beziehungsweise Dilatation (Dehnung)
- Scherdeformation
- Biegedeformation.

Die Elastizitätstheorie verformbarer Schalen wird schnell äußerst kompliziert, da im Allgemeinen Biegung und Dehnung gleichzeitig auftreten [67]. Dies führt zu nicht-linearem Verhalten, dass aber bei biologischen Membranen aufgrund der vernachlässigbaren Dehnungseffekte nicht berücksichtigt werden muss [67, 92]. Zusätzlich führt die Eigenschaft der Membran als zweidimensionale Flüssigkeit dazu, dass die laterale Spannung isotrop verteilt ist, was die Beschreibung weiter vereinfacht [67]. Die im Folgenden knapp präsentierte Theorie gilt streng genommen nur für Vesikel, da sie die Scherelastizität der RBK-Membran nicht berücksichtigt. Dennoch lassen sich für RBK wertvolle Erkenntnisse aus diesem Modell gewinnen und viele experimentell beobachtete Effekte können damit beschrieben werden.

Laterale Deformationen

Kompression beziehungsweise Dilatation und Scherdeformation finden in einer Ebene statt und erzeugen zueinander orthogonale Paare von Spannungen σ_1 und σ_2 , die parallel zur Ebene der Platten wirken (vgl. Abb. 3.5). Im Dreidimensionalen würden diese Spannungen Drücken entsprechen und besitzen folgerichtig im Zweidimensionalen die Einheit N/m. Sie werden als Funktion der beiden relativen Streckungen

$$\lambda_1 = \frac{L_1}{L} \quad (3.12)$$

$$\lambda_2 = \frac{L_2}{L} \quad (3.13)$$

in zwei zueinander senkrechten Richtungen ausgedrückt. Dabei ist L die jeweilige Länge in Ruhe und L_1 beziehungsweise L_2 sind die Längen im gestreckten/gestauchten Zustand. Ein quadratisches Membranstück der Fläche $S_{\text{Ruhe}} = L^2$ kann so in ein Rechteck der Fläche $S_{\text{gedehnt}} = \lambda_1 L \lambda_2 L$ überführt werden, mit der relativen Flächenänderung [49, 67]

$$\Delta S = S_{\text{Ruhe}} - S_{\text{gedehnt}} = (1 - \lambda_1 \lambda_2) L^2 \quad (3.14)$$

Für $|\sigma_1| \neq |\sigma_2|$ kommt es zu einer Überlagerung von Scherung und Dehnung, für $|\sigma_1| = |\sigma_2|$ und gegeneinander gerichteten Kräfte (wie in Abb. 3.5 gezeigt), gilt $\lambda_1 = \lambda_2^{-1}$. In diesem Fall bleibt die Fläche erhalten und die Spannung kann über das Hookesche Gesetz mit dem Schermodul μ ($[\mu] = \text{N/m}$) als Federkonstante ausgedrückt werden [67]:

$$\sigma_1 = \mu(\lambda_1^2 - \lambda_1^{-2}) \quad (3.15)$$

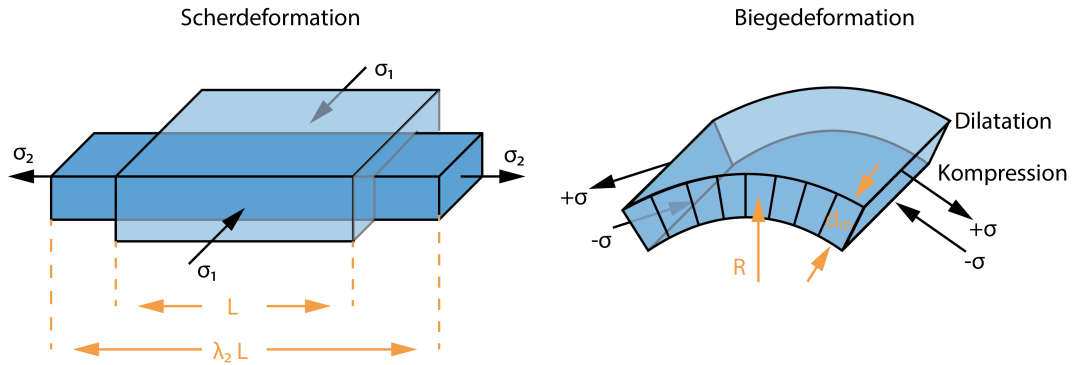


Abbildung 3.5.: Schematische Darstellung der grundlegenden Deformation dünner Platten. Links ist die Scherdeformation durch zwei orthogonale Spannungen σ_1 und σ_2 dargestellt, rechts die Biegedeformation durch zwei parallel entgegengesetzte Spannungen $+\sigma$ und $-\sigma$. Letztere erzeugt für eine Platte der Dicke d_m eine Krümmung mit Radius R (Abb. adaptiert nach [67]).

Den zweidimensionalen Schermodul kann man bei Bedarf durch Multiplikation mit der Membrandicke d_m in den entsprechenden dreidimensionalen Wert umrechnen [68]. Der Schermodul μ kann aber auch über das Poisson-Verhältnis (für inkompressible Lipidschichten $\approx \frac{1}{2}$) mit dem Young-Modul E verknüpft werden [67]

$$\mu = 3E d_m \leftrightarrow E = \frac{\mu}{3d_m} . \quad (3.16)$$

Der Young-Modul ist eine, von der Form unabhängige Materialkonstante mit der Dimension Energie pro Volumen ($[E] = \text{J}/\text{m}^3$) [57]. Die entsprechenden Zusammenhänge zur Umrechnung und einige Hinweise dazu sind in [57] zu finden. Als Größenordnung sei erwähnt, dass der Young-Modul einer Plasmamembran $\sim 10^8$ Pa, der von Gummi $\sim 10^9$ Pa und der von Gold $3 \cdot 10^{11}$ Pa beträgt [67].

Ist die angelegte Spannung isotrop in der Plasmamembran verteilt, kann die durch diese Spannung σ induzierte, relative Flächenänderung nach der klassischen Theorie der Dehnung durch [49, 57]

$$\frac{\delta A}{A} \approx \frac{1}{2} \left\{ \left(\frac{\delta u}{\delta x} \right)^2 + \left(\frac{\delta u}{\delta y} \right)^2 \right\} = \frac{1}{2} (\nabla u)^2 \quad (3.17)$$

beschrieben werden, mit der Auslenkung der Platte $u(x, y)$. Die mit der Dehnung verknüpfte elastische Energie ergibt sich zu [57]

$$G_{\text{Dehn}} = \frac{1}{2} \sigma \left(\frac{\delta A}{A} \right) . \quad (3.18)$$

Biegedeformation

Zur Betrachtung einer eindimensionalen Biegung muss die endliche Dicke d_m der Platte beachtet werden. Es greifen zwei laterale, einander entgegengerichtete Spannungen an der

Ober- ($+\sigma$) beziehungsweise Unterseite ($-\sigma$) der Platte an, wodurch deren Unterseite gestaucht und deren Oberseite gedehnt wird. Im Übergangsbereich gibt es stets eine sogenannte neutrale Fläche, an der für die angreifende Spannung $\sigma_0 = +\sigma + (-\sigma) = 0$ gilt [67].

Die Deformation ist durch die Krümmung H bestimmt, die mit dem Krümmungsradius R über $H = R^{-1}$ gegeben ist. Beliebige Krümmungen können durch die zweite Ableitung der Auslenkung $u(x, y)$ aus der Ebene beschrieben werden [67, 93]. Für die von zwei Hauptkrümmungen R_1 und R_2 erzeugte, mittlere Krümmung gilt demnach

$$H = \frac{1}{2}(R_1^{-1} + R_2^{-1}) \quad (3.19)$$

beziehungsweise, über die zweite Ableitung der Auslenkung $u(x, y)$ ausgedrückt [57],

$$H = \frac{1}{2}\left(\frac{\delta^2 u}{\delta x^2} + \frac{\delta^2 u}{\delta y^2}\right) = \frac{1}{2}\Delta u(x, y) \quad . \quad (3.20)$$

Gemäß dem Hookeschen Gesetz ist die elastische Energie der Deformation proportional zum Quadrat der mittleren Krümmung und für die elastische Energie pro Fläche gilt [49, 57, 67]

$$G_{\text{el.}} = \frac{1}{2}\kappa H^2 \quad (3.21)$$

mit dem Biegemodul κ ($[\kappa] = \text{J}$) als Proportionalitätskonstante.

Für reale biologische Membranen muss beachtet werden, dass sich die beiden Lipid-Monolagen, aus denen die „Platte“ aufgebaut ist, im Allgemeinen in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Daraus resultieren spontane Spannungen und die sogenannte *spontane Krümmung* H_0 . Die gesamte elastische Energie einer Oberfläche S unter Berücksichtigung der spontanen Krümmung H_0 wird durch die Helfrich-Gleichung der Biegeelastizität beschrieben [57]:

$$G_{\text{Krümmung}}^{\text{lokal}} = \frac{1}{2}\kappa \iint dS (H_1 + H_2 - H_0)^2 \quad . \quad (3.22)$$

Man sieht, dass die spontane Krümmung die Biegeenergie beliebig reduzieren kann. Dies ermöglicht gebogenen Systemen die Annahme eines Zustandes mit minimaler Energie, was von großer Bedeutung für biologische Systeme ist [57].

Eine andere (oft einfachere) Darstellung der spontanen Krümmung kann über die in Abb. 3.5 dargestellte Situation hergeleitet werden. Das Spannungspaar $+\sigma$ und $-\sigma$ erzeugt ein Drehmoment $M = 2\sigma d_m$, das nach dem Hookeschen Gesetz wiederum zu einer Krümmung führt [57]:

$$H_0 = \frac{M}{\kappa} \quad . \quad (3.23)$$

In Situationen, in denen ein Spannungsgradient in Normalenrichtung erzeugt wird, kann dieser Zusammenhang verallgemeinert werden zu [57]

$$H_0 = \frac{1}{\kappa} \int z \frac{d\sigma}{dz} dz \quad . \quad (3.24)$$

Der Beitrag der Gaußschen Krümmung ($H_{\text{Gauss}} = (R_1 R_2)^{-1}$) zur Biegeelastizität von Schalen kann hingegen für fluide Membranen häufig vernachlässigt werden, weil das Integral über H_{Gauss} unabhängig von der Form ist [57].

Besonderheiten bei roten Blutkörperchen

Die Viskoelastizität der Membran roter Blutkörperchen wird maßgeblich von ihrem Aufbau bestimmt. Die Lipid-Doppelschicht (Plasmamembran) als Bestandteil der RBK-Membran ist biegeelastisch mit einem sehr kleinen Biegemodul mit lokalen und globalen Anteilen, welches durch zwei Effekte erzeugt wird: Zum Einen durch das Streben der Lipidmoleküle nach paralleler Anordnung, zum Anderen durch den bilamellaren Aufbau und der daraus resultierenden, bei einer Biegung induzierten Spannung zwischen den Lipid-Monolagen [67]. Die Plasmamembran selbst besitzt keine Schersteifigkeit, diese wird erst durch die Kopplung an das Zytoskelett erzeugt [67].

Für solch geschlossene Schalen mit verbundartigem Aufbau muss neben den lokalen elastischen Eigenschaften auch der Beitrag der globalen Deformation berücksichtigt werden [57, 91, 94]. Betrachtet man die bikonkave Form eines RBK (vgl. Abb. 3.1), so muss zu deren Bildung die äußere Lipid-Monolage der Plasmamembran in den konkaven Bereichen gestaucht und in den konvexen gedehnt werden [57]. Dies gilt jeweils anders herum für die innere Monolage. Können sich die Monolagen entlang einer neutralen Fläche A_0 gegeneinander verschieben, so ist die gesamte elastische Energie dieser globalen Deformation proportional zum Quadrat der Flächenänderung ΔA zwischen den beiden Monolagen [57]. Berücksichtigt man, dass die Schale im Ausgangszustand eine spontane Flächenänderung ΔA_0 durchlaufen kann, so ergibt sich die globale Biegeenergie zu

$$G_{\text{Krümmung}}^{\text{global}} = \frac{1}{2} \kappa' \frac{\pi}{4A_0 d_m^2} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \quad , \quad (3.25)$$

mit dem globalen Biegemodul κ' und dem lokalen Biegemodul κ [57]. $G_{\text{Krümmung}}^{\text{global}}$ wird auch Flächen-Differenz-Elastizität (engl. *area-difference elasticity*) genannt und spielt z.B. für die Ausbildung unterschiedlicher Vesikelformen eine große Rolle [57]. Die gesamte Biegeenergie ist schließlich die Kombination aus lokaler und globaler Biegeenergie:

$$G_{\text{Krümmung}} = G_{\text{Krümmung}}^{\text{global}} + G_{\text{Krümmung}}^{\text{lokal}} \quad . \quad (3.26)$$

Während bei geschlossenen Kugelschalen die elastische Energie durch die Dehnung bestimmt wird, dominiert bei roten Blutkörperchen die Biegeenergie. Dies ist auf ihre Überschussfläche zurückzuführen, wodurch sie sich eher wie schwach gebogene Platten verhalten. Die laterale Dehnung ist dann ein Effekt zweiter Ordnung und muss nur berücksichtigt werden, wenn die Auslenkung groß gegenüber der Plattendimension ist [57].

Messung der elastischen Konstanten roter Blutkörperchen

Zu den Standardmethoden für die Messung der elastischen Konstanten (Oberflächenexpansionsmodul K , Schermodul μ , Biegemodul κ) der RBK-Membran gehören die Mikropipetten-technik und die Kraftmikroskopie (engl. *atomic force microscopy*, AFM) [57, 95]. Neuere Methoden sind optische Pinzetten (engl. *optical tweezers*) [96], Diffraktionsphasenmikroskopie [97, 98] und Experimente in Mikrokanälen [99].

Bei der Messung der Konstanten muss berücksichtigt werden, dass verschiedene Methoden unter Umständen zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen, da sie bezüglich der einzelnen,

die Deformierbarkeit der RBK bestimmenden Parameter unterschiedlich sensitiv sind [19]. Diese Problematik wird auch in Abschnitt 3.2.4 nochmals aufgegriffen.

Mikropipette Die Aspiration von Zellen mit einer Mikropipette ist eine der ältesten Methoden, um die elastischen Eigenschaften der RBK-Membran zu untersuchen. Dabei werden die Zellen durch das Anlegen eines Unterdrucks in Kapillaren mit definiertem inneren Radius (R_P) gesaugt. Aus der Verformung (z.B. die Ausdehnung der Zelle in die Kapillare hinein L_P) in Relation zum angelegten Unterdruck ΔP können dann Rückschlüsse auf die elastischen Eigenschaften gezogen werden [100, 101]. Geht man von einer konstanten Oberfläche aus, erhält man z.B. den Schermodul μ_{RBK} nach

$$\frac{\Delta P \cdot R_P}{\mu} = 2,45 \frac{\Delta L_P}{R_P} \quad \text{für } \left(\frac{L_P}{R_P} > 1\right) \quad (3.27)$$

über die Steigung der Kurve von $(\Delta P \cdot R_P)$ gegen $\left(\frac{\Delta L_P}{R_P}\right)$ [100, 102].

Die mittels Mikropipetten-Aspiration gemessenen Werte für den Schermodul bei Raumtemperatur liegen im Bereich von $\mu = 4 - 10 \mu\text{N/m}$ und weisen typischerweise einen Fehler von etwa 20% auf. Der mit der Mikropipette bestimmte Kompressionsmodul liegt in der Größenordnung von $K \approx 500 \text{ mN/m}$ [100, 103, 104] und streut je nach exakter Zusammensetzung der Lipidschicht zwischen $K = 57 \text{ mN/m}$ und $K = 1734 \text{ mN/m}$ [100, 105]. Messungen an Lipidschichten ergeben eine Biegesteifigkeit der Lipidmembran im Bereich von $\kappa \approx 10^{-19}\text{J}$.

Durch Mikropipettenaspiration wurde auch der Einfluss des Oberfläche-zu-Volumenverhältnisses auf die Deformierbarkeit roter Blutkörperchen untersucht, wobei für osmotisch angeschwollene RBK ein außerordentlich hoher Widerstand gegen Verformungen gefunden wurde [104].

Kraftmikroskopie Die Rasterkraftmikroskopie findet breite Anwendung zur Aufklärung nahezu beliebiger Oberflächenstrukturen, unter anderem auch der von Membranen. Sie kann aber auch zur Untersuchung der elastischen Eigenschaften von Zellen herangezogen werden. Dazu werden die Zellen zunächst auf einem Glasplättchen immobilisiert. Die Spitze des Cantilevers wird auf die Membran abgesenkt, drückt diese ein und wird wieder davon entfernt. Aus dem Radius der Spitze und der Kurve von Eindringkraft über Eindringtiefe können schließlich die elastischen Größen der Membran bestimmt werden. Dazu wird üblicherweise das sogenannte Hertz-Modell an die Messkurven angepasst [103, 106]. Es muss beachtet werden, dass die Spitze des AFMs normalerweise deutlich kleiner ist als das RBK, weshalb damit hauptsächlich die lokalen elastischen Eigenschaften gemessen werden.

Das Biegemodul roter Blutkörperchen ist im Allgemeinen zu klein, um es mit AFM-Messungen auflösen zu können. Auch zur Vermessung des Schermoduls ist die Methode nur bedingt geeignet, da er nur geringen Einfluss auf die Messgrößen hat, wenn die isotropen Kräfte groß sind [103]. In diesem Fall dominiert das Kompressionsmodul und mit dem AFM werden dafür Werte im gleichen Größenbereich vorgefunden wie mit der Mikropipette [103]. Eine nähere Betrachtung von Indentationsversuchen und der zugehörigen Theorie ist in [103] zu finden.

Optische Pinzette Für Messungen mit optischen Pinzetten werden zunächst kleine Glaskügelchen an die RBK-Membran gebunden. Zwei auf der RBK-Membran gebundene Kügelchen können dann mit zwei Laserstrahlen eingefangen und festgehalten werden. Durch das präzise Auseinanderbewegen der Laserstrahlen kann somit das RBK kontrolliert gestreckt und die dazu aufgewandte Kraft gemessen werden [95]. Auf der Zeitskala der Streckung spielt die Viskosität des Zytoplasmas dabei normalerweise keine Rolle und die elastische Reaktion kann auf die Membran zurückgeführt werden.

Der gefundene Schermodul liegt bei $\mu = 2,05 \pm 0,3 \mu\text{N/m}$ und ist somit deutlich kleiner als die mittels Mikropipette gemessenen Werte [96]. Dies hat zwei mögliche Ursachen: Zum Einen sind die globalen Deformationen der Membran bei Messungen mit der Mikropipette sehr groß, weshalb die theoretische Beschreibung nicht trivial ist und die Ergebnisse durch die Näherungen eventuell von der Realität abweichen, während bei Messungen mit der optischen Pipette lokal starke Deformationen auftreten [96]. Zum Anderen könnte es daran liegen, dass mit beiden Methoden systematisch verschiedene Subpopulationen untersucht werden. Während die optische Pinzette RBK untersucht, die gut an Glaskügelchen binden, ist die Adhäsion an Glas bei Messungen mit der Mikropipette unerwünscht [96].

Schon der Vergleich dieser zwei Standardmethoden zeigt also, dass bei der Beurteilung von Messergebnissen verschiedener Methoden äußerste Vorsicht geboten ist. Bis jetzt sind die Zusammenhänge, die zu diesen Unterschieden führen, nicht gänzlich geklärt, weshalb die explizite Bestimmung der elastischen Parameter von Zellen nach wie vor im Fokus wissenschaftlicher Studien steht [15].

Als Orientierungshilfe dienen im täglichen Laborbetrieb oftmals die in [57] zusammengestellten Werte für den Schermodul $\mu \approx 6 \mu\text{N/m}$, die Biegesteifigkeit $\kappa \approx 0,5 - 5 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ (was bei Raumtemperatur etwa $\kappa \approx 1 - 12 \cdot 10^{-3} k_B T$ entspricht) sowie dem Kompressionsmodul von $K \approx 10^3 \text{ mN/m}$.

3.2.4. Viskoelastizität roter Blutkörperchen

Um das dynamische Verhalten roter Blutkörperchen realistisch abbilden zu können, muss ein Zellmodell folgende Eigenschaften berücksichtigen [107]:

- Die Viskoelastizität der Membran mit einem viskosen Beitrag der Plasmamembran und einem elastischen Beitrag des Zytoskeletts.
- Die Biegesteifigkeit der Membran.
- Die Viskositäten des Zytoplasmas und der die Zelle umgebenden Flüssigkeit.

Von den aufgeführten Größen fehlt im Rahmen der hiesigen Zusammenstellung nur noch die Viskosität der Membran. Wie bereits erwähnt, kann die RBK-Membran als zweidimensionale Flüssigkeit aufgefasst und ihr somit auch eine Viskosität η_{Membran} zugewiesen werden. Diese spielt bei der Energiedissipation in dynamischen Kraftfeldern eine bisher nicht geklärte Rolle. Der Einfluss der Membranviskosität auf die Gesamtviskosität der Zelle ist deshalb immer noch Gegenstand aktueller Forschung [88, 107–109] und soll hier in aller Kürze diskutiert werden.

Geht man allgemein davon aus, dass sich die Gesamtviskosität der Zelle aus der Membranviskosität η_{Membran} und der Viskosität des Zytoplasmas $\eta_{\text{Zytoplasma}}$ zusammensetzt, erhält man mit einem noch näher zu bestimmenden Gewichtungsfaktor x :

$$\begin{aligned}\eta_{\text{ges}} &= \eta_{\text{Zytoplasma}} + \eta_{\text{Membran}} \\ &= \eta_{\text{Zytoplasma}} + x \cdot \eta_{\text{Zytoplasma}} \\ &= (1 + x) \cdot \eta_{\text{Zytoplasma}}\end{aligned}\quad (3.28)$$

Über die tatsächliche Größe von x liegen bisher keine eindeutigen Erkenntnisse vor. $\eta_{\text{Zytoplasma}}$ und η_{Membran} sind in der Messung nur schwer voneinander zu trennen und Simulationen sind aufgrund der unterschiedlichen Dimensionen von Zytoplasma und Membran sehr aufwendig beziehungsweise mit momentanen Rechnerleistungen noch nicht zufriedenstellend durchführbar (Timm Krüger, persönliche Mitteilung, 18. März 2015).

Obwohl das Volumen der RBK-Membran zwei Größenordnungen unter dem des Zytoplasmas liegt, könnte die durch die Membran dissipierte Energie aufgrund deren hoher Scherviskosität ($\eta_{\text{Membran}} \approx 20 - 60 \text{ mPas}$ [107], $\eta_{\text{Membran}} \approx 100 \cdot \eta_{\text{Zytoplasma}}$ [110]) den im Zytoplasma dissipierten Anteil überwiegen [108]. Aus dynamischen Experimenten mit RBK wurde gefolgert, dass in der Membran etwa 2-4 mal mehr Energie dissipiert wird als im Zytoplasma [88, 90]. Dies würde bedeuten, dass die Energiedissipation der Zelle von der Membran dominiert wird und $2 \lesssim x \lesssim 4$ [88, 90]. Eine andere Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Rate der Energiedissipation in Membran und Zytoplasma zwar stark mit der angelegten Scherrate ansteigt, man aber davon ausgehen kann, dass das Verhältnis der beiden Raten unabhängig von der Form der Zelle und der angelegten Scherrate konstant in etwa 1 ist. Somit würde $x \approx 1$ gelten [108, 109].

Messungen mit Mikropipetten haben ergeben, dass z.B. das Relaxationsverhalten von RBK nahezu ausschließlich von der Membranviskosität bestimmt wird und das Zytoplasma fast keinen Einfluss hat [110–112].

Andere experimentelle Studien verwenden zum Abgleich ihrer Beobachtungen mit theoretischen Vorhersagen hingegen lediglich die Viskosität des Zytoplasmas, während die Membranviskosität vernachlässigt wird [65, 113–116]. Trotz oder gerade wegen dieser Vernachlässigung, ergeben sich sehr gute Übereinstimmungen zwischen theoretischer Erwartung und experimentellen Ergebnissen.

In theoretischen Modellen wird die Membranviskosität außerdem häufig gänzlich vernachlässigt und die RBK-Membran als rein elastische Schale betrachtet [117, 118]. In den aufgrund der Komplexität des Problems und der deshalb benötigten großen Rechenleistung häufig verwendeten, zweidimensionalen Simulationen kann die Membranviskosität z.B. überhaupt nicht berücksichtigt werden (Timm Krüger, persönliche Mitteilung, 18. März 2015). Einen guten Überblick über die verschiedenen Ansätze und Implementierungen der Membranviskosität in Simulationen roter Blutkörperchen gibt [107].

Es wird vermutet, dass die unterschiedlichen Ergebnisse zum Teil auf die unterschiedlichen Messmethoden beziehungsweise Messparameter zurückgeführt werden können (vgl. z.B. [119]).

Das in dieser Arbeit verwendete, in Abschnitt 3.4.2 vorgestellte theoretische Modell für den trägheitsunabhängigen Lift-Effekt von Olla [120] basiert auf dem Ansatz von Keller &

Skalak [108]. Dort wird die Membranviskosität in erster Näherung vernachlässigt. Deshalb, und weil ihre Berücksichtigung bei den Berechnungen in dieser Arbeit zu unrealistischen Werten führen würde, die nicht durch experimentelle Messungen nachgestellt werden können, wird die Membranviskosität hier ebenfalls in erster Näherung vernachlässigt.

3.3. Dynamik roter Blutkörperchen im Scherfluss

Der komplexe Aufbau roter Blutkörperchen bewirkt ein vielfältiges Verhaltensmuster als dynamische Antwort der Zellen auf eine anliegende Scherspannung. Neben den Zelleigenschaften selbst spielt dabei auch die genaue Beschaffenheit des Flussfeldes eine wichtige Rolle. Das physiologisch relevante System roter Blutkörperchen in parabolischen Geschwindigkeitsfeldern, wie es z.B. im Blutkreislauf auftritt ist, ist dabei bereits eine äußerst komplexe Problemstellung für Experiment und Simulation. Auch werden RBK je nach Kapillargröße stärker oder schwächer durch die Anwesenheit einer Wand beeinflusst. Einen Überblick über physiologische Flussbedingungen gibt Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1.: Mittlere Strömungsgeschwindigkeiten und mittlere Drücke im Körpergefäßsystem des Menschen (aus [121]).

Gefäß	Durchmesser	Mittlere Geschwindigkeit (cm/s)	Mittlerer Druck (mmHg)
Aorta	20 - 25 mm	20	100
Kleine Arterien		10 - 5	95
Sehr kleine Arterien		2	80 - 70
Arteriolen	60 - 20 μm	0,2 - 0,3	70 - 35
Kapillaren	$\sim 6 \mu\text{m}$	0,03	35 - 15
Sehr kleine Venen		0,5 - 1,0	20 - 10
Kleine Venen		1 - 5 mm	< 15
Große Venen	5 - 10 mm	5 - 15	< 15
Vena cavae	20 - 30 mm	10 - 16	< 15

Um diese vielfältigen Einflüsse zu kontrollieren, wurde zunächst das vereinfachte System von Vesikeln im linearen Scherfluss untersucht. Dabei zeigte sich, dass bereits viele der im einfachen Scherfluss gefundenen Phänomene die tatsächlichen Verhaltensweisen von RBK im Poiseuille-Fluss sehr gut abbilden.

Dass bis jetzt nur vergleichsweise wenige experimentelle Daten zum dynamischen Verhalten roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss vorliegen, ist der nach wie vor technisch anspruchsvollen experimentellen Umsetzung geschuldet. Auch dass sich die relevanten Bestandteile des Systems über mehrere Größenordnungen auf der Längenskala verteilen (von Nanometer (Membrandicke) bis zu Millimeter (Kanaldimensionen)), trägt dazu bei. Dennoch wurden bereits zahlreiche Phänomene beschrieben und eine erschöpfende Zusammenfassung aller Details würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Aus diesem Grund soll hier ein

relativ knapper Einblick in die für diese Arbeit wichtigen Eigenschaften der Dynamik roter Blutkörperchen im Scherfluss gegeben werden. Einige grundlegende Phänomene werden (teils mangels ihrer detaillierten Beschreibung für RBK) dabei zunächst am Modellsystem von Vesikeln dargestellt.

3.3.1. Vesikel als Modellsystem für rote Blutkörperchen

Vesikel sind mit einer Flüssigkeit gefüllte, geschlossene Lipid-Doppelschichten. Die darin eingebauten Lipide besitzen hydrophile und hydrophobe Enden, weshalb sich in wässriger Lösung in vielen Fällen eine Doppelschicht ausbildet, die strukturell der Plasmamembran roter Blutkörperchen sehr ähnlich ist. Vesikel lassen sich in verschiedensten Größen herstellen, von wenigen Nanometern (engl. *small unilamellar vesicles*, SUV) bis hin zu einigen hundert Mikrometern (engl. *giant unilamellar vesicle*, GUV) Durchmesser. Während der Herstellung lassen sich viele Eigenschaften der Vesikel einstellen, z.B. die Größe, das reduzierte Volumen oder Viskosität und Dichte der eingeschlossenen Flüssigkeit. Wichtigster Unterschied zu RBK ist das fehlende Zytoskelett, wodurch die Vesikel keine Scherelastizität besitzt und das System wesentlich vereinfacht wird. Im Gegensatz zu Tropfen bleiben aber Oberfläche und Volumen von Vesikeln bei Deformation erhalten. Dadurch ähneln sie in einigen Eigenschaften eher festen Körpern als Tropfen [15].

Die Ähnlichkeit zwischen Vesikeln und RBK ermöglichte es z.B., die bikonkave Ruheform roter Blutkörperchen auf die Minimierung der elastischen Biegeenergie bei Vesikeln mit einem entsprechenden Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis zurückzuführen [122].

Sobald ein Scherfeld ins Spiel kommt, wird bereits die Modellierung von Vesikeln zur Herausforderung, da die Flussgleichungen für flexible Randbedingungen gelöst werden müssen. Dieses Wechselspiel zwischen Deformation und Flussfeld macht eine analytische Lösung nahezu unmöglich [15]. Eine zusätzliche Herausforderung bei der Modellierung stellt das Biegemodul von Vesikeln dar, welches in der Größenordnung weniger $k_B T$ liegt, wodurch thermische Membranfluktuationen auftreten, wenn die Membranspannung niedrig ist. Solche Fluktuationen können eine gewisse Überschussfläche binden, ohne dass es bei der optischen Mikroskopie direkt zu erkennen ist [123]. In einem angelegten Scherfluss tritt diese Überschussfläche dann unter Umständen in Erscheinung. Dies äußert sich z.B. darin, dass selbst sphärische Vesikel trotz der Erhaltung von Oberfläche und Volumen eine gewisse Deformierbarkeit aufweisen [15].

3.3.2. Dynamische Bewegungsformen von Vesikeln im Scherfluss

Die Dynamik von Vesikeln unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen, wie z.B. beim Anlegen eines Scherfeldes, verspricht viele Erkenntnisse über das Verhalten komplexerer Systeme unter den gleichen Bedingungen, wie etwa das roter Blutkörperchen. Deshalb waren sie bereits Inhalt zahlreicher theoretischer [90, 108, 124–128] und experimenteller [84, 113, 129–132] Studien, die sich mit ihrem dynamischen Verhalten in Scherfeldern beschäftigten.

In Ruhe wird die Form von Vesikeln ausschließlich durch das in Gleichung (3.8) beschriebene, reduzierte Volumen bestimmt. Im relativ simplen System eines einfachen Scherfeldes mit dem linearen Geschwindigkeitsfeld $v = \dot{\gamma}z$ benötigt man die dimensionslose Scher-

rate χ und den Viskositätskontrast $\lambda = \frac{\eta_{\text{in}}}{\eta_{\text{ext}}}$ zwischen innerer (η_{in}) und äußerer (η_{ext}) Viskosität zur vollständigen Charakterisierung des Systems. χ und $\dot{\gamma}$ werden dazu über den Vesikelradius R_V und das Biegemodul κ definiert [128]:

$$\chi = \frac{\eta_{\text{ext}} R_V^3 \dot{\gamma}}{\kappa} . \quad (3.29)$$

Manchmal wird χ auch als Kapillaritätszahl Ca bezeichnet, was zu Verwechslungen mit der in Gleichung (2.22) definierten Kapillaritätszahl führen kann [45, 133, 134]. Die dimensionslose Größe χ verknüpft nämlich nicht die Oberflächenspannung mit den viskosen Kräften, sondern setzt die Zeitskala des angelegten Flusses $\dot{\gamma}^{-1}$ in Relation zur Relaxationszeit $\tau = \eta_{\text{ext}} R_V^3 \kappa^{-1}$ der Vesikel nach einer Biegedeformation. Sie beschreibt somit die relative Stärke der hydrodynamischen Kräfte im Vergleich zur Biegesteifigkeit [45], oder, in anderen Worten: je größer χ , desto stärker die Deformation der Vesikel durch das Flussfeld.

Keller & Skalak stellten in ihrer wegweisenden Arbeit [108] eine Theorie für Vesikel mit einer festen ellipsoiden Form ($\chi \ll 1$) im einfachen Scherfluss auf (KS-Theorie) [15, 128]. Dazu erweiterten sie Jefferys Studien, die sich bereits früher mit festen Rotationsellipsoiden im Scherfluss beschäftigt hatten, um eine bewegliche Grenzfläche zwischen Vesikel und Fluss [108, 135].

Jeffery beschreibt für ein hartes Rotationsellipsoid in einem Scherfluss eine Rotationsbewegung, ähnlich der einer sich drehenden Münze [135]. In dieser Taumelbewegung (engl. *tumbling*, Abk.: TB, oder *flipping*) dreht sich die lange Achse des Rotationsellipsoids in einer ungleichmäßigen Art und Weise um eine Achse, die senkrecht zur Ebene des Scherfeldes steht [15].

Die KS-Theorie zeigt nun, dass sich Jefferys Ansatz auch auf ein Ellipsoid mit beweglicher Oberfläche anwenden lässt, wodurch auch Vesikel mit ihr beschrieben werden können [15]. Sie kommt für Vesikel zu zwei, sich deutlich voneinander unterscheidenden, Bewegungsregimen: Für große Viskositätskontraste λ (z.B. hohes η_{in}) verhält sich das Ellipsoid wie ein hartes Teilchen und vollführt die aus Jefferys Theorie bekannte Tumbling-Bewegung. Unterhalb eines kritischen Viskositätskontrastes λ_c nehmen die Vesikel hingegen einen festen Anstellwinkel θ an. Dieser ist definiert als der Winkel zwischen der langen elliptischen Hauptachse der Vesikel und den Stromlinien des ungestörten Flussfeldes. In diesem Zustand rotiert außerdem die Membran um die innere Flüssigkeit, ähnlich einer Panzerkette, von deren englischer Bezeichnung auch der Name des Bewegungszustandes abgeleitet wurde: *tank-treading*, Abk.: TT [15, 132, 136]. Der kritische Viskositätskontrast λ_c ist dabei unabhängig von der angelegten Scherrate, wird aber kleiner für Vesikel mit größerer Überschussfläche Δ (vgl. Abb. 3.6 links) [45].

Die KS-Theorie wird bis heute oft als Grundlage theoretischer Betrachtungen herangezogen, jedoch schlossen Keller & Skalak durch die Vorgabe einer festen Form explizit Deformationsvorgänge im Fluss aus ihrer Theorie aus [15]. Für $\chi \sim 1$ wird die Deformation der Vesikel durch das Flussfeld aber relevant und es kann ein zusätzliches Bewegungsregime zwischen TB und TT beobachtet werden, das zuerst in Experimenten von Kantsler & Steinberg entdeckt wurde [137]. Das sogenannte *Trembling-Regime* (TR) zeichnet sich durch unregelmäßige Oszillationen der Vesikel-Orientierung aus, die mit starken, asymmetrischen Formänderungen einhergehen [45, 138, 139]. Andere Bezeichnungen für dieses

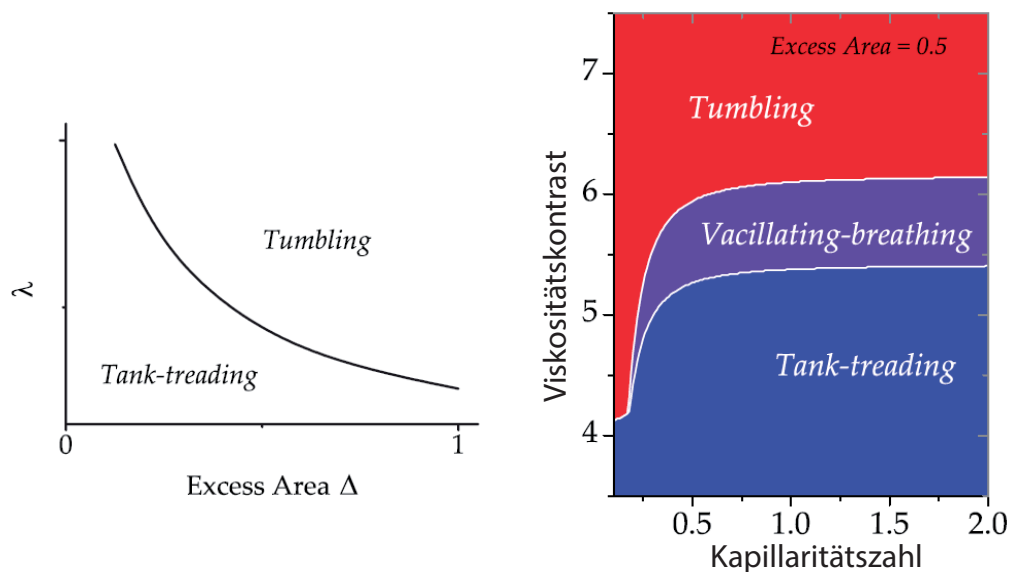


Abbildung 3.6.: Bewegungszustände von Vesikeln in Abhängigkeit von Kapillaritätszahl und Viskositätskontrast. *Links*: Verlauf des kritischen Viskositätskontrastes mit der Überschussfläche. $\Delta = 0$ entspricht einer Kugel, für die λ_c (in der Abbildung mit λ notiert) nach der KS-Theorie divergiert. *Rechts*: Ein typisches Phasendiagramm für eine Überschussfläche von $\Delta = 0,5$, also eine relativ sphärische Vesikel. Die jeweiligen Bereiche der drei Bewegungszustände sind eingezeichnet. Es ist deutlich zu sehen, dass nicht für alle Viskositätskontraste alle Bewegungszustände vorkommen. Auch der Einfluss der Scherrate (über Ca) ist begrenzt (Abb. modifiziert aus [142], mit freundlicher Genehmigung der American Physical Society, ©APS 2009).

Übergangs-Regime sind aus voneinander verschiedenen Ansätzen zur theoretischen Beschreibung entstanden und heißen *Vacillating-Breathing* (VB) [140] und *Swinging* (S) [141]. Auf die Unterschiede der verschiedenen Modelle geht [45] näher ein.

Der rechte Teil von Abb. 3.6 zeigt eine exemplarische Phasenlandschaft, aus der man die Einflüsse der jeweiligen Parameter auf den Bewegungszustand ablesen kann. Für eine (quasi-sphärische) Vesikel mit einer Überschussfläche von $\Delta = 0,5$ sind die drei Bereiche für TT, VB und TB als Funktion von λ und Ca aufgetragen. Es ist auch deutlich zu erkennen, dass der Einfluss der einzelnen Parameter auf die Bewegungszustände begrenzt ist. So vollführt eine Vesikel mit einem sehr kleinen Viskositätskontrast für alle Ca (also z.B. für alle Scherraten) eine TT-Bewegung, während bei großen λ unabhängig von Ca ausschließlich TB vorkommt. Lediglich in einem eng begrenzten Bereich ist eine Abhängigkeit des Bewegungszustandes von Ca zu erkennen. Im in Abb. 3.6 gezeigten Beispiel kann z.B. für $\lambda = 5$ die Vesikel durch eine Erhöhung von Ca (z.B. über die Scherrate) vom TB- über den VB- in den TT-Zustand getrieben werden.

3.3.3. Dynamische Bewegungsformen roter Blutkörperchen im Scherfluss

Im Fall von RBK kommen als weitere bestimmende Faktoren noch die Schersteifigkeit des Zytoskeletts und das Formgedächtnis der RBK-Membran [143] hinzu. Daraus erwachsen zusätzliche Phänomene, wie eine rollende und eine schwingende Bewegung oder, in sehr kleinen Kanälen, die Ausbildung der sogenannten Fallschirmform [144], wobei auf Formumwandlungen von RBK in sehr kleinen Kapillaren hier nicht näher eingegangen wird. Informationen dazu sind z.B. in [49] zu finden.

Die gängige Größe zur Charakterisierung der auf ein RBK wirkenden Kraft im Scherfluss ist die Scherspannung $\tau = \eta_{\text{ext}}\dot{\gamma}$, die auch häufig für die Einteilung der Bewegungsregime herangezogen wird. Dies ist aber nur mit Einschränkungen möglich, da der Bewegungszustand, wie eben für Vesikel gezeigt, maßgeblich vom Viskositätskontrast abhängt und nicht gleichverteilt von äußerer Viskosität und Scherrate [136]. So kann z.B. bei großen Viskositätskontrasten λ das RBK trotz sehr hoher Scherspannungen im Tumbling-Zustand verbleiben, während es bei einem niedrigeren Viskositätskontrast bei der gleichen Scherspannung bereits im TT Zustand ist.

Für eine eindeutige Beschreibung bedarf es deshalb der Angabe von äußerer Viskosität η_{ext} und Scherrate $\dot{\gamma}$, wenn man davon ausgeht, dass die innere Viskosität der RBK mit $\eta_{\text{in}} = 10$ mPas bei Raumtemperatur in guter Näherung konstant ist. Aus diesem Grund sind auch die quantitativen Aussagen von Simulationen mit Vorsicht zu genießen, da es stark vom jeweiligen Modell abhängt, wie z.B. die Membranviskosität der RBK für den Viskositätskontrast gewichtet wird. Deshalb werden im folgenden Kapitel hauptsächlich experimentelle Daten angegeben, um die Vergleichbarkeit mit den in dieser Arbeit gemessenen Ergebnissen sicherzustellen. Auch wenn die meisten experimentellen Studien in einem ähnlichen Bereich durchgeführt wurden und die Unterschiede deshalb relativ gering sind, wird hier versucht, die Bewegungsregime von RBK, soweit möglich, jeweils über die Scherspannung und die Angabe der Scherrate oder der äußeren Viskosität voneinander abzugrenzen. Im Fall von auftretenden Hystereseerscheinungen [114, 145] wird jeweils die Grenzscherrate bei ansteigender Scherspannung angegeben. Dieser Abschnitt hält sich im Wesentlichen an die Darstellung der detaillierten Untersuchungen zur Dynamik roter Blutkörperchen im einfachen Scherfluss von Dupire *et al.* [145] und zur Swinging-Bewegung von Abkarian *et al.* [114].

Bei kleinen Scherspannungen vollführen RBK die bereits von Vesikeln bekannte Tumbling-Bewegung [90, 136, 145]. Dabei rotiert die Symmetrieachse der RBK in der Ebene des Schergradienten und die Zelle verhält sich annähernd wie ein starrer Körper [145]. Modelle, welche die KS-Theorie um die elastische Energie und das Formgedächtnis roter Blutkörperchen erweitern [90, 114, 143], zeigen jedoch Unterschiede zu diesem Verhalten auf [145]. Laut diesen Modellen treten lokal begrenzte Membranzillationen auf, die Membran bleibt global gesehen aber ortsfest [145]. Der zeitliche Verlauf des Winkels kann trotzdem mit Jefferys Modell für starre Ellipsoide [135, 145] beschrieben werden. Die RBK verlassen den Tumbling-Zustand in etwa bei $\tau \approx 0,06$ Pa ($\eta_{\text{ext}} = 7,15$ mPas) [145] (andere Werte: $\tau \approx 0,05$ Pa bei $\eta_{\text{ext}} = 31$ mPas [114]; $\tau \approx 0,05$ Pa bei $\eta_{\text{ext}} = 54$ mPas [136]). Aus ihrem theoretischen Modell heraus bestimmten Skotheim & Secomb die Lage des Übergangs bei $\tau \approx 0,03$ Pa bei $\eta_{\text{ext}} = 27$ mPas [90].

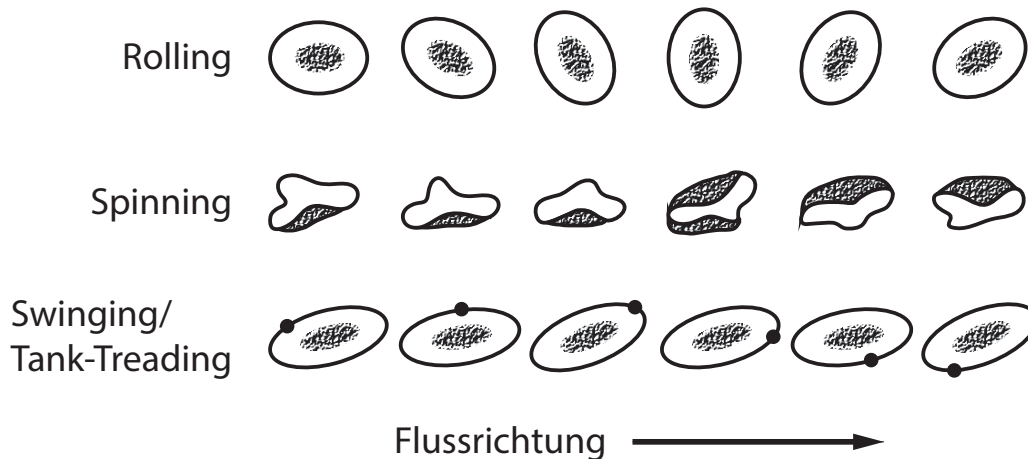


Abbildung 3.7.: Schematische Darstellung der Rolling, Spinning und Swinging/Tank-Treading-Bewegung (Abb. nach [136])

Bei einer Erhöhung der Scherspannung über diese Grenzen hinaus werden die Amplituden der lokalen Membranoszillationen immer größer und der Tumbling-Zustand dadurch destabilisiert. Eine Orientierungsänderung erlaubt es dem RBK schließlich den energetisch ungünstigen Scherdeformationen der Membran auszuweichen und die gesamte Zelldeformation zu minimieren [145]. Die Reorientierung findet zwischen $0,06 \text{ Pa} \lesssim \tau \lesssim 0,08 \text{ Pa}$ ($\eta_{\text{ext}} = 7,15 \text{ mPa}$) statt und bringt die Symmetrieachse der Zelle in die Scherebene (vgl. Abb. 3.7). Das RBK vollführt dann eine Rollbewegung, die nach dem engl. *rolling*, Abk.: RO, genannt wird [145]. Diese Bewegungsform ermöglicht der Zelle nicht nur die Minimierung der lokalen Scherdeformationen, sondern auch die der globalen Deformation [145]. Das RBK verbleibt in diesem energetisch günstigen Rolling-Zustand, bis die Scherspannung ausreichend ist, um die Membran in Bewegung um das Zytoplasma zu versetzen [145].

In manchen Studien wird der Rolling-Zustand überhaupt nicht beschrieben beziehungsweise beobachtet, sondern ein direkter Übergang der RBK vom Tumbling in einen Zustand, in dem sich die Membran um das Zytoplasma bewegt [114]. Dies geschieht durch eine immer stärkere Oszillation der einzelnen Membranelemente, die ab einer gewissen Scherkraft über genug Energie verfügen, um den hohen Widerstand der Membran bei der Änderung der Richtung der Krümmung zu überwinden. Dieser tritt auf, wenn sich die Membran vom äußeren Gürtel in die Delle auf der flachen Seite der bikonkaven Scheibe bewegt. Der Übergang liegt im Bereich von $0,05 \text{ Pa} < \tau < 0,11 \text{ Pa}$ bei einer externen Viskosität von $\eta_{\text{ext}} = 54 \text{ mPa}$ [136] und führt zu einer schwingenden Bewegung, nach dem engl. *swinging*, Abk.: SW, genannt [114, 145].

Der Übergang aus der Rolling-Bewegung zum Swinging läuft über eine weitere Zwischenstufe ab, die *spinning*, Abk.: SP, genannt wird [136, 145]. Spinning wurde von Goldsmith & Marlow ursprünglich als Übergangszustand zwischen Rolling und Tank-Treading beschrieben, wird seitdem aber kaum in der Literatur berücksichtigt [136]. Für den Übergang beginnt sich die während der Rolling-Bewegung senkrecht zur Scherebene stehende Rotationsach-

se in diese hineinzudrehen, während sich die Membran weiterhin um die Rotationsachse dreht. Nach einer 90° Drehung liegt die Rotationsachse schließlich in der Scherebene. Dabei nehmen die RBK eine trilobulare Form (dreieckig, mit geraden Abschnitten gegenüber den Ausstülpungen, vgl. Abb. 3.7) an und rotieren ähnlich einem Frisbee um die Rotationsachse. Bei den kleineren, von Dupire & Vialat verwendeten Scherraten [145], ist die Trilobularität nicht sichtbar, weshalb sie in deren Veröffentlichung nicht beschrieben wird [145]. Die Membran passt sich im Anschluss an die Reorientierung an die Stromlinien an und beginnt sich um das Zytoplasma zu bewegen [145]. Der Übergangsbereich liegt bei $0,09 \text{ Pa} \lesssim \tau \lesssim 0,15 \text{ Pa}$ mit $\eta_{\text{ext}} = 28,5 \text{ mPas}$ (untere Grenze [145]) beziehungsweise $\eta_{\text{ext}} = 54 \text{ mPas}$ (obere Grenze [136]).

Mit der einsetzenden Membranrotation um das Zytoplasma beginnt die bereits erwähnte Swinging-Bewegung. Dabei schwingt der Anstellwinkel des RBK um einen bestimmten Wert, wobei Frequenz und Amplitude hauptsächlich von der angelegten Scherspannung abhängen [114]. Grund für die Schwingbewegung ist das Formgedächtnis roter Blutkörperchen [143]. Dies führt dazu, dass z.B. viel Energie aufgebracht werden muss, wenn der Membranteil, der in Ruhe die Einbuchtung darstellt, seine Krümmungsrichtung ändern muss und nur wenig Energie, wenn er während der weiteren Rotation wieder in seine ursprüngliche Krümmungsrichtung zurückkehrt [114]. Folgerichtig ist die Swinging-Frequenz doppelt so groß wie die Tank-Treading-Frequenz [114].

Von Tank-Treading ist die Rede, sobald sich die Membran des RBKs um das Zytoplasma bewegt. Die Abgrenzung zum SW erfolgt über den Anstellwinkel zum Fluss, der bei der reinen TT-Bewegung konstant ist. Im TT-Zustand verhält sich das RBK ähnlich einem flüssigen Tropfen, weshalb beim TT auch von einem „verflüssigten“ Zustand gesprochen wird [145].

Im TT-Zustand nimmt das RBK bei stärkeren Scherspannungen eine elliptische Form an. Die rotierende Membran überträgt die Energie der angelegten Scherspannung auf das Zytoplasma, in dem sie schließlich dissipiert wird [109, 132]. Die Zusammensetzung der TT-Bewegung aus Rotation und Verformung kann man sich intuitiv klarmachen, wenn man die in Abb. 2.1 gezeigte Aufteilung eines Scherfeldes in Rotations- und Elongationsanteil bedenkt [15].

Die TT-Frequenz, mit welcher die Membran um das Zytoplasma rotiert, der Anstellwinkel zum Fluss und die Stärke der Deformation sind die charakteristischen Größen zur Beschreibung des TT-Zustandes. Sie werden vom reduzierten Volumen V^* (beziehungsweise der Überschussfläche Δ), dem Viskositätskontrast λ und der angelegten Scherrate $\dot{\gamma}$ bestimmt [90, 113, 146]. Die Deformation zumeist durch die Taylor-Deformation [147] (im Englischen auch als *Elongation Index* (EI) bekannt) charakterisiert [136, 148, 149]. Sie berechnet sich mit der Länge L und der Breite B der Zelle zu

$$\text{TD} = \frac{L - B}{L + B} \quad . \quad (3.30)$$

Für höhere Scherspannungen nimmt die TD für RBK im Allgemeinen zu. Die Deformationszunahme wird durch den Widerstand der Plasmamembran gegen Flächendehnung schließlich gebremst und geht in Sättigung [149].

Die TT-Frequenz nimmt linear mit der Scherrate und dem Viskositätskontrast zu [150],

während der Anstellwinkel mit steigender Scherrate und größerem reduzierten Volumen ab- und mit steigendem Viskositätskontrast zunimmt [113, 146].

Eine interessante physiologische Bedeutung des TT-Zustandes ist die Freisetzung von ATP [65]. Durch die unterschiedliche Membrankrümmung an verschiedenen Positionen auf der RBK-Membran öffnen sich während der Rotation der Membran Kanäle für den Transport von ATP nach außen, wo es als Signalmolekül die lokale Vergrößerung der Blutgefäße induziert [65]. Im vergrößerten Gefäß nimmt die Scherrate schließlich ab und das RBK verlässt den TT-Zustand wieder [65].

Eine weitere Folge der TT-Bewegung, der konstante Anstellwinkel zu den Stromlinien, spielt eine wichtige Rolle für die Entstehung des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes, ohne den der menschliche Blutkreislauf nicht funktionieren würde [15, 151].

3.4. Lift-Effekte auf Zellen im Scherfluss

Die rheologischen Eigenschaften von Blut werden neben der Dynamik der einzelnen Blutzellen auch signifikant von Lift-Effekten beeinflusst (vgl. Kapitel 1). Auf der Suche nach der Erklärung für den Fåhræus-Lindqvist Effekt entdeckten dabei Segré & Silberberg 1961 die trägheitsbedingten Lift-Kräfte auf harte Kugeln [22] bei $Re \geq 1$ und Goldsmith & Mason den trägheitsunabhängigen Lift-Effekt auf deformierbare Objekte bei $Re \leq 1$ [23], wobei letzterer in dieser Arbeit im Fokus steht. Aufgrund ihrer Bedeutung für die mikrofluidische Zellsortierung und zur Abgrenzung des trägheitsabhängigen vom trägheitsunabhängigen Lift-Effekt werden in diesem Abschnitt beide Phänomene eingeführt. Die Darstellung hält sich weitestgehend an die eigene Veröffentlichung [15].

3.4.1. Trägheitsbedingter Lift-Effekt

Als Segré & Silberberg 1961 harte Kugeln mit Durchmessern von 0,8 mm und 1,71 mm [152] in einer senkrechten Röhre mit einem Durchmesser von 11,6 mm untersuchten, stellten sie fest: „We have observed that macroscopic spherical particles collect into a thin, annular region when an initially uniform dilute suspension is passed in laminar flow through a straight tube.“ [22].

Knapp hinter dem Röhreneingang oder für niedrige Strömungsgeschwindigkeiten fanden sie die Kugeln zufällig über den Kanalquerschnitt verteilt. Für ausreichend große Geschwindigkeiten und Abstände vom Kanaleingang beobachteten sie hingegen eine Fokussierung der Kugeln auf konzentrische Kreistränge. Diese hatten einen Abstand von etwa $0,6 \cdot R$ (mit dem Rohrradius R) von der Mittelachse der Röhre [22, 152]. Ihre Untersuchungen führten sie bei Reynoldszahlen von $43 \leq Re \leq 175$ durch [152, 153].

Aus den Beobachtungen folgerten Segré & Silberberg, dass, um die ringförmigen Gleichgewichtspositionen zu realisieren, nicht nur eine von der Wand weg wirkende, sondern auch eine vom Zentrum weg weisende Kraft auf die Kugeln wirken müsse. Dieser in Abb. 3.8 graphisch dargestellte Aspekt war neu, da aufgrund der Beobachtungen des zellfreien Bereichs beim Fåhræus-Lindqvist Effekt bisher nur eine zentripetale Kraft vermutet wurde [152].

Es zeigte sich, dass die Fokussierung größerer Partikel stärker ausgeprägt ist und außerdem

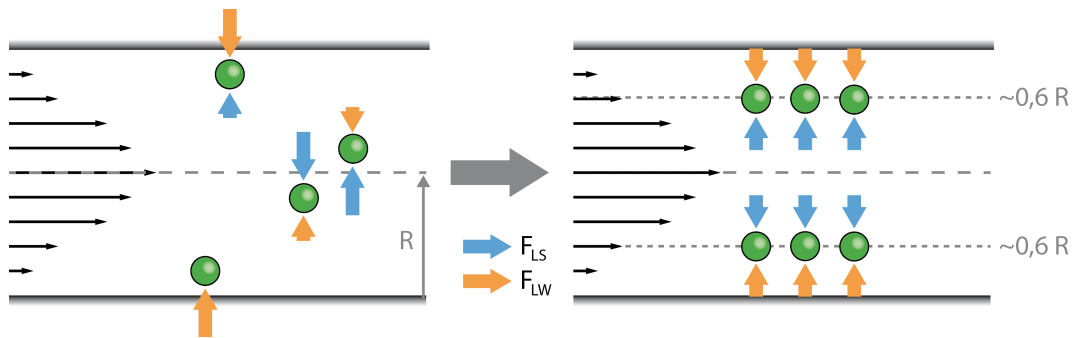


Abbildung 3.8.: Einstellung des Gleichgewichtes aus wand-induziertem (F_{LW}) und schergradient-induziertem (F_{LS}) Lift (Abb. nach [97]).

wurden Abhängigkeiten von der Partikel-Reynoldszahl Re_p und der charakteristischen Geschwindigkeit im Kanal U gefunden [152]. Aufgrund dieser Beobachtungen vermuteten bereits Segré & Silberberg als Ursache des Effektes die Trägheit der Flüssigkeit, da tatsächlich keine lateralen Bewegungen der Kugeln beobachtet wurden wenn diese vernachlässigbar war [152]. Ihre Annahme wurde in der Folgezeit durch theoretische und experimentelle Arbeiten anderer Gruppen bestätigt [23, 154, 155].

Den ersten erfolgreichen theoretischen Lösungsansatz veröffentlichte Saffman 1965 [156]. Darin behandelte er die Bewegung einer harten Kugel in einem linearen Scherfeld in der Nähe einer Wand [156]. In seinem Modell geht er davon aus, dass die Kugel nahe der Wand einen zusätzlichen Strömungswiderstand (*drag*) erfährt, der sie im Vergleich zur umgebenden Flüssigkeit abbremst. Die Stärke dieses Effektes hängt dabei von der relativen Größe von Kugel und Kanal (vgl. Re_p Gleichung (2.19)) sowie vom Abstand zur Wand ab. Eine Kugel mit einer relativen Geschwindigkeit parallel zu den Strömungslinien erfährt demnach eine von der Wand weg gerichtete Kraft, wenn die Kugel langsamer und eine zur Wand hin gerichtete Kraft, wenn die Kugel schneller ist als die sie umgebende Flüssigkeit (für $Re \gg 1$, Re_p klein und einem ausreichend großen Wandabstand). Die effektive Viskosität der Flüssigkeit ändert sich durch die zusätzliche Reibung nicht, wenn die Gesamtviskosität hoch ist. Außerdem zeigte Saffman, dass sich das Strömungsfeld um eine Kugel in der Nähe einer Wand deutlich von dem um eine Kugel im ungebundenen Scherfluss unterscheidet [156]. Dies berücksichtigte er jedoch nicht in seinen Berechnungen, da ihm die Implementierung als zu schwierig erschien [156]. Die Berechnungen von Saffman stimmen qualitativ gut mit den Ergebnissen von Segré & Silberberg überein, konnten aber aufgrund der unterschiedlichen Voraussetzungen (z.B. linearer Scherfluss statt Poiseuille-Profil) nicht direkt quantitativ mit ihnen verglichen werden.

Zahlreiche theoretische Untersuchungen folgten und versuchten, das von Segré & Silberberg beobachtete Verhalten harter Kugeln in einer Röhre zu erklären [153, 157–160]. Sie fanden zwar übereinstimmend, dass die Trajektorien stark von der Flussgeometrie abhängen und ob die Partikel Auftrieb erfahren oder nicht, konnten aber nicht weiter zur Klärung des Phänomens als Ganzes beitragen [158].

Die Studie von Cox & Brenner [157] behandelte dann als erste das vollständige dreidi-

mensionale Poiseuille-Profil inklusive der es begrenzenden Wand, fand aber lediglich eine nicht-triviale Lösung, die keine expliziten Schlüsse zuließ [158]. Ho & Leal [158] reduzierten das Problem schließlich auf eine zweidimensionale Darstellung des Poiseuille-Profiles und fanden als dominante Effekte für die laterale Migration die durch die Kugel hervorgerufene Störung des Strömungsfeldes und deren Reflektion an der Wand. Der Einfluss der Rotation der Kugel über den Magnus-Effekt sowie der Einfluss der relativen Geschwindigkeit der Kugel gegenüber der angrenzenden Strömung sind nach Ho & Leal um etwa ein bis drei Größenordnungen schwächer und können deshalb für auftriebsfreie Partikel vernachlässigt werden [53, 158]. Für größere Geschwindigkeitsunterschiede (z.B. für Partikel mit Auftrieb in einer senkrechten Röhre oder große Verhältnisse von Partikel- zu Kanalradius) müssen diese Effekte jedoch berücksichtigt werden [158, 161].

Ho & Leal klärten auch die Richtungen, in welche die einzelnen Komponenten der Kraft wirken. Demnach erzeugt die Wechselwirkung zwischen Kugel und Wand, der sogenannte „Wand-Effekt“, eine abstoßende Kraft. Die Wechselwirkung der Kugel mit der Krümmung des Strömungsfeldes bewirkt hingegen eine Migration hin zu Bereichen mit größerer Scher rate („Schergradienten-Effekt“) [53, 158]. Die Superposition beider Kräfte führt somit zu den von Segré & Silberberg beobachteten, konzentrischen Gleichgewichtspositionen. Die theoretischen Ergebnisse von Ho & Leal passten als erste hervorragend zu den verfügbaren experimentellen Daten [152, 158, 162, 163].

In den Folgejahren wurden die theoretischen Grundlagen der trägheitsbedingten Kräfte immer weiter geklärt. So wurde eine zusätzliche Abhängigkeit von der Reynoldszahl gezeigt und die Voraussetzungen der Modelle immer weiter gelockert (z.B. für Re bis zu 1700) [53, 153, 159, 160]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Gleichgewichtsposition der Partikel für höhere Re näher an der Wand liegt [153, 159, 160]. Die Skalierung der trägheitsbedingten Lift-Kräfte auf harte Kugeln im Poiseuille-Fluss in quadratischen Kanälen für $Re > 1$ und $Re_p \ll 1$ wurde bestimmt zu [53, 153, 158–161, 164]

$$F_L \propto \frac{\rho U^2 a^4}{w^2}. \quad (3.31)$$

Treffen die Voraussetzungen für die der Abschätzung zugrundeliegenden, asymptotischen Expansionstheorie nicht mehr zu, wie z.B. für räumlich stark eingeschränkte Objekte ($Re_p \geq 1$) oder Partikel sehr nahe an einer Wand, passen auch die theoretischen Vorhersagen nicht mehr zu den experimentellen Daten [153]. Di Carlo *et al.* bestimmten deshalb eine Skalierung für den Spezialfall von Partikeln mit Durchmessern in der Größenordnung des Kanals ($\frac{a}{D_h} \approx 1$) [165] und fanden heraus, dass für diesen Fall nahe einer Wand der wandinduzierte Lift-Effekt dominiert, der wie

$$F_{LW} \propto f_l \cdot \frac{\rho U^2 a^6}{w^4} \quad (3.32)$$

skaliert. f_l beschreibt hier einen dimensionslosen Lift-Koeffizienten [165]. Bei ausreichendem Abstand von der Wand überwiegt die schergradienten-induzierte Kraft [53, 165]

$$F_{LS} \propto f_l \cdot \frac{\rho U^2 a^3}{w^4}. \quad (3.33)$$

3.4.2. Trägheitsunabhängiger Lift-Effekt

Entdeckung der lateralen Migration deformierbarer Objekte im Stokes-Regime

Etwa ein halbes Jahr nachdem Segré & Silberberg ihre Ergebnisse veröffentlichten, zeigten Goldsmith & Mason in ihren Versuchen, dass keine Migration harter Kugeln bei Reynoldszahlen von $Re \leq 10^{-6}$ auftritt [23]. Dies war nicht weiter verwunderlich, da bereits theoretisch vorhergesagt war, dass unter diesen Bedingungen keine laterale Migration harter Partikel auftreten kann [24, 135, 155, 166]. „In striking contrast, liquid drops and tiny threads undergoing shear deformation migrated towards the tube axis.“ [23]. Dieses Ergebnis war neu und unerwartet, da keines der bisherigen Modelle dazu in der Lage war, eine laterale Kraft bei so kleinen Reynoldszahlen ohne Partikel-Partikel-Wechselwirkungen zu erklären [135, 155, 166].

In ihren sorgfältigen Beobachtungen erkannten Goldsmith & Mason, dass die Migrationsgeschwindigkeit deformierbarer Objekte mit ihrer Größe und dem Abstand vom Kanalzentrum zunimmt (beziehungsweise mit dem Abstand von der Wand ab). Ihr knapper Erklärungsversuch zur Entstehung der lateralen Migration basiert dabei auf der Krümmung des Geschwindigkeitsprofils, doch bereits Goldsmith & Mason war klar, dass zunächst die Wechselwirkungen zwischen weichen Objekten und dem Scherfeld genauer untersucht werden müssen, bevor konkrete Randbedingungen für die theoretische Beschreibung der trägheitsunabhängigen lateralen Migration festgelegt werden können [23, 166].

Diese Auffassung wurde durch eine ihrer weiteren Beobachtungen bekräftigt: Ihnen fiel auf, dass sich Tröpfchen im Scherfeld zu prolaten Spheroiden mit einem Anstellwinkel von $\sim 45^\circ$ verformten [166]. Sie erkannten auch: „When tiny liquid droplets [...] were present inside the drops, internal circulation could be observed.“ [166]. Damit beschrieben sie bereits die Tank-Treading-Bewegung von Tröpfchen, die erst später noch näher untersucht wurde [132, 136]. Die Beobachtung des TT-Phänomens zeigte, dass das Wechselspiel zwischen Scherfeld und deformierbaren Objekten komplizierte Verhaltensweisen erzeugt, die für die Rheologie solcher Suspensionen von enormer Bedeutung sind. In den Folgejahren beschäftigten sich deshalb mehrere Gruppen mit dem Wechselspiel weicher Objekte mit Scherkräften. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden bereits in Abschnitt 3.3 skizziert.

Hier werden nun die wichtigsten Untersuchungen zum trägheitsunabhängigen Lift-Effekt auf Vesikel und rote Blutkörperchen zusammengefasst, um die Grundlagen für die im weiteren Verlauf dieser Arbeit präsentierten Versuche zu schaffen.

Trägheitsunabhängiger Lift-Effekt auf Vesikel

Als direkte Konsequenz der Symmetrie und Reversibilität des Stokes-Regimes erfahren harte Kugeln bei sehr niedrigen Re keine Kraft, die senkrecht zu den Stromlinien wirkt. Wird die Symmetrie beziehungsweise die Reversibilität der Strömung jedoch gebrochen, kann dies auch im Stokes-Regime eine laterale Migration hervorrufen [23, 167, 168]. Dies ist z.B. der Fall für Vesikel, welche sich als gutes Modellsystem für RBK auch zur Untersuchung des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes anbieten.

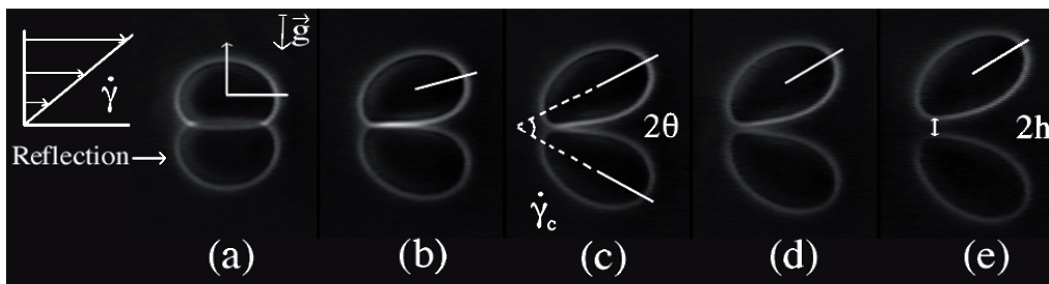


Abbildung 3.9.: Ablösevorgang einer initial adhärennten Vesikel nach Anlegen einer Scherkraft. (a) Adhärennte Vesikel, (b) Deformation durch eine angelegte Scherrate, (c) Ausrichtung mit festem Anstellwinkel, (d) Ablösen vom Substrat und (e) laterale Migration von der Wand weg. Im unteren Bereich der Bilder ist das Spiegelbild der Vesikel an der Kanalwand zu sehen (Abb. aus [130], mit freundlicher Genehmigung der American Physical Society, ©APS 2002).

Vesikel in Kontakt mit einer Wand Für Vesikel, die durch Adhäsion in Kontakt mit einer Wand stehen (z.B. Abb. 3.9(a)), ergibt sich an der Kontaktfläche eine Einschränkung der thermisch-induzierten Membranundulationen. Dadurch werden diese teilweise unterdrückt und eine abstoßende, entropisch begründete Wechselwirkung erzeugt, wie es die grundlegenden Arbeiten von Helfrich [169] und Servuss & Helfrich [170] beschreiben. Eine Vesikel in Kontakt mit einer Wand ist ein Modell, an dem interessante Aspekte der Ablösung adhärennter Zellen studiert werden können, weshalb es von mehreren Gruppen experimentell und theoretisch untersucht wurde [171–177]. Der von eingeschränkten Membranfluktuationen auf die angrenzende Wand ausgeübte Druck skaliert nach Helfrich mit [169]

$$p_b \sim \frac{(kT)^2}{\kappa h^3} \quad , \quad (3.34)$$

mit der Temperatur kT , dem Biegemodul der Membran κ und dem Abstand zwischen Wand und Membran $h = z - R$ (mit dem Abstand des tiefsten Punktes der Vesikel von der Wand h und dem Abstand des Vesikelschwerpunktes von der Wand z). Für Membranen mit einem endlichen Schermodul μ (wie z.B. die Membran roter Blutkörperchen) skaliert dieser Druck wie [178]

$$p_s \sim \frac{(kT)^2}{\mu h^5} \quad . \quad (3.35)$$

Gleichung (3.35) stellt ein einfaches Modell für RBK dar, wobei deren Kompositaufbau aber vernachlässigt wird [68].

Neuere Untersuchungen deuten an, dass die Membranfluktuationen zusätzlich aktiv durch Adenosintriphosphat (ATP) gesteuert werden [112, 179]. Aufgrund der Bedeutung der Undulationen für die Adhäsion und die Ablösung von Membranen von z.B. Gefäßwänden, würde eine aktive Steuerung eine Möglichkeit für Therapieansätze bieten, mit Anwendungen z.B. bei der Adhäsion von Blutplättchen, der Metastasierung von Krebs (vgl. Kapitel 7) oder der Sequestrierung *Plasmodium falciparum*-infizierter RBK (vgl. Kapitel 8).

Vesikel in der Nähe einer Wand Mit dem Ablösen von Vesikeln und deren Verhalten nahe einer Wand ($z \sim R$) haben sich unter anderen Seifert *et al.* beschäftigt [180]. In ihrem dreidimensionalen Ansatz beschreiben sie die adhärenente Vesikel als kugelige Kappe, die an einer Seite flach auf der Wand aufliegt und von einem attraktiven Potential gebunden wird, wie im Mikroskopbild in Abb. 3.9(a) gezeigt. Wird die Vesikel nicht deformiert und verbleibt mit dem flachen Teil zur Wand, wirkt aufgrund der anhaltenden Symmetrie des Systems keine Kraft. Ist die angelegte Scherkraft hingegen groß genug, um die Vesikelmembran auszulenken (Abb. 3.9(b)), entsteht schon für kleine Auslenkungen und Anstellwinkel θ eine repulsive Kraft. Diese steigt mit zunehmender Auslenkung weiter an, bis die Vesikel beginnt sich von der Wand zu lösen (Abb. 3.9(c)) und einen charakteristischen Anstellwinkel θ zum Fluss einzunehmen (Abb. 3.9(c/d)). Nach der Ablösung entfernt sich die Vesikel durch den anhaltenden Lift-Effekt zunehmend von der Wand (Abb. 3.9(e)).

Für Vesikel ohne Auftrieb fanden Seifert *et al.* durch eine numerische Berechnung, dass die Lift-Geschwindigkeit skaliert wie [180]

$$v_L \propto \frac{\dot{\gamma} R^3}{z^2} . \quad (3.36)$$

Für Vesikel deren Dichte höher ist als die der sie umgebenden Flüssigkeit, wirkt unter Umständen die Gravitationskraft der Lift-Kraft entgegen, wie in Abb. 3.9 durch den entsprechenden Vektor verdeutlicht wird. In diesem Fall stellt sich eine Gleichgewichtsposition ein, aus deren Lage die Stärke des Lift-Effektes berechnet werden kann, was von Lorz *et al.* [181] und später von Abkarian *et al.* [130] durchgeführt wurde. Während die Bestimmung der Kraft durch Lorz *et al.* mit bereits vorliegenden Vorhersagen gut übereinstimmt, weicht der empirisch bestimmte Zusammenhang von Abkarian *et al.* deutlich von den bisherigen Erwartungen ab. Letzterer wurde aus dem Gleichgewicht der Lift-Kraft mit dem Auftrieb $4\pi R^3 / 3\Delta\rho g$ bestimmt und gibt für die Lift-Kraft auf eine Vesikel

$$F_L = \frac{\eta \dot{\gamma} R^3}{h} \cdot f(1 - V^*) \quad (3.37)$$

Dabei steht $f(1 - V^*)$ für eine Funktion, die abhängig vom reduzierten Volumen V^* ist. In ihrer Studie realisierten sie unterschiedliche Werte für das reduzierte Volumen V^* durch osmotisches Schwellen der Vesikel in hypertonischen Zuckerlösungen und unterschiedlich starken Auftrieb durch den Einsatz von Glukose und Sukrose für die die Vesikel umgebenden, isoosmotischen Zuckerlösungen [130]. Die Skalierung orientiert sich an den theoretischen Herleitungen von Goldman *et al.* für harte Kugeln im Stokes-Fluss nahe einer Wand [164]. In deren Modell bewegen sich die Kugeln nahe der Wand in einer Kombination aus Roll- und Rutschbewegungen zwar sehr nahe an, aber ohne Kontakt zur Wand [15, 164]. Die jeweiligen Beiträge der Rotations- und Translationsgeschwindigkeiten stimmen hervorragend mit den experimentellen Ergebnissen überein [130, 131]. Dies ist umso erstaunlicher wenn man bedenkt, dass die Form der Vesikel gerade so nahe an der Wand z.B. durch Gravitationseffekte signifikant von der einer Kugel abweichen kann [182, 183].

Vesikel im TT-Zustand weit weg von einer Wand Mit dem Fall von quasi-sphärischen Vesikeln im TT-Zustand mit großem Abstand zur Wand ($z \gg R$) beschäftigte sich Olla [120,

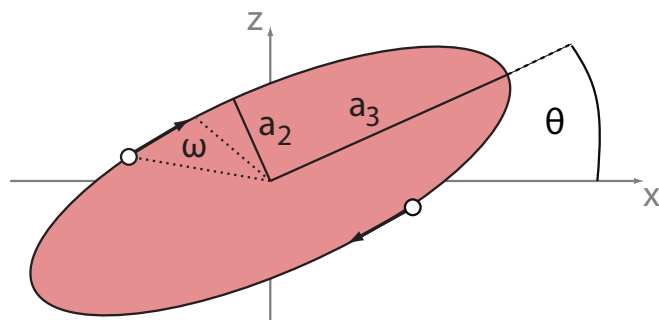


Abbildung 3.10.: Bezeichnung der elliptischen Hauptachsen einer tank-treadingen Vesikel in einer Strömung in Richtung der x-Achse. Die Achse a_1 zeigt in die Darstellungsebene hinein (Abb. nach [120]).

151]. Auf Grundlage der K-S-Theorie leitete er durch einen störungstheoretischen Ansatz den Ausdruck

$$v_L = \frac{\dot{\gamma} R^3}{z^2} \cdot U(\lambda, r_1, r_2) \quad (3.38)$$

her, mit dem effektiven Radius der ellipsoiden Vesikel $R = \sqrt[3]{a_1 a_2 a_3}$, der sich aus den Hauptachsen des Ellipsoids a_i berechnet, die wie in Abb. 3.10 angegeben definiert sind, und der dimensionslosen Driftgeschwindigkeit $U(\lambda, r_1, r_2)$. Letztere hängt nicht-trivial vom Viskositätskontrast $\lambda = \frac{\eta_{\text{in}}}{\eta_{\text{ext}}}$ zwischen der Gesamtviskosität der Vesikel η_{in} ab, die sich aus Membran und innerer Flüssigkeit zusammensetzt, und der Viskosität der externen Flüssigkeit η_{ext} . Die Viskosität der Membran kann in diesem Ansatz deshalb nicht isoliert vom Zytoplasma betrachtet werden. Außerdem enthält sie Beiträge der Formparameter $r_i = \frac{a_i}{a_3}$ [120].

Um aus dem Ausdruck für die Lift-Geschwindigkeit die zugehörige Kraft zu berechnen, wird die Stokes-Reibung ($F_{SR} = 6\pi\eta_{\text{ext}}R v_L$, vgl. Gleichung (2.11)) in Richtung der Lift-Geschwindigkeit v_L aus Gleichung (3.38) berücksichtigt und es ergibt sich

$$F_L = \frac{\eta_{\text{ext}} \dot{\gamma} R^4}{z^2} \quad (3.39)$$

Im Grenzfall harter Zellen ($\eta_{\text{in}} \rightarrow \infty$) beziehungsweise exakt runder Kugeln ($r_i \rightarrow 1$) geht die dimensionslose Driftgeschwindigkeit $U(\lambda, r_1, r_2)$ gegen null und der trägheitsunabhängige Lift-Effekt verschwindet. Dies entspricht z.B. dem Übergang vom Tank-Treading ins Tumbling-Regime. Der Verlauf von $U(\lambda, r_1, r_2)$ ist für verschiedene Kombinationen der Formparameter in Abb. 3.11 dargestellt. Die weiteren Abhängigkeiten spielen im Rahmen dieser Arbeit keine relevante Rolle, weshalb für Informationen dazu auf [120] verwiesen sei. Das durch Gleichung (3.38) vorhergesagte Verhalten von Vesikeln wurde durch Experimente in Schwerelosigkeit mit guter Übereinstimmung bestätigt [184].

Die Herleitung von Gleichung (3.38) gilt genau genommen nur für Vesikel weit weg von der Wand ($z \gg R$). Es lohnt sich trotzdem, eine grobe Abschätzung der trägheitsunabhängigen Liftgeschwindigkeit für den Fall $z \sim R$ vorzunehmen. Es ergibt sich damit, dass

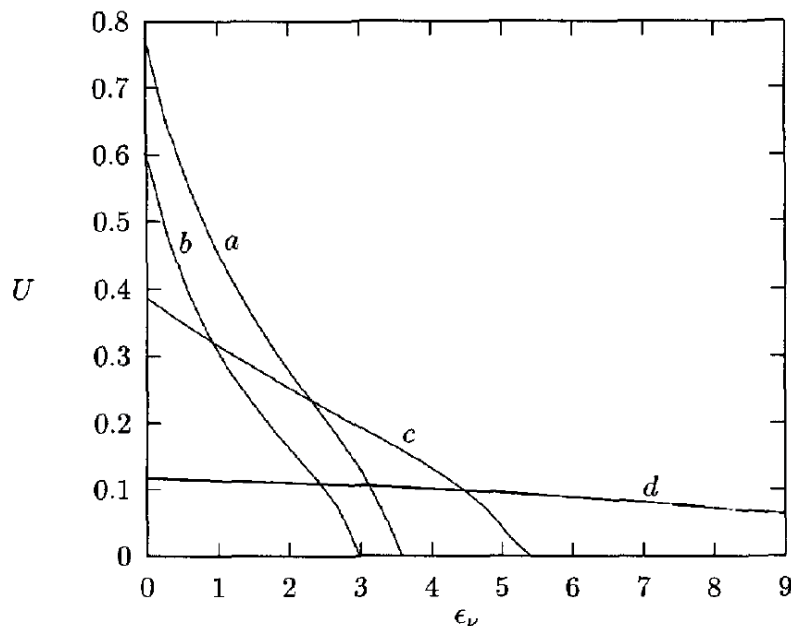


Abbildung 3.11.: Abhängigkeit der dimensionslosen Driftgeschwindigkeit U vom Viskositätskontrast $\lambda (= \epsilon_v)$ für unterschiedlich geformte Vesikel: (a) RBK in Ruheform ($r_1 = r_2 = 0,286$), (b) gedehntes RBK ($r_1 = r_2 = 0,213$), (c) prolater Ellipsoid ($r_1 = r_2 = 0,5$) und (d) oblater Ellipsoid ($r_1 = 1, r_2 = 0,8$, Abb. aus [120]).

die Lift-Geschwindigkeit nahe einer Wand in der gleichen Größenordnung liegt wie die Geschwindigkeitsänderung des Flusses über die Vesikelgröße in z -Richtung $v_L \sim \dot{\gamma}R = \Delta v$.

Weiterhin lässt sich der Übergang in das Regime abschätzen, in dem schließlich der trägheitsbedingte Lift-Effekt dominiert. Dazu vergleicht man den trägheitsinduzierten Lift-Effekt bei niedrigen Flussraten

$$v_{L,\text{inertia}} \sim \frac{\dot{\gamma}^2 R^3}{\eta_{\text{ext}}} \quad (3.40)$$

mit Gleichung (3.38) und erhält somit den Übergang zum trägheitsdominierten Regime in einem Kanal der Höhe H bei $1 \lesssim \frac{\dot{\gamma}H^2}{\eta_{\text{ext}}}$ [15, 120]. Dies entspricht dem Übergang in das Regime großer Reynoldszahlen [15].

Statt der dimensionslosen Driftgeschwindigkeit $U(\lambda, r_1, r_2)$ verwenden Vlahovska *et al.* eine Funktion $c(\lambda, \Delta)$, die abhängig vom Viskositätskontrast λ und der Überschussfläche Δ ist, und erhalten für die trägheitsunabhängige Lift-Geschwindigkeit den Ausdruck [133]

$$v_L = \frac{c(\lambda, \Delta)}{z^2} \quad (3.41)$$

Diese Skalierung ist den analytischen Ergebnissen von Seifert *et al.* [180] und Olla [120] sehr ähnlich und die Größenordnung von $c(\lambda, \Delta)$ ist ebenfalls vergleichbar mit den Ergebnissen

von Olla [133]. Mehr Überschussfläche verleiht der Vesikel eine größere Deformierbarkeit und führt zu einer höheren Lift-Geschwindigkeit.

Ein wichtiger und interessanter Unterschied zu Gleichung (3.38) ist, dass für die Herleitung von Vlahovska *et al.* keine Tank-Treading-Bewegung vorausgesetzt wurde und das Ergebnis, dass im quasi-sphärischen Grenzfall (für sehr kleine Überschussflächen) die Lift-Geschwindigkeit unabhängig vom Viskositätskontrast ist und $c(\lambda, \Delta) \sim \sqrt{\Delta}$ [133]. Damit kann also die Lift-Kraft auch auf nicht-tank-treadende, deformierbare Objekte abgeschätzt werden.

Eine neuere Simulation mittels der Randelementmethode (engl. *boundary integral method*) bestätigt zudem die allen Ansätzen für Vesikel mit entsprechendem Wandabstand gemeinsame Potenzskalierung $v_L \propto z^{-2}$ [185].

Die bisherigen Betrachtungen sind anhand linearer Scherflüsse durchgeführt worden. Diese Annahme ist in relevanten Anwendungen wie etwa biologischen Systemen oder mikrofluidischen Kanälen jedoch nur begrenzt gültig, da die Krümmung des Poiseuille-Profiles oft nicht vernachlässigt werden kann. Theoretisch [186, 187] und experimentell [188] wurde zudem gezeigt, dass eine laterale Migration von Vesikeln auch durch Schergradienten hervorgerufen werden kann. Dieser Effekt führt dazu, dass deformierbare Objekte in Regionen mit möglichst niedriger Scherdeformation getrieben werden [186, 189]. Der durch den Schergradienten hervorgerufene Drift-Effekt spielt in Kanälen eine Rolle, die etwa 10-50 mal größer sind als die Objekte selbst, was für RBK bedeutet, dass er für Kanäle mit Durchmessern von $\sim 100 - 500 \mu\text{m}$ berücksichtigt werden muss [186]. Sind diese Voraussetzungen erfüllt, dominiert der durch die Flussprofilkrümmung induzierte Drift-Effekt den wand-induzierten Lift vor allem nahe am Kanalzentrum [186]. Ein zweidimensionales Modell im unbegrenzten Poiseuille-Fluss ermöglichte die Bestimmung der Größenordnung dieses Effektes [187]. Es zeigte sich, dass Vesikel immer in Richtung der niedrigeren Scherraten migrieren und dass die Migrationsgeschwindigkeit mit der Scherrate zunimmt. Die Simulation sagt voraus, dass die Geschwindigkeit oberhalb einer kritischen Scherrate ein Plateau erreicht und nicht mehr weiter steigt und dass die Höhe des Plateaus von der Krümmung des Flussprofils abhängt [187]. Die durch die Krümmung des Flussprofils induzierte Migrationsgeschwindigkeit hängt somit nur von der normalisierten Scherrate ab, in welche die Deformierbarkeit der Vesikel durch die Membran-Steifigkeit κ eingeht.

Experimentell lässt sich ein unbegrenzter Poiseuille-Fluss jedoch nicht umsetzen, weshalb in Realität lediglich eine Superposition aus scher-induziertem und wand-induziertem Effekt beobachtbar und von Bedeutung ist. Couplier *et al.* fanden durch den Vergleich von Experimenten mit zweidimensionalen Randelementesimulationen heraus, dass sich die Kraft aus der Überlagerung beider Effekte nicht-trivial verhält, die resultierende Kraft jedoch gut mit den Vorhersagen von Olla [120] übereinstimmt.

3.4.3. Abgrenzung zu anderen Auftriebskräften

In diesem Abschnitt werden zur trägheitsunabhängigen Lift-Kraft verwandte Kräfte diskutiert und von ihr abgegrenzt. Im Einzelnen sind dies der hydrostatische Auftrieb, der Magnuseffekt und der Auftrieb am Flugzeugflügel.

Der hydrostatische Auftrieb wirkt auf alle Körper, die eine geringere Dichte als die

sie umgebende Flüssigkeit besitzen. In Versuchen zur lateralen Migration von Vesikeln wurde sein Einfluss durch die Anpassung der Dichte der inneren und äußeren Flüssigkeit [130] beziehungsweise durch die Ausführung der Experimente in Schwerelosigkeit [184] unterdrückt. Trotzdem kam es in diesen Versuchen zu einer lateralen Migration der Vesikel, wodurch der hydrostatische Auftrieb als mögliche Ursache dieser Migration verworfen werden kann. In Versuchen mit RBK ist die Dichte der äußeren Flüssigkeit meist geringer als die Dichte der RBK, weshalb diese aufgrund der hydrostatischen Kräfte im Kanal absinken würden. Der hydrostatische Auftrieb kann demnach nicht die Ursache für die Ausbildung der zellfreien Schicht in einer Kapillare sein.

Ein weiterer Effekt, der auch für RBK in Mikrokanälen auftritt, ist der Magnuseffekt. Nach [11] ergibt sich dessen Beitrag wie folgt: Wird ein Zylinder von einem Medium mit der Geschwindigkeit v_0 angeströmt und rotiert er mit der Winkelgeschwindigkeit ω , so strömt die Flüssigkeit an seiner Oberseite mit $v' = v_0 + \omega r$ und an seiner Unterseite mit $v'' = v_0 - \omega r$. Nach der Gleichung von Bernoulli (vgl. Gleichung (2.14)) überwiegt deshalb der statische Druck auf der Unterseite des Zylinders, und zwar um

$$\Delta p = \frac{1}{2}\rho(v'^2 - v''^2) \approx 2\rho\omega r v_0 \quad \text{für } \omega r \ll v_0 \quad . \quad (3.42)$$

Ein Zylinder der Länge l erfährt demnach eine Querkraft der Größenordnung $F \approx \rho\omega r v_0 r l$ beziehungsweise in Vektorschreibweise $\vec{F} \approx \rho r^2 l \vec{v} \times \vec{\omega}$ [11]. Im Reynoldszahlen-Bereich der *Inertial Microfluidics* (vgl. Abschnitt 3.4.1) muss der Magnuseffekt vor allem nahe einer Wand berücksichtigt werden, während sein Einfluss mit zunehmendem Abstand zwischen Zelle und Wand abnimmt [9, 161]. Bei niedrigen Re ist der Magnuseffekt schließlich so schwach, dass er vernachlässigt werden kann [166].

Auch der Auftrieb, der durch die Form eines Flugzeugflügels in einer Strömung erzeugt wird, tritt bei sehr kleinen Reynoldszahlen nicht auf. Der Effekt entsteht nämlich, indem es um den Flügel herum zu einer Wirbelbildung kommt [11]. Der Flügel behindert durch seine Wölbung nach oben in einem nach rechts strömenden Medium den links herum laufenden Wirbel erheblich stärker als den rechts herum laufenden, wodurch ersterer abreißt während der Rechtswirbel hängen bleibt und sich mit der Potentialströmung überlagert [11]. Ein solches Strömungsfeld ähnelt der Strömung um einen Körper der rechts herum rotiert (vgl. Magnuseffekt) [11]. Da es zur Erzeugung des Effektes jedoch zu einer Wirbelbildung kommen muss, kann er bei sehr kleinen Re vernachlässigt werden.

4. Experimentelle Methoden und Messaufbau

Du musst doch nur die Nippel durch die Lasche zieh'n
Und mit der kleinen Kurbel ganz nach oben dreh'n
Da erscheint dann auch ein Pfeil
Und da drückst du ganz leicht drauf
Und schon geht die Sache auf!

(Mike Krüger, *Der Nippel*)

Im folgenden Abschnitt werden die experimentellen Methoden und der grundsätzliche Messaufbau beschrieben, die in dieser Arbeit verwendet werden. Die Details der späteren Versuchsreihen, wie z.B. die genaue Zusammensetzung der Probenlösungen oder die exakten Maße des Kanals, sind dann zu Beginn des entsprechenden Abschnittes zusammengestellt.

4.1. Probenpräparation

Für die Experimente werden Lösungen roter Blutkörperchen mit unterschiedlichem Hämatokrit und mit unterschiedlichen Viskositäten der sie umgebenden Flüssigkeit hergestellt und in Mikrokanälen untersucht.

4.1.1. Vorbereitung der Blutproben

Blut von gesunden, freiwilligen Spendern wird direkt nach der Entnahme durch Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) am Koagulieren gehindert. Durch das „Waschen“ der Blutprobe werden dann alle für die Versuche unerwünschten Bestandteile des Blutes (wie etwa Serumproteine oder weiße Blutkörperchen) entfernt. Dazu wird die Probe im Verhältnis von $\sim 1 : 4$ mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS, $\text{pH} = 7,4$) vermischt. In einer Eppendorf Minispin Zentrifuge wird die Lösung dann mit 1000 U/min ($\sim 70g$) für 90 Sekunden zentrifugiert. Die RBK (als dichteste Bestandteile des Blutes) setzen sich dabei am Boden ab. Darüber formt sich die in Kapitel 1 erwähnte, weiß-gräuliche, im Englischen „buffy coat“ genannte, Schicht, welche hauptsächlich aus BP und WBK besteht. Auf den zellulären Bestandteilen verbleibt das gelbliche Serum mit den Serumproteinen. Letzteres wird, je nach Bedarf, mit beziehungsweise ohne der Buffy Coat abgenommen und die verbleibende Probe erneut $\sim 1 : 4$ mit PBS verdünnt. Der Waschvorgang wird mindestens dreimal wiederholt. Man erhält schließlich eine Lösung, die ausschließlich RBK in PBS enthält beziehungsweise, wenn man die Buffy Coat in der Probe belässt auch BP und WBK. Alle Versuche werden innerhalb von 8 Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt, um Effekte durch die Alterung von RBK zu vermeiden (z.B. verminderte Deformierbarkeit [190]).

Das für die Versuche in Kapitel 8 verwendete Blut stammt hingegen aus Blutkonserven, für die als Antikoagulant Acid-Citrate-Dextrose (ACD) benutzt wird. Die RBK aus Blutkonserven werden innerhalb einer Woche nach Entnahme verwendet.

4.1.2. Vorbereitung der Probenlösungen

Als äußeres Medium für die Versuche kommen Dextranlösungen unterschiedlicher Konzentrationen zum Einsatz. Dextran ist ein langkettiges Zuckermolekül, das die Viskosität der Flüssigkeit erhöht, aber nur wenig Einfluss auf deren Osmolarität hat. Für die 5%-ige beziehungsweise 10%-ige Stammlösung werden entsprechend 5% w/w beziehungsweise 10% w/w Dextran (Dextran from *Leuconostoc* spp., Molgewicht: $\sim 400 - 500$ kDa, Sigma Aldrich Inc.) eingewogen und unter Erwärmung und Rühren in PBS gelöst. Abschließend wird die fertige Lösung bei 70°C im Ultraschallbad für 15 Minuten entgast. Messungen mit einem Ubbelohde-Kapillarviskosimeter (Schott Instruments GmbH) ergaben dynamische Viskositäten von $\eta_{5\%} = 7$ mPas und $\eta_{10\%} = 27$ mPas für Dichten der Lösungen von $\rho_{5\%} = 1,03$ g/cm³ beziehungsweise $\rho_{10\%} = 1,05$ g/cm³.

4.2. Messaufbau

Die Versuche mit RBK-Lösungen werden in Mikrokanälen durchgeführt, die mittels Soft Lithography hergestellt werden. Zunächst wird der Soft Lithography-Prozess erläutert, bevor darauf eingegangen wird, wie die Kanäle für die unterschiedlichen Messreihen im Rahmen dieser Arbeit in den Messaufbau integriert werden.

4.2.1. Kanalherstellung

Die Herstellung von Kanälen im Mikrometerbereich stellte lange Zeit ein technisch sehr anspruchsvolles Problem dar. Solch kleine Kanäle konnten früher nur durch das Erwärmen und Langziehen von Glaskapillaren realisiert werden, bis sich seit dem Jahrtausendwechsel durch die Einführung des Soft Lithography-Prozesses gänzlich neue Möglichkeiten ergaben [28]. Der Soft Lithography-Prozess ermöglicht die schnelle und kostengünstige Herstellung von Mikrokanälen unterschiedlichster Geometrien (engl. *rapid prototyping*). Die Flexibilität der Kanalstrukturen und die Möglichkeit, Strukturdetails von bis zu ~ 1 μm zu realisieren, bieten hervorragende Voraussetzungen zur Modellierung physiologischer Umgebungen. Außerdem können Flussfelder auf der Größenskala von Zellen manipuliert werden, wie bereits in Abschnitt 2.2 kurz erwähnt wurde. Die Herstellung von Mikrokanälen nach dieser Methode ist in Abb. 4.1 schematisch dargestellt und wird hier kurz beschrieben.

Der erste Schritt ist der Entwurf der gewünschten Struktur und deren Übertrag in eine Vektorgrafik. Als Vektorgrafikprogramm kommen hier z.B. Autodesk AutoCAD oder Adobe Illustrator zum Einsatz. Die fertige Struktur wird dann hochaufgelöst auf eine Spezialfolie gedruckt. Folienmasken eignen sich je nach Auflösung für Strukturen mit Details nicht kleiner als ~ 5 μm , was für die hier verwendeten Kanäle vollkommen ausreichend ist. Für höhere Auflösungen werden die in der Produktion aufwändigeren Chrommasken benötigt. Die Prozessschritte 2 - 4 aus Abb. 4.1 finden im Reinraum statt, um Verunreinigungen durch

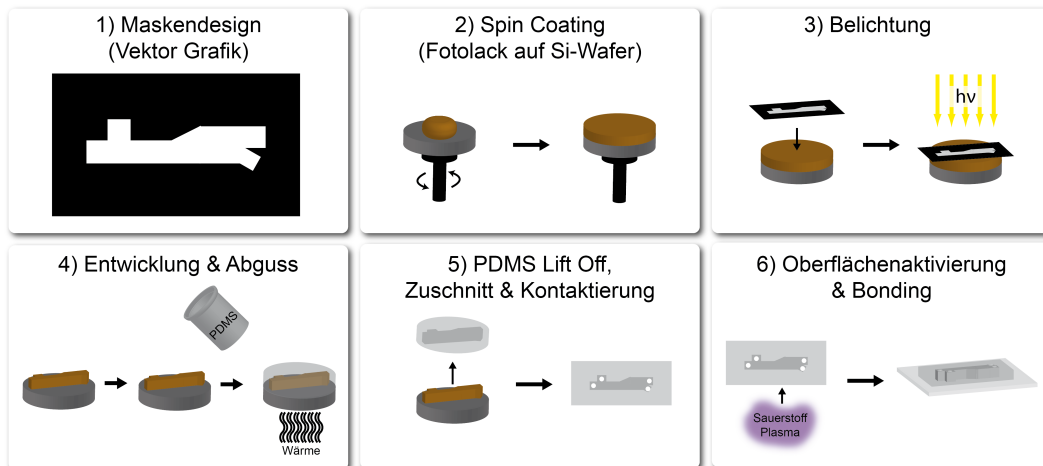


Abbildung 4.1.: Soft Lithography-Prozess zur Herstellung von Mikrokanälen.

z.B. Staub, Hautschuppen oder Haare zu vermeiden. Dabei wird zunächst Fotolack (in dieser Arbeit: NanoTM SU8-50 und NanoTM SU8-100, Microchem) durch Schleuderbeschichtung (engl. *spin coating*) gemäß des Hersteller-Datenblattes in der gewünschten Dicke auf einen Silizium-Wafer als Substrat aufgebracht (vgl. Abb. 4.1 (2)). In einem ersten Heizschritt, dem sogenannten Pre-Bake, wird das Lösemittel des Lackes zum Großteil verdampft, so dass er eine feste Oberfläche erhält. Darauf wird die Folienmaske gepresst und der Lack durch diese hindurch mit UV-Strahlung belichtet (vgl. Abb. 4.1 (3)). Dadurch wird der im Lack enthaltene Polymerisationskatalysator aktiviert und die belichteten Strukturen polymerisieren aus. Nach der Entwicklung mit einem Entwickler auf Aceton-Basis verbleiben die polymerisierten Strukturen auf dem Substrat, während der restliche Lack abgespült wird. Abschließend wird der Lack im sogenannten Hard Bake ausgeheizt, was ihm zusätzliche Stabilität verleiht. Die Zeiten für Belichtung, Heizschritte und Entwicklung des jeweiligen Lackes werden dem Datenblatt des Herstellers entnommen.

Auf die so entstandene Negativ-Form, auch *Master* genannt, wird das Elastomer Polydimethylsiloxan (PDMS) aufgegossen und etwa vier Stunden lang bei 60 °C ausgehärtet. PDMS ist thermisch und chemisch sehr beständig, biokompatibel und besitzt sehr gute optische Eigenschaften, wodurch es für den Einsatz in der Mikroskopie prädestiniert ist. Nach dem Aushärten lässt sich das PDMS recht einfach vom Silizium-Substrat abziehen, wobei die Negativ-Form erhalten bleibt und wiederverwendet werden kann. Die Härte von PDMS lässt sich dabei über das Verhältnis seiner zwei Komponenten, dem Polymer selbst und einem Platinlinker, gut einstellen. In dieser Arbeit werden Linker und Elastomer im Volumen-Verhältnis 1:10 angesetzt. Mit einer Biopsiestanze werden schließlich Löcher zur Kontaktierung des Kanals mit den Schläuchen gestanzt, bevor die Oberfläche mit einem Sauerstoffplasma behandelt wird. Bringt man die Oberfläche im Anschluss an diese Behandlung in Kontakt mit einem Glas-Objektträger, bilden sich kovalente Bindungen zwischen PDMS und Glas [191], wodurch der Kanal nach außen hin dicht verschlossen ist. Statt

eines Objektträgers kommen in dieser Arbeit auch die deutlich dünneren Deckgläschen zum Aufbringen der Kanäle zum Einsatz, da der Arbeitsabstand mancher Objektive zu gering ist, um den ganzen Kanal durch die dickeren Objektträger hindurch beobachten zu können.

4.2.2. Versuchsaufbau

Die Mikrokanäle werden für die Versuche auf einem invertierten Durchlichtmikroskop (Zeiss Axiovert 200m beziehungsweise, in Kapitel 8, Nikon Diaphot 300) montiert und, wie in Abb. 4.2 und Abb. 4.3 gezeigt, über Polytetrafluoroethylen (PTFE)-Schläuche mit den Spritzen (Hamilton Gastight Syringe, Hamilton Bonaduz) und den Höhenreservoirn verbunden. Die Flüsse werden einzeln über Spritzenpumpen (Harvard PHD 2000, Harvard Apparatus) gesteuert und die Vorgänge in der Kapillare durch den Objektträger hindurch mit dem Mikroskop beobachtet.

Zur Vermessung der Dynamik roter Blutkörperchen im Mikrofluss kommen einfache, gerade PDMS Kanäle mit zwei Eingängen zum Einsatz, deren einziger Auslass an ein Höhenreservoir angeschlossen wird (vgl. Abb. 4.2). Für die Sortierung von Zellen werden hingegen zwei Auslässe benötigt, die zur Kontrolle des jeweiligen statischen Drucks im Auslass an zwei separate Höhenreservoirn angeschlossen sind (vgl. Abb. 4.3). Vor der Verzweigung des Kanals in die beiden Auslässe ist eine Verbreiterung in z-Richtung implementiert, um die Höhenunterschiede zwischen den Zellen zu verstärken. Die exakten Maße für Querschnitt und Länge der Kanäle variieren zwischen den einzelnen Versuchsreihen und werden der Übersichtlichkeit halber im jeweiligen Abschnitt kurz zusammengefasst.

Zur Abbildung der recht schnellen dynamischen Vorgänge in den Kanälen werden Belichtungszeiten bis zu $1/25000$ s sowie Bildraten von bis zu einigen Tausend Bildern pro Sekunde benötigt. Dazu bedarf es einer Hochgeschwindigkeitskamera (Fastcam 1024PCI, Photron), die am Mikroskop montiert wird. Für Beobachtungen mit niedrigeren Bildraten, z.B. wenn die Dynamik einzelner Zellen nicht im Detail abgebildet werden muss, wird eine im Fluoreszenzbereich sensitivere Kamera (Orca 05G, Hamamatsu Photonics) benutzt. Die aufgenommenen Videos werden schließlich mit der quelloffenen Software ImageJ [192] analysiert.

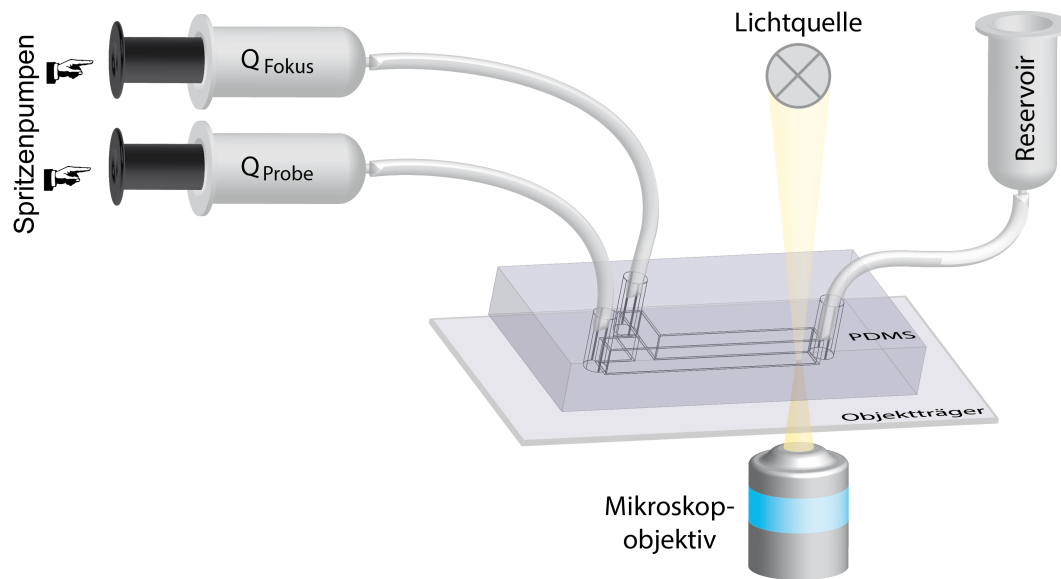


Abbildung 4.2.: Messaufbau für die Untersuchungen der Zelldynamik und des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes.

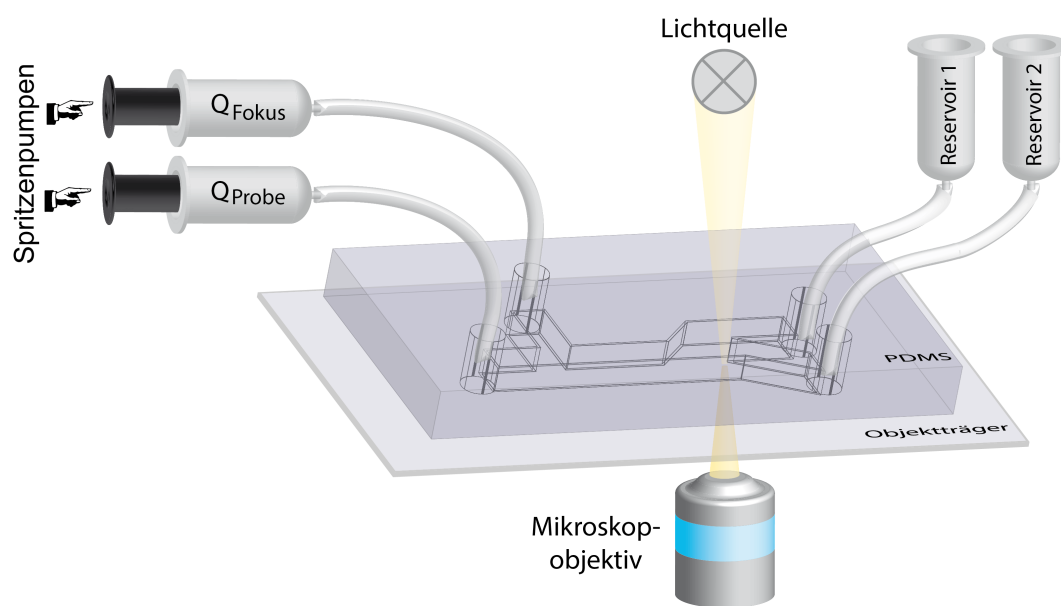


Abbildung 4.3.: Messaufbau für die Zellsortierung.

5. Experimente zur Dynamik roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss

Experiment is the sole judge of scientific "truth".

(Richard Feynman)

RBK nehmen im Poiseuille-Fluss je nach angelegter Scherspannung eine der in Abschnitt 3.3 beschriebenen, dynamischen Bewegungsformen an. Diese hängen auch stark von den intrinsischen Eigenschaften der RBK wie etwa ihrer Deformierbarkeit ab. Der trägheitsunabhängige Lift-Effekt (vgl. Abschnitt 3.4.2) sollte dabei umso größer sein, je stärker die Zelle die Symmetrie des Flussfeldes stört. Für RBK im TT-Zustand wird die größte Störung erwartet, da die Zelle darin eine konstante Ausrichtung und eine hohe Deformation aufweist. Dies macht das TT-Regime für die Untersuchung des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes besonders interessant, weshalb es hier zunächst etwas näher untersucht wird. Neben der Scherspannung, bei der die RBK mit der TT-Bewegung beginnen, werden zu diesem Zweck auch ihr Anstellwinkel und die Stärke der Verformung im TT-Regime bestimmt.

5.1. Versuchsaufbau

Die Versuche zur Morphologie und Dynamik roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss werden in einem einfachen, geraden PDMS-Kanal durchgeführt. Er besitzt einen quadratischen Querschnitt von $110\ \mu\text{m}$ Kantenlänge, wobei der Probenzufluss auf eine Höhe von $30\ \mu\text{m}$ begrenzt ist. Der Kanal wird in den Versuchsaufbau aus Abb. 4.2 integriert. Die Probenpräparation erfolgt wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, die verwendete Probenlösung enthält ausschließlich RBK in einer Konzentration, die einem Hämatokrit von $\text{Hct} \approx 0,1\%$ entspricht. Zell-Zell-Wechselwirkungen können bei dieser niedrigen Zellkonzentration vernachlässigt werden. Die Probenlösung wird für Fokussierflussraten von $Q_{\text{Fokus}} \leq 240\ \mu\text{l/h}$ mit $Q_{\text{Probe}} = 10\ \mu\text{l/h}$ injiziert. Für größere Fokussierflüsse wird der Probenzufluss auf $Q_{\text{Probe}} = 20\ \mu\text{l/h}$ erhöht, um eine ausreichende und konstante Probenzufuhr zu gewährleisten. Die Messungen der Höhe, des Bewegungszustandes, der Taylor-Deformation und des Anstellwinkels erfolgen an Position x_2 (vgl. Abb. 6.1). Die Zellhöhe entspricht dabei dem Abstand zwischen dem Schwerpunkt der Zelle und dem Kanalboden. Mittels Gleichung (2.8) wird schließlich aus dem Kanalquerschnitt, der Viskosität des äußeren Mediums, der Höhe der Zellen und der Flussrate die an den RBK angreifende Scherspannung berechnet.

5.2. Ergebnisse

5.2.1. Übergang ins Tank-Treading-Regime

Zur Bestimmung des Bewegungsregimes werden videomikroskopische Aufnahmen der RBK bei unterschiedlichen Flussraten Q und externen Viskositäten η_{ext} (und somit unterschiedlichen Scherspannungen τ beziehungsweise Viskositätskontrasten λ) aufgenommen. Den Zellen wird bei der Analyse der Videos gemäß ihrer Orientierung und ihres Erscheinungsbildes jeweils einer der in Abschnitt 3.3 eingeführten Bewegungszustände zugeordnet. In den durchgeführten Experimenten werden ausschließlich Rolling, Spinning und Tank-Treading beobachtet und durch den Abgleich mit Abb. 3.7 identifiziert. Beispielbilder der einzelnen Bewegungsformen sind in Abb. 5.1 zusammengefasst und belegen, dass die Bewegungsregime in den Experimenten klar unterscheidbar sind.

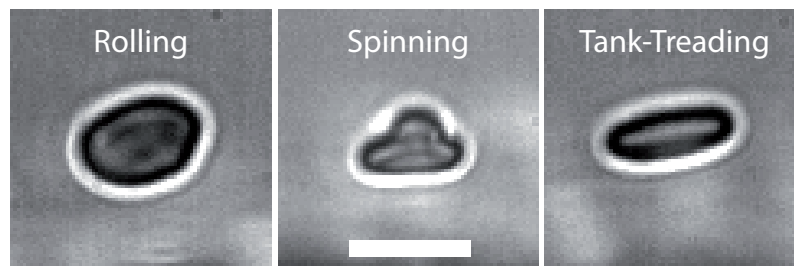


Abbildung 5.1.: Videomikroskopieaufnahmen der verschiedenen Bewegungsformen roter Blutkörperchen. Von links nach rechts sind typische Bilder der jeweiligen Erscheinungsform roter Blutkörperchen im Rolling-, Spinning- und Tank-Treading-Zustand gezeigt (Flussrichtung von links nach rechts, $Q = 200 \mu\text{l/h}$, $\eta_{\text{ext}} = 7 \text{ mPas}$, Maßstabsbalken: $10 \mu\text{m}$.)

Der Bewegungszustand und die Höhe wurden bei konstanter Flussrate für jeweils 100 voneinander unabhängigen Zellen bestimmt. Aus der Höhe wurde über Gleichung (2.8) mit dem angelegten Volumenfluss $Q = Q_{\text{Probe}} + Q_{\text{Fokus}}$ die Scherrate und mit der Viskosität der äußeren Lösung ($\eta_{\text{ext}} = 7 \text{ mPas} \rightarrow \lambda = 1,43$) die Scherspannung berechnet. Die Messergebnisse sind in Tabelle 5.1 numerisch und in Abb. 5.2 graphisch zusammengestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dabei den 95%-Konfidenzintervallen der Werte. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei niedrigen Flussraten respektive kleinen Scherspannungen die RO-Bewegung dominiert. Mit zunehmender Scherspannung steigt dann der Anteil der RBK im SP als Übergangsform, bis beide Bewegungsformen schließlich seltener werden und bei hohen Scherspannungen fast alle RBK die TT-Bewegung vollführen.

Eine zweite Versuchsreihe wurde mit einer äußeren Viskosität von $\eta_{\text{ext}} = 27 \text{ mPas}$ ($\lambda = 0,37$) durchgeführt. Die gleichen Flussraten führen hier zu deutlich höheren Scherspannungen und es befinden sich, unabhängig von der Flussrate, 100% der RBK im TT-Zustand. Aus diesem Grund kann hier kein Übergang zwischen verschiedenen Bewegungszuständen beobachtet werden. Bei den Messungen fällt allerdings die zunehmende Deformation der Zellen mit steigender Scherspannung auf, weshalb diese nun über die Taylor-Deformation (TD) quantifiziert wird.

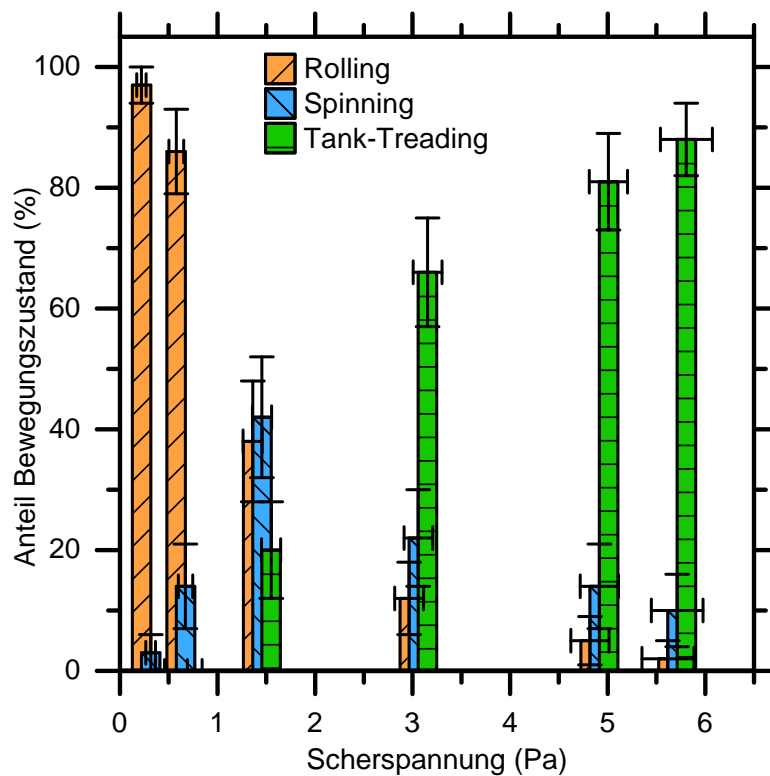


Abbildung 5.2.: Bewegungsformen roter Blutkörperchen in Abhängigkeit von der Scherspannung bei einer externen Viskosität von $\eta_{\text{ext}} = 7$ mPas. Mit zunehmender Scherspannung sinkt der zunächst hohe Anteil der RBK im RO-Zustand und die RBK gehen in die SP-Bewegung über. Bei noch höheren Scherspannungen nimmt schließlich die Häufigkeit beider Bewegungsformen zugunsten des TT-Zustandes ab.

5.2.2. Taylor-Deformation

Die verschiedenen Bewegungsregime spiegeln sich auch in den Werten der TD wider. Zur Bestimmung der TD werden die Länge $L (\hat{=} a_3)$ und Breite $B (\hat{=} a_2)$ aus Gleichung (3.30) mit den in Abb. 3.10 definierten elliptischen Hauptachsen in der Bildebene identifiziert. Die TD ist somit klein für RBK, die in der Bildebene kreisförmig erscheinen (z.B. im RO) und steigt mit zunehmender Deformation (SP) an, bis sie im TT-Zustand schließlich die höchsten Werte erreicht. Innerhalb des TT-Zustandes steigt der Wert dann vergleichsweise langsam an, bis er für sehr hohe Scherspannungen in Sättigung geht.

Dieser Übergang ist für den größeren der beiden untersuchten Viskositätskontraste bei einer äußeren Viskosität von $\eta_{\text{ext}} = 7 \text{ mPas}$ deutlich zu erkennen. Einzig der Sättigungsbereich wird in den vorliegenden Messungen nicht erreicht. Dieser ist bei höheren Scherspannungen zu finden, wie die Messungen beim kleineren Viskositätskontrast zeigen. Der insgesamt geringere Anstieg der TD mit der Scherspannung unterscheidet sich vor allem bei kleinen Scherspannungen signifikant von der Messreihe beim größeren Viskositätskontrast. Generell ist die Deformation bei festem τ für die höhere äußere Viskosität größer als für die niedrigere.

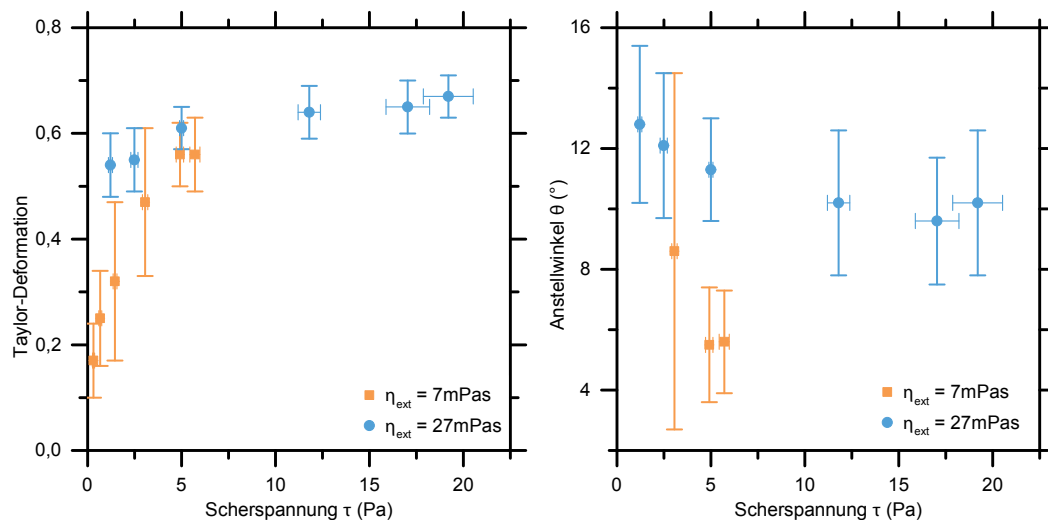


Abbildung 5.3.: Taylor-Deformation und Anstellwinkel gesunder RBK über der Scherspannung. Beim höheren Viskositätskontrast ($\lambda = 1,43$ mit $\eta_{\text{ext}} = 7 \text{ mPas}$) sieht man den deutlichen Anstieg der TD mit der Scherspannung τ , während dieser für den niedrigeren Viskositätskontrast ($\lambda = 0,37$ mit $\eta_{\text{ext}} = 27 \text{ mPas}$) deutlich geringer ausfällt. Der Anstellwinkel θ sinkt in beiden Fällen mit τ und nimmt bei festem τ kleinere Werte an, je größer λ ist.

Tabelle 5.1.: Steighöhe, Taylor-Deformation, Anteil der Zellen im TT-Regime und Anstellwinkel roter Blutkörperchen bei verschiedenen Scherspannungen in einem Kanal mit einem Querschnitt von $110 \mu\text{m} \times 110 \mu\text{m}$ (in y- beziehungsweise z-Richtung).

η_{ext}	$Q(\mu\text{l/h})$	$z(x_2)(\mu\text{m})$	$\dot{\gamma}(\text{s}^{-1})$	$\tau(\text{Pa})$	TD	θ	TT(%)
7 mPas	50	$24,9 \pm 4,0$	45	0,32	$0,17 \pm 0,07$	—	0
	100	$23,2 \pm 2,9$	96	0,67	$0,25 \pm 0,09$	—	0
	200	$21,2 \pm 1,8$	208	1,5	$0,32 \pm 0,15$	—	20
	450	$20,4 \pm 1,2$	481	3,1	$0,47 \pm 0,14$	$8,6 \pm 5,9$	66
	650	$20,1 \pm 1,1$	702	4,9	$0,56 \pm 0,06$	$5,5 \pm 1,9$	81
	750	$19,9 \pm 1,3$	816	5,7	$0,56 \pm 0,07$	$5,6 \pm 1,7$	88
27 mPas	50	$24,9 \pm 2,1$	45	1,2	$0,54 \pm 0,06$	$12,8 \pm 2,6$	100
	100	$24,2 \pm 1,8$	92	2,5	$0,55 \pm 0,06$	$12,1 \pm 2,4$	100
	200	$24,3 \pm 0,5$	185	5,0	$0,61 \pm 0,04$	$11,3 \pm 1,7$	100
	450	$23,0 \pm 1,3$	437	11,8	$0,64 \pm 0,05$	$10,2 \pm 2,4$	100
	650	$23,0 \pm 1,8$	631	17,0	$0,65 \pm 0,05$	$9,6 \pm 2,1$	100
	750	$23,6 \pm 1,8$	711	19,2	$0,67 \pm 0,04$	$10,2 \pm 2,4$	100

5.2.3. Anstellwinkel roter Blutkörperchen im Tank-Treading-Zustand

Eine weitere charakteristische Eigenschaft roter Blutkörperchen im TT-Regime ist ihr Anstellwinkel θ zu den (gedachten) Stromlinien des ungestörten Flusses. θ hängt hauptsächlich vom reduzierten Volumen V^* , dem Viskositätskontrast λ und der angelegten Scherspannung τ ab. Während bei gesunden RBK V^* innerhalb der normalen biologischen Schwankungen als konstant angesehen werden kann, lassen sich die Abhängigkeit von λ und τ durch Variation der äußeren Viskosität sowie der Flussrate Q untersuchen. Die in Tabelle 5.1 zusammengefassten und in Abb. 5.3 graphisch dargestellten Ergebnisse werden aus den bereits im Hinblick auf die TD ausgewerteten Messreihen gewonnen.

Für $\lambda = 0,37$ ($\eta_{\text{ext}} = 27$ mPas) befinden sich bei allen Werten für τ 100% der RBK im TT-Zustand und der Anstellwinkel nimmt monoton mit zunehmender Scherspannung ab. Für Scherspannungen $\tau \geq 11,8$ Pa ist, wie schon für die TD, ein Sättigungsbereich zu erkennen, in der sich der Winkel nicht mehr signifikant ändert.

Bei $\lambda = 1,43$ ($\eta_{\text{ext}} = 7$ mPas) wird der Winkel nur für die Messungen bei solchen Scherspannungen bestimmt, bei denen sich mehr als 50% der Zellen im TT-Zustand befinden. Dies ist für $\tau \geq 3,1$ Pa der Fall. Um dabei nicht willkürlich eine Subpopulation der Zellen zu vermessen, wird in diesen Messungen auch den Zellen im RO- oder SP-Zustand ein Anstellwinkel zugewiesen, wodurch die starke Streuung der Werte entsteht. Da in keiner der Messungen mit $\lambda = 1,43$ alle RBK im TT-Zustand sind, ist der Verlauf der Messkurve im Vergleich unregelmäßiger als bei $\lambda = 0,37$, wie in Abb. 5.3 gut zu erkennen ist. Generell werden für ähnliche Scherspannungen für $\lambda = 1,43$ kleinere Anstellwinkel beobachtet als beim niedrigeren Viskositätskontrast.

5.3. Diskussion

RBK in unterschiedlich ausgeprägten Poiseuille-Flüssen stellen ein wichtiges Modellsystem für die Untersuchung des Blutflusses dar. Die Aufklärung der physikalischen Eigenschaften näherte sich den RBK schrittweise über die Untersuchung von Vesikeln und RBK im linearen Scherfluss an. Jedoch existieren nur wenige Studien, die sich mit RBK in den physiologisch relevanten, parabolischen Geschwindigkeitsfeldern befassen. Dies hängt unter anderem mit den Herausforderungen der experimentellen Beobachtung von RBK in Mikrokanälen zusammen, deren Dynamik auf deutlich kürzeren Zeitskalen abläuft als die der in der Regel größeren Vesikel. Für den in dieser Arbeit untersuchten Scherspannungsbereich liegen deshalb bisher kaum experimentelle Daten vor, weshalb viele der hier gefundenen Ergebnisse mit Messungen im linearen Scherfluss oder mit Vesikeln verglichen werden müssen, um sie in die Literatur einordnen zu können.

5.3.1. Bewegungsregime und Taylor-Deformation

Studien anderer Gruppen zeigen, dass RBK bei niedrigen Scherspannungen auch im TT-Zustand ihre Ruheform beibehalten [114, 145]. Bei höheren Scherspannungen (wie den hier angewandten) ist dies jedoch nicht mehr der Fall. Die RBK werden deformiert und erscheinen unter dem Mikroskop als Ellipsen mit einem konstanten Anstellwinkel zum Fluss und einer Membran, die um das Zytoplasma rotiert (vgl. Abb. 5.1). Sehr deutlich zu beobachten ist dies für RBK in den Messungen mit der höheren externen Viskosität von $\eta_{\text{ext}} = 27$ mPa s und dem damit einhergehenden, niedrigeren Viskositätskontrast von $\lambda = 0,37$. Die ausgeprägte Ellipsenform und der konstante Anstellwinkel sind charakteristisch für den TT-Zustand bei so hohen Scherspannungen. Aus bereits veröffentlichten Messungen und Simulationen ist zu erwarten, dass sich bei einem Viskositätskontrast von $\lambda = 0,37$ alle RBK bei beliebigen Scherraten im TT-Zustand befinden [65, 114, 128, 145, 193, 194].

Ein detaillierterer, quantitativer Vergleich ist mit den Daten von Forsyth *et al.* möglich, da sie als einzige experimentell den Übergang ins TT-Regime und die Deformation roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss bei ähnlichen Parametern wie den in dieser Arbeit verwendeten untersuchten [65]. Sie benutzten dazu Viskositätskontraste $\lambda \geq 1,6$ unter der Annahme von $\eta_{\text{int}} = 12$ mPa s und der Vergleich mit den hier präsentierten Ergebnissen zeigt eine qualitativ sehr gute Übereinstimmung, auch wenn im Detail deutliche Unterschiede auszumachen sind: Zum Beispiel beobachten Forsyth *et al.* bei niedrigen Scherraten eine Tumbling-Bewegung und schließlich den Übergang ins TT-Regime, ohne RO- oder SP-Zustände zu beschreiben [65]. Eine signifikante Deformation der RBK im TT-Zustand finden Forsyth *et al.* ab Scherspannungen von $\tau \geq 2$ Pa bei $\lambda = 1,6$, wobei bei diesem Wert bereits über 80% der Zellen eine TT-Bewegung vollführen. In den hier präsentierten Versuchen mit $\lambda = 1,43$ (entspricht einem Wert von $\lambda = 1,71$ für $\eta_{\text{int}} = 12$ mPa s) finden sich erst für $\tau \geq 4,9$ Pa mehr als 80% der Zellen im TT, also bei deutlich höheren Scherspannungen. Eine mögliche Ursache hierfür ist die stabilisierende Wirkung der in den hier durchgeführten Experimenten beobachteten Rolling-Bewegung und der damit verbundene, spätere Übergang ins TT-Regime [145]. Warum Forsyth *et al.* kein RO beobachten (oder nicht beschreiben), lässt sich leider nicht im Detail klären. Eine mögliche Ursache für das Auftreten der RO-

Bewegung in den Experimenten dieser Arbeit wäre, dass die Zellen zu Beginn des Kanals an die Kanalwand fokussiert werden und somit in einen bestimmten Ausgangszustand versetzt werden, während dies bei Forsyth *et al.* nicht der Fall ist. Dupire & Viallat vermuten, dass diese Ausgangskonfiguration einen Einfluss auf den späteren Bewegungszustand haben könnte.

Interessant ist auch, dass in der Studie von Forsyth *et al.* [65], ebenso wie in der hier vorliegenden Arbeit, kein Swinging-Zustand beobachtet (oder nicht beschrieben) wird. Zieht man beide Studien in Betracht, ergeben sich zwei Erklärungsansätze: Eine Möglichkeit ist, dass unter den hohen Scherspannungen überhaupt keine SW-Bewegung auftritt, weil durch die starke Membranauslenkung die Krümmung der Membran an allen Stellen die gleiche Richtung aufweist. Die SW-Bewegung wäre in diesem Fall nur sehr schwach oder gar nicht vorhanden. Eine zweite Möglichkeit ergibt sich aus der Messung selbst. Die Beobachtungszeit der RBK in den Mikrokanälen ist sehr kurz, da sie mit relativ hoher Geschwindigkeit das Sichtfeld durchqueren. Im Vergleich zur SW-Frequenz bedeutet dies, dass nur ein kleiner Teil der SW-Bewegung sichtbar ist. Eine einzelne Messung ist somit wenig aussagekräftig, da nicht klar ist, welcher Abschnitt der Schwingung beobachtet wird. Bei der Vermessung mehrerer Zellen ergibt sich eine Streuung des Winkels, die größer ist als die erwartete Schwingung ($\sim 1,5^\circ$ [114]), weshalb nicht zwischen natürlicher Verteilung und SW unterschieden werden kann. Eine Klärung der Frage, ob und, wenn ja, wie genau eine SW-Bewegung unter den vorliegenden Umständen stattfindet, ist deshalb anhand der vorliegenden Messungen nicht möglich. Dazu sind weitere Messungen in einem modifizierten Aufbau notwendig, in denen die RBK über eine größere Zeitspanne beobachtet werden können. In dieser Arbeit wird im Folgenden davon ausgegangen, dass die RBK vom Rolling-beziehungsweise Spinning-Zustand direkt in die Tank-Treading-Bewegung übergehen, ohne eine Swinging-Bewegung zu durchlaufen.

Vor dem Erreichen des TT-Zustandes vollführen die RBK in den hier präsentierten Messungen eine RO-Bewegung. Charakteristisch hierfür ist das nahezu kreisrunde Erscheinungsbild in der Beobachtungsebene, welches sich in den Werten der Taylor-Deformation widerspiegelt. Beim größeren der beiden untersuchten Viskositätskontraste lässt sich der Übergang zwischen den Zuständen anhand der TD nachverfolgen: Für die niedrigste Scherspannung von $\tau = 0,3$ Pa ist die TD mit $TD = 0,17 \pm 0,07$ am kleinsten, was bedeutet, dass die RBK eine relativ runde Form haben. Mit zunehmendem SP- beziehungsweise TT-Anteil steigt die TD schließlich zunehmend an. Die parallel zueinander existierenden Bewegungsformen führen vor allem in den Übergangsbereichen zu einer breiten Verteilung der TD. Vergleicht man die Werte in Tabelle 5.1 und Abb. 5.3, so findet sich die breiteste Verteilung der TD bei $\tau = 1,5$ Pa. Bei dieser Scherspannung vollführen jeweils etwa 40% der RBK eine RO-beziehungsweise eine SP-Bewegung, während sich die restlichen 20% bereits im TT-Zustand befinden. Die TD erreicht schließlich für die Messungen bei $\tau = 4,9$ Pa und $\tau = 5,7$ Pa ihr Maximum, da sich dort die Mehrheit der RBK im TT-Zustand befindet.

Im Vergleich zu den Messungen mit dem kleineren Viskositätskontrast ($\lambda = 0,37$, vgl. Abb. 5.3) wird dieser Zusammenhang erneut deutlich. Bei $\lambda = 0,37$ befinden sich bei allen Scherspannungen 100% der RBK im TT-Zustand. Je kleiner nun der Anteil der tank-treadenden RBK bei einer bestimmten Scherspannung ist, desto stärker unterscheiden sich die Messreihen für die zwei verschiedenen Viskositätskontraste. Für $\tau = 3,1$ Pa sind

schließlich mehr als die Hälfte der RBK im TT-Zustand und die durch die Fehlerbalken dargestellte Verteilung umschließt bereits die Werte der vergleichbaren Messung beim kleineren Viskositätskontrast. Liegen schließlich mehr als 80% der RBK im TT-Zustand vor ($\tau \approx 5$ Pa), nehmen die Werte der TD bei beiden Viskositätskontrasten eine vergleichbare Größe an.

Betrachtet man die Messreihe bei $\lambda = 0,37$ separat, fällt die zunehmende Deformation der RBK mit steigender Scherspannung auf. Der Verlauf zeigt keine Stufen sondern steigt kontinuierlich an. Die Kurve flacht bei höheren Scherspannungen ab, was zum Teil an der Definition der TD liegt, hauptsächlich aber am hohen Widerstand der RBK-Membran gegen Flächendehnung. Die Messkurven stimmen qualitativ mit bekannten Ektazytometrie- und Rheoskop-Messungen überein [88, 149], ein quantitativer Vergleich damit ist jedoch schwierig, da, z.B. im Rheoskop, die RBK aus einer anderen Blickrichtung heraus vermessen werden (senkrecht zu der in den hier vorliegenden Messungen). Ein quantitativer Vergleich der von Forsyth *et al.* gemessenen Deformation mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergibt, dass bei Forsyth *et al.* der Anstieg mit steigender Scherspannung tendenziell etwas schwächer, qualitativ aber sehr ähnlich ausfällt. Forsyth *et al.* normieren zur Bestimmung der Deformation die Änderung der Zelllänge mit der Länge L_0 der Zelle bei der niedrigsten vermessenen Scherrate und finden $\frac{L}{L_0} \approx 1,1$ für $\lambda = 1,6$ und $\tau \approx 5$ Pa [65]. Ein Vergleich mit den hier präsentierten Ergebnissen wird durch diese Betrachtung erschwert, da die niedrigste vermessene Scherrate in diesem Fall deutlich höher ist als bei Forsyth *et al.* und bereits eine signifikante Deformation vorliegt. Eine Abschätzung ergibt unter der Annahme einer Ruhelänge $L_0 = 3,5 \mu\text{m}$ bei $\lambda = 1,43$ und $\tau \approx 5$ Pa ein Verhältnis von $\frac{L}{L_0} \approx 1,34$, also eine deutlich stärkere Deformation als in [65]. Nimmt man stattdessen $L_0 = 4,0 \mu\text{m}$, was im normalen Schwankungsbereich von RBK liegt, verringert sich das Verhältnis auf $\frac{L}{L_0} \approx 1,18$ und ist somit durchaus vergleichbar mit den Ergebnissen aus [65]. Es ergibt sich in jedem Fall eine gute qualitative Übereinstimmung der Ergebnisse beider Studien.

5.3.2. Anstellwinkel im TT-Zustand

Im TT-Zustand besitzen RBK wie in Abschnitt 3.3 beschrieben einen konstanten Anstellwinkel, der neben den viskoelastischen Eigenschaften der RBK auch von der angelegten Scherspannung und dem Viskositätskontrast zum äußeren Medium abhängt.

Für $\lambda = \text{const.}$ nimmt der Anstellwinkel θ mit zunehmender Scherspannung τ ab, wie in Abb. 5.3 gut zu sehen ist. Dieses Verhalten wurde bereits in Simulationen von Noguchi & Gompper [146] und Messungen von Kantsler & Steinberg [113] für Vesikel in linearen Scherfeldern beobachtet. Grobe Abschätzungen für θ aus den in diesen Arbeiten präsentierten Daten liegen, trotz der unterschiedlichen Systeme, im gleichen Bereich wie die hier gemessenen Werte. Der Anstellwinkel roter Blutkörperchen (im parabolischen Geschwindigkeitsfeld) wurde hingegen bisher kaum vermessen. In ihrer Veröffentlichung zur Swinging-Bewegung roter Blutkörperchen finden Abkarian *et al.*, dass im linearen Scherfeld bei Scherspannungen von $\tau \approx 0,04$ Pa ($\eta_{\text{ext}} = 22$ mPas) [114] die Schwingbewegung einen Winkel von $\theta \approx 12^\circ \pm 1,5^\circ$ abdeckt, ein Bereich der durchaus vergleichbar zu den hier präsentierten Werten für θ im TT-Zustand ist (vgl. Tabelle 5.1). Dies ist etwas überraschend, da die in dieser Arbeit gemessenen und in Tabelle 5.1 zusammengestellten

Werte bei deutlich höheren Scherspannungen gemessen wurden und deshalb kleiner sein sollten als die Werte von Abkarian *et al.*. Ein möglicher Grund für dieses Phänomen könnte die Krümmung des parabolischen Geschwindigkeitsprofils sein, die im Vergleich der beiden vermessenen Systeme einer der Hauptunterschiede ist.

Für $\tau = \text{const.}$ nimmt θ mit Vergrößerung des Viskositätskontrastes ab [113, 146]. Dieses Verhalten wird ebenfalls durch die in Abb. 5.3 gezeigten Messungen wiedergegeben und folgt qualitativ den Ergebnissen für Vesikel im linearen Scherfeld von [113, 146]. Die hohe Streuung des Winkels bei $\tau = 3,1 \text{ Pa}$ liegt daran, dass sich dort lediglich 66% der RBK im TT-Zustand befinden, während die anderen noch eine RO- beziehungsweise SP-Bewegung vollführen.

Das qualitative Verhalten der RBK in den hier untersuchten Kanälen stimmt, soweit vergleichbar, sehr gut mit den auf bereits veröffentlichten Messungen basierenden Erwartungen überein. Vor allem Forsyth *et al.* messen mit ihrem (vom Versuchsaufbau her am besten vergleichbaren) System Werte, die auch quantitativ sehr gut mit den hier präsentierten übereinstimmen. Im Detail offenbaren sich jedoch Unterschiede (z.B. die unterschiedliche Abfolge der Bewegungszustände oder die Beobachtung des Spinning-Zustandes), die im Rahmen dieser Arbeit nicht näher geklärt werden können und einen Ansatzpunkt für weitere Studien bieten.

6. Trägheitsunabhängiger Lift-Effekt auf Blutzellen im Poiseuille-Fluss

The ships hung in the sky in much the same way that bricks don't.
And still nothing happened.

(Douglas Adams, The Hitchhikers's Guide to the Galaxy)

Der trägheitsunabhängige Lift-Effekt wurde bisher ausschließlich durch Messungen mit Vesikeln im linearen Scherfluss untersucht. Von enormer praktischer Bedeutung ist jedoch dessen Stärke bei Blutzellen, vor allem roter Blutkörperchen, in parabolischen Geschwindigkeitsfeldern. Zum Einen aufgrund seiner physiologischen Bedeutung als Ursache für den zellfreien Bereich in Zusammenhang mit dem Fåhræus-Lindqvist-Effekt [15, 128] und zum Anderen, um den Effekt in Mikrokanälen kontrollieren und gezielt einsetzen zu können. Letzteres ist speziell für Lab-on-a-Chip-Systeme zur Zellcharakterisierung interessant. In diesem Abschnitt soll deshalb zunächst der trägheitsunabhängige Lift-Effekt auf Blutzellen (RBK und BP) in Mikrokanälen vermessen und mit der theoretischen Vorhersage für Vesikel von Olla [120] verglichen werden. Kapitel 6 orientiert sich an der eigenen Veröffentlichung [115].

6.1. Versuchsaufbau und Beispielmessung

6.1.1. Versuchsaufbau

Für die Messungen zum trägheitsunabhängigen Lift-Effekt auf Blutzellen im Poiseuille-Fluss wird der in Abb. 4.2 dargestellte Versuchsaufbau mit dem in Abb. 6.1 gezeigten Kanal verwendet. Der Aufbau ist damit äquivalent zu dem im vorangegangenen Kapitel. Die Probenpräparation erfolgt prinzipiell wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, wird jedoch aufgrund des Bedarfs an Blutplättchen leicht modifiziert. Bei den einzelnen Waschschrritten werden diesmal vorsichtig RBK und das Serum entfernt und der Rest mit PBS verdünnt. Nach drei Waschschrritten ist die BP-Konzentration in der Probenlösung etwa 2-3 mal so hoch wie in Vollblut und der Hämatokrit beträgt nur noch $Hct \approx 1\%$. Diese Suspension wird schließlich 1:10 in PBS/Dextran suspensiert, so dass die Probenlösung einen Hämatokrit von $Hct \approx 0,1\%$ aufweist, bei dem Zell-Zell-Wechselwirkungen vernachlässigt werden können. Für die Versuche wird die Probenlösung für Fokussierflussraten $Q_{\text{Fokus}} \leq 240 \mu\text{l/h}$ mit $Q_{\text{Probe}} = 10 \mu\text{l/h}$ injiziert. Für höhere Fokussierflussraten wird der Probenzufluss auf $Q_{\text{Probe}} = 20 \mu\text{l/h}$ erhöht, um eine ausreichende Probenzufuhr zu gewährleisten. Dies ergibt insgesamt elf verschiedene Gesamtflussraten $Q = Q_{\text{Probe}} + Q_{\text{Fokus}}$ von $20 \mu\text{l/h} \leq Q \leq 750 \mu\text{l/h}$, die für zwei verschiedene Viskositäten der äußeren Flüssigkeit ($\eta_{\text{ext}} = 7 \text{ mPas}$ und $\eta_{\text{ext}} = 27 \text{ mPas}$)

untersucht werden. An den Positionen x_1 und x_2 (vgl. Abb. 6.1) werden dazu Hochgeschwindigkeitsvideos aufgenommen und die Höhe z von durchschnittlich 250 Zellen pro Parameterkombination über dem Kanalboden ($z = 0$) bestimmt. Die Zellhöhe entspricht dabei dem Abstand zwischen dem Schwerpunkt der Zelle und dem Kanalboden. Um den Einfluss der Schwerkraft gegebenenfalls untersuchen zu können, werden die Experimente in einem auf die Seite gekippten Mikroskop durchgeführt, mit der Schwerkraft in z -Richtung wie in Abb. 6.1 angedeutet. Bevor die Ergebnisse vorgestellt werden, werden zunächst das Messprinzip und die Auswertemethodik anhand einer Beispielmessung anschaulich erklärt.

6.1.2. Beispielmessung

Die in Abb. 6.1 gezeigten Mikroskopaufnahmen und graphischen Auswertungen stammen von einem Experiment mit $Q_{\text{Probe}} = 10 \mu\text{l/h}$, $Q_{\text{Fokus}} = 190 \mu\text{l/h}$ und $\eta_{\text{ext}} = 27 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. Sie wurden an den in Abb. 6.1 eingezeichneten Positionen $x_1 = 0 \text{ mm}$ und $x_2 = (19 \pm 0,5) \text{ mm}$ aufgenommen und zeigen RBK und BP im Mikrokanal. Bei genauer Betrachtung zeigt sich, dass an der Position x_1 beide Zellsorten durchmischt sind, also das gleiche Höhenintervall in z -Richtung belegen. Am Ende des Kanals (x_2) ist schließlich zu erkennen, dass sich die RBK oberhalb der BP befinden. Eine erste Auswertung der Bilder ergibt, dass dies an einer deutlichen Höhenänderung der RBK liegt, währenddessen die BP ihre Höhe kaum verändert haben.

Zur Quantifizierung der Höhe z der Zellpopulationen wird zunächst die Höhe der einzelnen Zellen bestimmt. Aus diesen wird ein Histogramm mit einer Schrittweite in der Höhe z von $1 \mu\text{m}$ erstellt. Mit anderen Worten: Es wird der Anteil der Zellen in einem definierten Höhenintervall bestimmt. An das Histogramm wird schließlich mit Hilfe des Programmes „Origin“ (OriginLab) eine Gauss-Funktion angepasst, deren Position des Maximums die Höhe der Zellpopulation beschreibt und deren Standardabweichung als Maß für die Streuung der Zellen dient. Eine solche Auswertung für die hier behandelte Beispielmessung ergibt die in Abb. 6.1 gezeigten Graphen. Demnach belegen die Zellen am Kanalstart Höhen von $z_{\text{RBK}}(x_1) = (9,5 \pm 1,2) \mu\text{m}$ und $z_{\text{BP}}(x_1) = (10,1 \pm 2,0) \mu\text{m}$ sowie am Kanallende von $z_{\text{RBK}}(x_2) = (24,3 \pm 0,5) \mu\text{m}$ und $z_{\text{BP}}(x_2) = (13,3 \pm 3,2) \mu\text{m}$. Dieses Ergebnis stützt den ersten Eindruck, dass die Zellpopulationen sich am Kanallende kein gemeinsames Höhenintervall mehr teilen, sondern klar voneinander getrennte Höhen besitzen.

Zum Nachweis, dass außer des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes keine weiteren Lift-Kräfte, wie etwa der trägheitsbedingte Lift, wirken, wird die Höhe von starren, nicht-deformierbaren Latex-Mikrokugeln (MK) mit einem Durchmesser von $3 \mu\text{m}$ am Kanalstart und am Kanallende unter den gleichen Bedingungen wie RBK und BP gemessen. Diese belegen bei x_1 und x_2 im Rahmen der Messgenauigkeit das gleiche Höhenintervall, wie in Abb. 6.2 gut zu sehen. Dadurch ist nachgewiesen, dass trägheitsbedingte Kräfte vernachlässigt werden können.

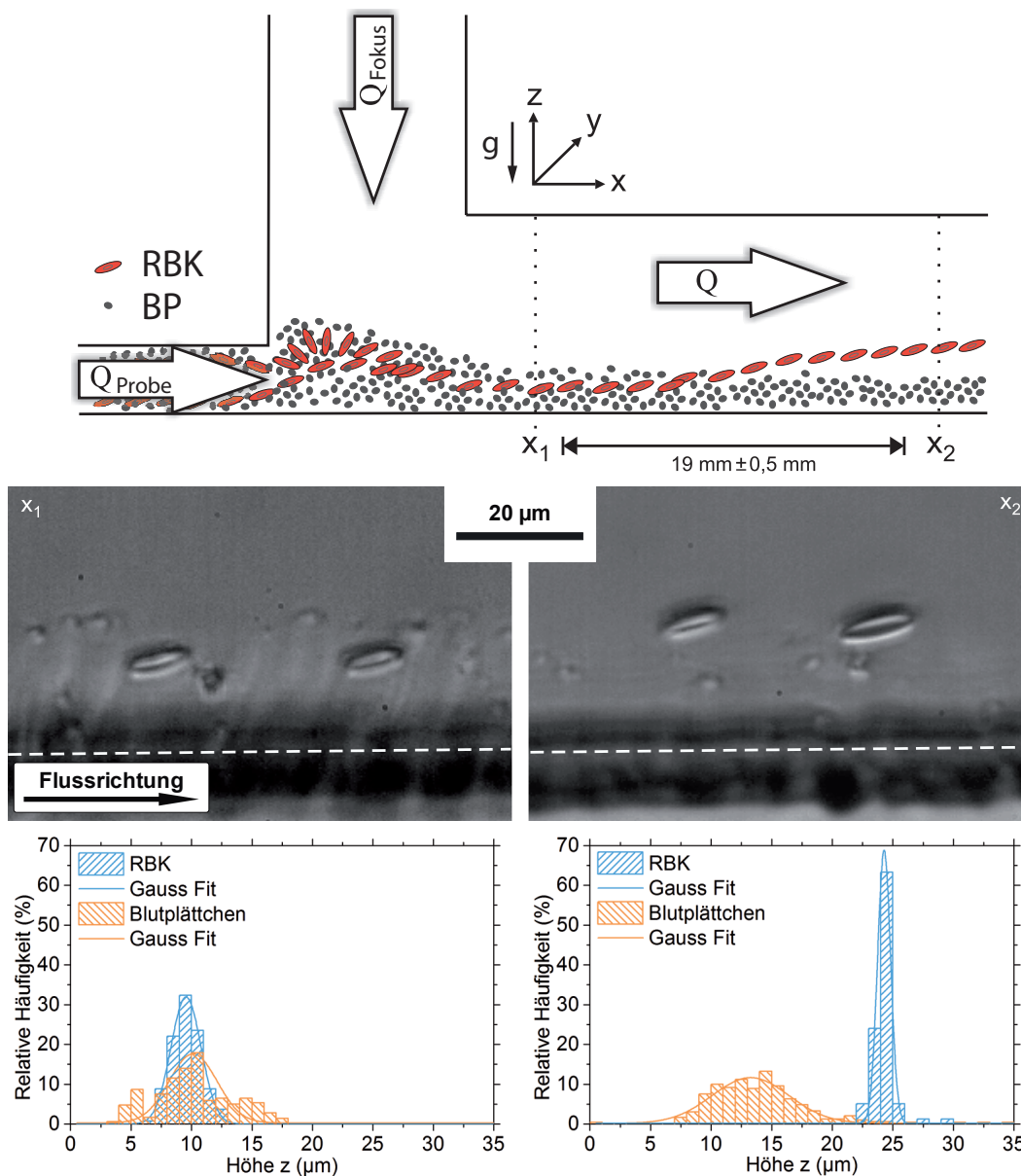


Abbildung 6.1.: Messprinzip und Auswertemethodik zum trägheitsunabhängigen Lift-Effekt auf RBK und BP. Die Suspension aus RBK und BP wird mit der Flussrate Q_{Probe} in den Kanal injiziert und vom Fokusfluss Q_{Fokus} an die untere Kanalwand fokussiert. An der Stelle x_1 belegen RBK und BP ein gemeinsames Höhenintervall. Nach 19 mm im Scherfluss sind die RBK bei x_2 aufgrund des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes schließlich deutlich weiter von der unteren Kanalwand entfernt als die BP. Zur Quantifizierung der z -Höhen werden Histogramme erstellt und eine Gauss-Funktion an die Daten angepasst (Abb. modifiziert aus eigener Veröffentlichung [115]).

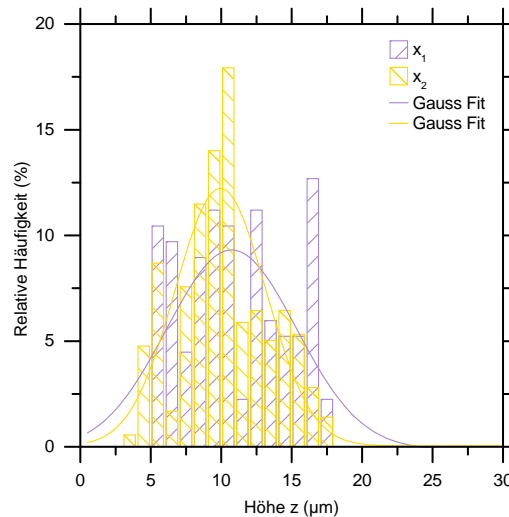


Abbildung 6.2.: Höhe von Latex-Mikrokugeln am Kanalbeginn und -ende für die gleichen Parameter wie in Abb. 6.1 ($Q = 200 \mu\text{l/h}$ und $\eta_{\text{ext}} = 27 \text{ mPas}$). Die starren Mikrokugeln belegen am Anfang (x_1) und am Ende (x_2) des Kanals das gleiche Höhenintervall, was belegt, dass kein Lift-Effekt auftritt.

6.2. Ergebnisse und Diskussion

6.2.1. Steighöhen von roten Blutkörperchen, Blutplättchen und Mikrokugeln

Ziel dieser Studie ist die Bestimmung der Höhe roter Blutkörperchen und Blutplättchen am Kanalenende (x_2) bei unterschiedlichen Flussraten und zwei verschiedenen Viskositäten der äußeren Flüssigkeit. Für alle Parameter werden auch Latex-Mikrokugeln mit einem Durchmesser von $3 \mu\text{m}$ als Modell für harte Kugeln der gleichen Größe wie BP vermessen. Damit können nicht nur trägheitsbedingte Kräfte ausgeschlossen werden, sondern über den Vergleich von BP und MK auch ein Lift-Effekt auf BP nachgewiesen werden (siehe unten). Aus den gewonnenen Daten kann die Abhängigkeit des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes vom Viskositätskontrast $\lambda = \frac{\eta_{\text{in}}}{\eta_{\text{ext}}}$ und der Scherrate $\dot{\gamma}$ für alle drei Objektsorten überprüft werden.

Die maximal erreichte Reynoldszahl in den Versuchen ist $Re = 0,4$ bei $\eta_{\text{ext}} = 7 \text{ mPas}$ und $Q = 750 \mu\text{l/h}$. Somit finden alle Versuche der Messreihe im Stokes-Regime statt, wodurch Einflüsse durch Trägheitseffekte theoretisch ausgeschlossen werden können. Der experimentelle Nachweis für die Richtigkeit dieser Annahme wurde bereits im Rahmen der Beispielmessung mit Latex-Mikrokugeln erbracht (vgl. Abb. 6.2).

Neben der Flussrate und der Viskosität der äußeren Flüssigkeit hängt die Stärke des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes nach Gleichung (3.38) auch von Größe, Form und Deformierbarkeit der Objekte ab. Die hier untersuchten Objekte unterscheiden sich in eben diesen Parametern voneinander: RBK sind deutlich größer und deformierbarer als BP, während letztere wiederum deformierbarer und anders geformt sind als die gleich

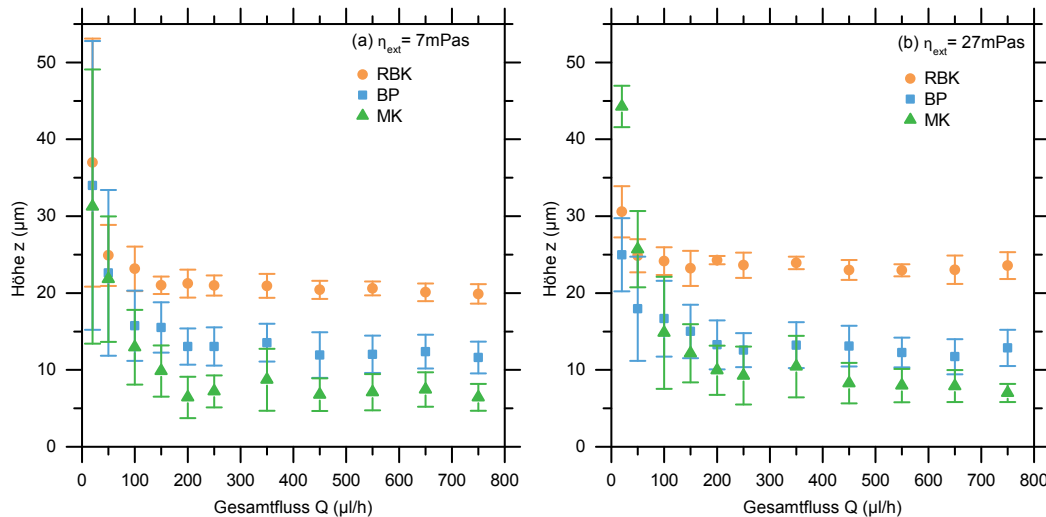


Abbildung 6.3.: Höhe von RBK, BP und MK bei unterschiedlichen Flussparametern am Kanalende. Höhe der Zellen bei x_2 über der angelegten Flussrate Q bei einer Flüssigkeitsviskosität von (a) 7 mPas und (b) 27 mPas. Die großen, deformierbaren RBK belegen das höchste z -Intervall, die deformierbaren aber kleineren BP bleiben darunter und die harten MK besetzen das niedrigste Intervall (Abb. adaptiert aus eigener Veröffentlichung [115]).

großen, harten Mikrokugeln. Diese Unterschiede spiegeln sich auch in den Höhen der Zellpopulationen am Kanalende wider, die in Abb. 6.3 über der Flussrate Q dargestellt sind.

Betrachtet man zunächst die Messungen bei einer äußeren Viskosität von $\eta_{\text{ext}} = 7 \text{ mPas}$, so findet man bei kleinen Flussraten eine relativ hohe Position aller Objekte sowie sehr breite Verteilungen. Dies kann durch eine einfache hydrodynamische Betrachtung erklärt werden: Die beiden Volumenflüsse Q_{Probe} und Q_{Fokus} werden separat in den Kanal injiziert und müssen sich nach ihrem Aufeinandertreffen das Kanalvolumen teilen. Im vorliegenden, laminaren Flussregime erfolgt die Aufteilung des Volumens gemäß des Flussratenverhältnisses. Für $Q_{\text{Fokus}} = 20 \mu\text{l/h}$ und $Q_{\text{Fokus}} = 40 \mu\text{l/h}$ liegt ein Probenzufluss von $Q_{\text{Probe}} = 10 \mu\text{l/h}$ an, weshalb dieser im Hauptkanal ein Drittel beziehungsweise ein Fünftel des Volumens belegen sollte. Dass die Zellen sich am Kanalende an einer deutlich höheren Position (bis hin zur Mitte des Kanals beziehungsweise einem Drittel der Kanalhöhe) befinden, kann wiederum zwei mögliche Ursachen haben. Zum Einen findet auch bei niedrigen Flussraten eine laterale Migration statt, zum Anderen könnten durch die schlagartige Expansion des Probenzuflusses vor der Position x_1 kurzzeitig Trägheitseffekte auftreten, welche die Zellpositionen beeinflussen. Nicht außer Acht lassen sollte man auch die Anfälligkeit des Flusses bei solch niedrigen Flussraten auf kleinste Druckschwankungen. Solche können z.B. durch unkontrollierte Bewegungen der Schläuche oder durch, nach einer Veränderung der Volumenflussrate, verbleibende Über- beziehungsweise Unterdrücke ausgelöst werden. Durch die breite Verteilung der Zellen sowie die Anfälligkeit des Flusses ist dieser Flussratenbereich

für die Untersuchung des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes nicht geeignet.

Für $Q \geq 100 \mu\text{l/h}$ ist die Fokussierung der RBK schließlich stark genug, um die Zellen auf ein Ausgangshöhenintervall von $\Delta z(x_1) \leq 11 \mu\text{m}$ zu fokussieren. Dadurch wird ihre Höhe am Kanalende schließlich maßgeblich vom trägheitsunabhängigen Lift-Effekt bestimmt. Für höhere Flussraten ist die erreichte Höhe am Kanalende bei beiden Viskositäten konstant und unabhängig von der Flussrate. Für BP und MK erreicht die Höhe hingegen erst bei Flussraten $Q \geq 150 \mu\text{l/h}$ konstante Werte. Die genaue Ursache dafür kann leider nicht geklärt werden, es dürfte sich aber auch hier um trägheitsbedingte Effekte am Kanaleingang im Zusammenspiel mit einem schwächeren Lift-Effekt handeln. Grund für die Unabhängigkeit der Lift-Höhe von der Flussrate ist die lineare Abhängigkeit von Lift- und Translations-Geschwindigkeit vom Volumenfluss. Somit kompensieren sich beide Effekte bei einer Flussratenveränderung und die am Ende des Kanals erreichte Höhe bleibt konstant. Aus der Konstanz der Endhöhen mit steigender Flussrate kann außerdem nochmals die Vernachlässigbarkeit trägheitsbedingter lateraler Kräfte abgeleitet werden. Diese skalieren quadratisch mit Q und würden deshalb zu einer Abhängigkeit der Endhöhen von der Flussrate führen.

Zur Berechnung der in Tabelle 6.1 aufgetragenen, durchschnittlichen Höhen für RBK, BP und MK, wird jeweils über die Höhen der einzelnen Messungen in dem Flussratenbereich gemittelt, in dem die Höhen konstant sind. Das gilt für RBK für alle Messungen mit $Q \geq 100 \mu\text{l/h}$ und für BP und MK für $Q \geq 150 \mu\text{l/h}$.

Tabelle 6.1.: Durchschnittliche Steighöhen \bar{z} für RBK, BP und MK. Die Werte entsprechen der Mittelung über alle Flussraten, bei denen die Steighöhe konstant bleibt. Dies sind für RBK die Messungen mit $Q \geq 100 \mu\text{l/h}$ und für BP und MK die Messungen mit $Q \geq 150 \mu\text{l/h}$.

	\bar{z}_{RBK}	\bar{z}_{BP}	\bar{z}_{MK}
$\eta_{\text{ext}} = 7 \text{ mPas}$	$20,6 \pm 0,5$	$12,5 \pm 0,7$	$7,2 \pm 0,8$
$\eta_{\text{ext}} = 27 \text{ mPas}$	$23,5 \pm 0,5$	$12,7 \pm 0,6$	$8,7 \pm 1,2$

Der größte Höhenunterschied, sprich die beste Auftrennung von RBK, BP und MK, wird für Flussratenverhältnisse von $\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}} \geq 20$ erreicht, was für die Messungen bei $Q = 200 \mu\text{l/h}$, $Q = 250 \mu\text{l/h}$ und $Q \geq 450 \mu\text{l/h}$ der Fall ist. Wie später anhand der Ergebnisse in Abschnitt 7.3.3 noch näher erläutert wird, liegt dies für RBK und BP an einer besseren größeninduzierten Vortrennung am Kanaleingang.

Qualitativ ist der Verlauf mit der Flussrate für die Messungen mit einer äußeren Viskosität von $\eta_{\text{ext}} = 27 \text{ mPas}$ gleich, die absoluten Steighöhen der Blutzellen am Kanalende sind jedoch höher. Quantifiziert man diese Steighöhenunterschiede durch $\Delta z = \bar{z}_{27\text{mPas}} - \bar{z}_{7\text{mPas}}$ ergeben sich $\Delta z_{\text{RBK}} = (2,9 \pm 0,7) \mu\text{m}$ und $\Delta z_{\text{BP}} = (0,2 \pm 0,8) \mu\text{m}$. Der Unterschied für BP ist unter Einbeziehung der Standardabweichung demnach nicht signifikant. Ein stärkerer Lift-Effekt für niedrigere Viskositätskontraste entspricht der Vorhersage von Gleichung (3.38). Ein detaillierter Vergleich der Messdaten mit dieser theoretischen Vorhersage wird im Folgenden angestellt.

6.2.2. Numerische Berechnung der Trajektorien

Um die experimentell ermittelten Werte mit der theoretischen Erwartung vergleichen zu können, werden die Trajektorien numerisch auf Grundlage des Ansatzes von Olla [120] für Vesikel im linearen Scherfluss berechnet. Man erhält für die Höhe $z(x_2)$:

$$z(x_2) = z(x_1) + \int_{x_1}^{x_2} \frac{dz}{dx} dx = z(x_1) + \int_{x_1}^{x_2} \frac{v_L}{v_x} dx \quad (6.1)$$

Die Lift-Geschwindigkeit v_L in z-Richtung wird durch Gleichung (3.38) gegeben und die Translationsgeschwindigkeit v_x in x-Richtung mit dem vereinfachten Poiseuille-Profil aus Gleichung (2.10) bestimmt. Die Berechnung erfolgt automatisiert mit einem Skript für die Software Matlab (siehe Anhang B) mit den in Tabelle 6.2 zusammengestellten Daten für RBK, BP und MK. Für Blutplättchen wird mangels verfügbarer Werte die gleiche innere Viskosität wie für RBK angenommen. BP enthalten allerdings, im Gegensatz zu RBK, weitere Zellstrukturen in ihrem Inneren, weshalb der tatsächliche Wert wahrscheinlich höher liegt [195]. Durch ihre prolate Form fällt die Viskosität nach [120] für die Berechnung des Lift-Effektes auf BP jedoch kaum ins Gewicht (vgl. Abb. 3.11).

Tabelle 6.2.: Eigenschaften von RBK, BP und MK für die numerische Berechnung [19, 89, 120, 195]. Die Werte für $U(\lambda, r_1, r_2)$ wurden aus Abb. 3.11 bestimmt.

	RBK	BP	MK
Ruhedurchmesser (μm)	7 - 8	2 - 4	3
Dicke in Ruhe (μm)	~ 2	~ 1	3
$R = (a_1 a_2 a_3)^{\frac{1}{3}}$	2,31	1,04	1,5
$r_1 = \frac{a_1}{a_3}$	0,213	~ 1	1
$r_2 = \frac{a_2}{a_3}$	0,213	$\sim 0,5$	1
η_{int} (mPas)	~ 10	~ 10	$\rightarrow \infty$
$U(\lambda = 1,43, r_1, r_2)$	0,23	0,11	—
$U(\lambda = 0,37, r_1, r_2)$	0,36	0,11	—
$U(\lambda \rightarrow \infty, r_1, r_2)$	0	0	0
Dichte ($\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$)	$\sim 1,10$	$\sim 1,07$	$\sim 1,05$

Für einen ersten Vergleich von Theorie und Experiment wird eine Trajektorie für die RBK aus der Beispielmessung in Abschnitt 6.1.2 gemessen und berechnet. Dazu wird entlang des Kanals in Abständen von jeweils circa 2 mm je ein Video aufgenommen und die Höhe der Zellen ausgezählt. Die gemessene Trajektorie ist zusammen mit der berechneten in Abb. 6.4 aufgetragen. Die numerische Rechnung erfolgte dabei mit den in Tabelle 6.2 zusammengestellten Werten und somit ohne Anpassungsparameter. Die Übereinstimmung zwischen dieser Rechnung für ein „Standard-RBK“ und den experimentell gemessenen Werten im verwendeten Versuchsaufbau ist überraschend gut, was aufgrund der Einfachheit

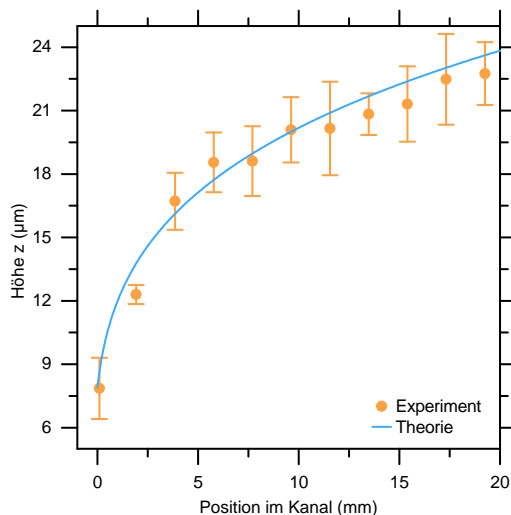


Abbildung 6.4.: Trajektorie von RBK entlang des Kanals und Vergleich mit der Theorie. Die einzelnen Punkte entsprechen den experimentell bestimmten Höhen am jeweiligen Messpunkt, während die numerisch berechnete Trajektorie als durchgehende Linie aufgetragen ist. Die Trajektorie wurde ohne jegliche Anpassung mit den Werten aus Tabelle 6.2 berechnet. Die erzielte Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment ist sehr gut.

des zugrundeliegenden Modells und der Unterschiede in den Voraussetzungen (RBK statt Vesikel, parabolisches statt lineares Flussprofil) so nicht zu erwarten war.

Weiterhin wird die Höhe der Zellen am Kanalende in Abhängigkeit vom Viskositätskontrast und der Flussrate numerisch berechnet. Die Änderung von η_{ext} führt dabei zu Viskositätskontrasten für RBK und BP von $\lambda(\eta_{\text{ext}} = 7 \text{ mPas}) = 1,43$ beziehungsweise $\lambda(\eta_{\text{ext}} = 27 \text{ mPas}) = 0,37$. Für die harten MK mit $\eta_{\text{int}} \rightarrow \infty$ gilt $\lambda \rightarrow \infty$, unabhängig von der äußeren Viskosität. Für $\lambda \rightarrow \infty$ gilt nach [120] $U(\lambda, r_1, r_2) \rightarrow 0$, weshalb MK keinen trägheitsunabhängigen Lift-Effekt erfahren [120]. Die berechneten Höhen am Kanalende sind zusammen mit den gemessenen in Tabelle 6.3 zusammengefasst.

Tabelle 6.3.: Durchschnittliche Steighöhen für RBK, BP und MK im Vergleich mit den Ergebnissen der numerischen Rechnung. Für die Rechnung wird eine Anfangshöhe aller Objekte von $\bar{z}_{x_1} = 8 \text{ µm}$ angenommen. Alle Werte sind in µm angegeben.

	\bar{z}_{RBK}		\bar{z}_{BP}		\bar{z}_{MK}	
	berechnet	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet	gemessen
$\eta_{\text{ext}} = 7 \text{ mPas}$	21,4	$20,6 \pm 0,5$	12,0	$12,5 \pm 0,7$	8	$7,2 \pm 0,8$
$\eta_{\text{ext}} = 27 \text{ mPas}$	23,8	$23,5 \pm 0,5$	12,0	$12,7 \pm 0,6$	8	$8,7 \pm 1,2$

Die Übereinstimmung der Höhen am Kanalende zwischen Experiment und Theorie ist überraschend gut. Auch die experimentell bestimmten Steighöhenunterschiede zwischen den beiden Viskositätskontrasten für RBK ($z_{\text{RBK}}^{\text{exp}} = 2,9 \mu\text{m} \pm 0,7 \mu\text{m}$) und BP ($z_{\text{BP}}^{\text{exp}} = 0,2 \mu\text{m} \pm 0,8 \mu\text{m}$) stimmen mit den theoretischen Erwartungswerten von $z_{\text{RBK}}^{\text{theo}} = 2,4 \mu\text{m}$ und $z_{\text{BP}}^{\text{theo}} = 0 \mu\text{m}$ überein. Es existiert kein Steighöhenunterschied bei BP, weil Objekte mit einer prolaten Form nach [120] im Vergleich zu oblaten Objekten sehr unempfindlich gegenüber einer Viskositätsänderung sind.

Der Vergleich von Rechnung und Experiment zeigt eindeutig, dass die von Olla für Vesikel im linearen Scherfeld hergeleitete Gleichung auch auf RBK im parabolischen Flussprofil angewandt werden kann. Dies lässt sich erklären wenn man bedenkt, dass die RBK durch ihre kleine räumliche Ausdehnung im Vergleich zum Kanalquerschnitt in guter Näherung ein lineares Scherfeld spüren. Sehr interessant ist hingegen die Tatsache, dass das Zytoskelett der RBK (vgl. Abschnitt 3.1) anscheinend keinen signifikanten Einfluss auf den trägheitsunabhängigen Lift-Effekt hat und sich das RBK im TT-Zustand in guter Näherung wie eine Vesikel verhält. Anscheinend fällt die Scherviskosität des Zytoskeletts in diesem Fall nicht ins Gewicht, weshalb diese für die Berechnung der Gesamtviskosität der Zelle vernachlässigt werden kann. Warum dem so ist, bleibt im Detail jedoch zu klären (vgl. Diskussion in Abschnitt 3.2.4).

Es sei erwähnt, dass der Einfluss der Schwerkraft auf die Höhe der Objekte am Kanalende in den vorliegenden Experimenten vernachlässigt werden kann. Eine Abschätzung mit dem Newtonschen Gesetz und Gleichung (2.11) ergibt, dass die gravitationsbedingte Sinkgeschwindigkeit im Mikrokanal für RBK um etwa vier Größenordnungen niedriger ist als die Lift-Geschwindigkeit [115] und damit unterhalb der Auflösungsgrenze des Versuchsaufbaus liegt.

Die vorgestellten Experimente und der Vergleich mit der Theorie zeigen, dass die Trennung von RBK und BP hauptsächlich durch deren unterschiedliche Größe hervorgerufen wird. Die Größen gehen kubisch in Gleichung (3.38) ein und führen zu etwa 8 - 10 μm Höhenunterschied am Ende des Kanals. Die Trennung von BP und MK basiert hingegen auf den Unterschieden in Form und Deformierbarkeit, die in der dimensionslosen Drift-Geschwindigkeit $U(\lambda, r_1, r_2)$ zusammengefasst sind. Der schwache Lift-Effekt auf Blutplättchen führt schließlich zu einem geringeren Höhenunterschied zwischen BP und MK von etwa 4 μm .

6.3. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde der trägheitsunabhängige Lift-Effekt auf rote Blutkörperchen, Blutplättchen und Mikrokugeln untersucht. Das in Abschnitt 3.4.2 vorgestellte Phänomen führt zu einer Migration der Zellen senkrecht zu den Stromlinien von der nächsten Kanalwand weg hin zur Kanalmitte. Übereinstimmend mit der theoretischen Erwartung konnte in den präsentierten Experimenten eine solche Migration nur für deformierbare Objekte (RBK und BP) beobachtet werden, nicht jedoch für harte Mikrokugeln.

In der durchgeführten Studie wurden zunächst die Einflüsse von Scherrate und Viskosität der äußeren Flüssigkeit auf die von den Zellen erreichte Höhe am Ende des Kanals untersucht.

Dabei stellte sich heraus, dass für ausreichend hohe Flussraten keine Abhängigkeit zwischen Flussrate und Steighöhe erkennbar ist. Grund hierfür ist die lineare Abhängigkeit von Lift- und Translations-Geschwindigkeit vom Volumenfluss, wodurch sich beide Effekte bei einer Flussratenveränderung kompensieren. Bei der Untersuchung des Einflusses der Viskosität der äußeren Flüssigkeit auf den trägheitsunabhängigen Lift-Effekt ergab sich, dass eine höhere äußere Viskosität (ein niedrigerer Viskositätskontrast) am Kanalende zu einer Position der Zellen führt, die gleich weit (BP) oder weiter (RBK) von der Wand weg liegt, als dies bei einer niedrigeren Viskosität der Fall ist. Ausschlaggebend für den Unterschied zwischen den verschiedenen Zellen ist hierbei ihre unterschiedliche Form. Die Beobachtungen stimmen sehr gut mit der theoretischen Betrachtung von Olla überein [120].

Um die experimentellen Werte näher mit diesem theoretischen Ansatz vergleichen zu können, wurde eine experimentell bestimmte Trajektorie entlang des Kanals mit einer nach Gleichung (6.1) numerisch berechneten verglichen (siehe Abb. 6.4). Es zeigte sich eine beeindruckende Übereinstimmung von Experiment und Theorie. Diese ist etwas überraschend, da der theoretische Ansatz für Vesikel im linearen Scherfluss hergeleitet wurde, die Experimente jedoch für RBK in einem parabolischen Geschwindigkeitsprofil durchgeführt wurden. Dies könnte zum Einen daran liegen, dass das auf die Zellen wirkende Scherfeld in erster Näherung als linear angesehen werden kann. Zum Anderen weisen die Ergebnisse aber auch darauf hin, dass die Scherviskosität des Zytoskeletts der RBK-Membran keine signifikante Rolle spielt und sie somit für die Gesamtviskosität der Zelle nicht so wichtig ist, wie andere Studien vermuten lassen [107, 111, 112, 114]. Im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführte Experimente zum trägheitsunabhängigen Lift-Effekt auf chemisch versteifte RBK kommen zu einem ähnlichen Ergebnis [196]. Dort konnte für Reagenzien, die das Spektrin-Netzwerk versteifen (Formalin, Diamid), kein Einfluss auf den Lift-Effekt gefunden werden. Auch wenn dieser Sachverhalt im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter geklärt werden kann, bedürfen speziell die Hintergründe der unterschiedlichen Gewichtungen der Membranviskosität durch unterschiedliche Messmethoden einer näheren Untersuchung.

Theorie und Experiment wurden weiterhin durch den Vergleich der gemessenen Steighöhen am Kanalende mit den numerisch berechneten Höhen für zwei unterschiedliche Viskositäten der äußeren Flüssigkeit überprüft. Für RBK zeigte sich hier erneut eine sehr gute Übereinstimmung, das heißt, dass die theoretische Beschreibung von Olla [120] auch den Einfluss des Viskositätskontrastes auf die Lift-Geschwindigkeit für RBK richtig abbildet. Auch für BP stimmen die Vorhersagen der Theorie mit den experimentellen Ergebnissen überein, wobei hier beachtet werden muss, dass für die numerische Rechnung einige (wohlbegründete) Annahmen gemacht werden mussten (z.B. zur Ausdehnung der Zellen in die Darstellungsebene hinein, Gesamtviskosität von RBKs), welche unter Umständen zu einem systematischen Fehler führen könnten.

Auch für Zellen, die gar keine TT-Bewegung vollführen (BP und insbesondere RBK im RO- oder SP-Zustand), wurde eine gute Übereinstimmung zwischen der numerischen Rechnung und dem Experiment gefunden (vgl. Messungen bei $\eta_{\text{ext}} = 7 \text{ mPa s}$ für $Q < 450 \mu\text{l/h}$). Das Modell für nicht-tank-treadende Zellen von Vlahovska *et al.* (vgl. [133] und Abschnitt 3.4.2) lässt jedoch auch für diese eine Abhängigkeit der Lift-Geschwindigkeit erwarten, die mit z^{-2} skaliert. Möglicherweise ist die Sensitivität des benutzten Setups also nicht ausreichend, um eventuelle Unterschiede zwischen den beiden Modellen aufzulösen. Auch hier bieten

sich weitere Experimente an, um mit noch genaueren Messdaten einen Abgleich zu beiden Theorien herzustellen. Durch einen solchen Abgleich von Theorie und Experiment könnte der hier vorgestellte Effekt schließlich auch zur Charakterisierung der Deformation von Zellen eingesetzt werden. Dies wäre, im Vergleich zu optischen Pinzetten oder Mikropipetten unter physiologisch relevanten Bedingungen und mit hohem Probendurchsatz möglich [115].

Die Ergebnisse von Experiment und numerischer Rechnung zeigten übereinstimmend einen deutlichen Steighöhenunterschied von etwa 8 - 10 μm zwischen RBK und BP, der maßgeblich auf den Unterschied in der Zellgröße zurückgeführt werden konnte. Eine geringere Auswirkung auf den trägheitsunabhängigen Lift-Effekt hat hingegen die Änderung von Form und Deformierbarkeit [120]. Trotzdem ließ sich diese durch den Vergleich von BP und MK nachweisen und es zeigte sich ein dadurch hervorgerufener Steighöhenunterschied von etwa 4 μm .

Diese Unterschiede sind auch von physiologischer Bedeutung: So ist ein unterschiedlich starker Lift-Effekt zum Beispiel eine wichtige Voraussetzung für den Marginations-Effekt in Strömungen mit hohem Hämatokrit. Als Margination bezeichnet man hier die Verdrängung von WBK [197, 198] oder BP [199, 200] durch RBK an den Kanalrand. Dies geschieht durch eine Vielzahl hydrodynamischer Wechselwirkungen zwischen den RBK und den anderen Blutzellen. Die Stärke des Marginationseffektes hängt dabei vom Unterschied im trägheitsunabhängigen Lift-Effekt zwischen RBK und WBK beziehungsweise RBK und BP ab. Im Fall von RBK und BP drängen die RBK stärker zur Kanalmitte als die BP. Je näher am Kanalzentrum, desto höher ist schließlich die Flussgeschwindigkeit, weshalb schließlich mehr RBK „von innen“ mit BP über Stöße wechselwirken als „von außen“, was im Mittel zu einer Verdrängung der BP in Richtung Kanalwand führt. Dies ist auch vom physiologischen Standpunkt aus sinnvoll, da Blutplättchen im Falle einer Gefäßverletzung zum Wundverschluss nahe an der Gefäßwand benötigt werden.

In vitro ist es naheliegend, die Steighöhenunterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen zur Zellsortierung zu verwenden. Um dieses Prinzip zu demonstrieren, wird der Mikrokanal hinter x_2 um eine einfache Gabelung erweitert und die zwei Auslässe an je ein Höhenreservoir angeschlossen (vgl. Abb. 4.3). Die Überlagerung mehrerer mikroskopischer Aufnahmen in Abb. 6.5 demonstriert schließlich eine erfolgreiche Trennung von RBK und BP am Ende des Kanals.

Die Einfachheit des Aufbaus und die Robustheit der Steighöhenunterschiede gegenüber unterschiedlicher Flussraten machen die Methode der Sortierung von Zellen mittels des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes (*Non-Inertial Lift Induced Cell Sorting*, NILICS) zu einem vielversprechenden Ansatz für die Integration in Lab-on-a-Chip-Systeme. Das Potential der Methode für die Trennung biologisch und medizinisch relevanter Zellen wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit anhand zirkulierender Tumorzellen und Malaria-infizierter RBK untersucht.

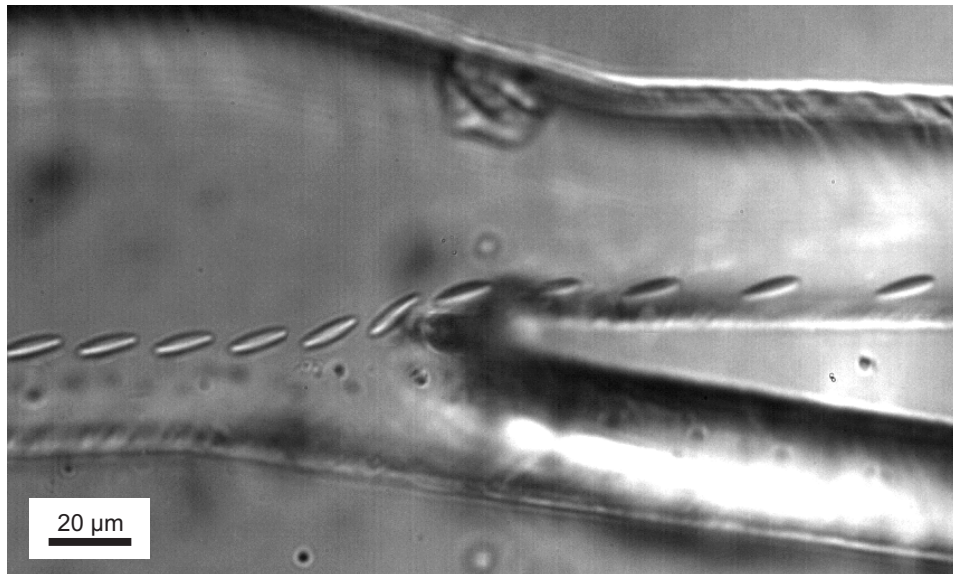


Abbildung 6.5.: Sortierung von RBK und BP am Ende des Mikrokanals. Nach der Trennung der Zellen kann ihre unterschiedliche Höhenposition zur Sortierung der RBK in den oberen und der BP in den unteren Kanal genutzt werden. Die Abbildung zeigt eine Überlagerung von elf aufeinanderfolgenden Mikroskopbildern mit einem Zeitabstand von je einer Millisekunde (Abb. aus eigener Publikation [115]).

7. Anwendung des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes zur Sortierung zirkulierender Tumorzellen

Man kann die Welt mit einem p-Auge und einem q-Auge ansehen, aber wenn man beide Augen zugleich aufmachen will, dann wird man irre.

(Wolfgang Pauli in einem Brief an Werner Heisenberg, 1926)

Im vorigen Kapitel wurde gezeigt, dass der trägheitsunabhängige Lift-Effekt zur Trennung von Zellen nach Größe und Deformierbarkeit verwendet werden kann. Eine medizinisch relevante und außerdem hochaktuelle Anwendung für dieses Verfahren ist die Anreicherung zirkulierender Tumorzellen aus Blutproben zu diagnostischen Zwecken und zur Untersuchung des Metastasierungsprozesses. Nach einer Einführung in das Thema „Krebs und Metastasierung“ folgt ein Überblick über vorhandene mikrofluidische Methoden zur Trennung zirkulierender Tumorzellen. In Hinblick auf die Anwendung von NILICS liegt der Fokus des Überblicks auf passiven, label-freien Methoden. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten NILICS-Methode und der damit durchgeführten Trennversuche werden schließlich einzeln und im Vergleich zu den bereits vorhandenen passiven und label-freien mikrofluidischen Methoden bewertet.

7.1. Biologische Grundlagen: Krebs, zirkulierende Tumorzellen und Metastasierung

Der Ausdruck „Krebs“ (auch „bösartige Tumoren“ oder „Neoplasien“) ist der Überbegriff für eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen [201]. Als Hauptmerkmal haben sie die Mutation des genetischen Materials einzelner Zellen gemein, die zu schneller Vermehrung und Ausbreitung auf umliegendes Gewebe führen [201, 202].

Mit über 8,2 Millionen Toten und etwa 14 Millionen Neuerkrankungen im Jahr 2012 gehört Krebs zu den führenden Invaliditäts- beziehungsweise Todesursachen weltweit. Prognosen zufolge wird die Anzahl der Neuerkrankungen in den kommenden zwei Jahrzehnten um etwa 70% steigen [201, 203]. Der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge sind dabei etwa ein Drittel der Erkrankungen auf nachteilige Verhaltens- beziehungsweise Ernährungsgewohnheiten zurückzuführen [201] und die meisten Todesfälle auf die Bildung von Metastasen. Metastasen wiederum sind kleine, über den Körper verteilte Tumoren, die ihren Ursprung im sogenannten Primärtumor haben [204, 205].

Obwohl er für die Sterblichkeit bei Krebserkrankungen eine so zentrale Rolle spielt, ist der Prozess der Metastasierung bis heute nicht zufriedenstellend erforscht [205–207]. Als sicher gilt, dass die Bildung von Metastasen ein mehrstufiger Prozess ist [205]. Er ist in Abb. 7.1 schematisch dargestellt und beginnt bereits in frühen Entwicklungsstadien des Primärtumors, in denen erste Zellen an den Blut- und den Lymphkreislauf abgegeben werden (Disseminierung und Intravasation) [204, 206–208]. Es ist noch ungeklärt, ob es sich dabei um Tumorstammzellen (engl. *cancer stem cells*, CSC) oder differenzierte Zellen nach einem epithelial-mesenchymal Übergang (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) handelt [204, 207]. Beim EMT verlieren die ausdifferenzierten Epithelzellen ihre epithelialen Eigenschaften wie etwa das Adhäsionsmolekül E-Cadherin, was ihnen eine gewisse Mobilität verleiht und zu CSC-ähnlichen Zellen macht, wodurch ihre Möglichkeiten zur Zirkulation im Blut- oder Lymphkreislauf verbessert werden [206, 207]. CSCs und CSC-ähnliche Zellen sind widerstandsfähiger als normale ausdifferenzierte Zellen. Durch ihre Flexibilität besitzen sie ein erhöhtes Potential dazu, Keimzellen für neue Tumore beziehungsweise Metastasen zu sein [207].

Sofern die Zellen die Intravasation und den damit verbundenen Wechsel ihres Umfeldes überleben, landen sie im Lymphkreislauf, zumeist in den am nächsten liegenden Lymphknoten, die für sie eine Sackgasse darstellen [207]. Dort bilden sich Metastasen aus, von denen wiederum Zellen an den Blutkreislauf abgegeben werden können [209]. Letzterer spielt eine zentrale Rolle beim Transport der Tumorzellen in weiter entfernte Organe und Körperteile [202, 205, 207]. Tumorzellen im Blutkreislauf werden zirkulierende Tumorzellen (engl. *circulating tumor cells*, CTCs) genannt. Ihre Rolle innerhalb des Metastasierungsprozesses ist zwar allgemein anerkannt, konnte aber bisher nicht eindeutig belegt werden [204, 210]. Es wird angenommen, dass CTCs im Blutkreislauf zirkulieren, aufgrund ihrer Größe irgendwann in kleinen Kapillaren hängen bleiben und in das umgebende Gewebe eindringen (dt. Paravasation, engl. *extravasation*) [205, 207]. Sofern die Anpassung an das neue Umgebungsgewebe erfolgreich verläuft, können die Zellen entweder in einen Ruhezustand übergehen, in dem Zellteilung und Apoptose im Gleichgewicht vorliegen, oder sie proliferieren und beginnen so die Bildung eines makroskopischen Sekundärtumors (engl. *colonization*) [204, 205, 207]. Der Metastasierungsprozess ist zur besseren Vorstellung in Abb. 7.1 grafisch dargestellt.

Nicht nur weil ihre tatsächliche Rolle beim Prozess der Metastasierung noch nicht im Detail geklärt ist, erfreuen sich CTCs großen Interesses. Ergebnisse zahlreicher Studien geben Grund zur Hoffnung, dass sie als eine Art „flüssige Biopsie“ (engl. *liquid biopsy*) dienen und die hochinvasive Biopsie des Primärtumors ersparen [204, 211–213] beziehungsweise wertvolle Zusatzinformationen über die metastasierenden Zellen liefern könnten [208, 214]. Dies ist wichtig, da die Zellen sich auf ihrem Weg durch den Körper verändern und es zu einer ausgeprägten Heterogenität zwischen dem Primärtumor und den Metastasen beziehungsweise auch unter den Metastasen selbst kommen kann, die durch eine Biopsie des Primärtumors alleine nicht abgebildet werden kann [208, 214].

Weiterhin konnte schon gezeigt werden, dass die Anzahl an CTCs im Blut mit der Aggressivität der Erkrankung, dem Ausmaß der Metastasierung, dem Krankheitsfortschritt, der Zeitdauer bis zu einem eventuellen Rückfall und den Überlebenschancen beziehungsweise der Überlebensdauer korreliert [204, 211–213]. Damit können durch die Auszählung von

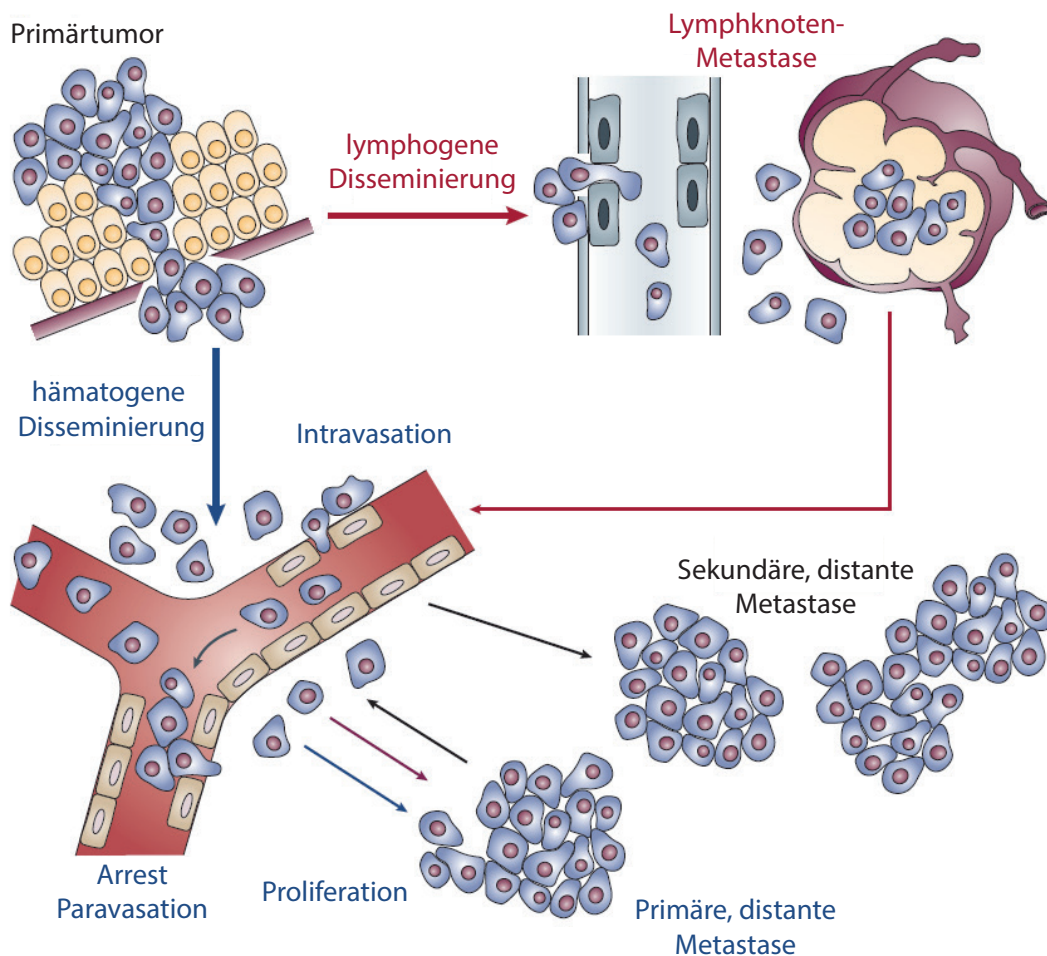


Abbildung 7.1.: Der Prozess der Metastasierung. Tumorzellen werden vom Primärtumor direkt oder über das lymphatische System an den Blutkreislauf abgegeben (Disseminierung und Intravasation). Im Blutkreislauf bleiben sie aufgrund ihrer Größe in kleineren Kapillaren hängen (Arrest) und gelangen zurück ins Gewebe (Paravasation). Dort sterben sie ab, gehen in einen Ruhezustand über, in dem ein Gleichgewicht aus Zellteilung (Proliferation) und Apoptose vorliegt, oder es bilden sich makroskopische Metastasen aus weil die Proliferation die Apoptose überwiegt. Diese Metastasen können wiederum Ursprung für weitere, sekundäre Metastasen sein (Abb. modifiziert aus [209], mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group, ©NPG 2004).

CTCs in Echtzeit Aussagen über die Wirksamkeit von Therapien gemacht werden und das sogar, wenn keine makroskopischen Metastasen nachgewiesen werden können [204]. Eine solch minimalinvasive Diagnosemethode, für die es lediglich der Entnahme einer geringen Menge peripheren Blutes bedarf, könnte die individuelle Therapie und somit das gesamte Krebsmanagement revolutionieren, indem sie eine bessere Früherkennung, Vorsorge und Echtzeitüberwachung von Therapien sowie des Krankheitsverlaufes ermöglichen würde [208].

Der erste (kritische) Schritt für die Untersuchung von CTCs ist allerdings deren Isolierung aus Blutproben. Ihre ursprüngliche Konzentration von etwa 1 - 100 Zellen pro Milliliter Blut [215] ist nämlich im Vergleich zu normalen Blutzellen (ca. 6 Milliarden pro Milliliter) so gering, dass eine Analyse nahezu unmöglich ist. Um sie reproduzierbar zählen oder genetisch untersuchen zu können, müssen also zunächst die störenden Blutzellen aussortiert werden, um möglichst viele CTCs mit möglichst wenigen anderen Zellen zu erhalten. Bedenkt man das Ziel, CTCs als flüssige Biopsie zu nutzen, muss eine solche Methode zur Anreicherung automatisierbar sein und auch mit kleinen Probenmengen zurechtkommen. Dies macht sogenannte Labore-auf-einem-Chip zu interessanten Kandidaten für die Anreicherung zirkulierender Tumorzellen aus Blutproben.

7.2. Überblick: Mikrofluidische Methoden zur Zelltrennung

7.2.1. Motivation: Der Weg zum Labor-auf-einem-Chip

Am Anfang des Computerzeitalters standen turnhallengroße Apparaturen, die einfache logische Operationen ausführen konnten. Über die Jahrzehnte hinweg wurden die Geräte schließlich immer kleiner und leistungsfähiger, bis hin zu den heute gängigen Smartphones und Tablet-PCs. Um diese Miniaturisierung umsetzen zu können, mussten die einzelnen Bauteile der Computer verkleinert, neue Fabrikationsmethoden entwickelt und Probleme wie z.B. die starke Hitzeentwicklung gelöst werden. Noch vor wenigen Jahrzehnten galt dabei das, was winzige Computer inzwischen leisten, als Science Fiction. So sind z.B. die „Kommunikatoren“ aus den Star Trek-Serien längst Realität geworden.

Ein ebenfalls gängiges Instrument der Star Trek-Besatzungen sind die medizinischen Untersuchungsgeräte. Zu Beginn noch handtaschengroß, später im Kugelschreiberformat in Umlauf, können diese Geräte nahezu beliebige medizinische Analysen durchführen und so z.B. Krankheitserreger in Sekundenschnelle identifizieren. Die tatsächliche Arbeit der Ärzte beschränkt sich dabei größtenteils auf Probennahme beziehungsweise die Injektion von Medikamenten. Im Gegensatz zu den Kommunikatoren, die durch die mobile Telefonie bereits weit verbreitet sind, ist die Vision der medizinischen Echtzeit-Diagnostik mit kleinen, automatisierten Geräten immer noch Zukunftsmusik. An ihrer Realisierung wird jedoch unter anderem mithilfe mikrofluidischer Methoden unter Hochdruck gearbeitet. Die Miniaturisierung alltäglicher Laborprozesse auf einen kleinen Chip und deren Integration in nur wenige Zentimeter große Analysesysteme sind gemeint, wenn man von einem *Lab-on-a-Chip* (Labor-auf-einem-Chip, LOC) oder von *Micro-Total-Analysis-Systems* (μ TAS) spricht.

Durch eine solche Miniaturisierung und Integration von Laborroutinen in Mikrosysteme verringert sich der Bedarf an Platz, Verbrauchsmitteln und Probenvolumen, die Analysezeiten

sinken drastisch und es wird kein speziell geschultes Personal zur Bedienung der Geräte mehr benötigt [26]. Dies ermöglicht Analysen am Patienten (*Point-of-Care Diagnostics*) und die Ergebnisse liegen noch während der Untersuchung vor, wodurch sie zur Diagnose beitragen können, statt dass wie bisher die Probe in ein externes Labor transportiert werden muss und die Ergebnisse erst 1-2 Tage später vorliegen. Die genannten Verbesserungen bringen Einsparungen von Zeit und Kosten beim ärztlichen Personal, beim Laborpersonal und nicht zuletzt beim Patienten, der z.B. keinen Extratermin mehr für die Besprechung von Laborergebnissen braucht. Für den Patienten sind eine bessere Behandlung und eine einfachere und zuverlässigere Früherkennung von Krankheiten einige weitere Vorteile. Auch unter volkswirtschaftlichen Gesichtspunkten sind diese Einsparungen von Behandlungskosten und die schnellere Gesundung nicht zu vernachlässigen, da die Gesundheitskosten für unsere alternde Bevölkerung stetig wachsen werden. So muss z.B. in den nächsten Jahren mit deutlich steigenden Kosten für Behandlung, Produktivitätsausfälle und Krankheitstagen bei Krebspatienten gerechnet werden [216, 217]. Diese Entwicklung kann durch die Etablierung neuer, effizienterer Analysemethoden zumindest gebremst werden.

Schon jetzt erliegen etwa 70% der Krebspatienten ihrem Leiden in den Entwicklungsländern in Afrika, Asien sowie Zentral- und Südamerika, in denen die medizinische Versorgung schlecht und die finanziellen Mittel vergleichsweise gering sind [201]. Effiziente und kostengünstige Medizinprodukte, die ohne gut ausgebaute Infrastruktur funktionieren, könnten hier neue Möglichkeiten für die betroffenen Gesellschaften schaffen [218]. In abgelegenen Gebieten wird eine ordentliche und wirtschaftliche medizinische Versorgung auch in Zukunft nur mit günstigen (Einweg-) *Stand-Alone*-Geräten zu realisieren sein. Auf der Entwicklung von LOC-Systemen und μ TAS ruht die Hoffnung, dass sie diese Rolle übernehmen und so zur Verbesserung der globalen Gesundheitsversorgung beitragen können [218].

Ein schönes Beispiel, an dem sich die Vorteile eines LOC-Systems demonstrieren lassen, ist das von Easley *et al.* entwickelte System zur genetischen Analyse [38]. Es kann den Erreger des Keuchhustens (*bordetella pertussis*) in einem nasalen Punktat in weniger als 24 Minuten nachweisen, ohne dabei auf besondere externe Geräte angewiesen zu sein [38]. Dies ist eine signifikante Verbesserung im Vergleich zu den Analysezeiten molekularer (2 Stunden), serologischer (24 Stunden) und kulturbasierter (48 Stunden) Nachweismethoden, die in entsprechend gut ausgestatteten Labors durchgeführt werden müssen [38].

Bisher noch hauptsächlich in der Grundlagenforschung angewandt, bietet die Mikrofluidik auch neue Möglichkeiten für die Untersuchung der Eigenschaften einzelner Zellen [219] oder von Blutproben mitsamt ihrer zellulären Bestandteile [220]. Vor allem für die Analyse von Blutproben müssen die Zellen sortiert werden, um einheitliche Proben zur weiteren Untersuchung zu erhalten. Nachfolgend werden nun zunächst Parameter zur Charakterisierung der Leistung von Zelltrennsystemen eingeführt. Das Kapitel gibt weiterhin einen Überblick über verschiedene, bereits existierende Methoden zur Zelltrennung, bevor auf die Anreicherung zirkulierender Tumorzellen aus Blutproben mittels NILICS eingegangen wird. In den Versuchen wird die Sortierleistung des Systems in einer breit angelegten Parameterstudie untersucht und abschließend mit anderen Methoden verglichen.

Mit der Thematik der Zelltrennung und der Zellcharakterisierung befassen sich zahlreiche Übersichtsartikel [221–229], auf die hiermit für eine ausführlichere und detailliertere Darstellung verwiesen sei, als sie der folgende, zusammenfassende Abschnitt bietet.

7.2.2. Charakterisierung von Zelltrennsystemen

Die Leistung eines Zelltrennsystems kann mit den Parametern Sortiereffizienz, Probenreinheit, Anreicherungsfaktor und Probendurchsatz vollständig beurteilt werden [230]. Die Sortiereffizienz E beschreibt, wie viele der in das System injizierten Zielzellen richtig sortiert werden (n_{true}). Sie berechnet sich mit der Gesamtzahl der injizierten Zellen n_{ges} zu

$$E = \frac{n_{\text{true}}}{n_{\text{ges}}} \cdot 100\% \quad . \quad (7.1)$$

Die richtig sortierten Zielzellen werden zumeist von fehlsortierten Zellen der zweiten Zellart verunreinigt. Als Maß für diese Verunreinigung wird die Probenreinheit P verwendet, die den Anteil der Zielzellen n_{true} an den insgesamt im Auffangbehälter gesammelten Zellen angibt. Dies entspricht der Konzentration der Zielzellen, welche mit der Anzahl der die Zielzellen kontaminierenden Zellen n_{con} durch

$$P = \frac{n_{\text{true}}}{(n_{\text{true}} + n_{\text{con}})} \cdot 100\% \quad (7.2)$$

gegeben ist.

Die Veränderung der Konzentration der Zielzellen zwischen der sortierten Probe und der ursprünglich injizierten Probe beschreibt der Anreicherungsfaktor A . Er setzt sich aus den Probenreinheiten vor und nach der Sortierung zusammen zu

$$A = \frac{P_{\text{sortiert}}}{P_{\text{injiziert}}} \quad (7.3)$$

und kann für niedrige Konzentrationen der Zielzellen in sehr guter Näherung als Änderung der Verhältnisse zwischen Zielzellen und kontaminierenden Zellen

$$A \approx \frac{\left(\frac{n_{\text{ziel}}}{n_{\text{con}}}\right)_{\text{sortiert}}}{\left(\frac{n_{\text{ziel}}}{n_{\text{con}}}\right)_{\text{injiziert}}} \quad (7.4)$$

bestimmt werden.

Als Probendurchsatz (engl. *throughput*) wird schließlich die Anzahl der Zellen bezeichnet, die pro Zeiteinheit sortiert werden. Gängigerweise wird er in Zellen oder in Probenvolumen pro Zeiteinheit angegeben.

Je nach Zielsetzung der Sortierung muss die Relevanz der einzelnen Parameter bei der Beurteilung eines Systems gewichtet werden. So kann z.B. eine hohe Sortiereffizienz gleichzeitig eine sehr niedrige Probenreinheit zur Folge haben und umgekehrt. Bei anderen Anwendungen ist es wiederum wichtig, bestimmte Probenvolumina in möglichst kurzer Zeit zu prozessieren, um Veränderungen der Probe z.B. durch Alterungsprozesse zu verhindern. Hier kommt dem Probendurchsatz unter Umständen eine größere Bedeutung zu als z.B. der Probenreinheit. Generell ist es natürlich erstrebenswert, für alle Parameter gleichzeitig gute Werte zu erzielen.

7.2.3. Aktive, label-basierte Trennmethode

Methoden zur Trennung von Objekten wie z.B. Zellen können prinzipiell in aktive und passive Ansätze unterteilt werden. Bei aktiven Methoden wird die Trennung der Objekte durch extern erzeugte Kraftfelder hervorgerufen, während dies bei passiven Methoden lediglich über Wechselwirkungen der Zellen mit der Kanalstruktur oder der Flüssigkeit geschieht. Beispiele für aktive Trennmethode sind die Trennung mittels akustischer Oberflächenwellen [231–237], dielektrophoretischer [238–241] oder magnetischer Kräfte [242–244].

Für viele aktive Methoden müssen die zu sortierenden Objekte erst markiert werden, um sie sortieren zu können. So werden zur Sortierung z.B. über Antikörper-Antigenbindungen magnetische Kügelchen an die Zielzellen gebunden [242, 243]. Voraussetzung für ein solches Vorgehen ist die Verfügbarkeit eines bekannten Antikörper-Antigenpärchens für die Zielzellen, das keine unerwünschten Zellen markiert. Weitverbreitet ist auch die Markierung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen [235–237, 245]. Hierbei können entweder fluoreszierende Kügelchen an die Zellen gebunden oder ein Farbstoff zugesetzt werden, der nur bestimmte Zellen färbt. Für letztere Methode gibt es z.B. Farbstoffe die erst nach einer Reaktion in lebenden Zellen leuchten und somit eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen ermöglichen. Andere Farbstoffe färben wiederum die DNA von Zellen an, wodurch z.B. Zellen mit Zellkern von RBK getrennt werden können.

Eine Markierung der Zellen stellt auf der einen Seite einen großen Vorteil für die Trennmethode dar, da sie exakt auf die Markierung eingestellt werden kann, was zu sehr guten Sortierleistungen führt. Auf der anderen Seite werden die Zellen durch die Markierung aber modifiziert, was die Ergebnisse anschließender Analysen möglicherweise beeinträchtigt. Außerdem kann es Zellen geben, die aus irgendeinem unerwarteten Grund nicht markiert und folglich nicht sortiert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Sortierung zirkulierender Tumorzellen über einen Antikörper-Antigenansatz, der darauf basiert, dass die CTCs für Epithelzellen typische Oberflächenmarker offenbaren. Nach einem EMT oder bei zirkulierenden Krebsstammzellen sind diese jedoch nicht mehr vorhanden, wodurch diese nicht aussortiert werden. So können unter Umständen ganze Subpopulationen der Zielzellen verfehlt werden.

Aktive Methoden, bei denen die Zellen nicht separat markiert werden, stellen eine interessante Alternative dar. Beispielsweise können Teilchen mit akustischen Oberflächenwellen nach Größe [233] oder mit elektrischen Feldern nach ihren dielektrischen Eigenschaften [238] voneinander getrennt werden. Dadurch können auch Subpopulationen sortiert werden, die von gängigen, label-basierten Methoden nicht erfasst werden. Nichtsdestotrotz benötigt man zur Erzeugung der externen Kraftfelder Peripheriegeräte oder zusätzliche Komponenten auf dem Chip, was die Aufbauten schnell kompliziert machen kann. Methoden, die ohne solche Kraftfelder auskommen, sind deshalb von großem Interesse für die Integration in LOC-Systeme oder μ TAS.

7.2.4. Passive, label-freie Trennmethode mit Fokus auf der Anreicherung zirkulierender Tumorzellen

CTCs unterscheiden sich von den sie umgebenden Blutzellen durch ihre physikalischen (Größe, Dichte, elektrische Ladung, Deformierbarkeit) und biologischen (z.B. Oberflächen-

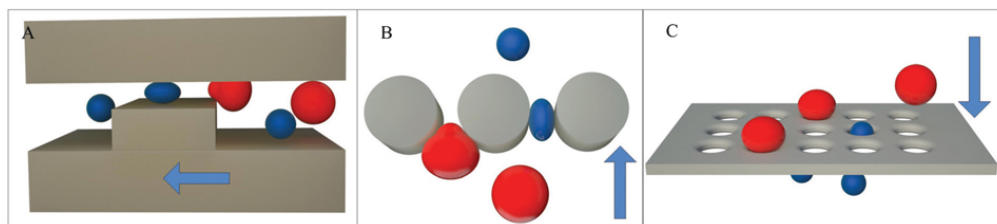


Abbildung 7.2.: Schematische Darstellung der Mikrofiltrationsmechanismen: (A) Dämme, (B) Säulen und (C) Poren (Abb. aus [247], mit freundlicher Genehmigung von The Royal Society of Chemistry, ©RSC 2014).

proteine) Eigenschaften [208]. Letztere werden zur label-basierten Trennung herangezogen, bei der aber, wie eben dargestellt, unter Umständen ganze Subpopulationen der Zielzellen verfehlt werden können [207]. Eine Alternative bietet die passive, label-freie Trennung, welche ausschließlich auf den physikalischen Unterschieden in Größe, Form und Deformierbarkeit der Zellen basiert. Die treibenden Kräfte werden dabei aus dem Wechselspiel der Objekte mit dem Flussfeld oder mit Kanalstrukturen erzeugt. Je nach Sensitivität der Methode können so auch unerwartet auftretende Zellen aussortiert werden, solange sie sich physikalisch von den sie umgebenden Zellen unterscheiden.

Einen guten Überblick über label-freie Sortiermethoden geben [246, 247]. Der Abschnitt zur Trennung mittels „Inertial Microfluidics“ und Sekundärflüssen hält sich größtenteils an die Darstellung der eigenen Veröffentlichung [15]. Weitere interessante Übersichtsartikel zur Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen mit verschiedensten mikrofluidischen Methoden, auch aktiven, geben [230, 248–251].

Mikrofiltration

Filtration ist die wohl intuitivste Methode zur Trennung von Zellen nach Größe und Deformierbarkeit und den meisten aus frühkindlichen Alltagserfahrungen im Sandkasten bekannt. Als Mikrofiltration wird ein Prozess bezeichnet, bei dem Zellgemische durch eine Matrix mikroskopischer Verengungen gezwungen werden, um die Zielzellen von den Hintergrundzellen zu trennen [247]. Wie in Abb. 7.2 gezeigt, können Filtrationsstrukturen je nach ihrer grundlegenden Geometrie in drei Kategorien eingeordnet werden: Dämme, Säulen und Poren. Durch Dämme wird der Kanalquerschnitt plötzlich verringert, durch die gezielte Anordnung von Säulen werden etwas anders geartete Verengungen erzeugt, in denen die Zielzellen hängen bleiben und die Trennung mittels Poren erfolgt gängigerweise mittels einer Membran. Die wichtigsten experimentellen Parameter der Mikrofiltrationsmethoden sind die Größe der Öffnungen und die angelegte Flussrate [247].

Einen verbreiteten, auf Poren basierenden, Ansatz zur Isolation von CTCs entwickelten Vona *et al.* und nannten ihn „Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells“, kurz ISET [252]. Der Ansatz wurde von mehreren Gruppen aufgegriffen und optimiert, unter anderem durch die Verwendung neuer Membranmaterialien zur exakteren Einstellung der Porengröße. Zuletzt wurde anhand von Mikrosieben aus Silizium auch der Einfluss der Deformierbarkeit

auf die Zelltrennung untersucht und die Sortierung von MCF-7- (Brustkrebs) und HEPG2- (Leberkarzinom) Krebszellen aus Vollblutproben mit einer Sortiereffizienz von etwa 80% demonstriert [246, 253].

Ein Beispiel für größenbasierte Mikrofiltration mittels einer Säulenstruktur wurde von Mohamed *et al.* umgesetzt [254]. Die Methode wird bezüglich der verwendeten Flussraten und Strukturen ausführlich charakterisiert, jedoch werden keine genaueren Angaben zur Sortierleistung gemacht [246, 254, 255].

Die Zellen müssen bei beiden Methoden nach der Trennung erst wieder aus dem Filter gespült werden, bevor sie für weitere Analysen zur Verfügung stehen. Außerdem haben Mikrofilter allgemein den Nachteil, dass die, wie auch immer gearteten Verengungen durch die darin hängen bleibenden Zellen verstopfen, was Schwankungen im Flussfeld und der Sortierleistung zur Folge hat.

Deterministic Lateral Displacement

Deterministic Lateral Displacement, kurz DLD, ist eine zur einfachen Filtration alternative Methode, bei der Zellen oberhalb einer gewissen Größe durch Wechselwirkungen mit Säulen lateral zu den Stromlinien des Flusses abgelenkt werden. Unterhalb dieser kritischen Größe erfahren die Zellen keine laterale Ablenkung und können das Gitter nahezu unbeeinflusst passieren. DLD vermindert die Gefahr der Kanalverstopfung im Vergleich zur Filtration deutlich und kann bei sehr hohem Probendurchsatz gute Sortiereffizienzen von bis zu 85% erreichen [256, 257]. DLD-Systeme können außerdem kontinuierlich betrieben werden, weil die Zielzellen nicht in einer Matrix hängen bleiben, aus der sie wieder ausgespült werden müssen [256, 257]. Größter Nachteil des Ansatzes ist, dass die Säulenordnung für bestimmte Zellgrößen ausgelegt sein muss und nicht beliebige, verschieden große Zellen voneinander getrennt werden können. Bei der Berechnung der kritischen Größe muss außerdem die Deformierbarkeit der Zellen berücksichtigt werden, da eine Verformung der Zellen an den Säulen einen Einfluss auf ihre effektive Größe hat.

Inertial Microfluidics

Inertial Microfluidics, auf Trägheitseffekten basierende, mikrofluidische Systeme, wurden erstmals von di Carlo *et al.* zur Zelltrennung verwendet [56]. In ihrer wegweisenden Veröffentlichung zeigten sie, dass im laminaren Flussregime für $Re \geq 1$ die Trägheit der Flüssigkeit zu Ordnungseffekten führt, die zur Trennung von Objekten verwendet werden können (vgl. Abschnitt 3.4.1) [56]. Die der Trennung zugrunde liegenden Kräfte sind die von Segré & Silberberg beschriebenen, trägheitsbedingten Lift-Kräfte [22] und, in gekrümmten Kanälen, durch Trägheitseffekte der Flüssigkeit hervorgerufene Sekundärflüsse (Dean-Fluss) [258]. Viele Arbeitsgruppen griffen die Idee der Zelltrennung mittels trägheitsbedingter Effekte auf, wodurch zahlreiche unterschiedliche Ansätze entwickelt wurden, die sich nicht nur in ihrer Geometrie, sondern auch in den jeweils ausgenutzten Phänomenen unterscheiden.

Gerade Kanäle Gerade Kanäle sind die wohl einfachste Umsetzung der Zelltrennung mittels des trägheitsbedingten Lift-Effekts. Letzterer führt in geraden Kanäle zur Fokussierung

der Zellen an bestimmten Positionen [259], die zur Verbesserung einer anschließenden Flusszytometrie-Messung [260], aber auch zur Anreicherung von Zellen [261] genutzt werden kann.

Eine der neuesten Entwicklungen kann durch die Modulation des Kanalquerschnittes Mikropartikel mit einer Sortiereffizienz von bis zu $E = 99\%$ und einer Probenreinheit von $P \geq 90\%$ sortieren. Sie wurde von Zhou *et al.* zusammen mit einer theoretischen Beschreibung des Separationsprozesses präsentiert [262]. In weiteren Experimenten zeigten Zhou *et al.*, dass ihr System auch Krebszellen aus verdünnten Blutproben sortieren kann, ohne jedoch die Sortierleistung quantitativ zu analysieren.

Methoden, die trägheitsbedingte Kräfte in geraden Kanälen ausnutzen, sind im Allgemeinen auf Zellkonzentrationen von $\text{Hct} \leq 1\text{-}2\%$ beschränkt, da bei höheren Konzentrationen Zell-Zell-Wechselwirkungen die Separation stark beeinträchtigen [262, 263].

Gerade Kanäle mit seitlichen Aussparungen Gerade Kanäle mit seitlichen Aussparungen sind eine Weiterentwicklung der einfachen geraden Kanäle. Ziel dieser Modifikation ist es, neben einer besseren Zelltrennung, vor allem die Verwendung höherer Zellkonzentrationen in den Probenlösungen zu ermöglichen. Die Aussparungen können dabei zwei unterschiedlichen Zwecken dienen: (i) dem Auffangen der Zielzellen [264] oder (ii) einer Verstärkung der Zell-Fokussierung [265–267].

Die grundlegende Idee beider Ansätze ist es, plötzliche Verbreiterungen in den Kanal einzubauen, um die unterschiedliche Abhängigkeit der trägheitsbedingten Lift-Kräfte vom Wandabstand zu nutzen. Passieren die Zellen eine Aussparung, fällt die wand-induzierte ($F_{LW} \propto z^{-4}$) deutlich stärker ab, als die vom Schergradienten induzierte Kraft ($F_{LS} \propto z^{-1}$), was zu einer verstärkten Migration der Zellen in Richtung Wand führt. Da die Stärke von F_{LS} wiederum stark von der Zellgröße abhängt ($F_{LS} \propto a^3$), bewegen sich größere Zellen schneller zur Wand hin als kleinere, bis die Aussparung endet und die Zellen wieder eine verstärkte wand-induzierte Kraft erfahren.

Einige Ansätze folgen dem oben genannten Prinzip (i) und nutzen die sich in den Aussparungen bildenden, laminaren Wirbel [268, 269], um die Zellen in den Aussparungen einzufangen [264, 270]. In einem zweiten Schritt wird die Flussrate dann erniedrigt, wodurch die Wirbel verschwinden, die Zellen aus dem Kanal herausgespült und zur weiteren Analyse gesammelt werden [264, 270]. Eine erste experimentelle Umsetzung dieses Ansatzes präsentierten Hur *et al.* [270]. Sie sammelten Zellen der HeLa-Linie in den Aussparungen und erreichten bei Verwendung einer Probenlösung mit $\text{Hct} = 1\%$ hohe Probenreinheiten bei gleichzeitig relativ niedrigen Sortiereffizienzen ($P = 85\%$, $E = 43\%$). Eine theoretische Charakterisierung dieses Ansatzes führten Zhou *et al.* durch. Sie untersuchten die Auswirkungen des exakten Kanaldesigns und der experimentellen Parameter [271] auf die Leistung der Technik.

Den aktuellen Stand der Technik dieses Ansatzes dokumentierten schließlich Sollier *et al.* in ihrer Veröffentlichung zur Optimierung der Trennung mit einer umfangreichen Parameterstudie [264]. Sie bestückten den geraden Kanal mit sich symmetrisch gegenüberliegenden Aussparungen und erreichen damit sehr hohe Probenreinheiten von $80\% < P < 100\%$ mit einem sehr hohen Probendurchsatz, welcher der Prozessierung einer klinisch relevanten Blut-

probe mit einem Volumen von 7,5 ml in 20 Minuten entspricht [264]. Limitierender Faktor des Systems ist die niedrige Sortiereffizienz von $E = (34,5 \pm 7,5)\%$ (für MCF-7-Zellen bei $Hct \approx 1\%$), die für höhere Hämatokritwerte bis auf $E = (10 \pm 5)\%$ (bei $Hct = 10\%$) fällt. Die Parameterstudie zeigt weiterhin, dass es für verschieden große oder unterschiedlich deformierbare Zellen auch unterschiedlicher Flussraten für eine optimale Trennung bedarf und dass die Zellen umso schlechter sortiert werden, je kleiner und deformierbarer sie sind [264]. Dies ist nachteilig für die Anwendung zur Sortierung von CTCs, da invasivere CTCs im Regelfall deformierbarer sind als harmlosere CTCs [204, 207, 247, 272, 273] und zudem vermutet wird, dass *in vivo* CTCs deformierbarer sind als die in der Parameterstudie verwendeten *in vitro* Zellkulturlinien [247]. Sollier *et al.* haben zwar zum Abschluss der Studie gezeigt, dass sie mit der Methode CTCs in Patientenproben nachweisen können, sie führten jedoch keine Kontrollmessungen durch, um zu überprüfen, ob die zuvor mit *in vitro* Zelllinien bestimmte Sortierleistung auch für die Patientenproben ihre Gültigkeit behält [264].

Die alternative Möglichkeit (ii) nutzt den Wechsel von Aussparungen und Verengungen zur Manipulation der Zelltrajektorien, um die Zellen am Kanalende in zwei separate Auslässe zu sortieren. Für dieses Prinzip wurden einige unterschiedliche Ausführungen entwickelt. Zum Einen gibt es die als *Multi-Orifice-Flow-Fractionation (MOFF)* bezeichneten Ansätze, die mehrfache, beidseitige Verengungen/Verbreiterungen des Kanals ausnutzen. Bhagat *et al.* führen diese Verengungen z.B. so klein aus, dass die größeren Zellen auf die zentralen Stromlinien gezwungen werden [265]. Dort gleichen sich die Liftkräfte zu beiden Kanalseiten hin aus, weshalb die Zellen in der Kanalmitte verbleiben und am Ende von den kleineren Blutzellen getrennt werden können, welche aufgrund der Lift-Kräfte Positionen abseits der zentralen Stromlinien annehmen. Mit der MCF-7-Zelllinie und einem Hämatokrit der Probenlösung von $Hct \approx 2\%$ wurde mit dieser Methode eine Sortiereffizienz von bis zu $E = 80\%$ erreicht [265]. Moon *et al.* entwickelten einen Kanal mit weniger restriktiven Verengungen und nutzten ausschließlich das Wechselspiel zwischen Verengungen und Aussparungen zur Manipulation der Zelltrajektorien. Durch eine Hintereinanderschaltung mehrerer solcher Kanäle erreichten sie Sortiereffizienzen von bis zu $E = 99\%$ für MCF-7 Zellen in einer stark verdünnten RBK-Lösung (Verdünnung 1:100, d.h. $Hct \approx 0,5\%$) [266]. Nachteile dieser Methode sind die hohe Verdünnung der Probe und die recht niedrige Probenreinheit.

Lee *et al.* entwickelten hingegen einen Kanal mit Aussparungen lediglich auf einer Seite und taufte das System *Constriction-Expansion-Array (CEA)* [267]. Mit diesem Kanal schafften sie es, MCF-7 Zellen aus Vollblutproben zu sortieren. Dies gelang mit einer beachtlichen Effizienz von bis zu $E = 99\%$ und hohem Probendurchsatz (10^8 Zellen pro Minute) [267].

Gekrümmte Kanäle und Spiralen Gekrümmte und Spiral-Kanäle stellen eine weitere Möglichkeit dar, durch die Trägheit der Flüssigkeit ausgelöste Sekundärströmungen bei $Re > 1$ für die Zelltrennung zu nutzen. Die sogenannte Dean-Strömung entsteht hier durch die laterale Beschleunigung der Flüssigkeit in einem gebogenen Kanal. Ihre Stärke kann über die Dean-Zahl charakterisiert werden. Diese ergibt sich für einen Kanal mit dem hydraulischen Durchmesser D_h (vgl. Gleichung (2.20)) und dem Krümmungsradius r_c zu

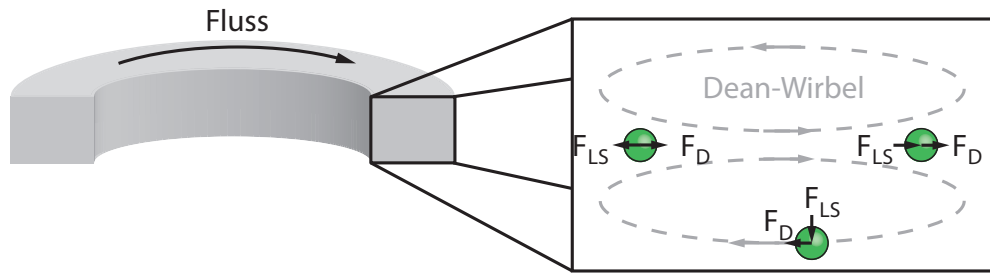


Abbildung 7.3.: Schematische Darstellung der Dean-Wirbel in einem gekrümmten Kanal. Die Dean-Wirbel erzeugen eine Kraft F_D auf die Partikel, wodurch diese auf eine Position in der Nähe der Wand fokussiert werden, die dem Krümmungszentrum näher ist. Durch die ebenfalls wirkende, scherinduzierte Lift-Kraft F_{LS} stellt sich dort je nach Partikelgröße eine bestimmte Gleichgewichtsposition ein (Abb. nach [275]).

[56, 258, 274]

$$De = Re \cdot \left(\frac{D_h}{2r_c}\right)^{1/2} . \quad (7.5)$$

Wie in Abb. 7.3 schematisch dargestellt, ist die Dean-Strömung in der Kanalmitte vom Krümmungszentrum weg und an der oberer beziehungsweise unteren Kanalwand zum Krümmungszentrum hin gerichtet. Dadurch entstehen zwei sich gegenläufig drehende Wirbel, die ein zusätzliches Kraftfeld erzeugen. Die Dean-Kraft F_D fokussiert alle Partikel vertikal gesehen im Zentrum des Kanals, während die horizontale Position über die scherinduzierte Lift-Kraft F_{LS} von der Partikelgröße abhängt [275]. Größere Partikel positionieren sich dabei näher am Kurveninneren als kleinere. Für eine ausführliche Betrachtung der Einflüsse von Krümmungsradius, Kanalgröße, Partikelgröße sowie der Reynoldszahl sei auf [276] verwiesen.

Eine der ersten Methoden, die den Dean-Fluss in Mikrokanälen ausnutzte, wurde von Mao *et al.* zur Fokussierung von Objekten entwickelt und als „microfluidic drifting“ bezeichnet [277]. Das ursprüngliche Design beschränkt sich auf eine einzelne 90°-Kurve und eine Fokussierung durch zusätzliche Zuflüsse. Die Methode wurde stetig verbessert und liefert nun für Partikel und Zellen Ergebnisse, die mit der Leistung kommerzieller Beckman & Coulter Flusszytometer vergleichbar sind [278, 279].

Die erste Anwendung von Spiralkanälen zur Sortierung von CTCs aus Blutproben präsentierten Bhagat *et al.* [280]. Das zunächst mit Mikropartikeln charakterisierte und theoretisch beschriebene System wurde weiterentwickelt und schließlich auch zur Trennung von Zellen benutzt [281]. Eine Optimierung des Spiralkanals durch Guan *et al.* zeigte, dass ein trapezförmiger Querschnitt zu einer deutlich besseren Trennung unterschiedlich großer Zellen führt als ein rechteckiger [282].

Zeitgleich entwickelten Hou *et al.* einen Spiralkanal, mit dem sie unterschiedliche Krebszelllinien (u.a. MCF-7, HeLa) mit Sortiereffizienzen von $E \geq 85\%$ bei $Hct = 20\%$ und sehr hohen Anreicherungsfaktoren von bis zu $A = 10^9$ sortieren können [283]. Sie zeigten auch,

dass ihre Methode zirkulierende Tumorzellen aus Patientenproben sortieren kann, verzichteten allerdings ebenfalls auf Kontrollmessungen um die Sortierleistung der Patientenproben mit der für *in vitro* Zelllinien zu vergleichen.

Im Rahmen einer Kollaboration wurden die beiden Methoden [282, 283] schließlich vereinigt und ein Spiralkanal mit einem einzelnen Einlass und trapezförmigem Querschnitt zur Sortierung von CTCs entwickelt [284]. Mit diesem können klinisch relevante Vollblutproben mit einem Volumen von 7,5 ml innerhalb von 20 Minuten prozessiert werden und dies bei Sortiereffizienzen für MCF-7-Zellen von $E = 85\%$ und gleichzeitig sehr hohen Probenreinheiten. Um allerdings die Prozessierung von Vollblut zu ermöglichen, mussten die RBK vor der Sortierung lysiert werden [284].

Der knappe Überblick über die Zellsortierung mit Methoden, die auf trägheitsbedingten Effekten beruhen zeigt, dass diese Phänomene äußerst interessante Ansatzmöglichkeiten für die passive und label-freie Trennung von Zellen im Scherfluss bereitstellen. Es ist absehbar, dass die Entwicklung dieser Methoden voranschreiten und mittelfristig kommerziell verfügbare Systeme hervorbringen wird [275, 285].

Trotz allen Fortschritts bringt die Nutzung der trägheitsbedingten Kräfte jedoch auch Nachteile mit sich. So nimmt die Sortierleistung in der Regel stark mit dem abnehmenden Durchmesser der CTCs ab [264] und wurde deshalb zumeist für die relativ große MCF-7-Zelllinie untersucht. Für kleinere Zelllinien liegen hingegen kaum Daten zur Sortierleistung der Methoden vor. Weiterhin nimmt die Sortierleistung im Allgemeinen für steigende Deformierbarkeit der CTCs [264] und steigende Zellkonzentrationen ab [266, 284]. Für die Untersuchung von Patientenproben, in denen die CTCs vermutlich kleiner und deformierbarer sind als in *in vitro* Zellkulturen [247, 272, 286], stellen diese Punkte bedeutende Hürden dar.

Trägheitsunabhängige Methoden

Trägheitsunabhängige Methoden sehen die Deformierbarkeit nicht als Störgröße, sondern nutzen explizit durch diese ausgelöste Effekte zur Zelltrennung aus. Sie arbeiten im Stokes-Regime ($Re < 1$), in dem trägheitsbedingte Effekte vernachlässigbar sind [53]. Zellsortierung bei solch niedrigen Re ist aber noch nicht so weit verbreitet wie die trägheitsbasierten Methoden [15]. Dies liegt zum Einen daran, dass die Randbedingungen durch die Deformierbarkeit der Zellen deutlich komplizierter werden, was die theoretische Beschreibung und Vorhersage der Effekte erschwert. Zum Anderen kann bei solch niedrigen Flussraten nur schwerlich ein praktikabler Probendurchsatz erreicht werden, ohne das Stokes-Regime zu verlassen. Während die theoretische Beschreibung der Effekte nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung ist [15], lässt sich das Problem des niedrigen Probendurchsatzes inzwischen durch mikrofluidische Methoden, wie etwa der Parallelisierung mehrerer Kanäle, nahezu routinemäßig lösen [35]. Die niedrigen Flussraten sind zudem nicht nur nachteilig, sondern sie gewährleisten durch schwache Scherkräfte eine äußerst schonende Umgebung für die prozessierten Zellen, was deren Überlebenschancen und die Wahrscheinlichkeit der Unversehrtheit erhöht.

Neben den bereits vorgestellten DLD-Systemen, gibt es lediglich zwei weitere Methoden,

welche die Strömungsverhältnisse im Stokes-Regime zur Zelltrennung ausnutzen. Eine Methode separiert RBK vom Blutplasma durch eine Vergrößerung des zellfreien-Bereiches nahe der Kanalwände, die durch die Kanalgeometrie hervorgerufen wird [287]. Eine andere Gruppe nutzt den sogenannten Marginations-Effekt (vgl. Abschnitt 8.3 und [288]) aus, um mit Malariaparasiten infizierte RBK von gesunden RBK zu trennen [289]. Bisher wurde allerdings keine Methode entwickelt, welche explizit den trägheitsunabhängigen Lift-Effekt zur Zelltrennung oder speziell zur Trennung von CTCs und RBKs verwendet. Eine solche Methode wird im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und im nächsten Abschnitt zunächst am Beispiel der CTC-Sortierung aus RBK-Lösungen charakterisiert.

7.3. NILICS - Non-Inertial Lift Induced Cell Sorting am Beispiel zirkulierender Tumorzellen

Im vorigen Kapitel wurde der trägheitsunabhängige Lift-Effekt auf verschieden große und unterschiedlich deformierbare Objekte experimentell untersucht. Die dort präsentierten Ergebnisse zeigen, dass in Übereinstimmung mit der theoretischen Betrachtung von Olla die Lift-Geschwindigkeit von RBK größer ist als die der kleineren BP und die der deformierbaren BP größer als die der gleich großen, harten Mikrokugeln. Es wurde in Abb. 6.5 gezeigt, dass RBK und BP aufgrund des durch den trägheitsunabhängigen Lift-Effekts erzeugten Höhenunterschieds, in zwei separate Auslässe sortiert werden können. Dies motiviert den Versuch, den trägheitsunabhängigen Lift-Effekt als treibende Kraft eines Zelltrennsystems zu nutzen. Im Rahmen dieser Arbeit wird dazu ein Mikrokanal entworfen, der als eben solches Trennsystem verwendet werden kann. Die Methode wird als *non-inertial lift induced cell sorting* (NILICS) bezeichnet (vgl. eigene Veröffentlichung [290]). NILICS stellt einen passiven und label-freien Ansatz dar, der Zellen kontinuierlich nach Größe und Deformierbarkeit als Trennparameter sortieren kann. Als relevantes System werden nun zirkulierende Tumorzellen untersucht. Diese sind zwar weniger deformierbar, dafür aber deutlich größer als RBK und sollten demnach mit NILICS aus einer Blutprobe aussortiert werden können.

Nach einer grundlegenden Beschreibung des Versuchsaufbaus und des Trennprinzips werden in diesem Kapitel Blutproben mit verschieden hohem Hämatokrit mit MV3-Melanomzellen aus einer Zellkultur angereichert. Bei unterschiedlichen Flussparametern werden die Zellgemische dann mittels NILICS getrennt und die Effektivität der Trennung überprüft. Anschließend wird durch Versuche mit HEPG-2-Leberkarzinomzellen und MCF-7-Brustkrebszellen kontrolliert, ob Größe und Typ der Krebszellen einen Einfluss auf die Sortierung haben. Für alle drei Zelllinien werden schließlich Sortiereffizienz, Probenreinheit und Anreicherungsfaktor für die Sortierung aus Vollblut bestimmt.

7.3.1. Versuchsaufbau

Aufbau und Trennprinzip

Die Versuche zur Trennung von CTCs aus RBK-Lösungen beziehungsweise unverdünntem Vollblut werden mit dem in Abb. 4.3 skizzierten Setup durchgeführt (vgl. auch eigene Veröffentlichung [290]). Das Kanaldesign ist in Abb. 7.4 dargestellt. Die Einlässe und der

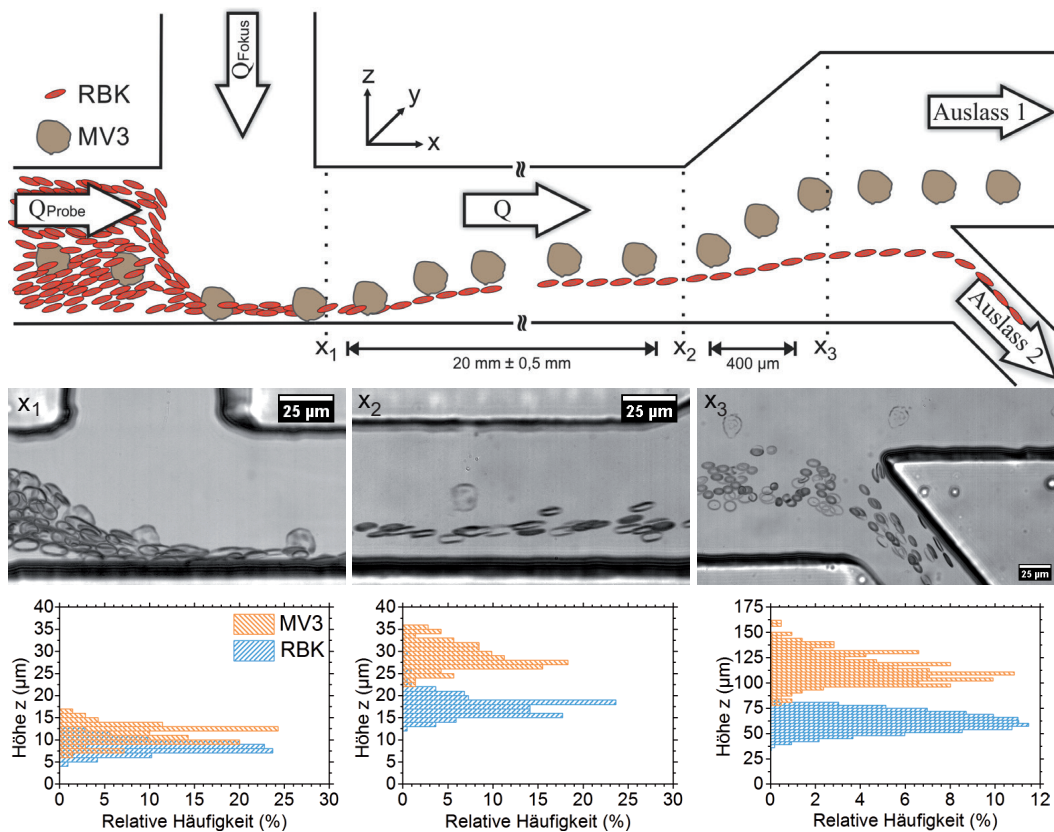


Abbildung 7.4.: NILICS - Trennprinzip für die CTC-Sortierung. Skizze des Kanals zur Veranschaulichung des Trennprinzips und Überlagerung von je fünf aufeinanderfolgenden Mikroskopbildern an den Positionen x_1 , x_2 und x_3 sowie die jeweils zugehörigen Histogramme (Abb. modifiziert aus eigener Veröffentlichung [290]).

Trennkanal haben einen Querschnitt von $66 \mu\text{m} \times 63 \mu\text{m}$ in z- beziehungsweise y-Richtung, bis zur Verbreiterung im Anschluss an x_2 . Dort wird der Kanal auf einer Länge von $400 \mu\text{m}$ auf eine z-Höhe von $276 \mu\text{m}$ erweitert, was einem Öffnungswinkel von 27° entspricht. Die Verzweigung der Auslässe befindet sich schließlich auf einer Höhe von $84 \mu\text{m}$.

Für den Fokussierfluss wird eine 5%-ige Dextran/PBS-Lösung (vgl. Abschnitt 4.1) verwendet. Für die Suspensionen mit $\text{Hct} \leq 9\%$ wird die gleiche Dextran/PBS-Lösung verwendet, für $\text{Hct} \geq 20\%$ dann aber eine dextranfreie Mischung aus PBS und OptiPrep (Axis-Shield) im Verhältnis 6,5:3,5. Grund für die veränderte Zusammensetzung der Lösung ist die durch Dextran verstärkte Bildung von RBK-Aggregaten (vgl. Abschnitt 3.1.3) [291–293], die bei niedrigem Hct kaum, bei höherem Hct aber deutlich zu beobachten ist. Für den Fokussierfluss wird weiterhin eine 5%-ige Dextran/PBS-Lösung verwendet und die OptiPrep-Konzentration an die des Probenflusses angepasst. In reinem PBS sinken die Zellen in der Spritze und im Schlauch jedoch schnell ab, weshalb die Dichte der Lösung mittels OptiPrep angepasst wird.

Der Probensuspension werden zudem 2 mg/ml BSA und 5 mg/ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zugesetzt, um unspezifisch Bindungen der Zellen untereinander und mit den Kanalwänden zu vermeiden. Anschließend werden die dem Zielhämatokrit entsprechende Menge RBK und die Krebszellen zugegeben. Die verwendeten Probensuspensionen sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst.

Tabelle 7.1.: Zusammensetzung der untersuchten Probensuspensionen. Hämatokrit der Probensuspensionen, verwendete Lösung, Verhältnis der konzentrierten RBK-Suspension ($\text{Hct} \approx 100\%$) zur Lösung sowie die Konzentration der Krebszellen ($c(\text{CTC})$) und der RBK ($c(\text{RBK})$) in Zellen/ml.

Hämatokrit	Lösung	RBK:Lösung	$c(\text{CTC})$	$c(\text{RBK})$
0,5%	PBS/Dextran	1:200	$\sim 8 \cdot 10^5$	$\sim 4 \cdot 10^7$
4%	PBS/Dextran	1:20	$\sim 8 \cdot 10^5$	$\sim 3 \cdot 10^8$
9%	PBS/Dextran	1:10	$\sim 8 \cdot 10^5$	$\sim 6 \cdot 10^8$
20%	PBS/OptiPrep	1:4	$\sim 1 \cdot 10^6$	$\sim 7 \cdot 10^8$
30%	PBS/OptiPrep	3:7	$\sim 1 \cdot 10^6$	$\sim 1,1 \cdot 10^9$
40%	PBS/OptiPrep	2:3	$\sim 1 \cdot 10^6$	$\sim 1,3 \cdot 10^9$
Vollblut	—	—	$\sim 1 \cdot 10^6$	$\sim 1,4 \cdot 10^9$

Im Experiment wird die Probensuspension durch den Probeneinlass mit der Flussrate Q_{Probe} injiziert und vom Fokussierfluss Q_{Fokus} an die untere Wand gedrückt. Die Zellen erreichen ihre Ausgangshöhe z_{x_1} an der Position x_1 direkt nach dem Ende des Fokusflusses (vgl. Abb. 7.4). Anschließend fließen sie in x -Richtung entlang des Kanals und erfahren den trägheitsunabhängigen Lift-Effekt, der bis zur Position x_2 zu einer Trennung der Zellpopulationen führt. Beim Durchfließen der folgenden Verbreiterung bleiben die Zellen auf den bei x_2 besetzten Stromlinien, wodurch die absoluten Höhenunterschiede der Zellen relativ zur unteren Wand vervielfacht werden (*hydrodynamic spreading* [228]). Dies vereinfacht die anschließende Auftrennung der Zellpopulationen in die Auslässe 1 beziehungsweise 2. Der gesamte Prozess ist in Abb. 7.4 schematisch dargestellt. Die darin enthaltenen Überlagerungen von Mikroskopbildern an den Positionen x_1 , x_2 und x_3 veranschaulichen den Trennvorgang im Kanal und die darunter dargestellten Histogramme beschreiben die Höhenverteilungen der Zellen an der jeweiligen Position für eine Beispielmessung mit $Q_{\text{Probe}} = 20 \mu\text{l/h}$, $Q_{\text{Fokus}} = 580 \mu\text{l/h}$ und $\text{Hct} = 4\%$. Für die Histogramme wurde die Höhe mehrerer Einzelzellen bestimmt und die relative Häufigkeit in z -Intervallen von $1 \mu\text{m}$ (an x_1 und x_2) beziehungsweise $3 \mu\text{m}$ (an x_3) berechnet. An die Histogramme wird eine Gauss-Funktion angepasst, deren Position des Maximums als mittlere Höhe und deren Standardabweichung als Maß für die Streuung der Zellen identifiziert wird, wodurch sich die in Tabelle 7.2 zusammengefassten Werte ergeben.

Anhand der Höhenverteilungen in Abb. 7.4 und Tabelle 7.2 ist zu erkennen, dass die Schwerpunkte der Zellpopulationen unter den vorliegenden Bedingungen bereits bei x_1 voneinander getrennt sind, sich die Verteilungen dort jedoch noch stark überlappen. Diese Vortrennung wird durch den Fokussierfluss verursacht, der zu einem sogenannten *pinching*

Tabelle 7.2.: Höhen z der Zellpopulationen aus der in Abb. 7.4 dargestellten Beispielmessung mit MV3-Melanomzellen an den Stellen x_1 , x_2 und x_3 für $Q_{\text{Probe}} = 20 \mu\text{l/h}$, $Q_{\text{Fokus}} = 580 \mu\text{l/h}$ und $\text{Hct} = 4\%$.

	$z(x_1)$	$z(x_2)$	$z(x_3)$
RBK	$(8 \pm 2) \mu\text{m}$	$(17 \pm 2) \mu\text{m}$	$(62 \pm 10) \mu\text{m}$
MV3	$(11 \pm 2) \mu\text{m}$	$(28 \pm 3) \mu\text{m}$	$(111 \pm 14) \mu\text{m}$

der Zellen führt, indem er sie an die Kanalwand drückt [294, 295]. Der Schwerpunkt der Zellen kann sich dabei der Kanalwand maximal bis auf einen Zellradius nähern und liegt für unterschiedlich große Zellen somit auf unterschiedlichen Stromlinien.

Auf dem Weg durch den Kanal bis x_2 nimmt der Höhenunterschied zwischen den Zellpopulationen dann durch den Einfluss des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes deutlich zu, bis die Verteilungen bei x_2 vollständig voneinander getrennt sind. Die anschließende Verbreiterung des Kanals auf die etwa 4-fache Höhe ($H(x_3) / H(x_2) = 276 \mu\text{m} / 66 \mu\text{m} \approx 4$) lässt theoretisch eine Vervierfachung der Zellhöhen erwarten, was die Messdaten in Tabelle 7.2 auch bestätigen. Mit dem durch die Höhenreservoirs erzeugten statischen Druck kann die Höhe des gesamten Zellzuflusses schließlich wie mit einem Offset eingestellt werden, um ihn bezüglich der Trennkante des Kanals richtig zu positionieren.

Verwendete Krebszelllinien

In den hier vorgestellten Versuchen dienen Krebszellen aus *in vitro* Zellkulturen in RBK-Suspensionen als Modellsystem für zirkulierende Tumorzellen. Dieses weit verbreitete Vorgehen ist praktisch, um Trennmethode zu entwickeln, untersuchen und untereinander vergleichen zu können, da die Zellkulturlinien im Allgemeinen weltweit verfügbar und im Vergleich zu Patientenproben deutlich einfacher zu beschaffen und zu handhaben sind.

Allerdings ist bisher nicht im Detail geklärt, wie groß die Gemeinsamkeiten beziehungsweise Unterschiede zwischen kultivierten Krebszellen eines bestimmten Zelltyps und „echten“ CTCs aus Patienten wirklich sind. Beim Vergleich von CTCs aus Patientenproben mit Zellkulturen kommen mehrere Studien schon für die Zellgröße zu unterschiedlichen Ergebnissen [247]. So fanden Jin *et al.* z.B., dass auf Prostatakrebs zurückgeführte CTCs aus Patientenproben etwa halb so groß sind wie die kultivierten Zellen einer vergleichbaren Zelllinie [247]. CTCs, die bei Brustkrebs auftreten, sind im Vergleich zu entsprechenden *in vitro* Zellen hingegen, je nach Studie, etwa gleich groß [296] oder größer [297]. Unterschiede zwischen Zellkulturen und „echten“ CTCs bestehen auch in der Deformierbarkeit der Zellen: *in vivo* CTCs sind deutlich deformierbarer als *in vitro* Kulturzellen [272, 286]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Krebserkrankung im klinischen Bild umso aggressiver erscheint, je deformierbarer die CTCs sind [272, 273]. Die teils widersprüchlichen Ergebnisse der Studien könnten unter anderem an der starken Heterogenität der CTCs (vgl. Abschnitt 7.1) liegen, was ebenfalls eine Eigenschaft ist, die von den relativ homogenen Kulturzellen nur bedingt abgebildet wird. Diese unsichere Datenlage erschwert die Vorhersage des Verhaltens von

CTCs aus Patientenproben in Systemen, die mit *in vitro* Zellen charakterisiert wurden [247]. Nichtsdestotrotz stellen Zellen aus Zellkulturen aber nach wie vor das beste verfügbare Modell für CTCs dar, weshalb es auch in dieser Arbeit zur Anwendung kommt.

NILICS wird im Folgenden mit drei verschiedenen Zelllinien aus Zellkulturen charakterisiert. Die meisten Versuche wurden mit der aggressiven MV3-Melanomzelllinie (Hautkrebs) durchgeführt (vgl. [298]) (zur Verfügung gestellt von Prof. Stefan Schneider, Universitätsklinikum Mannheim, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg). Diese Melanomzellen haben einen durchschnittlichen Durchmesser von $D_{MV3} = (14 \pm 2) \mu\text{m}$. Weiterhin kommen MCF-7-Brustkrebszellen ($D_{MCF-7} = (22 \pm 4) \mu\text{m}$) und HEPG2-Leberkarzinomzellen ($D_{HEPG2} = (13 \pm 2) \mu\text{m}$) zum Einsatz (beide Zelllinien zur Verfügung gestellt von Prof. Ernst Wagner, Ludwig-Maximilians-Universität München *via* NIM). Die hier angegebenen Zellgrößen wurden mittels optischer Mikroskopie an jeweils mindestens 20 Zellen vermessen. Alle Zellkulturen werden nach Standardmethoden in einem *Minimal Essential Medium* (MEM) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin kultiviert. Konfluente Zellen werden mit einer Mischung aus Trypsin und EDTA gelöst und weiterverarbeitet (alle Medien von: Biochrom AG). Für weitere Informationen zu Zellkulturen sei [299] empfohlen und für genaue Kulturanweisungen auf die Datenbank der *American Type Culture Collection* (ATCC) verwiesen.

7.3.2. Sortierung von MV3-Melanomzellen

Zunächst werden am Beispiel von MV3-Melanomzellen die Einflüsse des Flussratenverhältnisses $\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}}$ und des Hämatokrits für $0,5\% \leq \text{Hct} \leq 9\%$ auf die Sortierleistung untersucht (vgl. eigene Veröffentlichung [290]). Dies ermöglicht eine gute Beobachtung des Sortiervorganges und des Einsetzens kollektiver Effekte. In einem zweiten Schritt wird der Hämatokrit dann schrittweise bis hin zu Vollblut erhöht und die Übertragbarkeit der bis dahin gefundenen Ergebnisse auf Zellen aus anderen Ursprungsgeweben (MCF-7, HEPG2) und unterschiedlicher Größe (MCF-7) überprüft (vgl. eigene Veröffentlichung [300]).

Zur Charakterisierung der Sortierleistung mittels der in Abschnitt 7.2 eingeführten Parameter wurden durchschnittlich ~ 200 MV3-Zellen pro Parametersatz ausgezählt. Als Fehler wurde für die Sortiereffizienz, die Probenreinheit und den Anreicherungsfaktor jeweils das 95%-Konfidenzintervall ermittelt. Die allgemeinen Definitionen von Sortiereffizienz, Probenreinheit und Anreicherungsfaktor (Gleichungen (7.1) bis (7.4)) können für die spezielle Anwendung auf NILICS mit der Anzahl der Blut- beziehungsweise Krebszellen in der injizierten Suspension (n_{rbk} beziehungsweise n_{ctc}), in Auslass 1 (n_{rbk1} beziehungsweise n_{ctc1}) und den Verhältnissen der Krebszellen zu den RBK in der injizierten Probe ($c = \frac{n_{\text{ctc}}}{n_{\text{rbk}}}$) und in Auslass 1 ($c_1 = \frac{n_{\text{ctc1}}}{n_{\text{rbk1}}}$) umformuliert werden zu

$$E = \frac{n_{\text{ctc1}}}{n_{\text{ctc}}} \quad (\cdot 100\%) \quad (7.6)$$

$$P = \frac{n_{\text{ctc1}}}{(n_{\text{ctc1}} + n_{\text{rbk1}})} \quad (\cdot 100\%) \quad (7.7)$$

$$A = \frac{P_1}{P} \approx \frac{c_1}{c} = \frac{n_{\text{ctc1}} n_{\text{rbk}}}{n_{\text{ctc}} n_{\text{rbk1}}} = E \cdot \frac{n_{\text{rbk}}}{n_{\text{rbk1}}} \quad , \quad (7.8)$$

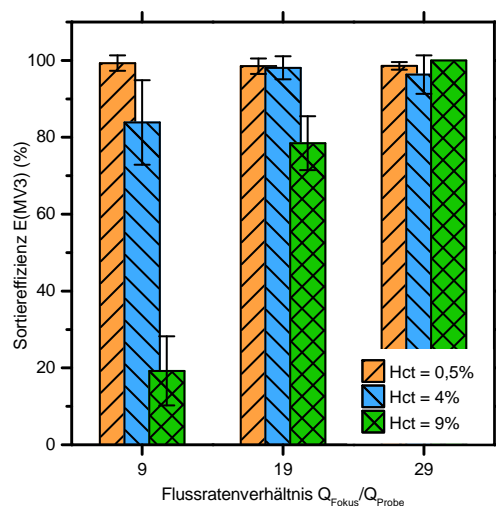


Abbildung 7.5.: Sortiereffizienz bei verschiedenen Hämatokritwerten und Flussratenverhältnissen. Der Probenzufluss erfolgt konstant mit $Q_{\text{Probe}} = 20 \mu\text{l/h}$ bei Fokussierflüssen von $Q_{\text{Fokus}} = 180 \mu\text{l/h}$, $380 \mu\text{l/h}$ und $580 \mu\text{l/h}$. Für $Q_{\text{Fokus}} / Q_{\text{Probe}} = 9$ nimmt E deutlich mit dem Hämatokrit ab, mit steigendem Flussratenverhältnis jedoch wieder zu und ist bei $Q_{\text{Fokus}} / Q_{\text{Probe}} = 29$ schließlich konstant für alle untersuchten Hämatokritwerte (Abb. modifiziert aus eigener Veröffentlichung [290]).

unter Einbeziehung der Näherung für den Anreicherungsfaktor für kleine Konzentrationen der CTC. Einen Überblick über alle Messwerte zu diesen Größen gibt Tabelle C.1 im Anhang.

Abhängigkeit der Sortiereffizienz von Hämatokrit und Flussratenverhältnis

In Abb. 7.5 ist die Sortiereffizienz für MV3-Zellen aus Suspensionen mit Hct = 0,5%, 4% und 9% über unterschiedlichen Flussratenverhältnissen aufgetragen. Letztere werden durch Variation des Fokussierflusses $Q_{\text{Fokus}} = 180 \mu\text{l/h}$, $380 \mu\text{l/h}$ beziehungsweise $580 \mu\text{l/h}$ bei gleichzeitig konstantem Probenzufluss $Q_{\text{Probe}} = 20 \mu\text{l/h}$ erzeugt und betragen somit $Q_{\text{Fokus}} / Q_{\text{Probe}} = 9$, 19 beziehungsweise 29.

In der Abbildung ist gut zu erkennen, dass für Hct = 0,5% (orange Säulen) die Sortiereffizienz unabhängig vom Flussratenverhältnis und mit durchschnittlich $E \approx 99\%$ sehr hoch ist. Bei Hct = 4% (blaue Säulen) ist die Sortiereffizienz für das kleinste Flussratenverhältnis ($Q_{\text{Fokus}} / Q_{\text{Probe}} = 9$) mit $E = (84 \pm 11)\%$ etwas kleiner, nimmt dann aber bei höheren Flussratenverhältnissen wieder konstant hohe Werte an (durchschnittlich $E \approx 97\%$). Für den höchsten untersuchten Hämatokrit (Hct = 9%) ist die Sortiereffizienz bei $Q_{\text{Fokus}} / Q_{\text{Probe}} = 9$ mit $E = (19 \pm 9)\%$ die niedrigste aller Versuche. Sie steigt im weiteren Verlauf schrittweise mit dem Flussratenverhältnis an, über $E = (78 \pm 7)\%$ bei $Q_{\text{Fokus}} / Q_{\text{Probe}} = 19$ bis hin zu $E = 100\%$ bei $Q_{\text{Fokus}} / Q_{\text{Probe}} = 29$.

Die Ergebnisse zeigen also zwei deutliche Trends für den Verlauf der Sortiereffizienz mit

dem Hämatokrit (bei $Q_{\text{Fokus}} / Q_{\text{Probe}} = 9 = \text{const.}$) sowie für den Verlauf der Sortiereffizienz mit dem Flussratenverhältnis (bei $\text{Hct} = 9\% = \text{const.}$). Bei einem kleinen (konstant gehaltenen) Flussratenverhältnis nimmt E mit steigendem Hämatokrit ab und bei einem relativ hohen (konstanten) Hämatokrit nimmt E mit steigendem Flussratenverhältnis zu (vgl. Abb. 7.5 und eigene Veröffentlichung [290]).

Ursache für den Verlauf der Sortiereffizienz mit dem Hämatokrit bei einem niedrigen Flussratenverhältnis ist, dass der schwache Fokussierfluss bei $Q_{\text{Fokus}} / Q_{\text{Probe}} = 9$ zu einer Begrenzung der Zellen am Kanaleingang auf ein Höhenintervall von lediglich $\Delta z \leq 7 \mu\text{m}$ führt (vgl. Kapitel 6). Somit findet nahezu kein Pinching und damit keine Vortrennung der Zellen nach Größe statt. An Position x_1 befinden sich deshalb immer noch zahlreiche RBK oberhalb der MV3-Zellen (oberhalb entspricht einem höheren z -Wert). Bei niedrigem Hämatokrit ist dies kein Problem, mit steigender RBK-Konzentration treten dann allerdings zunehmend mehr Stöße zwischen den schneller aufsteigenden Krebszellen und den immer zahlreicher vorhandenen RBK auf, wodurch die RBK nach oben versetzt beziehungsweise Krebszellen bei ihrer Migration behindert werden.

Der Verlauf der Sortiereffizienz mit dem Flussratenverhältnis bei $\text{Hct} = 9\%$ lässt sich dementsprechend auf ein stärkeres Pinching mit zunehmendem Flussratenverhältnis zurückführen. Bei $Q_{\text{Fokus}} / Q_{\text{Probe}} = 9$ wird der Probenzufluss am Kanaleingang auf $\Delta z \leq 7 \mu\text{m}$ beschränkt, für $Q_{\text{Fokus}} / Q_{\text{Probe}} = 19$ beträgt das Ausgangsintervall dann nur noch $\Delta z \leq 4 \mu\text{m}$ und der Schwerpunkt der RBK-Verteilung befindet sich etwa auf gleicher Höhe mit dem der Krebszellen, was an der Erhöhung der Sortiereffizienz zu sehen ist. Für $Q_{\text{Fokus}} / Q_{\text{Probe}} = 29$ kann schließlich die effizienteste Vortrennung der Zellen beobachtet werden, da der Probenfluss auf $\Delta z \leq 3 \mu\text{m}$ beschränkt wird. Der starke Pinching-Effekt führt hier dazu, dass der Schwerpunkt der RBK-Verteilung unter den der Krebszellverteilung gedrückt wird (vgl. Abb. 7.4), wodurch die Zell-Zell-Wechselwirkungen während des Steigvorgangs bis x_2 auf ein Minimum reduziert werden.

Abhängigkeit der Probenreinheit und des Anreicherungsfaktors von Hämatokrit und Flussratenverhältnis

Die Zell-Zell-Wechselwirkungen und deren Abnahme mit stärkeren Fokussierflüssen sind auch deutlich in den Werten von Probenreinheit P und Anreicherungsfaktor A zu erkennen, die in Abb. 7.6 graphisch dargestellt sind.

Anders als die Sortiereffizienz steigt P für alle Hct mit steigendem Flussratenverhältnis an. Betrachtet man ein konstantes Flussratenverhältnis, so nimmt P für alle Flussratenverhältnisse mit steigendem Hct ab. Der qualitative Verlauf der Entwicklung des Anreicherungsfaktors mit dem Flussratenverhältnis und dem Hämatokrit ist gleich dem der Probenreinheit, jedoch weniger klar. Der Grund für die Abnahme von P und A mit steigendem Hämatokrit liegt in der steigenden Anzahl injizierter RBK im Vergleich zu der konstant gehaltenen Anzahl an Krebszellen. Obwohl die RBK unabhängig vom Hämatokrit gleich effizient aussortiert werden (vgl. Tabelle C.1), steigt die absolute Anzahl falsch sortierter RBK mit dem Hämatokrit an, wodurch P und A sinken. Für A ergibt sich dieser Zusammenhang aus Gleichung (7.8) und für P lässt sich mit den Gleichungen (7.6) bis (7.8) und der für kleine

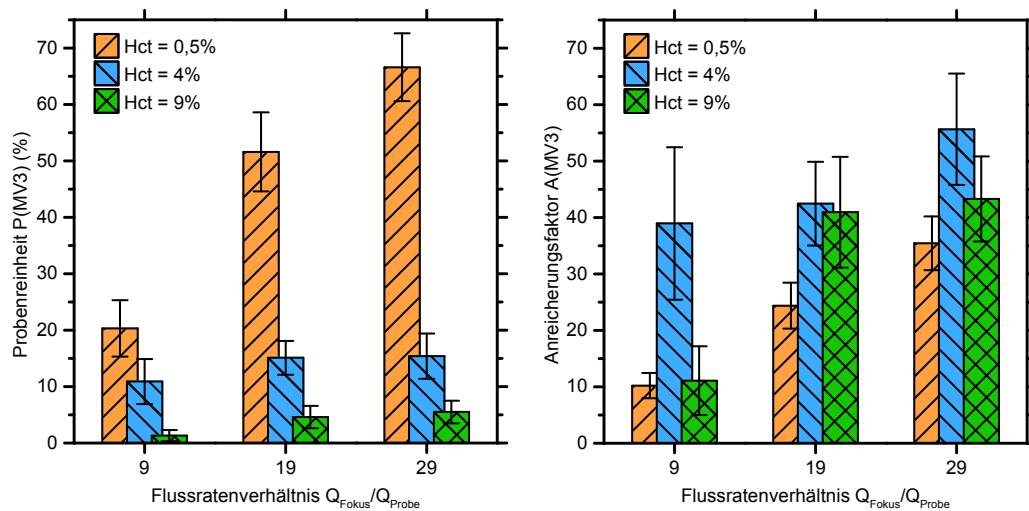


Abbildung 7.6.: Probenreinheit und Anreicherungsfaktor in Abhängigkeit von Hämatokrit und Flussratenverhältnis. Die Probenreinheit nimmt mit steigendem Hämatokrit ab und mit steigendem Flussratenverhältnis zu. Der Anreicherungsfaktor zeigt ein ähnliches Verhalten, das jedoch durch die Ausreißer bei Hct = 4% nicht so deutlich zu erkennen ist.

CTC-Konzentrationen gültigen Relation $c_1 = A \cdot c = A \cdot \frac{n_{\text{ctc}}}{n_{\text{rbk}}}$ zeigen, dass

$$P = \frac{n_{\text{ctc}1}}{(n_{\text{ctc}1} + n_{\text{rbk}1})} = \frac{n_{\text{ctc}1}/n_{\text{rbk}1}}{(n_{\text{ctc}1}/n_{\text{rbk}1} + 1)} = \frac{A \cdot c}{(A \cdot c + 1)} \quad (7.9)$$

und, für kleine c ,

$$P \approx A \cdot c = A \cdot \frac{n_{\text{ctc}}}{n_{\text{rbk}}} \quad (7.10)$$

gilt. Diese näherungsweise Betrachtung zeigt sehr anschaulich, wie P und A zusammenhängen und deren Abhängigkeit vom injizierten Verhältnis der Krebszellen zu den RBK.

Insgesamt betrachtet lässt sich aus den durchgeführten Messungen mit $0,5\% \leq \text{Hct} \leq 9\%$ die Schlussfolgerung ziehen, dass die Sortierleistung umso besser ist, je weniger Zell-Zell-Wechselwirkungen auftreten. Dabei ist es für die Sortiereffizienz E nicht von Bedeutung, ob dies durch ein höheres Flussratenverhältnis oder durch einen niedrigeren Hct erreicht wird, während P und A mit steigendem Hämatokrit abnehmen.

Überlebensfähigkeit der Zellen

Um die Überlebensfähigkeit (engl. *viability*) der Zellen nach der Sortierung zu überprüfen, wurde eine Reaktivierung der sortierten Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde in einem extra Experiment die doppelte MV3-Zellkonzentration bei einem Hämatokrit von Hct = 4% und einer Flussrate von $Q = 600 \mu\text{l/h}$ in den Kanal injiziert. Die gesammelte Probe wurde zweimal zentrifugiert und in PBS resuspendiert, um die Dextran-Lösung zu entfernen.

Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturmedium in den Brutschrank gegeben. Anfangs war ein langsames Wachstum zu beobachten als in der Kontrollkultur. Grund dafür könnte die niedrige Zellkonzentration beim Anlegen der Kultur sein. Nach einer Woche hatten die Zellen wieder die gleiche Wachstumsrate wie die Kontrollkultur erreicht. Nach über drei Wochen, in denen weder Wachstumsänderungen noch Änderungen im Erscheinungsbild der Zellen festgestellt werden konnten, wurde die Kultivierung gestoppt. Der Versuch zeigt, dass die mit dem NILICS-Aufbau sortierten Zellen überlebensfähig sind und zum Anlegen einer neuen Zellkultur genutzt werden können.

7.3.3. Sortierung verschiedener Krebszellen aus hochkonzentrierten Blutproben und Vollblut

Die bisherigen Versuche wurden mit Proben durchgeführt, deren Hämatokrit deutlich unter dem von Vollblut liegt. Eine notwendige Verdünnung bedeutet allerdings einen zusätzlichen Prozessschritt und eine Verringerung des Zelldurchsatzes bei gleichbleibendem Volumenfluss. Es wäre daher für die praktische Anwendung von NILICS ein bedeutender Vorteil, wenn CTCs aus unverdünnten Blutproben sortiert werden könnten.

Deshalb wird in diesem Kapitel untersucht, welche Auswirkungen höhere Zellkonzentrationen auf die Sortierleistung haben. Auf Basis der Ergebnisse des vorangegangenen Abschnittes werden dazu Experimente mit RBK-Suspensionen mit Hct = 20%, 30% und 40% sowie unverdünnten Vollblutproben durchgeführt. Dabei wird zunächst die Sortierleistung mit MV3-Zellen untersucht und mit den Ergebnissen des vorangegangenen Abschnittes verglichen. Weiterführend werden dann auch die Sortierleistung für die deutlich größeren MCF-7-Zellen bestimmt sowie für HEPG2-Leberkarzinomzellen, die etwa gleich groß sind wie MV3-Zellen, aber ein anderes Ursprungsgewebe aufweisen.

Abhängigkeit der Sortierleistung vom Flussratenverhältnis

Zunächst wird der Effekt des Flussratenverhältnisses auf die höher konzentrierten Lösungen untersucht. Die Untersuchung erfolgt anhand eines Hämokrits von Hct = 40%, da eine eventuelle Abhängigkeit vom Flussratenverhältnis dort am stärksten sichtbar wäre und es werden zwei der Flussraten aus dem vorhergehenden Abschnitt und eine nochmals höhere verwendet. Die Flussratenverhältnisse von $\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}} = 20, 30$ beziehungsweise 40 werden dazu durch Variation des Fokussierflusses $Q_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{l/h}, 600 \mu\text{l/h}$ beziehungsweise $800 \mu\text{l/h}$ bei gleichzeitig konstantem Probenzufluss $Q_{\text{Probe}} = 20 \mu\text{l/h}$ erzeugt. Beim höchsten Volumenfluss von $Q = 820 \mu\text{l/h}$ liegt eine Reynoldszahl von $Re \approx 0,6$ vor, das System befindet sich also klar im Stokes-Regime. Die Ergebnisse zur Sortiereffizienz sind in Abb. 7.7 graphisch dargestellt. Einen detaillierten Überblick über die einzelnen Messwerte gibt Tabelle C.1 im Anhang.

Die Messungen ergeben eine hohe Sortiereffizienz von $(92 \pm 6)\% \leq E \leq (96 \pm 5)\%$, die im Rahmen der Messgenauigkeit unabhängig vom Flussratenverhältnis ist. Das gleiche Bild ergeben auch die Bestimmung der Probenreinheit ($P \approx 0,2\% \approx \text{const.}$) und des Anreicherungsfaktors ($A \approx 15\% \approx \text{const.}$). Während die Probenreinheit aufgrund der Vielzahl an RBK im Kanal niedrig ist, werden die Zielzellen immer noch um mehr als eine

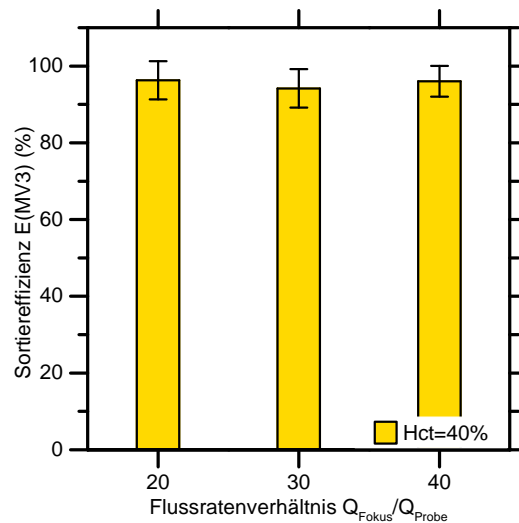


Abbildung 7.7.: Sortiereffizienz für MV3-Zellen bei Hct = 40% und verschiedenen Flussratenverhältnissen. Der Probenzufluss erfolgt konstant mit $Q_{\text{Probe}} = 20 \mu\text{l/h}$ bei Fokussierflüssen von $Q_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{l/h}$, $600 \mu\text{l/h}$ und $800 \mu\text{l/h}$. Die Sortiereffizienz ist für alle untersuchten Flussratenverhältnisse konstant (Abb. modifiziert aus eigener Veröffentlichung [300]).

Größenordnung angereichert. Beide Werte sind im Rahmen der Messgenauigkeit unabhängig vom Flussratenverhältnis.

Es wird also bereits bei einem Flussratenverhältnis von 20 eine hervorragende Sortiereffizienz erreicht, die bei höheren Flussratenverhältnissen nicht mehr weiter steigt. Die Begrenzung des Probenzuflusses durch den Fokussierfluss in z -Richtung auf $\Delta z \leq 3 \mu\text{m}$ ist also ausreichend, um die Zell-Zell-Wechselwirkungen so zu reduzieren, dass sie die Sortiereffizienz nicht mehr beeinflussen.

Für Probenreinheit und Anreicherungsfaktor können auch keine signifikanten Veränderungen mehr mit dem Flussratenverhältnis festgestellt werden. Sie erreichen aufgrund der hohen Anzahl an RBK im Kanal (von denen im Durchschnitt mehr als 93% aussortiert werden) nicht mehr die Werte der Versuche mit niedrigerem Hämatokrit. Der Grund dafür wird für P sehr anschaulich durch Gleichung (7.10) beschrieben, wenn man bedenkt, dass die Anzahl der CTCs in den Versuchen konstant gehalten wurde. Betrachtet man für den Anreicherungsfaktor außerdem die Näherung in Gleichung (7.4), so lässt sich ableiten, dass bei einer Erhöhung der Anzahl der injizierten RBK n_{rbk} die Anzahl der fehlsortierten RBK genauso oder überproportional steigen muss, um bei konstanter Sortiereffizienz einen konstanten oder abnehmenden Anreicherungsfaktor zu erreichen. Diese Zunahme an Fehlsortierungen kann wiederum nur auf hydrodynamische Wechselwirkungen der RBK mit den CTCs zurückgeführt werden.

Die niedrigen Werte für P und A können durch eine Mehrfachsartierung verbessert werden. Bei einem Ausgangshämatokrit von Hct = 40% erhält man in Auslass 1 im gleichen Volumen einen Hämatokrit von $\text{Hct} \approx 0,40 - (0,40 \cdot 0,93) \approx 3\%$. Aufgrund der hohen Sortiereffizienz

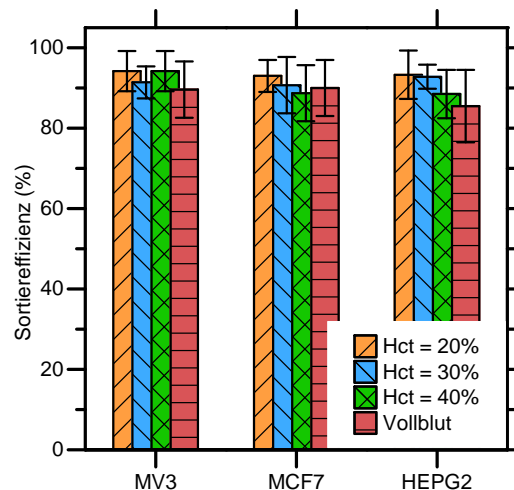


Abbildung 7.8.: Sortiereffizienz für MV3-, MCF-7- und HEPG2-Zellen bei verschiedenen Hämatokritwerten. Der Probenzufluss erfolgt konstant mit $Q_{\text{Probe}} = 20 \mu\text{l/h}$ bei einem Fokussierfluss von $Q_{\text{Fokus}} = 600 \mu\text{l/h}$. Die Sortiereffizienz ist bei diesem Flussratenverhältnis für alle untersuchten Hämatokritwerte und Zelllinien konstant (Abb. modifiziert aus eigener Veröffentlichung [300]).

befinden sich aber nach wie vor nahezu alle CTCs in der Probe. Führt man mit dieser Probe nun eine erneute Sortierung durch, erhält man wie in Abschnitt 7.3.2 beschrieben eine Probenreinheit von $P \geq 15\%$, die durch jeden weiteren Durchlauf zunehmend verbessert wird. Die Werte für A steigen noch schneller, da sich die Anreicherungsfaktoren der beiden Sortierdurchgänge miteinander multiplizieren. Dies bedeutet eine Anreicherung nach einem zweiten Sortierdurchlauf von $A \approx 10^3$.

Abhängigkeit der Sortierleistung vom Hämatokrit und dem Zelltyp

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wird für die folgenden Versuche ein festes Flussratenverhältnis von $\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}} = 30$ verwendet, um verschiedene Zelllinien aus Blutproben mit Hct = 20%, 30%, 40% und Vollblut auszusortieren. Ziel der Versuche ist es zu klären, welchen Einfluss der Hämatokrit bei konstantem Flussratenverhältnis auf die Zelltrennung hat und ob sich die Sortierleistung mit Größe beziehungsweise Ursprungsgewebe der Krebszellen verändert. Zu diesem Zweck werden, neben den MV3-Zellen, auch die MCF-7- und die HEPG2-Zellkulturlinie untersucht. Im Vergleich zu MV3-Zellen (Ursprungsgewebe: Haut, Durchmesser $D_{\text{MV3}} = (14 \pm 2) \mu\text{m}$) sind die HEPG2-Zellen (Ursprungsgewebe: Leber, Durchmesser $D_{\text{HEPG2}} = (13 \pm 2) \mu\text{m}$) etwa gleich groß, aber anderen Ursprungs und die MCF-7-Zellen (Ursprungsgewebe: Brust, Durchmesser: $D_{\text{MCF-7}} = (22 \pm 4) \mu\text{m}$) deutlich größer als die beiden anderen Zelllinien. Die in den Messungen bestimmten Sortiereffizienzen, Probenreinheiten und Anreicherungsfaktoren sind in Tabelle C.1, Tabelle C.2 und Tabelle C.3 im Anhang zusammengefasst.

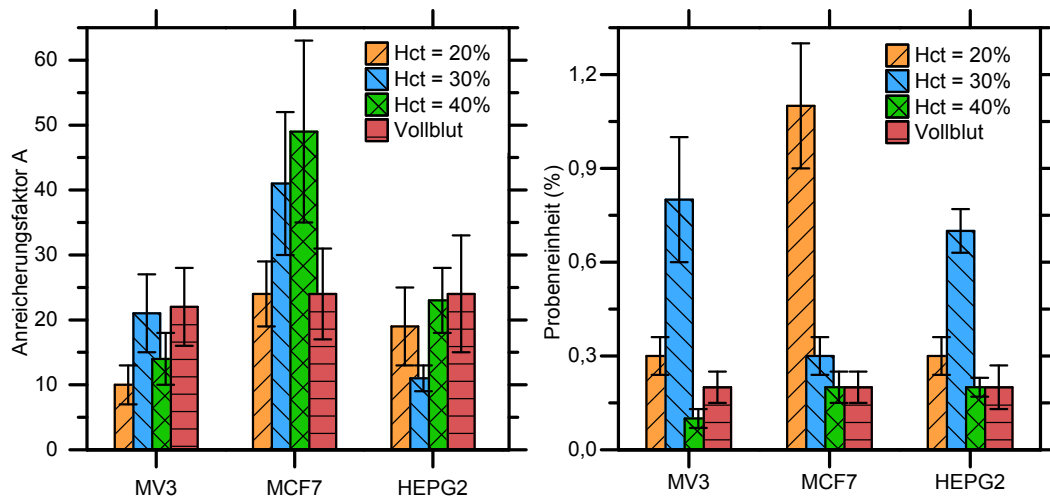


Abbildung 7.9.: Anreicherungsfaktor und Probenreinheit für MV3-, MCF7- und HEPG2-Zellen bei verschiedenen Hämatokritwerten. Der Probenzufluss erfolgt konstant mit $Q_{\text{Probe}} = 20 \mu\text{l/h}$ mit einem Fokussierfluss von $Q_{\text{Fokus}} = 600 \mu\text{l/h}$. Keiner der Werte zeigt eine eindeutige Abhängigkeit vom Hämatokrit. Der Anreicherungsfaktor ist für MCF-7-Zellen höher als für die HEPG2- und MV3-Zelllinien (Abb. modifiziert aus eigener Veröffentlichung [300]).

Anhand von Abb. 7.8 lässt sich zunächst erkennen, dass die Sortiereffizienz bei einem Flussratenverhältnis von $\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}} = 30$ für alle Zelllinien unabhängig vom Hämatokrit ist. Dies gilt auch für die Versuche mit Vollblut, dessen Hämatokrit nochmals über 40% liegt. Des Weiteren lassen sich im Rahmen der Messgenauigkeit keine Unterschiede in der Sortiereffizienz der einzelnen Zelllinien ausmachen. NILICS liefert demnach für alle Hämatokritwerte bis hinauf zu Vollblut und verschiedene Zelllinien gleichmäßig sehr hohe Sortiereffizienzen über einen weiten Bereich von Flussraten, -verhältnissen und Zellkonzentrationen.

Die Ergebnisse für Probenreinheit und Anreicherungsfaktor sind in Abb. 7.9 dargestellt. Für den Anreicherungsfaktor ist keine eindeutige Abhängigkeit vom Hämatokrit erkennbar, es lässt sich aus den Messdaten aber eine Abhängigkeit von den Zelltypen ableiten: Im Vergleich der HEPG2- mit der MV3-Zelllinie überlappen die Fehlerbereiche jedoch so stark, dass eventuelle Unterschiede kaum signifikant sind. Anders verhält es sich jedoch mit den MCF-7-Zellen. Sie erreichen im Durchschnitt signifikant höhere Anreicherungsfaktoren als MV3- und HEPG2-Zellen, was aller Wahrscheinlichkeit nach an ihrem größeren Durchmesser liegt. Durch diesen erreichen sie bereits bei der Vortrennung durch den Pinching-Effekt einen größeren Abstand zu den RBK, wodurch es zu einer geringeren Fehlsortierung von RBK kommt. Nach Gleichung (7.8) bedeutet dies einen Anstieg des Anreicherungsfaktors. Die für die Probenreinheit bestimmten Werte sind hingegen durchgehend sehr niedrig, was wohl der Hauptgrund für deren starke Streuung sein dürfte, die in Abb. 7.9 zu sehen ist. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erläutert, können Probenreinheit und Anreicherungsfaktor durch einen zweiten Sortiervorgang stark verbessert werden.

7.3.4. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Abschnitt wurde die Sortierung von Krebszelllinien mittels NILICS aus verschiedenen konzentrierten Blutsuspensionen bis hin zu Vollblut demonstriert. Treibende Kraft der Sortierung ist der trägheitsunabhängige Lift-Effekt, der für die größeren Krebszellen stärker ist als für RBK. Für die Versuche wurde eine konstante Konzentration an Krebszellen zu Blutsuspensionen mit Hämatokritwerten von $0,5\% \leq \text{Hct} \leq 40\%$ gemischt und in einen geraden Mikrokanal injiziert. Der Probenzufluss wird zu Beginn von einem Fokussierfluss auf einen bestimmten Bereich Δz an die untere Wand des Kanals begrenzt. Durch die Fokussierung der Zellen an die Kanalwand kommt es zu einem sogenannten Pinching-Effekt: Der Schwerpunkt der Zellen muss mindestens einen Zellradius Abstand von der Wand haben, wodurch unterschiedlich große Zellen nach Größe getrennt werden. Im hier präsentierten Fall liegt also der Schwerpunkt der RBK-Verteilung unterhalb dessen der CTC-Verteilung. Dies ist von Vorteil für die Trennung, da die CTCs einen stärkeren Lift-Effekt erfahren als die RBK und durch die Vortrennung am Kanaleingang Zell-Zell-Wechselwirkungen beim Steigvorgang minimiert werden.

Für niedrige Flussratenverhältnisse, sprich schwache Fokussierflüsse, hängt die Sortierleistung dann auch stark vom Hämatokrit der injizierten Probenlösung ab. Aufgrund der schwachen Fokussierung müssen die CTCs die RBKs während des Trennvorgangs erst „überholen“, wobei es zu Stößen zwischen den Zellen kommt. Diese treten bei höheren Zellkonzentrationen vermehrt auf, wodurch der Trennprozess gestört wird. Bei hohen Flussratenverhältnissen $\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}} \geq 20$ ist die Sortierleistung schließlich unabhängig vom Flussratenverhältnis. Ab diesem Wert werden durch das Pinching und der damit einhergehenden Vortrennung der Zellen die während des Steigvorgangs auftretenden Wechselwirkungen zwischen den Zellen minimiert. Diese Vorgänge spiegeln sich auch in den Größen Sortiereffizienz, Probenreinheit und Anreicherungsfaktor wider, mit welchen das System bezüglich seiner Sortierfähigkeiten charakterisiert wurde.

Die Sortiereffizienz E ist für $\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}} \geq 20$ konstant für alle untersuchten Hämatokritwerte bis hin zu unverdünntem Vollblut. Sie ist auch unabhängig von der Art der CTCs, was durch Versuche mit unterschiedlichen Zelllinien gezeigt wurde. Dazu kamen Zellen aus den Kulturlinien MV3 (Hautkrebs), MCF-7 (Brustkrebs) und HEPG2 (Leberzellkarzinom) zum Einsatz, mit denen durchschnittlich Sortiereffizienzen von über 90% erreicht wurden. Für die Versuche, in denen die Zellen direkt aus Vollblut aussortiert wurden, ergaben sich $E_{\text{MV3}} = E_{\text{MCF-7}} = (90 \pm 7)\%$ und $E_{\text{HEPG2}} = (86 \pm 9)\%$.

Anders verhält es sich mit der Probenreinheit, für die sich aus den Messungen Werte zwischen $P_{\text{Hct}=0,4\%} \approx 67\%$ und $P_{\text{Hct}=40\%} \approx 0,1\%$ und eine klare Abhängigkeit vom Hämatokrit ergeben. Dieses Verhalten konnte auf die Definition der Probenreinheit zurückgeführt werden, die für niedrige Verhältnisse der CTCs zu den RBKs mit dem Anreicherungsfaktor über $P \approx A \cdot \frac{n_{\text{ctc}}}{n_{\text{rbk}}}$ zusammenhängt. Die Probenreinheit nimmt also mit einem sinkenden Ausgangsverhältnis von CTC zu RBK, wie es für den steigenden Hct der Fall ist, ab. Bei festem Hämatokrit ergeben sich mit steigenden Flussratenverhältnissen wiederum höhere Werte für die Probenreinheit.

Auch der Anreicherungsfaktor ist bei NILICs für niedrige Hämatokrite am höchsten. Er erreicht einen Wert von $A_{\text{Hct}=0,4\%} \approx 104$, der stetig mit steigendem Hämatokrit abnimmt,

bis er für die Sortierung von CTCs aus Vollblutproben $A_{MV3} = (16 \pm 6)$, $A_{MCF-7} = (24 \pm 7)$ und $A_{HEPG2} = (24 \pm 9)$ beträgt. Grund ist die höhere Fehlsortierung der RBK bei höheren Hämatokritwerten als Folge hydrodynamischer Wechselwirkungen zwischen RBKs und CTCs. P und A können durch wiederholte Sortierungen stark verbessert werden. Nach der ersten Sortierung von RBK aus Vollblut sind etwa 96% der RBK aussortiert, was bei einer erneuten Injektion der Probe in den Trennkanaal einen Ausgangshämatokrit von etwa 3% ergibt. Für eine solche Probenlösung gelten wiederum die Ergebnisse aus Abschnitt 7.3.2 und es ergäben sich eine Probenreinheit von $P \geq 15\%$ sowie ein Anreicherungsfaktor in der Größenordnung von $A \approx 10^3$, da sich die Anreicherungs faktoren beider Sortierdurchgänge multiplizieren.

Im Vergleich zu anderen Methoden zur passiven und label-freien CTC-Sortierung (vgl. Abschnitt 7.2.4), besteht der Hauptnachteil von NILICS im niedrigen Probendurchsatz, da, um im Stokes-Regime zu bleiben, nur relativ geringe Flussraten zur Verfügung stehen. Der Probendurchsatz kann recht einfach durch eine Erhöhung der Flussraten verbessert werden, bis trägheitsbedingte Kräfte die Sortierung beeinflussen. Ab welcher Flussrate dies der Fall ist, müsste in einer gezielten Parameterstudie herausgefunden werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Parallelisierung mehrerer Kanäle, was mit mikrofluidischen Methoden inzwischen routinemäßig realisierbar ist [35].

Im Gegenzug hat NILICS aber bedeutende Vorzüge gegenüber anderen Trennmetho den. So konnte eine hocheffiziente Trennung auch für die relativ kleinen MV3- und HEPG2-Zellen demonstriert werden, während die meisten anderen passiven und label-freien Methoden lediglich mit den recht großen MCF-7-Zellen charakterisiert wurden. Die wenigen Messungen mit kleineren Zelllinien ergaben (z.B. für Methoden, die trägheitsbedingte Lift-Kräfte ausnutzen) einen drastischen Abfall der Sortierleistung mit der Zellgröße und mit zunehmender Deformierbarkeit der Zellen [264]. Da nur kleine Krebszellen die engen Kapillaren des peripheren Blutkreislaufes passieren können und eben diese im Verdacht stehen, äußerst kritisch für die Bildung von Metastasen zu sein, ist eine effiziente Sortierung solch kleiner Zellen sehr wichtig. Weiterhin ist bekannt, dass aggressivere CTCs deformierbarer sind, eine Eigenschaft, welche die Trennung durch NILICS begünstigt, sich allerdings störend auf viele andere Methoden auswirkt.

In Abschnitt 7.3.3 wurde ein weiterer wichtiger Vorteil von NILICS nachgewiesen: Die Möglichkeit, unverdünnte Vollblutproben prozessieren zu können. Dies konnte bisher lediglich mit einer einzigen, auf Trägheitseffekten basierenden Methode demonstriert werden, welche wiederum ausschließlich für die große MCF-7 Zelllinie charakterisiert wurde [267]. Mit diesen großen Zellen liefert die Methode von Lee *et al.* immerhin zu NILICS vergleichbare Werte bei einem höheren Probendurchsatz eines Einzelkanals. Es bleibt aber zu zeigen, dass diese Werte auch für kleinere und deformierbarere Zellen erreicht werden können.

Ein weiterer, für die Integration in μ TAS sehr wichtiger, Vorteil ist der extrem einfache Aufbau und die Stabilität der Sortierleistung von NILICS gegenüber der Konzentration der Probenlösung, der Flussraten und des Flussratenverhältnisses. Außerdem wurde gezeigt, dass die Sortierung für verschiedenste Zelltypen mit konstanter Sortierleistung durchgeführt werden kann, was NILICS vielseitig und für die Untersuchung von Proben mit unbekanntem Zielzellen gut geeignet macht.

Die nächsten Schritte in der Entwicklung von NILICS sollten das Ziel verfolgen, die

Methode für die praktische Anwendung vorzubereiten. Dazu muss zunächst das Kanaldesign überarbeitet werden. Die Strecke zwischen x_1 und x_2 sollte so verkürzt werden, dass die Verbreiterung beginnt, sobald die CTCs durch den Lift-Effekt bis zur Mitte des Kanals gestiegen sind, da an diesem Punkt der Abstand zwischen CTCs und RBKs am größten ist. Weiterhin sollte der Kanal im Anschluss unter einem etwas kleineren Winkel als dem bisher verwendeten auf eine möglichst große Höhe verbreitert werden, um die Zellverteilungen weit aufzufächern. Die Geometrie der Auslässe muss schließlich so gestaltet werden, dass gemäß der Kontinuitätsgleichung (vgl. Gleichung (2.13)) der Volumenstrom in beiden Auslässen gleich ist, um unerwünschte Effekte bei der Auftrennung zu vermeiden. In einem zweiten Schritt ist es sinnvoll, mehrerer Kanäle in Reihe zu schalten, um die Sortierleistung bezüglich P und A zu verbessern. Möglichkeiten zur Erhöhung des Probendurchsatzes wurden bereits diskutiert, wobei das Ziel die Prozessierung einer 7,5 ml Vollblutprobe sein sollte, die aktuell das Standardvolumen bei klinischen Untersuchungen darstellt. Strukturell gesehen ist auch eine erhöhte Automatisierung von NILICS erstrebenswert, um Schwankungen in der Sortierung durch den Nutzer zu vermeiden und die Ergebnisse reproduzierbarer zu gestalten. Die nächsten Studien sollten zudem mit Patientenproben durchgeführt werden, um die Übertragbarkeit der, anhand von Zellkulturen charakterisierten Sortierleistung auf diese zu überprüfen. Außerdem müssen die Ergebnisse mit den Resultaten von verfügbaren Standardmethoden (z.B. CellSearch, Flusszytometrie) verglichen werden.

8. *Plasmodium falciparum*-infizierte rote Blutkörperchen im Mikrofluss

I know, I know the sun is hot
 Mosquitoes come, suck your blood
 Leave you there all alone
 Just skin and bone

(Queens of the Stone Age, Mosquito Song)

Viele klinische Symptome einer durch den Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* ausgelösten Erkrankung lassen sich auf rheologische Störungen der Blutzirkulation zurückführen. Folglich sind die rheologischen Eigenschaften *Plasmodium falciparum*-infizierter RBK im Mikrofluss als Modellsystem für den physiologischen Blutfluss von besonderem Interesse, um die Entstehung der klinischen Symptomatik zu verstehen und eventuelle Ansatzpunkte für Therapien zu identifizieren. Wie bereits in Kapitel 5 für gesunde RBK geschehen, wird in diesem Kapitel zunächst die Dynamik roter Blutkörperchen anhand der Taylor-Deformation, des Übergangs in die Tank-Treading-Bewegung und des Anstellwinkels der RBK darin charakterisiert. Die Analyse der Messdaten zum trägheitsunabhängigen Lift-Effekt ergibt, dass infizierte rote Blutkörperchen (iRBK) eine kleinere Lift-Geschwindigkeit besitzen und näher an der Kanalwand bleiben als gesunde RBK. Es wird aufgezeigt, dass dieser Unterschied von großer Bedeutung für das Überleben des Parasiten im Blutkreislauf ist und einige schwerwiegende klinische Symptome begünstigt. Im ersten Teil dieses Kapitels wird zum besseren Verständnis zunächst eine Einführung in die Krankheit Malaria und speziell in den intraerythrozytären Entwicklungszyklus des Parasiten *P. falciparum* mitsamt seiner Auswirkungen auf die roten Blutkörperchen gegeben.

8.1. Malaria - Ein Überblick

Malaria bedroht in etwa die Hälfte der Weltbevölkerung und forderte allein im Jahr 2012 weltweit 627'000 Todesopfer bei etwa 200 Millionen Neuerkrankungen [301, 302]. In den afrikanischen Ländern ist Malaria für 25% der Todesfälle bei Kindern unter 5 Jahren verantwortlich und verursacht dort jährliche Kosten von etwa 12 Milliarden US-Dollar [303]. Mit ihrer weiteren Verbreitung in z.B. Indien, Brasilien, Afghanistan, Vietnam oder China stellt die Krankheit eine weltweite Bedrohung und wirtschaftliche Last dar, zu deren Bekämpfung große Hoffnungen auf innovativen, gut verfügbaren und preisgünstigen Methoden, wie etwa LOC-Systemen, ruhen [304].

Der Begriff Malaria stammt vom italienischen „mal'aria“, was übersetzt in etwa „schlechte

Luft“ bedeutet und von der Assoziation der Krankheit mit Feucht- und Sumpfgebieten herührt [305]. Dem französischen Militärarzt Charles Laveran fielen Ende des 19. Jahrhunderts erstmals Parasiten im Blut von Patienten auf und Ronald Ross, ein britischer Militärarzt, erkannte wenig später, dass die Krankheit von Moskitos übertragen wird [305]. Von den ca. 400 Spezies der Gattung *Anopheles* sind bis heute nur 60 bekannt, die Malariaparasiten auf den Menschen übertragen können. Die Parasiten selbst gehören zur Gattung *Plasmodium* und sind eukaryotische Einzeller [306]. Von den über 150 benannten Spezies dieser Gattung sind wiederum nur die fünf in Tabelle 8.1 zusammengefassten *Plasmodien* *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi* infektiös für den Menschen [305–307]. Erkrankungen durch *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* sind in der Regel nicht lebensbedrohlich, vor allem bei *P. vivax* und *P. ovale* können aber durch schlafende Zellen in der Leber, sogenannte Hypnozoiten, auch noch nach mehreren Jahren Rückfälle auftreten [305]. Bei einer Infektion mit *P. knowlesi* oder *P. falciparum* (*Pf*) besteht hingegen akute Lebensgefahr und die Infektion muss umgehend medizinisch behandelt werden [308]. Während *P. knowlesi* lediglich eine begrenzte Rolle in Südostasien spielt und erst seit kurzem näher untersucht wird [307, 308], ist *Pf* für den Großteil der Todesfälle durch Malaria verantwortlich, weshalb dieser Spezies besondere Aufmerksamkeit geschenkt wird [303]. Warum *Pf*-Infektionen soviel schwerwiegender sind als die Infektionen mit anderen Spezies, liegt hauptsächlich an Zytoadhäsions-Mechanismen wie der Sequestration, der Anlagerung infizierter RBK an das Endothel in kleinen Blutgefäßen [308]. Dadurch wird die Blutversorgung von Organen behindert und schlimmstenfalls unterbunden, was, wenn das Gehirn betroffen ist, zur sogenannten zerebralen Malaria führt. Im Rahmen des nächsten Abschnitts wird nun zunächst der intraerythrozytäre Entwicklungszyklus von *P. falciparum* näher beschrieben und dabei auch detaillierter auf die dabei auftretenden Zytoadhäsions-Mechanismen und die Sequestration sowie deren Folgen eingegangen.

8.2. Der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Der Lebenszyklus von *Pf*-Parasiten enthält Entwicklungsphasen in Moskitos als auch im menschlichen Wirt und stellt somit ein äußerst komplexes Geflecht unterschiedlichster Prozesse dar. In der vorliegenden Arbeit spielen ausschließlich die intraerythrozytären Entwicklungsstadien im menschlichen Wirt eine Rolle, weshalb sich die folgende Darstellung nach einem äußerst knappen Überblick über den gesamten Zyklus im menschlichen Körper auf ebendiese konzentriert.

Der Zyklus im menschlichen Wirt wird durch den Stich eines infizierten, weiblichen *Anopheles*-Moskitos initiiert. Dabei werden mit dem Speichel des Moskitos Sporoziten übertragen, welche über die Blutbahn in die Leber gelangen. Dort dringen sie in Hepatozyten (Leberepithelzellen) ein und vermehren sich innerhalb von etwa einer Woche, in der zunächst keinerlei Krankheitssymptome auftreten, zu mehreren Leber-Merozoiten (*Exoerythrozytäre Schizogonie*). Im nächsten Schritt zerstören die Leber-Merozoiten die Leberzelle und gelangen so zurück in die Blutbahn [309]. Dort beginnt nun die für die vorliegende Arbeit relevante, ungeschlechtliche, intraerythrozytäre Entwicklung (*Intraerythrozytäre Schizogonie*). Während des intraerythrozytären Zyklus' (IEZ) treten sämtliche klinischen Symptome

Tabelle 8.1.: Übersicht über die fünf für den Menschen infektiösen *Plasmodien* und ihres klinischen Bildes (modifiziert und erweitert nach [307, 308])

Erkrankung	Erreger	Klinisches Bild
<i>Malaria tropica</i>	<i>P. falciparum</i>	hohes, meist unregelmäßiges Fieber heftige Kopf- und Gliederschmerzen rasche Verschlechterung des Allgemeinzustandes schnelle Progression zu lebensbedrohlichen Komplikationen möglich Multiorganversagen möglich infizierte Zellen adhären in peripheren Blutgefäßen (Sequestration)
<i>Malaria quotidiana</i>	<i>P. knowlesi</i>	Fieberschübe im 24h-Zyklus rasche Anämie (Blutarmut), Gelbsucht und Nierenversagen tödliche Parasitämien können erreicht werden keine Sequestration
<i>Malaria tertiana</i>	<i>P. vivax</i> <i>P. ovale</i>	hohes Fieber in 48h-Intervallen Anämie und Splenomegalie (Milzvergrößerung) bei längeren Verläufen Rückfälle durch persistierende Leberformen (Hypnozoiten) noch nach Monaten möglich keine Sequestration
<i>Malaria quartana</i>	<i>P. malariae</i>	Fieberperioden alle 72h milderer, oftmals langwieriger Verlauf keine Sequestration

auf und es entwickeln sich aus dem IEZ heraus geschlechtliche Gametozyten, die bei einem erneuten Stich aufgenommen werden können und die Infektion somit auf den Moskito übertragen.

Aufgrund ihrer Bedeutung für diese Arbeit werden die grundlegenden Abläufe während des IEZ und der darin enthaltenen, intraerythrozytären Entwicklungsstadien des Parasiten nun etwas detaillierter skizziert. Selbst in diesem recht eng begrenzten Bereich können nicht alle Aspekte zufriedenstellend behandelt werden, was der Komplexität der physikalischen, biologischen und biochemischen Vorgänge geschuldet ist. Für weitergehende Informationen sei auf die guten Zusammenstellungen zur Morphologie der Parasiten [310], zu den strukturellen und funktionellen Veränderungen der RBK [311] sowie zu den daran beteiligten parasitären Proteinen [312] verwiesen.

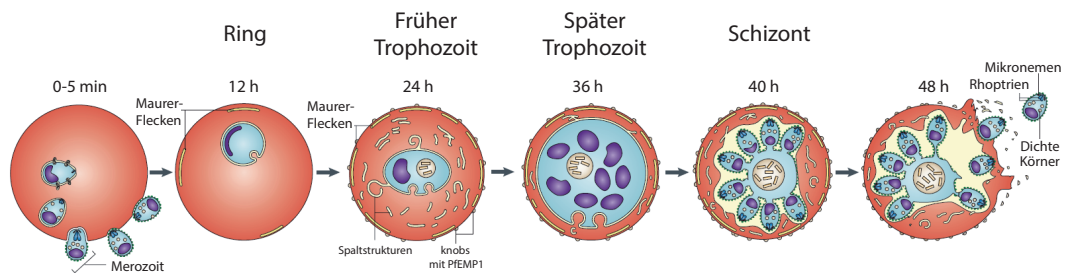


Abbildung 8.1.: Entwicklungsstadien im intraerythrozytären Zyklus von *Plasmodium falciparum*. Merozoiten binden an RBK und dringen in diese ein. Der Parasit entwickelt sich dann in der parasitophoren Vakuole über das Ring-Stadium, das frühe und späte Trophozoiten-Stadium bis hin zum Schizonten, der beim Platzen der Wirtszelle in mehrere Merozoiten zerfällt. Während der Entwicklung werden verschiedene parasitäre Strukturen innerhalb des RBK und auf der RBK-Membran ausgebildet (Abb. modifiziert aus [312], mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group, ©NPG 2009).

8.2.1. Merozoiten

Ausgangspunkt des IEZ sind die Merozoiten. Sie sind selbst nicht fortbewegungsfähig und müssen deshalb beim Verlassen der alten Wirtszelle so im Blutfluss verteilt werden, dass sie neue Wirtszellen erreichen können. Den dazu benötigten Impuls bekommen sie beim Austritt aus ihrem alten Wirts-RBK, aus dem sie regelrecht herauskatapultiert werden. Begleitet von biochemischen Reaktionen zur Destabilisierung der iRBK Membran [309, 313], läuft dieser Austrittsvorgang allgemein in vier Schritten ab [314]: (i) osmotisches Anschwellen des iRBK, (ii) Ausstoß von 1-2 Merozoiten durch die Membran, (iii) "Kringeln" der iRBK-Membran am Austrittspunkt nach außen und (iv) schnelle Umstülpung der Membran. Der gesamte Vorgang von Freisetzung bis Invasion muss dann möglichst schnell (wenige Sekunden bis fünf Minuten, vgl. Abb. 8.1) vollzogen werden, da die „nackten“ Merozoiten für das körpereigene Immunsystem angreifbar sind und von diesem unschädlich gemacht würden [309, 310].

Nach ihrer Freisetzung erkennen die relativ kleinen Merozoiten (Durchmesser ca. $1 \times$

1,6 μm) neue RBK. Dies geschieht mit der dicken, borstigen Schicht von in der Plasmamembran verankerten Proteinen auf ihrer Oberfläche, welche der Fernerkennung neuer Wirtszellen dient und zusammen mit Rezeptoren auf der RBK-Membran eine erste, oberflächliche Verbindung zwischen Merozoit und RBK ausbildet (vgl. Abb. 8.1) [309, 310]. Anschließend reorientiert sich der Merozoit, um mit seinem apikalen Komplex eine feste Bindung zur RBK-Membran zu etablieren. Diese Bindung wird dann durch den Aktin-Myosin-Motor des Parasiten entlang dessen Achse verschoben, wodurch sich der Merozoit immer weiter in das RBK hineinarbeitet. Während des Eindringens verliert der Parasit seine borstige Oberflächenschicht, die außerhalb des RBKs verbleibt. Die an der Bindung Merozoit-RBK beteiligten Proteine tragen am Ende des Invasionsvorgangs zum Wiederverschluss der RBK-Membran und zur Bildung der parasitophoren Vakuole bei. Nähere Informationen zum komplexen Invasionsprozess finden sich unter anderem in [309, 315].

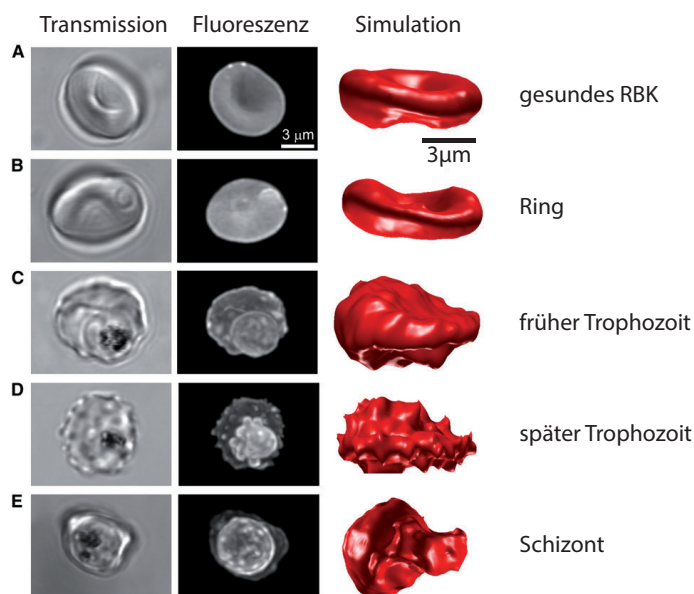


Abbildung 8.2.: Mikroskopische Abbildung der Entwicklungsstadien im IEZ von *Plasmodium falciparum*. Gezeigt sind jeweils ein im Durchlichtmodus (linke Spalte) und ein im Fluoreszenzmodus (mittlere Spalte) des Mikroskops aufgenommenes Bild. Die Simulationen (rechte Spalte) wurden an mehrschichtige Aufnahmen eines Konfokalmikroskops angepasst (Abb. modifiziert aus [316], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier, ©Elsevier 2010).

8.2.2. Die Ring-Form

Das sehr frühe Trophozoiten-Stadium (bis zu etwa 24 Stunden nach der Invasion (*past invasion*, p.i.)) wird, aufgrund seines Erscheinungsbildes, bei *P. falciparum* als Ring-Stadium bezeichnet. Der Grund für diesen Namen wird anhand der Mikroskopbilder in Abb. 8.2 und der schematischen Zeichnung in Abb. 8.3 klar. Die charakteristische Morphologie entsteht

durch eine Einstülpung des Parasiten nach der Invasion, wodurch er eine flach, diskoide oder schüsselförmig-konkave Form annimmt. Im dicken Rand des Parasiten befinden sich dabei die meisten Zellorganellen, während nur vereinzelte Strukturen im zentralen Bereich vorkommen. Dieser ringförmige Rand weist im Mikroskop einen wesentlich höheren Kontrast auf, weshalb er als Ring sichtbar wird [310].

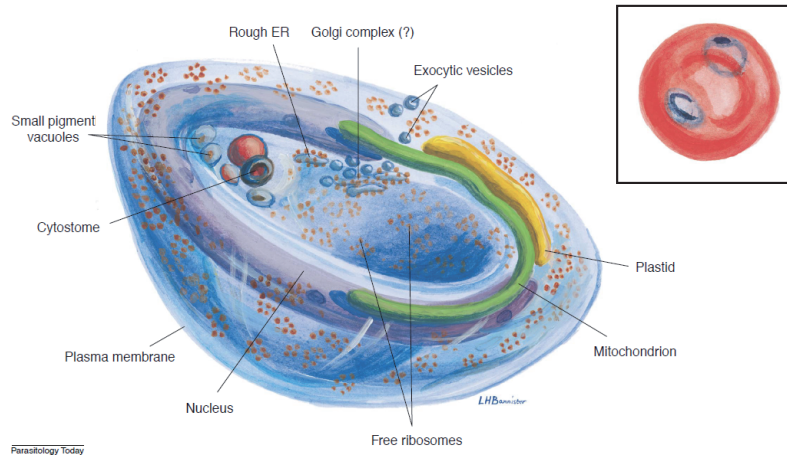


Abbildung 8.3.: Aufbau eines Parasiten im Ring-Stadium und dessen Erscheinungsbild im RBK (aus [310], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier, ©Elsevier 2000).

Der Parasit beginnt im Ring-Stadium mit der Nahrungsaufnahme. Dabei werden kleine Portionen der Hämoglobinlösung des RBKs über verschiedene Transportwege in die parasitophore Vakuole eingebracht und dort verstoffwechselt. Als Endprodukt des Stoffwechsels werden bräunliche Hämozoin-Kristalle ausgeschieden, die anfangs in mehreren kleinen, in späteren Stadien dann in einer großen Pigmentvakuole gesammelt werden [310].

Wichtige strukturelle Veränderungen des RBKs während des Ring-Stadiums sind die Reduzierung des Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses [85, 316] und die Expression des *ring-infected surface antigen* (RESA) [317]. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass der relativ harte Parasit und die Änderung des Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses für den Hauptteil der Deformierbarkeitsänderung verantwortlich sind. Eine Studie, die diesen Sachverhalt durch in RBK eingebrachte Latex-Mikrokugeln modellierte zeigte allerdings, dass dies nicht der Fall ist und ein anderer Mechanismus mitverantwortlich für die reduzierte Deformierbarkeit im Ring-Stadium sein muss [86]. Dieser zweite Beitrag wird nach heutigem Wissensstand RESA zugeordnet: Es stabilisiert das Spektrin-Netzwerk des iRBK direkt nach der Invasion und verleiht ihm eine höhere Widerstandskraft gegen mechanische und thermische Einflüsse [317]. Durch diesen Mechanismus schützt sich der Parasit vor dem Eindringen weiterer Merozoiten in „seine“ Wirtszelle und gleichzeitig vor den erhöhten Temperaturen während der Fieberschübe. Letztere sind Teil der Antwort des Immunsystems auf die Freisetzung der Merozoiten mitsamt des Inhaltes der alten, geplatzten iRBK in die Blutbahn. Der Grad der durch RESA herbeigeführten Versteifung des Zytoskeletts wurde mit optischen Pinzetten (*Optical Tweezers*) bestimmt. Dazu wurde der Schermodul von

Ring-RBK und genetisch modifizierten Ring-RBK, in denen das Gen zur RESA-Produktion stillgelegt wurde, untersucht [318]. Die Studie kommt zu dem Ergebnis, dass der Schermodul der RBK-Membran gesunder RBK (etwa $6,8 \mu\text{N/m}$) durch RESA etwas mehr als verdoppelt wird (auf $17,7 \mu\text{N/m}$), während der Wert für infizierte RBK ohne RESA nicht viel höher ist als der gesunder RBK ($9,4 \mu\text{N/m}$). RESA ist demnach im Ring-Stadium der Hauptgrund für die geringere Deformierbarkeit der iRBK, was bedeutet, dass der Parasit selbst sowie das reduzierte Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis nur eine untergeordnete Rolle spielen [318]. Im Laufe der weiteren Entwicklung des Parasiten nimmt die Bedeutung von RESA ab und neue Proteine werden vom Parasiten in die Membran eingebaut [318].

8.2.3. Trophozoiten

Morphologische Änderungen

Streng genommen zählt bereits die Ring-Form zum Trophozoiten-Stadium. Bei *P. falciparum* spricht man aber erst dann von einem Trophozoiten, wenn die für den vorhergehenden Entwicklungszustand charakteristische Ring-Form nicht mehr zu erkennen und der Parasit größer und kugelig geworden ist, ähnlich der Darstellung in Abb. 8.4. Während des Wachstums wird dabei weiterhin Hämoglobin zu Hämozoin, das sogenannte Parasiten-Pigment, verstoffwechselt. Das Hämozoin wird in der Pigmentvakuole gesammelt, die im Lichtmikroskop deutlich als dunkler Fleck erkennbar ist (vgl. Abb. 8.2). Das iRBK wird außerdem zunehmend sphärischer (vgl. Abb. 8.2 und [316]), da das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis beständig abnimmt [86, 310]. Hier endet allerdings bereits die Einigkeit der Forschung, da es widersprüchliche Ergebnisse darüber gibt, ob der Verringerung des Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses eine Zunahme des Volumens [316] oder eine Abnahme der Oberfläche zugrunde liegt [85]. Grund für die Formveränderungen sind jedenfalls die Aktivitäten des Parasiten, der nach der Invasion das ursprünglich nur mit einer Hämoglobininlösung gefüllte RBK im Prinzip zu einer voll-funktionsfähigen eukaryotischen Zelle umbaut [319]. Anzeichen dafür sind die steigende Anzahl der freien Ribosomen und die Vergrößerung des endoplasmatischen Reticulums. Beides sind auch Indizien für eine verstärkte Proteinsynthese [310]. Die Rolle der in Abb. 8.1 angedeuteten, Golgi-Apparat-ähnlichen Maurer-Flecken (engl. *Maurer's clefts*) ist bis jetzt unklar, während bei der Aufklärung von Funktion und Auswirkungen der verschiedenen Proteine bereits größere Fortschritte gemacht wurden [310, 312, 320].

Modifikation der iRBK-Membran durch parasitäre Proteine

Während seiner Entwicklung im IEZ exprimiert der Parasit mehrere Proteine, die ins Zytoplasma des RBK gelangen und deren Zusammensetzung für das entsprechende Entwicklungsstadium charakteristisch ist [319, 320]. Manche dieser Proteine werden in die RBK-Membran eingebaut und die Vernetzung von RBK-Membran-Proteinen durch parasitäre Proteine ist der Hauptgrund für die Zunahme des Schermoduls, welche wiederum einen Beitrag zum gesamten Deformierbarkeitsverlust leistet [193, 321]. Abb. 8.5 zeigt eine schematische Übersicht über die Positionen und Bindungen der für die Modifikation der RBK-Membran wichtigsten Proteine. Soweit bisher bekannt, haben das *P. falciparum erythrocyte membrane protein 3* (PfEMP3) und das *knob-associated histidine-rich protein* (KAHRP) die größte

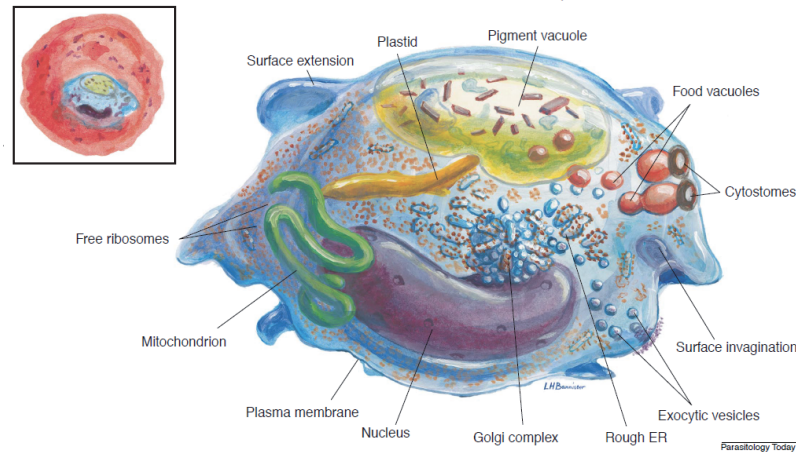


Abbildung 8.4.: Aufbau eines Parasiten im Trophozoiten-Stadium und dessen Erscheinungsbild im RBK (aus [310], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier, ©Elsevier 2000).

Bedeutung für den Deformierbarkeitsverlust der RBK-Membran im Trophozoiten-Stadium [320, 322]. Da es sich um Modifikationen des Zytoskeletts handelt, wird der „Deformierbarkeitsverlust“ hier durch eine Zunahme des Schermoduls hervorgerufen. PfEMP3 erzeugt etwa 15% des Deformierbarkeitsverlustes durch Versteifung des Zytoskeletts, indem es an Spektrin und Bande 4.1 bindet, während KAHRP an Spektrin, Aktin und Ankyrin bindet, sowie zusätzlich im Verdacht steht, die Spektrinfilamente auch quer zu vernetzen [322]. Durch Mikropipettenmessungen an genetisch manipulierten Parasiten wurde gezeigt, dass KAHRP für etwa 50% des Deformierbarkeitsverlustes der RBK verantwortlich ist [322]. Ansammlungen von KAHRP unterhalb der RBK-Membran führen zudem zu einer Wölbung der Membran, was von außen betrachtet zur Ausbildung charakteristischer Beulen (engl. *knobs*) führt. In neueren Studien wurden Indizien dafür gefunden, dass Mitglieder der STEVOR-Proteinfamilie (STEVOR: *subtelomeric variable open reading frame*) ebenfalls die Deformierbarkeit der iRBK ab dem Trophozoiten-Stadium vermindern. Hier besteht jedoch noch weiterer Klärungsbedarf, bevor konkrete Schlüsse gezogen werden können [323]. Auch das *mature parasite-infected erythrocyte surface antigen* (MESA beziehungsweise PfEMP2) könnte über seine Bindung an Bande 4.1 die RBK-Deformierbarkeit beeinflussen, was ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung ist [319].

Deformierbarkeit infizierter roter Blutkörperchen im Trophozoiten-Stadium

Eine exakte, beziehungsweise eine allgemeingültige Bestimmung des Schermoduls als Maß der Deformierbarkeit von iRBK gestaltet sich schwierig. Zum Einen schwankt der Wert zwischen verschiedenen Parasitensträngen, zum Anderen wird er durch die jeweilige Messmethode selbst beeinflusst [119]. Zusätzlich dazu kommen systematische Unsicherheiten, wie etwa ein unterschiedliches Alter der für die Parasitenkultur benutzten RBKs (da deren Deformierbarkeit mit der Zeit abnimmt [190]), oder Unterschiede beim genauen Zeitpunkt

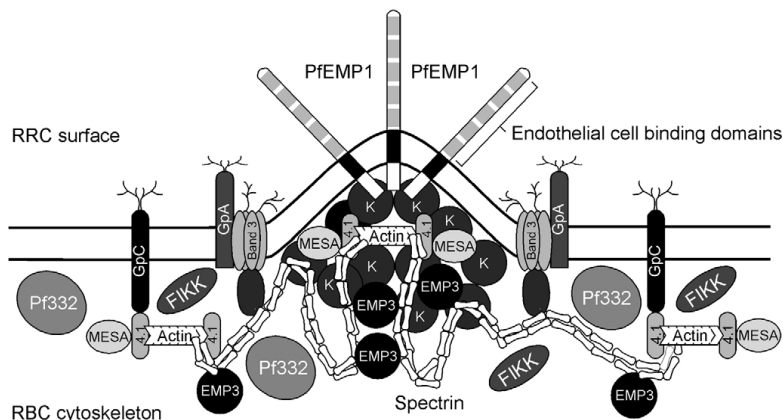


Abbildung 8.5.: Membran eines iRBK mit den vom Parasiten exprimierten Proteinen, welche die RBK-Membran modifizieren. Abkürzungen: K = knob-associated histidine-rich protein (KAHRP); PfEMP1 = *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1; PfEMP3 = *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3; Pf332 = *Plasmodium falciparum* protein 332; FIKK = FIKK kinases; MESA = mature parasite-infected erythrocyte surface antigen; Ank = Ankyrin; Gp = Glykophorin; 4.1 = Bande 4.1 (Abb. aus [320], mit freundlicher Genehmigung der American Society for Clinical Pathology, ©ASCP 2014).

der Messung nach der Invasion des Parasiten. Bei der Betrachtung der relativen Deformierbarkeitsabnahme infizierter RBK gegenüber gesunder spielt es zudem eine Rolle, ob die nicht-infizierten RBK in Kontakt mit den iRBK waren oder nicht. Durch das Platzen von iRBK werden Stoffe freigesetzt, welche die Membran von nicht-infizierten RBK oxidativ angreifen, was zu einer Schädigung der Struktur und einer Verringerung der Deformierbarkeit führen kann [324]. Diese Versteifung ist deutlich schwächer als die durch den Parasiten hervorgerufene, weil die Anzahl der nicht-infizierten RBK aber deutlich größer ist als die der iRBK, ist der Effekt physiologisch trotzdem von großer Bedeutung [324]. Durch ihre geringere Deformierbarkeit werden mehr RBK in der Milz aussortiert und die Gesamtviskosität des Blutes steigt an [66, 325]. Die Lysis nicht-infizierter RBK während einer Malaria-Erkrankung spielt über diesen Mechanismus vermutlich sogar eine größere Rolle bei der Entstehung einer Anämie, als das Platzen der iRBK bei der Freisetzung der Merozoiten [324].

Die genannten Faktoren sowie die Unzulänglichkeiten der theoretischen Modelle führen zu einer relativ breiten Streuung der Messwerte für die Deformierbarkeitsänderung von iRBK im Vergleich zu RBK. Als einzige dynamische Messmethode pumpeten Guo *et al.* RBK und iRBK durch kleine Verengungen in mikrofluidischen Kanälen [99]. Aus dem dafür benötigten Druck bestimmten sie mithilfe eines Tröpfchenmodells (*liquid drops*) die unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften der Zellen. Obwohl Tröpfchen ein beliebtes Modell für RBK sind ist fraglich, ob die Anwendung für iRBK bei starken Deformationen gerechtfertigt bleibt, da der Parasit in den iRBK durch das Modell nur sehr begrenzt be-

rücksichtigt werden kann. Für iRBK im späten Trophozoiten-Stadium fanden Guo *et al.*, dass sie etwa (7 ± 2) -mal weniger deformierbar sind als RBK. Statische Messmethoden sind deutlich weiter verbreitet. Mittels *Diffraction Phase Microscopy*, einer Methode, bei der die Membran-Fluktuationen der Zellen in tomographischen Schnitten gemessen werden, ermittelten Park *et al.* eine Deformierbarkeitsabnahme um das (6 ± 2) -fache [97] bei Zellen, die flach auf einer Glasoberfläche adhärirten. Die niedrigsten Werte für die Deformierbarkeitsabnahme ergeben Messungen mit optischen Pinzetten beziehungsweise Mikropipetten. Beide Methoden kommen zu dem Schluss, dass iRBK etwa 4-mal weniger deformierbar sind als RBK [326, 327]. Vor allem die Theorie für optische Pinzetten und Mikropipetten ist nicht für die Anwendung auf Zellen ausgelegt, die einen relativ großen Festkörper enthalten. Daher stellt sich, wie bereits bei Guo *et al.*, auch hier die Frage, inwiefern die für die Abschätzung des Deformierbarkeitsverlustes gemachten Annahmen für iRBK überhaupt gültig sind [193].

Zytoadhäsion

Die ausgeprägte Zytoadhäsion der iRBK ist eben die Eigenschaft, welche die *falciparum*-Malaria klinisch so viel gefährlicher macht als die durch die anderen Spezies ausgelösten Erkrankungen. Um zu überleben, müssen alle *Plasmodien* die Filterfunktion der Milz umgehen. Während *P. vivax* diese Aufgabe durch eine erhöhte Deformierbarkeit der iRBK löst, werden die iRBK bei einer *P. falciparum* Infektion deutlich weniger deformierbar, weshalb eine Vermeidung der Milzpassage der einzige Ausweg ist [66, 325]. Während ein Großteil der iRBK im Ring-Stadium noch deformierbar genug ist, um die Milz zu passieren, ist dies spätestens ab dem Trophozoiten-Stadium aufgrund der wachsenden parasitären Strukturen nicht mehr der Fall. Deshalb haben sich bei *P. falciparum* Mechanismen entwickelt, die gängigerweise unter dem Oberbegriff *Zytoadhäsion* zusammengefasst werden [321, 328]. Dazu gehören die Ausbildung von Bindungen zwischen iRBK und iRBK (*Autoagglutination*), zwischen iRBK und nicht-infizierten RBK (Rosettenbildung, engl. *rosetting*) [329, 330] sowie die Adhäsion der iRBK direkt an das vaskuläre Endothel (Sequestration) oder über Blutplättchen vermittelt an das Endothel (engl. *platelet-mediated sequestration*) [331, 332]. Die Zytoadhäsions-Mechanismen führen zur Störung des Blutflusses in kleinen Blutgefäßen bis hin zur Verstopfung von Kapillaren. Die Folgen sind lebensbedrohliche Durchblutungsstörungen und Organversagen, wobei besonders das Gehirn (zerebrale Malaria), und z.B. auch die Plazenta während der Schwangerschaft, sehr empfindlich auf Durchblutungsstörungen reagieren, wodurch es zu schweren Nebenwirkungen kommen kann [302, 308, 333].

Neben seiner Bedeutung für die Versteifung der RBK-Membran spielt KAHRP auch eine wichtige Rolle für die Zytoadhäsion. Wie in Abb. 8.5 gut zu erkennen ist, dient es als Anker für das *Plasmodium falciparum* membrane protein 1 (*PfEMP1*), welches aus der iRBK-Membran heraussteht und nach heutigem Wissensstand das zentrale Protein für die adhäsiven Wechselwirkungen ist. Ob es das einzige für die Zytoadhäsion relevante Protein ist, oder ob noch weitere Proteine (z.B. der Familien RIFIN (repetitive interspersed family) oder STEVOR) signifikant beteiligt sind, ist Gegenstand aktueller Forschung [312, 320, 334, 335]. Jedenfalls ist es ein sehr interessanter Aspekt, dass ein und dasselbe Protein gleichzeitig die RBK-Membran versteift und eine wichtige Rolle für die Zytoadhäsion spielt (warum wird in Abschnitt 8.3.4 anhand von Ergebnissen dieser Arbeit näher erläutert).

8.2.4. Schizonten

Im Schizonten-Stadium durchläuft der Parasit mehrere Kernteilungen und es werden in einem streng geregelten Prozess die zuvor replizierten Zellelemente auf einzelne Tochter-Merozoiten aufgeteilt (wie in Abb. 8.6 angedeutet). Der Stoffwechsel wird bis kurz vor dem Platzen des iRBK aufrecht erhalten und verbraucht bis dahin fast das gesamte im Zytosol des iRBK vorhandene Hämoglobin [310]. Auch die Proteinsynthese und deren Export in die Wirtszelle bleibt bis kurz vor dem Ende des IEZ bestehen und führt im späten Stadium oft zu einer etwas kantigen Form des iRBK, was in Abb. 8.2(E) gut zu erkennen ist. Nachdem fast alle Bestandteile der Tochter-Merozoiten den einzelnen Zentren der Tochterzellen zugeordnet wurden, wandern zuletzt je ein Zellkern, ein Mitochondrium und ein Plastid aus dem zentralen Bereich des Parasiten-Zytoplasmas in die neuen Zellen [310]. Abschließend werden die Tochter-Merozoiten vom Parasitenrest, der hauptsächlich aus der Pigmentvakuole besteht, abgetrennt. Wie die für die neue Invasion wichtige Oberflächenschicht auf die Merozoiten kommt, ist bis jetzt ungeklärt. Sind die Merozoiten aber mit ihr ausgestattet, so ist ihre Entwicklung abgeschlossen und der IEZ beginnt nach dem Platzen des iRBKs von vorne [310].

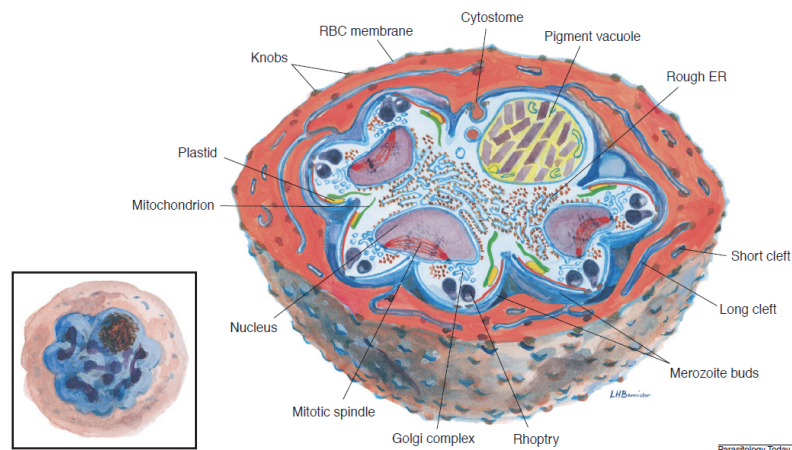


Abbildung 8.6.: Aufbau eines Parasiten im Schizonten-Stadium und dessen Erscheinungsbild im RBK (aus [310], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier, ©Elsevier 2000).

8.3. Experimente mit *Plasmodium falciparum*-infizierten roten Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss

Die durch eine Infektion mit *P. falciparum* hervorgerufenen klinischen Symptome treten nur während des IEZ auf und sind mit diesem eng verknüpft. So können die Mechanismen, die zu den Symptomen führen, prinzipiell in zwei Kategorien aufgeteilt werden [324]. Ein Teil wird durch das Platzen der iRBK am Ende des IEZ (z.B. Anämie) hervorgerufen, wozu auch

die Reaktionen des Wirtsorganismus auf die dabei freigesetzten, parasitären Stoffwechselprodukte und Hämoglobinreste gehören (z.B. Fieberschübe). Die zweite Ursache sind Störungen des Blutflusses, vor allem der Mikrozirkulation durch Zytoadhäsions-Mechanismen (führen z.B. zu Organversagen und zerebraler Malaria). In der Mikrozirkulation des Blutkreislaufes fallen etwa 80% des gesamten Blutdruckes ab, was die enorme Bedeutung von Störungen in diesen kleinen Gefäßen verdeutlicht (vgl. Abschnitt 3.1.3). So verwundert es auch nicht, dass die Schwere des Krankheitsverlaufes mit der Deformierbarkeitsabnahme der RBK korreliert [320, 336].

Der Einfluss der Deformierbarkeit roter Blutkörperchen auf den Blutfluss in der Mikrozirkulation erfolgt dabei über einen direkten und einen indirekten Weg. Der direkte Einfluss erfolgt über die Erhöhung der Gesamtviskosität des Blutes durch den größeren Anteil von RBK mit höherer effektiver Viskosität [18, 337, 338] und über den erhöhten Druck, der aufgewandt werden muss, um steifere RBK durch Kapillaren mit Durchmessern in der Größenordnung des RBK-Durchmessers zu pressen (vgl. inverser Fåhræus-Lindqvist Effekt [16]) [16, 77]. Letzterer Effekt kann z.B. auch zur Bestimmung der Deformierbarkeit von RBK und iRBK genutzt werden [99, 339].

Auf indirektem Weg wird die Mikrozirkulation durch die Schwächung des F-L-Effektes (vgl. Kapitel 1) beeinflusst, bei dem mit weniger deformierbaren RBK eine dünnere zellfreie Schicht auftritt als mit gesunden RBK [15, 340]. Dadurch treten die Zellen häufiger mit der Gefäßwand in Wechselwirkung, wodurch der Strömungswiderstand steigt. Als physikalische Kraft, die den zellfreien Bereich erzeugt, ist eine Schwächung des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes die wahrscheinlichste Ursache für dieses Phänomen. Wie in Abschnitt 3.4.2 dargestellt, kommen als Erklärung für einen schwächeren trägheitsunabhängigen Lift-Effekt hauptsächlich Änderungen in Größe, Form und Deformierbarkeit der Zellen in Frage. Betrachtet man die Veränderungen von iRBKs während des IEZ, bleibt die Größe nahezu konstant, wohingegen sich alle bestimmenden Eigenschaften der RBK-Deformierbarkeit und der Form Schritt für Schritt ändern [341]: (i) die MembranstEIFigkeit (bzw. der Schermodul der Membran) [326, 327], (ii) die Viskosität des Zytoplasmas [310] und (iii) das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis (und damit die Form) [85, 86, 316].

Bisher wurde aber nicht nachgewiesen, dass der trägheitsunabhängige Lift-Effekt auf iRBK schwächer ist als auf RBK, was im Rahmen dieser Arbeit verifiziert wird. Dazu werden im folgenden Abschnitt, der sich an die eigene Veröffentlichung [342] hält, zunächst das Verhalten von *Pf*-infizierten RBK in einem Poiseuille-Fluss untersucht und mit dem von gesunden RBK verglichen. Im Fokus steht dabei der trägheitsunabhängige Lift-Effekt, zu dessen Charakterisierung Trajektorien der Zellen entlang des Kanals aufgenommen werden. Für eine detailliertere Betrachtung der Unterschiede werden dann die Taylor-Deformation, der Übergang ins TT-Regime und der Anstellwinkel in der TT-Bewegung bei verschiedenen Scherspannungen untersucht (vgl. Kapitel 5).

8.3.1. Versuchsaufbau

Für die Messungen werden Parasiten des *Pf*-Laborstranges 3D7S8 [343] mit Standardmethoden kultiviert und die Synchronisation der Stadien mit 5%-Sorbitollösung durchgeführt [343]. Die Bestimmung des Entwicklungsstadiums erfolgt über die Beobachtung der mit

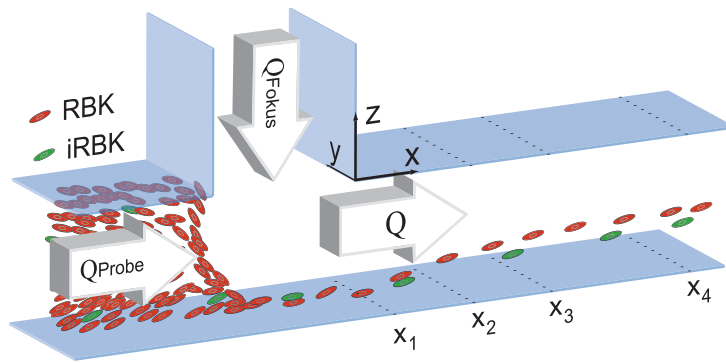


Abbildung 8.7.: Schematische Darstellung des verwendeten Mikrokanals. Die Höhen der Zellen werden an den Messpunkten x_1 bis x_4 bestimmt und TD und Anstellwinkel an der Position x_4 vermessen (Abb. modifiziert aus eigener Veröffentlichung [342]).

Acridine Orange angefärbten Parasiten im Fluoreszenzmikroskop direkt vor den Versuchen. Im Zusammenspiel mit einer engen Überwachung der Kultur ist es so möglich, das Stadium bis auf wenige Stunden genau zu bestimmen. Für die Versuche wurden iRBK im Trophozoiten-Stadium mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung (MACS) aussortiert. Dies ist möglich, da das Stoffwechselprodukt Hämozoïn ein paramagnetisches Moment besitzt. Die Hämozoïnmenge reicht aber erst ab dem Trophozoiten-Stadium für eine magnetisch aktivierte Sortierung aus [343].

Die Versuche werden mit iRBK durchgeführt, die seit 32 - 36 Stunden einen Parasiten in sich tragen. Diese Zeit nach der Invasion entspricht dem späten Trophozoiten-Stadium. Die Zellen werden abzentrifugiert und das Zellpellet für die Versuche in einer 10%-igen Dextranlösung ($\eta = 27$ mPas, vgl. Abschnitt 4.1) suspensiert, so dass ein Hämatokrit von $Hct \approx 1 - 2 \%$ erreicht wird. Für die Kontrollmessungen werden die nicht-infizierten RBK verwendet, die zuvor mit den iRBK in der Kultur waren. Somit ist sichergestellt, dass Unterschiede zwischen RBK und iRBK nicht auf deren Vorgeschichte, sondern ausschließlich auf die Infektion mit dem Parasiten zurückzuführen sind. Für den Fokussierfluss wird eine zellfreie, 10%-ige PBS/Dextran-Lösung verwendet.

Die Versuche werden mit dem in Abb. 4.2 gezeigten Setup und dem in Abb. 8.7 gezeigten Kanal mit einem Querschnitt von $w = 91 \mu\text{m}$ und $h = 102 \mu\text{m}$ (in y- bzw. z-Richtung) durchgeführt. Die Messpunkte zur Bestimmung der Trajektorien befinden sich direkt nach dem Einlass bei $x_1 = 0$, bei $x_2 = x_1 + 5 \text{ mm}$, $x_3 = x_1 + 10 \text{ mm}$ und $x_4 = x_1 + 20 \text{ mm}$. Der Probenzufluss erfolgt mit Flussraten von $Q_{\text{Probe}} = 5, 10, 20, 30$ und $40 \mu\text{l/h}$ und der Fokussierfluss wird jeweils so eingestellt, dass $Q_{\text{Fokus}} = 20 \cdot Q_{\text{Probe}}$ gilt, um das Verhältnis zwischen Proben- und Fokussierfluss konstant zu halten. Zur Bestimmung der Höhen an den jeweiligen x-Positionen und des Anteils der Zellen im TT-Zustand bei x_4 werden je 100 Zellen vermessen. Die Taylor-Deformation und der Anstellwinkel werden bei x_4 für je 50 Zellen bestimmt und die zugehörigen Scherraten in der entsprechenden Höhe aus dem Poiseuille-Profil eines rechteckigen Kanals nach Gleichung (2.8) berechnet.

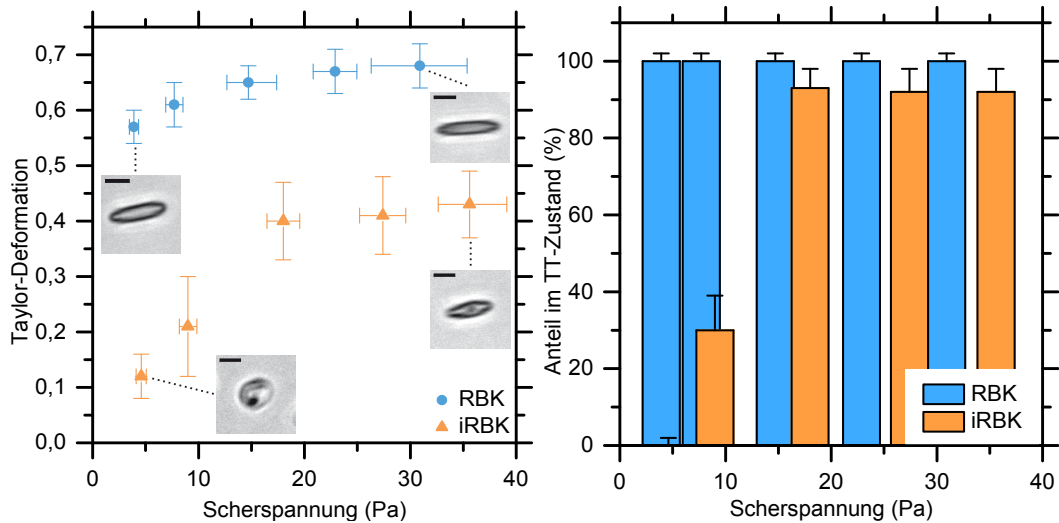


Abbildung 8.8.: Taylor-Deformation von RBK und iRBK sowie Anzahl der tank-treadenden Zellen über der Scherspannung (Abb. modifiziert aus eigener Veröffentlichung [342]).

8.3.2. Ergebnisse

Taylor-Deformation, Übergang ins Tank-Treading-Regime und Anstellwinkel

Um die Unterschiede zwischen RBK und iRBK zu untersuchen, wird zunächst die Taylor-Deformation (TD) an der Kanalposition x_4 vermessen. Dazu wird die Länge der beiden elliptischen Hauptachsen in der Bildebene bestimmt und die TD entsprechend Gleichung (3.30) berechnet (vgl. Kapitel 5). Es ergibt sich der in Abb. 8.8 zusammen mit repräsentativen Mikroskopbildern dargestellte Verlauf der TD über der angelegten Scherspannung. Auf den ersten Blick fällt auf, dass die Deformation der RBK bei allen Scherspannungen stärker ist als die der iRBK. Der Verlauf der TD mit der Scherspannung ist für RBK monoton steigend und relativ glatt. Der Anstieg der TD wird zu höheren Scherspannungen hin immer kleiner und es deutet sich eine Sättigung an, wie sie auch für den niedrigeren Viskositätskontrast in den Messungen in Kapitel 5 gefunden wurde. Für iRBK zeigt sich hingegen nach sehr niedrigen TD-Werten eine ausgeprägte Stufe im Bereich $4,6 \text{ Pa} \leq \tau \leq 18,0 \text{ Pa}$, ähnlich dem in Abb. 5.3 gezeigten Verlauf für RBK beim höheren Viskositätskontrast. Für hohe Scherspannungen bleibt die TD dann nahezu konstant.

Die Mikroskopbilder in Abb. 8.8 legen eine Änderung des Bewegungszustandes der iRBK nahe, wie sie beim Übergang ins TT-Regime stattfindet. Tatsächlich steigt die Anzahl der sich im TT-Zustand befindlichen iRBK in ebendiesem Scherspannungsbereich stark an, während sich alle RBK bei allen untersuchten Scherspannungen im TT-Regime befinden. In den hier durchgeführten Messungen wird kein SP-Zustand der iRBK im Übergangsbereich zwischen RO und TT beobachtet. Die Messdaten zur Anzahl der Zellen im TT-Regime sind in Abb. 8.8 aufgetragen und in Tabelle D.1 im Anhang zusammengefasst.

Abschließend wird der charakteristische Anstellwinkel θ der Zellen in der TT-Bewegung

bestimmt (vgl. Abschnitt 3.3 und Kapitel 5). Eine Zellpopulation wird dann als im TT-Regime befindlich angesehen, wenn mehr als 50% der Zellen die TT-Bewegung vollführen. Trotz der in Abb. 8.9 gut sichtbaren, relativ großen Streuung der Winkel bei einzelnen Messpunkten, lassen sich eindeutige Trends des Winkels feststellen: RBK nehmen bei einer festen Scherspannung stets einen flacheren Anstellwinkel an als iRBK und der Anstellwinkel für eine bestimmte Zellpopulation nimmt mit zunehmender Scherspannung ab.

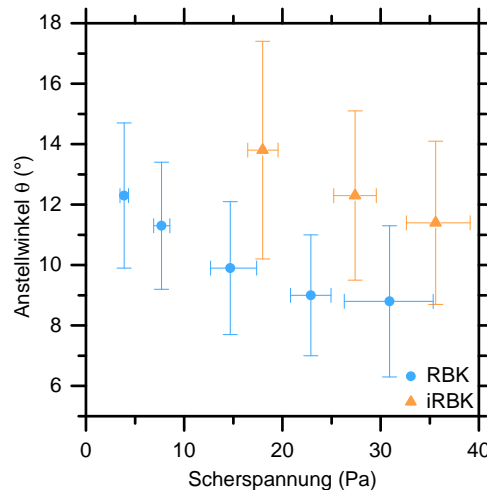


Abbildung 8.9.: Anstellwinkel tank-treadender RBK und iRBK über der Scherspannung (Abb. modifiziert aus eigener Veröffentlichung [342]).

Trägheitsabhängiger Lift-Effekt auf *Plasmodium falciparum*-infizierte rote Blutkörperchen

Die Höhe der einzelnen Zellpopulationen wird wie in Kapitel 6 beschrieben gemessen, die relative Häufigkeit in Höhenintervallen von $1 \mu\text{m}$ bestimmt und eine Gaussfunktion daran angepasst, deren Position des Maximums als mittlere Höhe der Zellpopulation und deren Standardabweichung als Maß für die Streuung innerhalb einer Population interpretiert werden. Die für iRBK und RBK bei verschiedenen Flussraten gemessenen Trajektorien sind in Abb. 8.10 zusammengestellt. Da das Verhältnis $\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}}$ für alle Messungen konstant gehalten wird, ergeben sich einheitliche Ausgangshöhen der Zellen bei x_1 von $z_{\text{RBK}} = (7,7 \pm 1,0) \mu\text{m}$ und $z_{\text{iRBK}} = (8,2 \pm 0,9) \mu\text{m}$. Es fällt zunächst auf, dass die iRBK bei allen Flussraten unterhalb der RBK bleiben. Weiterhin zeigen die Trajektorien von RBK und iRBK keine Abhängigkeit von der Flussrate (und damit von der angelegten Scherspannung), was sich auch an den Höhen am Ende des Kanals erkennen lässt (vgl. Tabelle D.1). Dies ist etwas überraschend, da sich für den Bewegungszustand und die TD durchaus deutliche Unterschiede mit der Scherspannung ergeben haben.

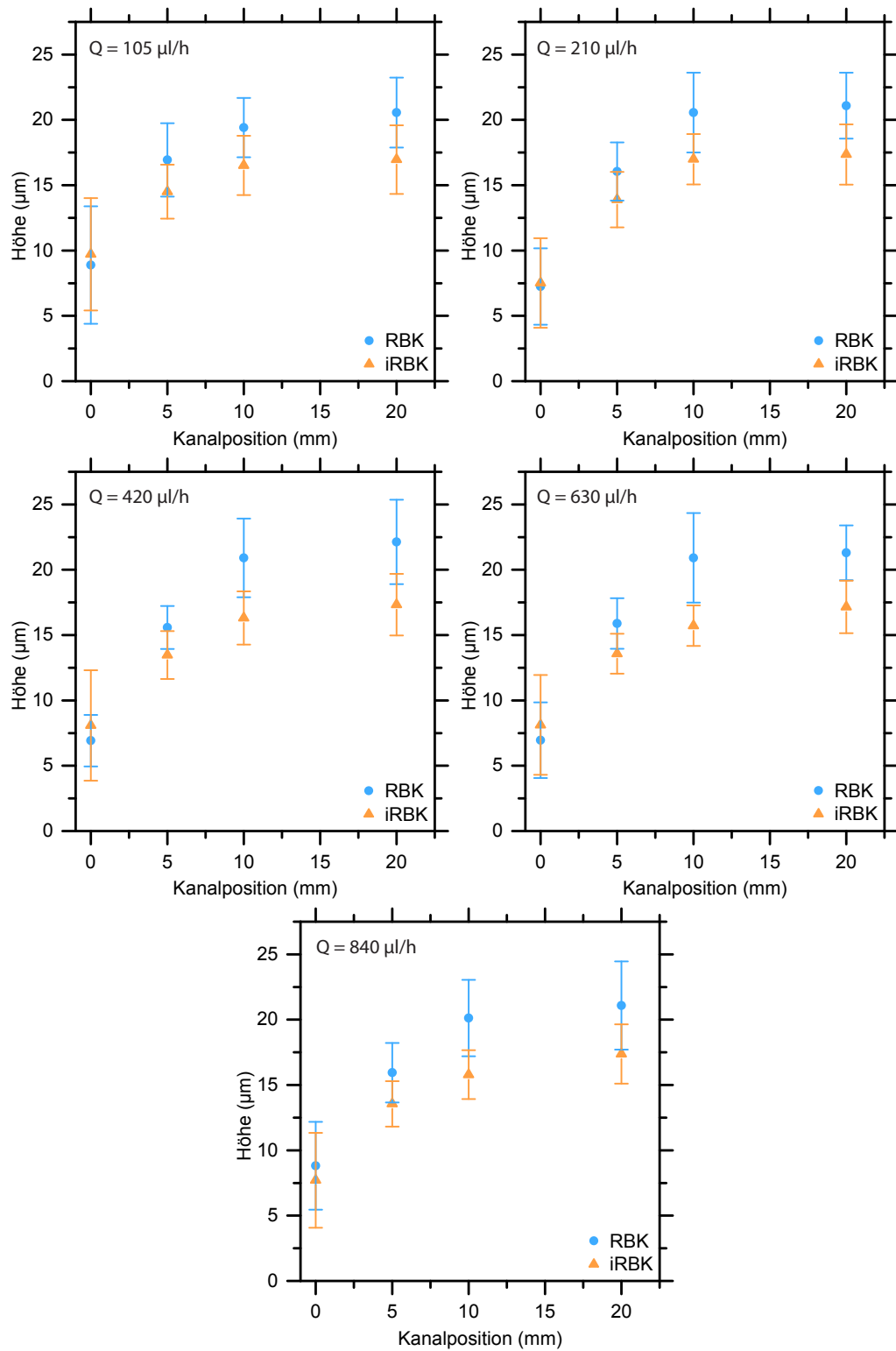


Abbildung 8.10.: Trajektorien von RBK und iRBK entlang des Kanals bei verschiedenen Flussraten (Abb. modifiziert aus eigener Veröffentlichung [342]).

8.3.3. Diskussion

Unter den gegebenen experimentellen Umständen ist der trägheitsunabhängige Lift-Effekt die einzig mögliche Ursache für die in Abb. 8.10 eindeutig zu erkennende, laterale Migration von RBK und iRBK. Durch die niedrigen Reynoldszahlen (Kanalquerschnitt $w \times h = 91 \times 102 \mu\text{m}$, $\eta_{\text{ext}} = 27 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ und $105 \mu\text{l/h} \leq Q \leq 840 \mu\text{l/h} \rightarrow 0,01 \leq Re \leq 0,1$) können nämlich Trägheitseffekte und durch den niedrigen Hämatokrit der Probensuspensionen (Hct $\approx 1\text{-}2\%$) Zell-Zell-Wechselwirkungen ausgeschlossen werden. Die genannten Parameter führen zu Scherspannungen im physiologischen Bereich von $4 \text{ Pa} \leq \tau \leq 36 \text{ Pa}$, wobei $\tau \approx 4 \text{ Pa}$ typischerweise in Arterien und $\tau \approx 30 \text{ Pa}$ in den Sinusoiden der roten Pulpa der Milz erreicht werden.

Nach der Invasion induziert der Parasit im iRBK zahlreiche Veränderungen, die bei nahezu gleichbleibender Größe hauptsächlich Form und Deformierbarkeit des iRBK betreffen (vgl. Abschnitt 8.2 bzw. Abb. 8.2). Die Abnahme des Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses führt zu einer sphärischeren Form und einer geringeren Deformierbarkeit, wobei letztere zusätzlich durch die Membranmodifikationen und die Verstoffwechslung von Hämoglobin in festes Hämozin, sowie nicht zuletzt durch den wachsenden Parasiten selbst vermindert wird. All diese Änderungen führen zu einer Veränderung der dynamischen Antwort der RBK auf eine angelegte Scherspannung im Poiseuille-Fluss.

Taylor-Deformation und Übergang ins Tank-Treading

Um die Änderungen der morphologischen und mechanischen Eigenschaften der iRBK näher zu untersuchen, wird aus den Messdaten der durchgeführten Experimente die TD bestimmt. Dazu werden (wie in Kapitel 5) die Längen der Hauptachsen in der Beobachtungsebene gemessen und über Gleichung (3.30) miteinander verknüpft. Die in Abb. 8.8 dargestellten Daten zeigen eine starke Ähnlichkeit zu den Messungen in Abb. 5.3. Der Hauptunterschied zwischen den Messungen in Kapitel 5 und den hier gezeigten ist, dass die RBK in Kapitel 5 innerhalb von acht Stunden nach der Entnahme vermessen wurden (im Folgenden „frische“ RBK (fRBK) genannt), während die hier benutzten RBK nach der Entnahme in einer Blutkonserve aufbewahrt wurden und sich direkt vor den Messungen zusammen mit den iRBK im Kulturmedium befanden. Die Kurven zeigen qualitativ den gleichen Verlauf für RBK und fRBK, der somit auch mit den vorhandenen Ektazytometrie- und Rheoskop-Messungen übereinstimmt [88, 149]. Da die Scherspannungen der einzelnen Messpunkte nicht exakt übereinstimmen, gestaltet sich ein exakter quantitativer Vergleich schwierig. Betrachtet man für einen bestimmten TD-Wert die Scherspannung, welche benötigt wird, um diesen zu erreichen, so ist diese für die hier verwendeten RBK größer als für fRBK. Der Unterschied liegt dabei etwa in der Größenordnung von $\Delta\tau \approx 3 \text{ Pa}$. Demnach sind die RBK, welche in der Blutkonserve gelagert wurden und mit den iRBK in der Kultur waren, etwas weniger deformierbar als die in Kapitel 5 verwendeten fRBK. Aufgrund der relativ großen Streuung von TD und τ bei den Einzelmessungen müsste dieser Zusammenhang allerdings in einer extra Studie nochmals überprüft werden.

Vergleicht man weiterhin die TD von RBK und iRBK bei gegebener Scherspannung, so ist sie für iRBK durchgehend niedriger als für RBK. Dies ist ein eindeutiger Nachweis

für die geringere Deformierbarkeit der iRBK. Ein genauer quantitativer Vergleich ist nicht möglich, da die iRBK im untersuchten Scherspannungsbereich an keinem Punkt die gleiche TD aufweisen wie RBK (vgl. Abb. 8.8 und Tabelle D.1 im Anhang).

Im hier untersuchten Parameterbereich zeigt sich für iRBK eine ähnliche Stufe in der TD wie für RBK beim höheren Viskositätskontrast in Kapitel 5. Anfänglich sehr niedrig, steigt die TD zwischen $9 \text{ Pa} \leq \tau \leq 18 \text{ Pa}$ stark an, bevor sie schließlich nahezu konstant bleibt. Diese Stufe entsteht durch die Reorientierung der iRBK beim Wechsel von der Rolling- in die Tank-Treading-Bewegung, was auch durch die Messung der Anzahl der tank-treadenden Zellen im rechten Graph in Abb. 8.8 und in Tabelle D.1 belegt wird. Im Vergleich zu Kapitel 5 fällt auf, dass in den hier vorliegenden Messungen kein Spinning-Zustand für iRBK beobachtet wird. Auch dieses Phänomen kann anhand der vorliegenden Messungen nicht im Detail geklärt werden, da zum Einen die Vergleichbarkeit der beiden Messreihen unzureichend ist und, zum Anderen, bisher keine theoretische Beschreibung des SP-Zustandes existiert. Somit kann nur vermutet werden, dass das kleinere Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis die für die Ausbildung der trilobularen Form (vgl. Abschnitt 3.3) notwendigen Membranauslenkungen verhindert. Auch der durch die parasitären Proteine hervorgerufene, höhere Schermodul der iRBK-Membran könnte dabei eine Rolle spielen.

Betrachtet man die gesunden RBK, so befinden sich diese im untersuchten Scherspannungsbereich durchgehend in einem stabilen TT-Zustand, was mit bereits veröffentlichten Messungen und Simulationen übereinstimmt [65, 114, 128, 145, 193, 194]. Für iRBK im Trophozoiten-Stadium setzt die TT-Bewegung hingegen erst bei $\tau > 4,6 \text{ Pa}$ ein und die Mehrzahl der iRBK befindet sich erst ab $\tau \geq 18,0 \text{ Pa}$ im TT-Zustand. Dieser Übergangsbereich stimmt hervorragend mit den Rheoskop-Messungen von Cranston *et al.* [193] überein. Bei der höchsten dort verwendeten Scherspannung von $\tau = 8,0 \text{ Pa}$ befinden sich im Rheoskop 20% der iRBK im TT-Zustand, während es in den hier präsentierten Experimenten bei $\tau = 9,0 \text{ Pa}$ ($30 \pm 9\%$) sind. Für Scherspannungen $\tau \geq 18,0 \text{ Pa}$ befinden sich schließlich über 90 % der iRBK im TT-Zustand. Solch hohe Scherspannungen wurden in bisherigen Arbeiten nicht erwähnt.

Als schwieriger erweist sich der Vergleich mit den numerischen Simulationen von Ye *et al.*. Auch hier stimmen die Beobachtungen qualitativ überein, der Übergang der iRBK ins TT wird in der Simulation jedoch schon bei $\tau \approx 2 \text{ Pa}$ gefunden [194]. Gründe für diese Differenz könnte zum Einen das Modell von Ye *et al.* sein, in dem sie den Parasiten als nicht vorhanden annehmen und die Deformierbarkeitsänderung des iRBK ausschließlich als Erhöhung des Schermoduls der Membran berücksichtigen [194]. Dabei wird auch die Veränderung des Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses und die Erhöhung der inneren Viskosität vernachlässigt. Zum Anderen wird in den numerischen Rechnungen die RO-Bewegung nicht berücksichtigt, sondern TU als Ausgangskonfiguration angenommen. Da die RO-Bewegung aber den Anstieg der Membranspannung mit der Scherspannung minimiert und sich somit der Bewegungszustand selbst stabilisiert [145], verschiebt sich der Übergang ins TT-Regime hin zu höheren Scherspannungen. Die Stabilisierung der RO-Bewegung könnte durch die parasitären Strukturen im iRBK und der iRBK-Membran noch zusätzlich verstärkt werden. So führt die Quervernetzung von Spektrin und Ankyrin sowie die Bildung der *knobs* dazu, dass die Membran einer deformierenden Kraft einen höheren Widerstand entgegensetzt und somit die RO-Bewegung gegenüber dem TT bevorzugt wird. Zudem ist noch nicht geklärt,

ob direkte Verbindungen zwischen Parasit und der iRBK-Membran bestehen [344], die einer Rotation der Membran ebenfalls eine gewisse Kraft entgegensetzen würden.

Die hier präsentierten Messungen zeigen einen Ausschnitt aus dem Phänomen der „downward inclusion“, das Ye *et al.* in ihren numerischen Simulationen ausführlich untersucht haben und das, trotz der quantitativen Mängel, die qualitativen Vorgänge richtig beschreibt [194]. Demnach durchlaufen infizierte RBK die gleichen Bewegungszustände wie gesunde RBK, erreichen jedoch aufgrund ihrer geringeren Deformierbarkeit den jeweils höheren Bewegungszustand erst bei größeren Scherspannungen. In ihren Simulationen beobachteten sie auch, dass dieses Phänomen nicht nur für RBK und iRBK auftritt, sondern auch für die einzelnen Entwicklungsstadien der iRBK, z.B. also Trophozoiten erst bei höheren Scherspannungen mit dem TT beginnen als Ringe.

Anstellwinkel im TT-Zustand

Die Orientierung von RBK im Scherfluss ist eine Konsequenz ihrer viskoelastischen Eigenschaften und verändert sich deshalb während des IEZ kontinuierlich. Beim Übergang von der RO-Bewegung zum TT ändert sich die Orientierung der Zellen stark. Im TT-Zustand besitzen die RBK einen konstanten Anstellwinkel, der sowohl von den viskoelastischen Eigenschaften der Zelle, als auch von der angelegten Scherrate und der Viskosität des externen Mediums abhängt. In den hier durchgeführten Versuchen wurde die externe Viskosität konstant gehalten und der Anstellwinkel von RBK und iRBK bei unterschiedlichen Scherspannungen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 8.9 graphisch dargestellt und in Tabelle D.1 im Anhang nochmals zusammengefasst.

Für RBK wird ein qualitativ sehr ähnlicher, abnehmender Verlauf des Anstellwinkels mit der Scherspannung beobachtet, wie der in Kapitel 5 präsentierte für fRBK. Im Rahmen der Fehlerbalken, die hier die Standardabweichung der Messwerte angeben, sind die Kurven auch quantitativ identisch. Auch der Anstellwinkel für iRBK nimmt mit zunehmender Scherspannung ab. Dieses Verhalten war aufgrund von Simulationen [146] und Messungen [113] für Vesikel im linearen Scherfeld sowie den in Kapitel 5 präsentierten Ergebnissen zu erwarten.

Dennoch offenbaren die Messungen ein interessantes Detail, das nach den Messungen in Kapitel 5 so nicht erwartet wurde: Die Anstellwinkel für iRBK sind zu größeren Winkeln hin verschoben. Die Erwartung war, dass der größere Viskositätskontrast der iRBK im Vergleich zu RBK zu einer Abnahme des Anstellwinkels bei fester Scherrate führen würde, so wie es für die zwei Viskositätskontraste in Kapitel 5 gefunden wurde. Die bisherigen Messungen von TD, Bewegungszustand und Trajektorien belegen auch die höhere Gesamtviskosität der iRBK im Vergleich zu RBK. Dennoch scheint ein anderer Effekt zu überwiegen, nämlich die Abnahme des Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses. Diese führt zu einer Abnahme des reduzierten Volumens (vgl. Abschnitt 3.2 und [146]), was wiederum einen größeren Anstellwinkel zur Folge hat. Aus dem Verhalten des Anstellwinkels wird also deutlich, dass die Formänderung der iRBK teilweise einen größeren Einfluss auf die Dynamik der iRBK hat als die Membranversteifung und die Viskositätssteigerung des Zytoplasmas. Dieses Ergebnis ist auch für die theoretische Betrachtung des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes von Bedeutung.

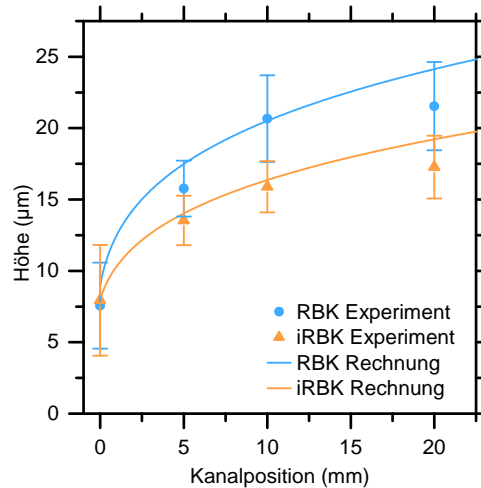


Abbildung 8.11.: Experimentell bestimmte und numerisch berechnete Trajektorien für RBK und iRBK. Gemittelte Trajektorien der Zellen bei Volumenflüssen von $Q = 420 \mu\text{l/h}$, $630 \mu\text{l/h}$ und $840 \mu\text{l/h}$ und zugehörige numerisch berechnete Bahnkurve (Abb. modifiziert aus eigener Veröffentlichung [342]).

Trägheitsunabhängiger Lift-Effekt auf *Plasmodium falciparum*-infizierte rote Blutkörperchen

Die vorangegangenen Messungen haben gezeigt, dass sich Deformierbarkeit und Form der iRBK ändern. Beide Größen entwickeln sich in eine Richtung, die zu einer Abnahme der dimensionslosen Driftgeschwindigkeit $U(\lambda, r_1, r_2)$ und somit nach Gleichung (3.38) zu einer Abnahme der Lift-Geschwindigkeit führt. Mit den Erkenntnissen aus den Untersuchungen von TD und Anstellwinkel sowie den vorherrschenden Bewegungszuständen bei den jeweiligen Scherspannungen kann der Unterschied im trägheitsunabhängigen Lift-Effekt jetzt genauer betrachtet werden.

Da die Theorie von Olla [120] Vesikel im TT-Zustand voraussetzt, werden zum Abgleich damit auch nur die Messungen verwendet, in denen sich die Mehrheit der Zellen in der TT-Bewegung befindet. Dies ist für iRBK bei den Volumenflüssen $Q = 420 \mu\text{l/h}$, $630 \mu\text{l/h}$ und $840 \mu\text{l/h}$ der Fall. Die Ergebnisse aus Kapitel 6 zeigen, dass die Flussrate selbst keinen Einfluss auf die Trajektorien der Zellen hat. Die Änderung von Form und Anstellwinkel über diese drei Flussraten hinweg ist ebenfalls sehr gering und für RBK beziehungsweise iRBK deutlich kleiner als zwischen RBK und iRBK. Dies rechtfertigt die Mittelung über alle drei Messungen um die Statistik der Experimente für den Abgleich mit der Theorie zu verbessern. Die resultierenden Trajektorien sind zusammen mit den mit Gleichung (6.1) numerisch berechneten Trajektorien in Abb. 8.11 aufgetragen. Für RBK ergibt sich erneut eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Rechnung, vor allem wenn man bedenkt, dass für die Rechnung Größe, Deformierbarkeit und dimensionslose Driftgeschwindigkeit $U(\lambda, r_1, r_2)$ eines typischen RBKs aus der Literatur angenommen wurden (wie in Tabelle 6.2 zusammengefasst), ohne die Kurve auf irgendeine Weise anzupassen.

Für iRBK ist die dimensionslose Driftgeschwindigkeit $U(\lambda, r_1, r_2)$ hingegen nicht bekannt, da keiner der drei bestimmenden Parameter bekannt ist. Da in $U(\lambda, r_1, r_2)$ aber alle Parameter der iRBK zusammengefasst sind, die durch den Parasiten während des IEZ verändert werden, wird sie für die Berechnung der zugehörigen Trajektorie soweit verringert, bis die berechnete Bahnkurve mit der experimentell ermittelten übereinstimmt. Um die in Abb. 8.11 gezeigte Trajektorie zu erzielen, muss $U(\lambda, r_1, r_2) = 0,17$ gesetzt werden. Vergleicht man diesen Wert mit dem für gesunde RBK, kann man die Änderung der Deformierbarkeit abschätzen, wenn in erster Näherung die Formänderung vernachlässigt wird und man die gesamte Änderung von $U(\lambda, r_1, r_2)$ auf die Änderung des Viskositätskontrastes zurückführt. Mit Abb. 3.11 erhält man

$$U(\lambda) = 0,17 \rightarrow \lambda \approx 1,9 \left(= \frac{\eta_{\text{int}}}{\eta_{\text{ext}}} \right) \xrightarrow{\eta_{\text{ext}}=27\text{mPa}\cdot\text{s}} \eta_{\text{int}} \approx 51\text{mPa}\cdot\text{s} \quad , \quad (8.1)$$

was im Vergleich mit der inneren Viskosität gesunder RBK bei Raumtemperatur ($\eta_{\text{int}} \approx 10 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ [89]), eine etwa 5-mal höhere innere Viskosität der infizierten RBK im Trophozoiten-Stadium ergibt.

Wie die Ergebnisse zum Anstellwinkel im TT-Zustand jedoch gezeigt haben, kann die Formänderung auch für den trägheitsunabhängigen Lift-Effekt nicht vernachlässigt werden. Berechnet man r_2 aus den für die TD gemessenen elliptischen Hauptachsen der iRBK, ergibt sich $r_2 \approx 0,41 \pm 0,02$. Dieser Wert weicht deutlich von dem für gesunde RBK ab, für welchen Theorie und Messung erneut gut übereinstimmen (Theorie: $r_1 = r_2 = 0,213$ [120], Experiment: $r_2 = 0,222 \pm 0,04$). Im verwendeten Versuchsaufbau lässt sich leider r_1 nicht bestimmen. Deshalb wird für die folgende Betrachtung angenommen, dass für iRBK genauso wie für RBK $r_1 \approx r_2$ gilt. Dies bedeutet für iRBK schließlich eine eher prolate Form, für die $U(\lambda, r_1, r_2)$ deutlich schwächer vom Viskositätskontrast abhängt als für RBK. Es ergibt sich mit Kurve c in Abb. 3.11 [120]:

$$U(\lambda, r_1, r_2) = 0,17 \rightarrow \lambda \approx 3,4 \left(= \frac{\eta_{\text{int}}}{\eta_{\text{ext}}} \right) \xrightarrow{\eta_{\text{ext}}=27\text{mPa}\cdot\text{s}} \eta_{\text{int}} \approx 92\text{mPa}\cdot\text{s} \quad . \quad (8.2)$$

Dieser Wert würde eine Abnahme der Deformierbarkeit von iRBK im Vergleich zu RBK um etwa das 9-fache bedeuten. Für beide Abschätzungen wurden einige Annahmen gemacht, die erst noch durch weitere Messungen überprüft werden müssen, womit die Bestimmung der Deformierbarkeitsänderung dann genauer möglich wäre. Vorerst kann mit dieser relativ groben Abschätzung lediglich festgehalten werden, dass das iRBK im Vergleich zu gesunden RBK etwa 5- bis 9-mal weniger deformierbar ist, ein Bereich der gut mit den in Abschnitt 8.2.3 zusammengestellten Literaturwerten übereinstimmt, die hier der Übersichtlichkeit halber nochmals kurz wiederholt werden: Aus ihren dynamischen Messungen in einem mikrofluidischen Kanal errechneten Guo *et al.* eine (7 ± 2) -fache Abnahme der Deformierbarkeit [99]. Dieses Ergebnis stimmt ziemlich exakt mit der Abschätzung aus dem trägheitsunabhängigen Lift-Effekt überein. Statische Messungen mittels *diffraction phase microscopy* ((6 ± 2) -fach, [97]), *optical tweezers* (~ 4 -fach, [327, 345]) und Mikropipette (~ 4 -fach, [326]) kommen zu geringeren Deformierbarkeitsverlusten, bleiben aber grundsätzlich in der gleichen Größenordnung wie die hier bestimmten Werte. Für die starken Schwankungen gibt es mehrere mögliche Erklärungen: (i) unterschiedliches Alter der für die

Parasitenkultur verwendeten RBK, (ii) unterschiedlicher Zeitpunkt der Messungen während des Trophoziten-Stadiums und (iii) der unterschiedliche Charakter der Messmethoden (z.B. statisch/dynamisch, vgl. [119]) und die daraus resultierende unterschiedliche Gewichtung der RBK-Eigenschaften (vgl. Abschnitt 3.2.4).

Abschließend sei darauf hingewiesen, dass kein Unterschied zwischen den Trajektorien für iRBK im RO- und im TT-Zustand gemessen werden konnte. Da der Lift-Effekt für Zellen mit $z \gg R$ in beiden Bewegungszuständen mit z^{-2} skaliert (vgl. Abschnitt 3.4.2), deutet dies darauf hin, dass die Unterschiede aufgrund des Bewegungszustandes zu klein sind, um im verwendeten Versuchsaufbau aufgelöst zu werden.

8.3.4. Zusammenfassung, Interpretation und Ausblick

Eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* hat schwerwiegende Auswirkungen auf die rheologischen Eigenschaften roter Blutkörperchen *in vivo*. In den hier vorgestellten *in vitro* Experimenten wird das Verhalten einzelner RBK in Mikrokanälen als Modellsystem für den physiologischen Blutfluss untersucht, mit besonderem Fokus auf den trägheitsunabhängigen Lift-Effekt, um die physikalischen Hintergründe dieser rheologischen Störungen zu ergründen. In Analogie zu Kapitel 5 wurden zu diesem Zweck die Taylor-Deformation, der Bewegungszustand und der Anstellwinkel von RBK und iRBK im TT-Zustand bestimmt. Weiterhin wurden für mehrere Flussraten, welche physiologische Scherspannungen im Kanal erzeugen, Trajektorien der Zellen aufgenommen und miteinander verglichen.

Bei den in diesem Kapitel durchgeführten Versuchen wurden nicht RBK aus frisch entnommenen Blutproben verwendet, sondern RBK aus einer Blutkonserve, die innerhalb von maximal einer Woche nach Blutentnahme in die *P. falciparum*-Zellkultur gegeben wurden. Sobald die iRBK das späte Trophoziten-Stadium erreicht hatten (32 - 36 Stunden p.i.), wurde ein Teil der Zellkultur per MACS getrennt und die infizierten sowie die nicht-infizierten RBK vermessen. Somit haben RBK und iRBK die gleiche Vorgeschichte und Einflüsse, wie z.B. durch den Aufenthalt im Zellkulturmedium, stören den Vergleich beider Zelltypen nicht. Im Rahmen dieses Kapitels werden die Zellen aus Kapitel 5, welche innerhalb von acht Stunden nach der Entnahme aus dem Spender vermessen wurden, deshalb als „frische“ RBK (kurz fRBK) bezeichnet.

Die Messdaten zur Taylor-Deformation unter verschiedenen Scherspannungen belegen eindeutig die reduzierte Deformierbarkeit von iRBK, wobei am Verlauf der Messkurve auch der Übergang vom RO- in den TT-Zustand zu erkennen ist. Während der Scherspannungsbereich des Übergangs in hervorragender Übereinstimmung mit Messungen von Cranston *et al.* ist [193], wurde, im Vergleich zu numerischen Simulationen, lediglich eine qualitative Übereinstimmung gefunden. Grund für die quantitativen Unterschiede zwischen Messung und Simulation könnten die Annahmen der Simulation sein, in der die Präsenz des Parasiten vernachlässigt und die Änderungen ausschließlich als zusätzlicher Beitrag zum Schermodul der Membran berücksichtigt werden. Endgültig geklärt werden kann dieser Sachverhalt erst, wenn die in Abschnitt 3.2.4 kurz diskutierte Frage nach dem Einfluss der Scherviskosität der Membran auf die Gesamtviskosität des RBK beantwortet ist. Eine Auszählung der Zellen in Anbetracht ihres Bewegungszustandes bestätigte das Ergebnis der Messungen zur TD und ergab im Vergleich zu Kapitel 5 zudem, dass iRBK direkt vom RO ins TT übergehen,

ohne dass ein Spinning-Zustand beobachtet werden konnte. Gründe für diesen Unterschied könnten das reduzierte Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis der iRBK im Zusammenspiel mit den Modifikationen der Membran durch parasitäre Proteine sein. Um dieses Phänomen endgültig zu klären, bedarf es der genaueren Untersuchung der Dynamik von RBK im parabolischen Scherfluss, da bis jetzt nicht geklärt ist, wie und warum es zur Ausbildung des SP-Zustandes mit der trilobularen Form der Zelle kommt. Ein weiterer Vergleich der Ergebnisse dieses Kapitels mit den Resultaten aus Kapitel 5 gibt auch Hinweise darauf, dass die hier verwendeten RBK im Vergleich zu fRBK an Deformierbarkeit eingebüßt haben.

Für den Anstellwinkel der Zellen in der TT-Bewegung ergab sich ein etwas überraschendes Ergebnis. Während der Verlauf des Anstellwinkels über der Scherspannung für RBK und iRBK qualitativ und für RBK auch quantitativ wie erwartet mit den Ergebnissen aus Kapitel 5 übereinstimmt, zeigten iRBK für $\tau \approx \text{const.}$ einen größeren Anstellwinkel als RBK. Aufgrund der Messdaten aus Kapitel 5 und der bekannten strukturellen Veränderungen, die der Parasit am iRBK vornimmt wurde erwartet, dass die iRBK sich wie viskosere RBK verhalten und einen niedrigeren Anstellwinkel annehmen. Neben dem Viskositätskontrast hat aber eben auch das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis (beziehungsweise das reduzierte Volumen V^*) einen Einfluss auf den Anstellwinkel. Eine Verringerung des Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses bewirkt demnach eine Vergrößerung des Anstellwinkels, bis im Grenzfall sphärischer Objekte $\theta \approx 45^\circ$ gilt [113, 146]. Die hier präsentierten Messergebnisse zeigen nun, dass die Veränderung des Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses (und damit der Zellform) einen größeren Einfluss auf den Anstellwinkel infizierter RBK hat als der veränderte Viskositätskontrast.

Für den Vergleich mit der Theorie von Olla [120] wurden schließlich aufgrund der Ergebnisse über den Bewegungszustand der Zellen die Trajektorien der Messungen mit $Q = 420 \mu\text{l/h}$, $630 \mu\text{l/h}$ und $840 \mu\text{l/h}$ ausgewählt und über sie gemittelt, da in diesem Flussratenbereich die Änderung der Deformation und der Orientierung der RBK und iRBK klein und deutlich geringer ist als der Unterschied zwischen den beiden Zellpopulationen. Wie bereits in Kapitel 6 zeigte sich eine hervorragende Übereinstimmung zwischen den Messwerten und der mit den Literaturwerten aus Tabelle 6.2 und Gleichung (6.1) berechneten Trajektorie. Da alle durch den Parasiten im iRBK hervorgerufenen Änderungen der iRBK im Vergleich zu RBK in der dimensionslosen Driftgeschwindigkeit zusammengefasst sind, wurde diese schließlich als variabler Parameter zur Anpassung der Rechnung an die Messdaten für iRBK benutzt. Zusammen mit den Ergebnissen der TD und des Anstellwinkels konnte aus der Berechnung des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes eine Abschätzung für die Deformierbarkeitsänderung von iRBK im Vergleich zu RBK gemacht werden. Nach dieser Abschätzung ergibt sich, dass iRBK mit Parasiten im Trophozoiten-Stadium zwischen 5- und 9-fach weniger deformierbar sind als gesunde RBK. Diese Abschätzung passt sehr gut in das Bild der, je nach verwendeter Methode stark streuenden Werte aus der Literatur. Auch hier muss wieder berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Messmethoden eventuell verschiedene Aspekte der RBK-Deformierbarkeit unterschiedlich gewichten (vgl. Abschnitt 3.2.4). Um den mit den durchgeführten Messungen bestimmten Bereich der Deformierbarkeitsänderung weiter einzuschränken, sind zusätzliche Untersuchungen mit einem zu diesem Zweck optimierten Messaufbau sowie die Bestimmung des Formparameters r_1 notwendig. Eine solche Bestimmung hätte mehrere Vorteile gegenüber existierenden Methoden, denn sie wäre

z.B. berührungsfrei, erfolgte unter physiologischen Umständen und es könnte, im Vergleich zu z.B. Mikropipette- oder *optical tweezer*-Experimenten, eine gute Statistik erstellt werden.

Eine weitere Fragestellung, die durch solche Messungen beantwortet werden könnte, ist: Büßen nicht-infizierte RBK durch den Kontakt mit infizierten RBK beziehungsweise deren Stoffwechselprodukten an Deformierbarkeit ein? Solch ein Effekt hätte immense Auswirkungen auf die klinische Symptomatik, da von diesen Veränderungen viel mehr RBK betroffen wären als durch die Invasion der Parasiten selbst [324]. Weniger deformierbare RBK würden höhere Blutviskositäten bewirken [337] und in der Milz mit höherer Wahrscheinlichkeit aussortiert [66, 325]. Höherer Blutdruck, schlechtere Durchblutung und Anämie wären die Folge, alles Symptome, die bei einer Malaria-Erkrankung auftreten. Vergleicht man vor diesem Hintergrund die Messungen aus Kapitel 5 mit den hier durchgeführten, so stellt man fest, dass die nicht-infizierten RBK mit einer Höhe am Kanalende von $z = (21,5 \pm 0,5) \mu\text{m}$ unter vergleichbaren Bedingungen $\sim 2 \mu\text{m}$ niedriger bleiben als fRBK ($z = (23,5 \pm 0,5) \mu\text{m}$, vgl. Kapitel 5).

Ursächlich für diesen Steighöhenunterschied können zwei Effekte sein: (i) Deformierbarkeitsverlust der RBK in der Blutkonserve [190, 346] und (ii) oxidative Veränderungen der RBK-Membran durch Kontakt mit iRBK beziehungsweise Produkten des parasitären Stoffwechsels [325, 347]. Da in den präsentierten Versuchen ausschließlich Blutkonserven mit einem Alter von bis zu einer Woche nach Blutentnahme zur Anwendung kamen, ist der Effekt durch Alterung in der Blutkonserve sehr gering [190]. Somit bliebe als mögliche Erklärung nur noch die oxidative Veränderung der RBK-Membran. Der Vergleich beider Messreihen ergibt zusammen mit den Unterschieden der TD ein erstes Indiz auf diese Veränderung, muss aber, um eine definitive Aussage tätigen zu können, durch weitere Messungen ergänzt werden. Bei diesen müssen die Einflüsse auf die roten Blutkörperchen durch Lagerung, Zellkultur und oxidative Effekte systematisch untersucht und z.B. mit Messungen an fRBK, denen künstlich oxidative Schäden (z.B. durch Chemikalien) zugefügt wurden, verglichen werden.

Die physiologische Interpretation der bisher vorgestellten Ergebnisse beginnt bei der direkten und indirekten Beeinflussung der Rheologie des Blutflusses durch die RBK. Eine Infektion mit *P. falciparum* wirkt sich nun ebenfalls auf direktem und indirektem Weg auf den Blutfluss aus. Zum Einen wird die Gesamtviskosität durch die steiferen iRBK erhöht [337] und zum Anderen wird der Fåhræus-Lindqvist-Effekt geschwächt. Der zellfreie Bereich an den Kanalwänden schrumpft durch den schwächeren trägheitsbedingten Lift-Effekt, was zu erhöhter Reibung und somit zu einer höheren effektiven Viskosität der Suspension führt [337, 338]. Der Körper hat nun zwei Möglichkeiten, diesem Phänomen zu begegnen: Er kann den Blutdruck erhöhen, um den Volumenfluss konstant zu halten, wodurch die Belastung des gesamten Kreislaufsystems zunimmt, oder er hält den Druck konstant und nimmt einen geringeren Volumenfluss in Kauf. Letzterer führt zu niedrigeren Fließgeschwindigkeiten in den Blutgefäßen, wodurch Zytoadhäsions-Mechanismen wie Sequestration oder Rosetting begünstigt werden [307, 348, 349].

Weiterhin erfahren iRBKs einen Marginations-Effekt, der bisher bereits für weiße Blutkörperchen [198, 288, 350] und Blutplättchen [128] im Detail untersucht wurde. Für WBK tritt Margination dann auf, wenn sich die RBK im Durchschnitt auf zentrumsnäheren Stromlinien befinden als die WBK. Um diese Situation herbeizuführen, bedarf es einer Migration der

RBK, die durch den trägheitsunabhängigen Lift-Effekt hervorgerufen wird, der für RBK stärker ist als für WBK [288]. Durch das parabolische Geschwindigkeitsprofil interagieren dann mehr RBK auf der zum Kanalzentrum hin gelegenen Seite mit dem WBK als auf der zur Kanalwand hin gelegenen, wodurch das WBK in Richtung Wand verdrängt wird. Dass Margination stattfinden kann, bedarf es zahlreicher Interaktionen zwischen den Zellen, wozu eine hohe Zellkonzentration notwendig ist. Endergebnis ist die Verdrängung der WBK auf Trajektorien, die näher an der Wand liegen als die der RBK. Die Stärke des Marginations-Effektes hängt, neben der relativen Zellkonzentrationen (nimmt die Konzentration der (häufigeren) Teilchen ab (z.B. der RBK), nimmt auch der Marginations-Effekt ab [337]), vor allem von der unterschiedlichen Stärke des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes ab. Verändert sich dieser Unterschied, so verändert sich auch das Ausmaß der Margination und es wurde z.B. gezeigt, dass für WBK mit einer höheren Deformierbarkeit ein schwächerer Marginations-Effekt auftritt als für weniger deformierbare [198, 288].

Zellen wie WBK und BP werden also durch Margination in Gefäßbereiche verdrängt, in denen langsamere Fließgeschwindigkeiten vorherrschen und in denen sie mehr Kontakt zum Endothel haben. Wie in den hier präsentierten Versuchen gezeigt wurde, ist der trägheitsunabhängige Lift-Effekt auch für iRBK kleiner als für RBK, was für diese bedeutet: (i) iRBK erfahren einen Marginations-Effekt aufgrund des für sie schwächeren trägheitsunabhängigen Lift-Effektes und (ii) der Marginations-Effekt nimmt mit zunehmender Reife des Parasiten durch die damit abnehmende Deformierbarkeit der iRBK zu. Durch den Marginations-Effekt auf Stromlinien näher am Endothel versetzt, können iRBK schließlich besser mit den Gefäßwänden wechselwirken, sprich sequestrieren. Neben diesem direkten Kontakt der iRBK mit dem Endothel bedeutet ihre Position nahe an den Gefäßwänden auch, dass sie an Verzweigungen des Gefäßsystems mit höherer Wahrscheinlichkeit in den kleineren Seitenkanal fließen (ähnlich dem *plasma skimming*-Effekt). In kleineren Gefäßen herrschen wiederum niedrigere Fließgeschwindigkeiten und die Abstände zu den Gefäßwänden sind kleiner. Beides ist von Vorteil für die Sequestration und verhilft den iRBK somit, die Milz-Passage zu vermeiden.

Dass der Unterschied in der Stärke des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes ausschlaggebend für diese Phänomene und für die Stärke der Sequestration ist, wird indirekt auch durch die experimentelle Studie von Flatt *et al.* [349] belegt. Darin weisen die Autoren nach, dass die Zytoadhäsion der iRBK mit einer abnehmenden Deformierbarkeit der RBK ebenfalls abnimmt. Von physikalischer Seite aus kann dieses Ergebnis schließlich nur über den schwächeren Lift-Effekt und die dadurch schwächere Margination der Zellen erklärt werden.

Abschließend sei erwähnt, dass das Marginations-Phänomen und das Abzweigen von iRBK in die kleineren Randkanäle durch Hou *et al.* zur Sortierung von iRBK aus hochkonzentrierten RBK-Suspensionen genutzt wurde [289]. Im folgenden Kapitel wird nun gezeigt, dass eine solche Sortierung auch durch die direkte Ausnutzung des unterschiedlich starken, trägheitsunabhängigen Lift-Effektes auf iRBK und RBK möglich ist.

9. Anreicherung *Plasmodium falciparum*-infizierter roter Blutkörperchen im Ring-Stadium mittels NILICS

One Ring to rule them all, One Ring to find them,
One Ring to bring them all and in the darkness bind them

(J. R. R. Tolkien - *The Lord of the Rings*)

Methoden zur Synchronisation und Anreicherung von iRBK mit Parasiten in unterschiedlichen Stadien sind Voraussetzung für eine Vielzahl wissenschaftlicher Untersuchungen, wie z.B. der Präparation von Antigenen für immunologische Untersuchungen oder für proteomische Studien, in denen eine Kontamination mit anderen Stadien oder Wirtszellen unerwünscht ist [15]. Die gängigen Methoden zur Anreicherung von iRBK aus RBK-Suspensionen nutzen verschiedene physikalische oder biochemische Eigenschaften, um möglichst reine iRBK Proben (nur ein Entwicklungsstadium, keine Fremdzellen) zu erhalten. So führt die Invasion des Parasiten z.B. zu einer niedrigeren Dichte des iRBK im Vergleich zu RBK, wodurch iRBK im Trophozoiten- und Schizonten-Stadium per Dichtegradienten-Zentrifugation (z.B. mit Percoll/Ficoll) angereichert werden können [351, 352]. Die sogenannte Sorbitol-Methode nutzt die erhöhte Anfälligkeit der iRBK im Trophozoiten- und Schizonten-Stadium auf Schwankungen des osmotischen Drucks [193, 344, 353]. Eine Erhöhung des osmotischen Drucks durch Zugabe von Sorbitol bringt reifere iRBK zum Platzen und wird deshalb auch standardmäßig zur Synchronisation von Parasitenkulturen verwendet. Bei der Gel-Flotation werden die in speziellen Substraten reduzierten Sedimentationsraten von iRBK im Vergleich zu RBK zur Auftrennung genutzt [354]. Eine weitere, weit verbreitete Methode zur Anreicherung von iRBK ist die magnetisch aktivierte Zell-Sortierung (MACS). Diese basiert auf den paramagnetischen Eigenschaften des beim Parasitenstoffwechsel entstehenden Hämzoins [244]. Alle diese Methoden haben einen großen Nachteil: Die Auftrennung beziehungsweise Anreicherung der iRBK ist bei all diesen Methoden erst ab dem Trophozoiten-Stadium möglich, da im Ring-Stadium die Unterschiede zwischen RBK und iRBK noch zu gering sind. Eine Methode zur Anreicherung von iRBK im Ring-Stadium wäre jedoch aus diagnostischer als auch wissenschaftlicher Hinsicht von großem Interesse: (i) in Blutproben von Patienten werden bei *P. falciparum*-Infektionen meist nur Ring-Stadien gefunden, da spätere Stadien in den Blutgefäßen sequestrieren, (ii) eine direkte Anreicherung aus Patientenproben vermindert das Risiko einer *in vitro*-Adaption der Parasiten, welche die Untersuchung biologischer relevanter Prozesse im Ring-Stadium verhindern würde. Die im vorangegangenen Abschnitt vorgestellten Ergebnisse über den Unterschied im trägheitsunabhängigen Lift-Effekt auf RBK und iRBK im Trophozoiten-Stadium motivieren den Versuch, mittels

der in Kapitel 7 eingeführten NILICS-Methode, iRBK bereits im Ring-Stadium aus einer RBK-Lösung heraus zu sortieren. Das folgende Kapitel hält sich im Wesentlichen an die eigene Veröffentlichung [355].

9.1. Versuchsbeschreibung

9.1.1. Herstellung der Probenlösungen

Der *P. falciparum* Laborstrang 3D7S8 wird mit Standardmethoden kultiviert und mit einer 5 %-igen Sorbitollösung synchronisiert [343]. Frisch entnommene RBK werden für die Kultur in Blutkonserven aufbewahrt und die Experimente innerhalb einer Woche nach der Blutentnahme durchgeführt. Das Stadium der Parasiten wird vor den Experimenten durch Färbung mit Acridine Orange im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Zusammen mit der engmaschigen Beobachtung der Kultur ermöglicht dieses Vorgehen eine sehr exakte Bestimmung des Zeitpunkts nach der Invasion. Für die Versuche wird die Parasitenkultur zentrifugiert und 10 $\mu\text{l/h}$ des Pellets mit 500 $\mu\text{l/h}$ der 10 %-Dextran-Lösung verdünnt, so dass ein Hämatokrit von $\text{Hct} \approx 2\%$ erreicht wird.

9.1.2. Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau entspricht dem in Abb. 4.3 gezeigten, zur Beobachtung der Experimente kommt hier aber ein invertiertes Nikon Diaphot 300 Fluoreszenzmikroskops mit einer darauf montierten Videokamera (Hamamatsu Orca 05G) zum Einsatz.

Der für diese Versuche verwendete Mikrokanal ist in Abb. 9.1 schematisch dargestellt. Er entspricht prinzipiell dem in Kapitel 7 verwendeten, besitzt allerdings andere Maße. So ist der Kanalquerschnitt der Proben- und Fokussierfluss-Zuflüsse als auch des 20 mm langen Trennkanals $w \times h = 92 \mu\text{m} \times 102 \mu\text{m}$ in y- beziehungsweise z-Richtung. Die Verbreiterung des Kanals erfolgt hier über eine Strecke von 400 μm auf $h = 301 \mu\text{m}$ und die Trennung erfolgt schließlich wieder in zwei separate, mit Höhenreservoirs verbundene Auslässe. Die Auslässe trennen sich unter einem Winkel von 49° und sind je 250 μm hoch. Durch die Ausrichtung der Höhenreservoirs kann der Höhenoffset des Zellstromes gesteuert werden, um eine optimale Trennung zu erreichen. Direkt vor den Experimenten wird der Kanal mit einer Lösung aus 5 mg/ml BSA in PBS gespült, um unspezifische Bindungen der Zellen mit den Kanalwänden zu unterdrücken. Die Probenlösungen werden bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von $Q_{\text{Probe}} = 40 \mu\text{l/h}$ in den Kanal injiziert und mit einem Fokussierfluss von $Q_{\text{Fokus}} = 800 \mu\text{l/h}$ an die untere Kanalwand fokussiert. Das Flussratenverhältnis beträgt dementsprechend $\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}} = 20$ und die Reynoldszahl im Separationskanal beträgt $Re = 0,1$, weshalb trägheitsbedingte Effekte ausgeschlossen werden können. In den jetzt präsentierten Versuchen wird Auslass 1 als Hauptauslass genutzt und, wie in Abb. 9.1 angedeutet, die iRBK in Auslass 2 sortiert.

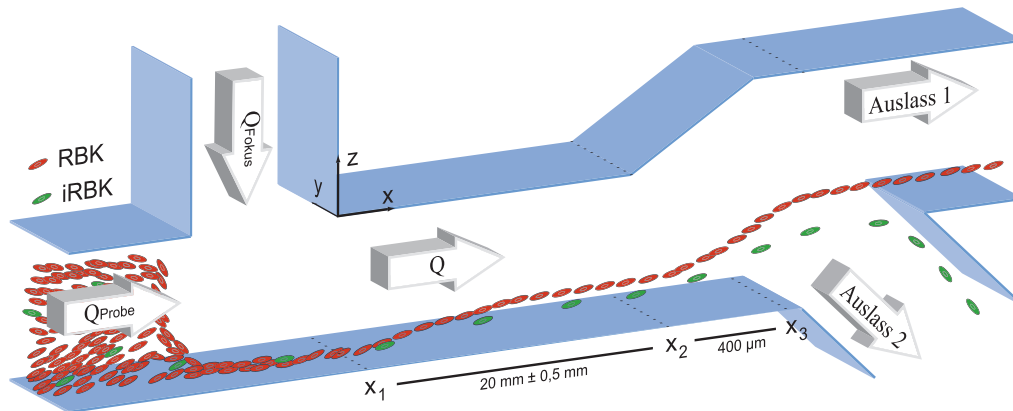


Abbildung 9.1.: Für die Trennung verwendeter Mikrokanal und Trennprinzip für die Anreicherung von iRBK im Ring-Stadium aus einer Lösung mit RBK (Abb. modifiziert aus eigener Veröffentlichung [355]).

9.1.3. Auswertung

Nach den Trennversuchen werden die ursprüngliche Probenlösung sowie die an den zwei Auslässen gesammelten Proben für je 5 Minuten bei 2000 U/min ($\sim 270g$) in einer Eppendorf Minispin-Zentrifuge zentrifugiert. Der dextranshaltige Überstand wird abgenommen und durch das gleiche Volumen PBS ersetzt, da die FACS-Auswertung Artefakte enthielt, die auf Dextran zurückzuführen waren. Die so erhaltenen Proben werden mit Hoechst 33342 (Invitrogen, Verdünnung: 1:8000 in PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Hoechst 33342 färbt die DNA der Parasiten, wodurch in der anschließend durchgeführten, fluoreszenzaktivierten Flusszytometrie (FACSVerse, BD Bioscience) iRBK von RBK unterschieden werden können. Für die Auswertung werden je 250'000 Zellen pro Probe ausgezählt, alternativ, in Proben mit wenigen Zellen, wird die Zählung 180 Sekunden lang durchgeführt. Die aus der Flusszytometrie erhaltenen Daten werden mit der Software FlowJo (Tree Star Inc.) ausgewertet und die Parasitämie P bestimmt, die der in Gleichung (7.2) definierten Probenreinheit entspricht:

$$P = \frac{n_{\text{iRBK}}}{(n_{\text{iRBK}} + n_{\text{rBK}})} \quad (\cdot 100\%) \quad . \quad (9.1)$$

Die Parasitämie der injizierten und in Auslass 2 gesammelten Proben wird benutzt, um die Anreicherung A zu berechnen:

$$A = \frac{P_{\text{Auslass 2}}}{P_{\text{Eingang}}} \quad . \quad (9.2)$$

9.2. Ergebnisse

Es werden drei voneinander unabhängige Messungen für drei Probensuspensionen aus RBK und iRBK (8 - 10 h p.i.) durchgeführt, deren Ausgangsparasitämie sich kulturbedingt

unterscheidet (vgl. Tabelle 9.1). Während des je einstündigen Sortiervorgangs werden so jeweils 40 μ l Probenvolumen sortiert. Die Höhe des Zellstromes wird an der Gabelung der Auslässe mit Hilfe der Höhenreservoire so eingestellt, dass etwa die untersten 1 % der ankommenden Zellen in Auslass 2 gesammelt werden. Die restliche Probe wird in Auslass 1 geleitet, der in diesem Fall lediglich zum Auffangen des Ausschusses dient. Da die Fluoreszenz-Intensität der iRBK (beziehungsweise der darin enthaltenen Parasiten) direkt mit der Menge der darin vorhandenen DNA korreliert, können, wie in Abb. 9.2 exemplarisch gezeigt, die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Parasiten voneinander unterschieden werden. Aufgrund der während der Kultivierung der Proben in regelmäßigen Abständen durchgeführten Synchronisation sind nur sehr wenige Trophozoiten und Schizonten in den Messungen auffindbar, was eine Unterscheidung zwischen diesen Entwicklungsstufen nicht möglich macht. Da der Fokus in diesem Abschnitt aber auf den iRBK im Ring-Stadium liegt, werden im Weiteren Trophozoiten und Schizonten unter dem Begriff „spätere Stadien“ zusammengefasst. Die gemessenen Parasitämien der einzelnen Proben vor und nach der Sortierung sind in Tabelle 9.1 zusammengefasst. In der ersten sortierten Probe wurden nicht genügend Zellen gemessen, um einen sinnvollen Intensitäts-Grenzwert für die Unterscheidung zwischen Ring- und späteren Stadien zu bestimmen.

Das zu der dargestellten FACS-Auswertung gehörige Histogramm in Abb. 9.2 illustriert die Anreicherung der iRBK im Ring-Stadium in Auslass 2 im Vergleich zur injizierten Probe und zu Auslass 1. Die Anzahl entspricht hier der jeweiligen Anzahl an gezählten Zellen in Intervallen der Fluoreszenzintensität, wobei sich die Breite dieser Intervalle jeweils um eine Größenordnung mit jeder Größenordnung auf der Intensitätsachse verbreitert. Aus den Parasitämien lassen sich mit Gleichung (9.2) die Anreicherungsfaktoren für die einzelnen Messungen berechnen und es ergibt sich durchschnittlich eine Anreicherung um den Faktor $A = 4,3 \pm 0,5$. Um die Lebensfähigkeit der iRBK nach der Anreicherung zu überprüfen, wurden die sortierten iRBK in eine neue Kultur überführt. Die optische Kontrolle im Mikroskop erbrachte keinen Unterschied in der Entwicklung der Parasiten zur entsprechenden Kontrollprobe nach 24 und 48 Stunden.

9.3. Diskussion

Im frühen Ring-Stadium spielen weder der Parasit noch die Kristallisation von Hämoglobin zu Hämozoin eine große Rolle, wenn es um die Abnahme der Deformierbarkeit der iRBK geht. Hauptursache ist nach den in Abschnitt 8.2 vorgestellten Messungen von Mills *et al.* in diesem frühen Stadium das *ring-infected surface antigen* (RESA) [318]. RESA stabilisiert die Spektrin-Tetramere des Zytoskeletts, um das Eindringen weiterer Parasiten in die bereits besetzte Wirtszelle zu unterbinden. Messungen mittels Mikropipette [318], einem mikrofluidischen Kanal mit definierten Verengungen [99] und mittels *diffraction phase microscopy* [97] kommen übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass iRBK im Ring-Stadium in etwa halb so deformierbar sind wie RBK. Die Ergebnisse dieser Methoden hängen jedoch auch stark vom Schermodul der Membran ab. Dessen Einfluss auf die Gesamtviskosität der Zelle ist allerdings immer noch ungeklärt (vgl. Abschnitt 3.2.4) und wird bei der bisherigen Betrachtung in dieser Arbeit sogar gänzlich vernachlässigt. Geht man davon aus, dass im

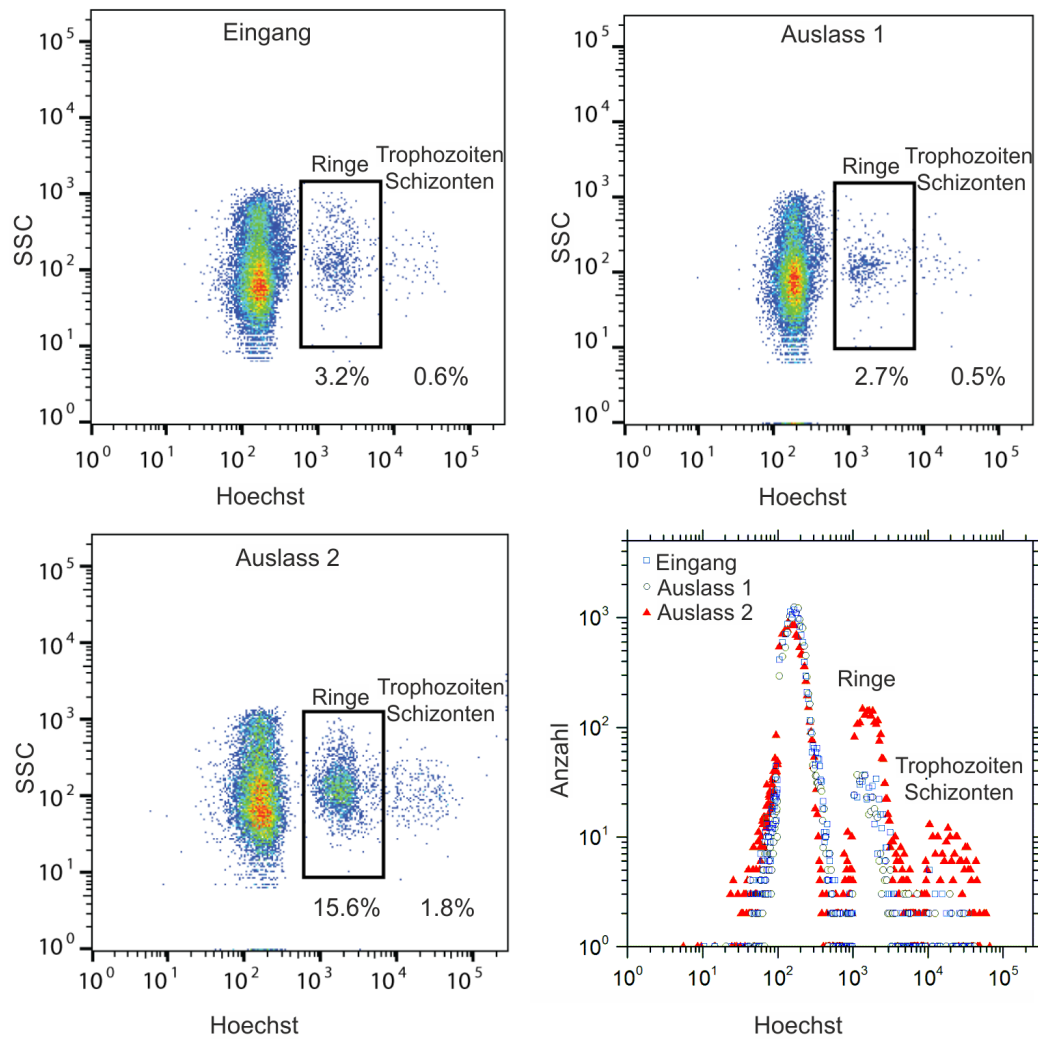


Abbildung 9.2.: Beispiel-Ergebnis der Zytometrie-Auswertung: Die Parasitämie der injizierten Probe beträgt 3,8%. Durch die Intensität des DNA-Farbstoffes Hoechst 33342, die umso höher ist, je mehr parasitäre DNA in den iRBK ist, lassen sich die Ring-Stadien (3,2%) sowie die Trophozoiten und Schizonten (0,6%) voneinander unterscheiden. Der zur Sammlung des Ausschusses genutzte Auslass 1 enthält schließlich etwas weniger iRBK, während sowohl die Ring- als auch Trophozoiten- und Schizonten-Stadien in Auslass 2 deutlich angereichert sind. Das Histogramm zeigt die absolute Anzahl der Zellen in den jeweiligen Intensitätsintervallen für alle drei Proben (Abb. modifiziert aus eigener Veröffentlichung [355]).

Tabelle 9.1.: Parasitämie P (%) der Proben am Kanaleingang, Auslass 1, Auslass 2 und der Anreicherungsfaktor A der iRBK im Ring-Stadium bzw. den späteren Stadien (Trophozoiten und Schizonten) (modifiziert aus eigener Veröffentlichung [355]).

Stadium	Eingang	Auslass 1	Auslass 2	A (Ringe)	A (spätere Stadien)
Ringe (~ 8 h p.i.)	1,6	1,6	6,1	3,8	—
spätere Stadien	—	—	—	—	—
Ringe (~ 10 h p.i.)	3,2	2,6	15,8	4,7	—
spätere Stadien	0,6	0,5	1,8	—	3,0
Ringe (~ 10 h p.i.)	3,4	2,1	15,7	4,5	—
spätere Stadien	0,6	0,5	2,0	—	3,3
			Durchschnitt:	$4,3 \pm 0,5$	$3,2 \pm 0,2$

Ring-Stadium grob geschätzt etwa 10% des iRBK-Volumens vom Parasiten eingenommen werden, hätte dies nach theoretischen Betrachtungen zur Viskosität von ineinander verschachtelten Vesikeln [356] durchaus signifikante Auswirkungen auf die Viskosität des Zytoplasmas (Timm Krüger, persönliche Mitteilung, 18. März 2015). Diese Viskositätserhöhung liegt noch dazu in der richtigen Größenordnung, um die beobachtete Veränderung der Dynamik und des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes der iRBK zu erklären. Welcher der Effekte ausschlaggebend ist, lässt sich im Rahmen dieser Arbeit aber nicht genauer klären, nichtsdestotrotz zeigen die hier präsentierten Versuche, dass der Deformierbarkeitsunterschied zwischen iRBK im frühen Ring-Stadium und RBK groß genug ist, um sie voneinander zu trennen.

Nach dem Prinzip von NILICS ermöglicht dies eine kontinuierliche Anreicherung von iRBK im frühen Ring-Stadium, ohne die iRBK dazu markieren zu müssen. Verglichen mit der einzig verfügbaren Routine-Methode zur Anreicherung von iRBK im Ring-Stadium, dem Heraussammeln einzelner Zellen mit dem Mikromanipulator, zeichnet sich die hier vorgestellte Methode durch einen hohen Probendurchsatz von $\sim 12'000$ Zellen pro Stunde aus.

Neben dem Mikromanipulator gibt es nur noch eine weitere Methode, um iRBK im Ring-Stadium anzureichern. Diese basiert auf einer mikrofluidischen Umsetzung des Marginations-Effektes und setzt deshalb die Verwendung hoher Zellkonzentrationen voraus [289]. Diese Vielzahl an RBK, die zur Sortierung notwendigerweise vorhanden sind, sowie der benutzte Effekt, nach dem die iRBK sich am Rand der RBK-Verteilung befinden, führt zwangsläufig zu vielen fehlsortierten RBK und verhindert somit das Erreichen hoher Probenreinheiten in der gesammelten Probe (vgl. Gleichung (7.2) und Gleichung (7.10)). Trotzdem wurde mit dieser Methode eine Verdoppelung der Parasitämie von späteren Stadien erreicht und demonstriert, dass die Anreicherung prinzipiell auch im Ring-Stadium funktioniert [289]. Es werden allerdings keine Zahlen für die Versuche mit iRBK im Ring-Stadium genannt [289].

Im hier präsentierten Aufbau wird im Durchschnitt eine Anreicherung von $A = 4,3 \pm 0,5$ für iRBK im frühen Ring-Stadium (8 - 10 h p.i.) erreicht. Die Probenreinheit der gesammelten Probe entspricht in diesen Versuchen der Parasitämie in Auslass 2, die mit $6,1\% \leq P \leq 15,8\%$ erfreulich hoch ist. Anreicherungsfaktor und Probenreinheit könnten dabei sogar noch verbessert werden, wenn weniger als ein Prozent der Zellen in Auslass 2 sortiert würden. Da durch dieses Verfahren jedoch weniger Zellen gesammelt würden, muss im Einzelfall über Sinn und Unsinn eines solchen Vorgehens entschieden werden.

Die durchschnittliche Anreicherung für spätere Stadien ist in den präsentierten Versuchen mit $A = 3,2 \pm 0,2$ niedriger als die für iRBK im Ring-Stadium. Da der Unterschied im trägheitsunabhängigen Lift-Effekt für diese Zellen aber größer ist als für iRBK im Ring-Stadium, erscheint dieses Ergebnis fraglich. Eine mögliche Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch liefert die angelegte Scherspannung. Gerade am Kanal Anfang, wo die Zellen noch nahe an der Wand sind, gilt $\tau \geq 36 \text{ Pa}$ und liegt damit sogar über den Werten die *in vivo* in der roten Pulpa der Milz erreicht werden ($\tau \approx 30 \text{ Pa}$) [85]. Deshalb wird vermutet, dass einige iRBK mit Parasiten im Trophoziten- bzw. Schizonten-Stadium auf dem Weg durch den Kanal platzen und somit schlicht weniger iRBK der späten Stadien am Ende des Kanals ankommen als ursprünglich injiziert werden.

9.4. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass nicht nur Zellen verschiedener Größe, sondern auch solche, die sich lediglich in Form und Deformierbarkeit unterscheiden, voneinander getrennt werden können. Dazu wurde das NILICS-System angewandt, um *Plasmodium falciparum*-infizierte RBK von gesunden RBK kontinuierlich und ohne Markierung der Zielzellen zu trennen. NILICS ermöglicht die Anreicherung von iRBK mit Parasiten im Ring-Stadium in einer bisher nicht dagewesenen Effizienz und Reinheit. Die Anreicherung von iRBK im Ring-Stadium ist von besonderer Bedeutung, weil

1. in diesem Entwicklungsstadium wichtige biologische Prozesse ablaufen, die bisher nur unzureichend untersucht werden konnten,
2. durch die direkte Anreicherung und Analyse von iRBK im Ring-Stadium *in vitro*-Adaptionen der Parasiten vor weiteren Untersuchungen vermieden werden können und
3. in peripheren Blutproben fast ausschließlich iRBK im Ring-Stadium zu finden sind, da spätere Stadien z.B. sequestrieren.

Eine Anreicherung und Detektion von iRBK im Ring-Stadium mittels eines billigen, als Einwegartikel und ohne weitere Infrastruktur funktionierenden μ TAS wäre gerade in ressourcenarmen Gebieten zur mikroskopischen Diagnose von großem Interesse. NILICS bringt alle Voraussetzungen mit, um den Teil der Anreicherung in einem solchen μ TAS übernehmen zu können.

In drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten konnten iRBK im frühen Ring-Stadium um einen Faktor von durchschnittlich $A = 4,3 \pm 0,5$ angereichert werden.

Für spätere Stadien sinkt die Anreicherung auf $A = 3,2 \pm 0,2$, da wahrscheinlich einige der iRBK den Sortierprozess nicht unbeschadet überstehen. Mit einem Durchsatz von $\sim 12'000$ Zellen pro Stunde bei einer erreichten Probenreinheit von $P \leq 16\%$ ist die hier präsentierte Methode effizienter als die Anreicherung mittels des Marginations-Effektes [289] und deutlich schneller als die einzig verfügbare Routine-Methode, dem Einzelzellsortieren mit dem Mikromanipulator.

Weitere Verbesserungen des Sortierergebnisses können durch die in der Mikrofluidik standardmäßig gegebenen Möglichkeiten der Parallelisierung beziehungsweise der In-Reihe-Schaltung mehrerer Kanäle erreicht werden. Außerdem wurde gezeigt, dass iRBK im Ring-Stadium bei Temperaturen im Fieberbereich weiter an Deformierbarkeit verlieren [318]. Dies könnte durch einen kleinen Umbau des NILICS-Systems ausgenutzt werden, um das Sortierergebnis zu verbessern. Die Optimierung des Designs des NILICS-Kanals für die Anwendung für iRBK und eine ausführlichere Charakterisierung und Optimierung der Versuchsparameter stellen den nächsten Schritt in der Entwicklung der Methode dar. So muss z.B. getestet werden, ob und, wenn ja, wie viele iRBK im Kanal zerstört werden und ob sich die Scherspannungen, welche im Kanal auf die Zellen wirken, eventuell noch verringern lassen. Die Ergebnisse aus Abschnitt 8.3 lassen z.B. vermuten, dass die Zellen auch im RO-Zustand voneinander getrennt werden können, was für die iRBK wesentlich schonender wäre als in die TT-Bewegung gezwungen zu werden. Im Anschluss an diese Optimierungen müssen Versuche mit Patientenproben durchgeführt werden. Es könnte nämlich sein, dass die Anreicherung mit frischen Patientenproben noch bessere Ergebnisse liefert als die Verwendung von *in vitro* Zellkulturen, da die Deformierbarkeit der RBK in der Blutkonserve und durch das Prozedere der Parasitenkultur bereits herabgesetzt wird. Allerdings ist unklar, ob diese Veränderungen gleichermaßen für RBK und iRBK ablaufen, weshalb eine experimentelle Untersuchung zwingend notwendig ist.

10. Zusammenfassung

You fought hard and you saved and learned,
but all of it's going to burn.
And your mind, your tiny mind,
you know you've really been so blind.

(*The Crazy World of Arthur Brown, Fire*)

Kurzzusammenfassung In dieser Arbeit wurde das Verhalten von roten Blutkörperchen (RBK) im Poiseuille-Fluss unter besonderer Berücksichtigung des trägheitsunabhängigen Lift-Effekts untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass der trägheitsunabhängige Lift-Effekt auf RBK und Blutplättchen (BP) in sehr guter Näherung mit einer für Vesikel entwickelten Theorie beschrieben werden kann. Die Abhängigkeit der Liftgeschwindigkeit von Größe, Form und Deformierbarkeit der Zellen motivierte die Ausnutzung des Lift-Effektes zur Zellsortierung und es wurde die Methode des *non-inertial lift-induced cell sorting*, kurz NILICS, entwickelt. Das Potential von NILICS zur Sortierung von Zellen nach Größe, Form und Deformierbarkeit wurde anhand der Sortierung zirkulierender Tumorzellen (nach Größe) und *Plasmodium falciparum*-infizierter RBK (nach Form/Deformierbarkeit) aus RBK-Suspensionen demonstriert. Eine Charakterisierung der Dynamik von RBK im Poiseuille-Fluss zeigte Unterschiede zu den bisher in der Literatur veröffentlichten Beschreibungen selbiger auf. Der Vergleich mit Messungen zur Dynamik von *Plasmodium falciparum*-infizierten RBK im Poiseuille-Fluss ermöglichte Rückschlüsse auf die durch den Malaria-Parasiten am RBK hervorgerufenen Modifikationen und deren Auswirkungen auf die rheologischen Eigenschaften der infizierten RBK.

Blut wurde schon früh als äußerst kritischer Bestandteil des menschlichen Körpers erkannt und mit dementsprechend großem Interesse erforscht. Bereits die ersten mikroskopischen Untersuchungen zeigten dabei, dass Blut hauptsächlich aus roten Blutkörperchen (RBK) und einer sie umgebenden Flüssigkeit, dem sogenannten Blutplasma, besteht (vgl. Kapitel 1). Weitere Untersuchungen machten schließlich deutlich, dass diese beiden Bestandteile auch die rheologischen Eigenschaften von Blut maßgeblich bestimmen (vgl. Abschnitt 3.1.3). Ein wichtiges Beispiel dafür ist der Fåhræus-Lindqvist-Effekt in der Mikrozirkulation. Er beschreibt die Ausbildung einer zellarmen Schicht in der Nähe der Gefäßwände, wodurch die Reibung zwischen RBK und Wand deutlich reduziert und der hydrodynamische Widerstand des Blutes stark gesenkt wird. Die physikalische Ursache für diesen Effekt ist der trägheitsunabhängige Lift-Effekt, eine repulsive Wechselwirkung zwischen der Wand und einem

deformierbaren Objekt, die durch den Bruch der Symmetrie des Flussfeldes bei sehr kleinen Reynoldszahlen hervorgerufen wird. Er führt zu einer Migration der deformierbaren Objekte von der Wand weg, hin zur Mitte des Kanals. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der von Olla [120] theoretisch hergeleitete Ausdruck für die Lift-Geschwindigkeit tanktreadender Vesikel im linearen Scherfeld (vgl. Gleichung (3.38)) auch auf die Migration von RBK und Blutplättchen (BP) in parabolischen Geschwindigkeitsfeldern angewandt werden kann (vgl. Kapitel 6). Die Ergebnisse der durchgeführten Messungen stimmen gut mit der theoretischen Erwartung überein, insbesondere der vorhergesagten Abhängigkeiten vom Viskositätskontrast, der Zellform und der Zellgröße. Aufgrund dieser Abhängigkeiten des trägheitsunabhängigen Lift-Effekts sind RBK, BP und harte Mikrokugeln am Ende des Mikrokanals unterschiedlich weit von der Kanalwand entfernt und voneinander getrennt. Dies ermöglicht die Sortierung der Zellen nach Größe, Form und Deformierbarkeit in separate Auslässe und motivierte die Entwicklung der *non-inertial lift induced cell sorting*-Methode, kurz NILICS.

Das Potential des NILICS-Systems zur Sortierung von Zellen nach Größe wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit anhand von Krebszellen aus RBK-Suspensionen unterschiedlicher Konzentration ($0,5\% < \text{Hct} < 40\%$) bis hin zu unverdünntem Vollblut charakterisiert (vgl. Kapitel 7). Als Modellsystem für zirkulierende Tumorzellen (CTCs) dienten dazu drei *in vitro* Krebszellkulturlinien aus unterschiedlichen Primärgeweben und mit unterschiedlicher Größe. Dies waren MV3-Melanomzellen, MCF-7 Brustkrebszellen und HEPG2 Leberkarzinomzellen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Sortierleistung zunächst mit dem Verhältnis aus Fokusfluss und Probenfluss $\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}}$ ansteigt, bis ein kritischer Wert des Flussratenverhältnisses überschritten ist, der von der Größe der Zellen abhängt. Grund für diese Abhängigkeit ist ein am Kanaleingang auftretender Pinching-Effekt. Der Pinching-Effekt ist ein sterischer Effekt und bewirkt, dass Zellen sich der Wand bis auf maximal einen Zellradius nähern können. Dies verursacht eine Vortrennung nach Größe, da der Schwerpunkt von größeren Zellen (CTCs) weiter von der Wand entfernt bleibt als der von kleineren Zellen (RBKs). Es zeigte sich, dass die Sortierleistung bei kleinen Flussratenverhältnissen stark vom Hämatokrit abhängt. Grund ist der nur schwach ausgeprägte Pinching-Effekt bei diesen Flussratenverhältnissen, wodurch es vermehrt zu störenden Zell-Zell-Wechselwirkungen bei der lateralen Migration kommt. Oberhalb des kritischen Flussratenverhältnisses ($\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}} \geq 20$) ist die Sortiereffizienz E dann konstant und es gilt im Regelfall $E \geq 90\%$ für alle untersuchten RBK-Konzentrationen und Vollblut. Die Probenreinheit P und der Anreicherungsfaktor A hängen hingegen stärker von der RBK-Konzentration ab, was an deren Definitionen liegt (vgl. Gleichungen (7.6) bis (7.8)). Im Vergleich zu anderen Sortiermethoden (vgl. Abschnitt 7.2) überzeugt der hier präsentierte NILICS-Ansatz vor allem durch seinen einfachen Aufbau und seine gute und, gegenüber den untersuchten Parametern, sehr robuste Sortierleistung. Vor allem für kleinere Krebszellen (z.B. MV3, HEPG2) übertrifft die Sortierleistung andere Methoden deutlich (vgl. Abschnitt 7.3.4).

Während die Sortierung von CTCs hauptsächlich auf der unterschiedlichen Größe der Zellen basiert, zeigten die Versuche mit Blutplättchen und harten Mikrokugeln in Kapitel 6, dass auch Form und Deformierbarkeit der Zellen als Sortierkriterium dienen können. Ein für Medizin und Biologie sehr wichtiges Beispiel, in dem sich Zellen nicht in ihrer Größe, sondern nur in ihrer Form und Deformierbarkeit voneinander unterscheiden, ist eine

Malaria-Infektion mit dem Parasiten *Plasmodium falciparum* (vgl. Abschnitt 8.1). Dieser dringt in RBK ein und verändert ihre Struktur so, dass ihr Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis ab- und die Gesamtviskosität der Zelle zunimmt (vgl. Abschnitt 8.2), was zu einer effektiv geringeren Deformierbarkeit der infizierten RBK (iRBK) im Vergleich zu gesunden RBK führt. In dieser Arbeit konnte anhand von Versuchen mit iRBK im Trophozoiten-Stadium nachgewiesen werden, dass iRBK tatsächlich einen schwächeren trägheitsunabhängigen Lift-Effekt erfahren als gesunde RBK. Biologisch gesehen ist dieses Phänomen möglicherweise Teil der Überlebensstrategie des Parasiten: Die reduzierte Deformierbarkeit der iRBK führt dazu, dass sie beim passieren der Milz aussortiert würden. Um dies zu verhindern, exprimiert der Parasit Proteine an der RBK-Oberfläche, welche an Rezeptoren an den Endothelzellen der Blutgefäße binden können (Sequestration). Der Kontakt zwischen iRBK und Endothel wird nun umso intensiver, je näher die iRBK an der Wand sind, also je schwächer der trägheitsunabhängige Lift-Effekt ist. Sequestration kann durch die Verstopfung von Gefäßen zu schwerwiegenden klinischen Komplikationen führen, wie etwa zerebraler Malaria oder Organversagen. Die in dieser Arbeit vorgestellte Studie zum trägheitsunabhängigen Lift-Effekt auf iRBK wurde mit Parasiten im Trophozoiten-Stadium durchgeführt, da es für iRBK in dieser Entwicklungsstufe bereits Anreicherungsverfahren gibt (hier MACS), mit denen sie in ausreichender Menge für die Versuche zur Verfügung gestellt werden können. Im Gegensatz hierzu existiert für iRBK im Ring-Stadium noch keine Standardmethode für eine solche Anreicherung und es können bisher nur einzelne iRBK in diesem Entwicklungsstadium mit einem Mikromanipulator aussortiert werden. Eine Anreicherung von iRBK im Ring-Stadium ist aber nicht nur für die Arbeit mit *in vitro* Zellkulturen interessant, sondern besonders für die Anreicherung von iRBK aus Patientenproben für Diagnose und Forschung. Die experimentelle Umsetzung einer solchen Anreicherung konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich demonstriert werden. Es wurde eine Erhöhung der Konzentration der iRBK um mehr als das 4-fache im Vergleich zur Ausgangskonzentration erreicht. Dieser Wert wird durch jeden folgenden Sortierdurchgang potenziert, weshalb mit wenigen Sortierdurchläufen sehr reine iRBK Proben erhalten werden können. Die Ergebnisse zeigen, dass NILICS auch zur Anreicherung von Zellen eingesetzt werden kann, die sich nur marginal in Form oder Deformierbarkeit voneinander unterscheiden.

Bei den Versuchen zur Charakterisierung des trägheitsunabhängigen Lift-Effektes auf RBK im Poiseuille-Fluss fiel auf, dass das dynamische Verhalten der RBK teilweise von dem in der Literatur beschriebenen abweicht, was die nähere Untersuchung desselben motivierte. In der Literatur werden in Abhängigkeit von der anliegenden Scherspannung und dem Viskositätskontrast Tumbling (TB), Rolling (RO), Spinning (SP), Swinging (SW) und Tank-Treading (TT) als Bewegungszustände der RBK beschrieben (vgl. Abschnitt 3.3). In dieser Arbeit konnten davon mit steigender Scherspannung jedoch nur RO, SP und TT sowie die jeweiligen Übergänge beobachtet werden. Diese Entwicklung mit zunehmender Scherspannung spiegelt sich auch in den Werten der Taylor-Deformation (TD) wieder, die für RO am niedrigsten und für TT am höchsten ist, was der stärkeren Deformation der RBK im TT-Zustand entspricht (vgl. Abb. 5.3). Innerhalb des TT-Zustandes steigt die TD erwartungsgemäß mit zunehmender Scherspannung und erreicht bei hohen Scherspannungen einen Sättigungsbereich. Die Untersuchungen zum trägheitsunabhängigen Lift-Effekt wurden hauptsächlich mit RBK im TT-Zustand durchgeführt, weshalb neben der Bestimmung des

Scherspannungsbereiches, in dem letzterer auftritt, auch der Anstellwinkel θ als eine seiner charakteristischen Größen bestimmt wurde. Bei gesunden RBK stellte sich heraus, dass der Anstellwinkel mit zunehmender Scherspannung und abnehmendem Viskositätskontrast kleiner wird (vgl. Abb. 5.3), was qualitativ mit dem Verhalten von Vesikeln übereinstimmt.

Wie für gesunde RBK, wurden auch für iRBK der Übergang ins TT-Regime, die TD sowie der Anstellwinkel im TT-Zustand in Abhängigkeit von der Scherspannung vermessen (vgl. Abschnitt 8.3). Dabei zeigten sich qualitativ ähnliche Verläufe wie für gesunde, frisch vom Spender entnommene RBK (in diesem Zusammenhang „frische“ RBK (fRBK) genannt, vgl. Kapitel 5), quantitativ unterscheiden sich die Ergebnisse jedoch teils deutlich. Bezüglich RBK und fRBK ist dies auf deren unterschiedliche Vorgeschichte zurückzuführen. Die fRBK wurden innerhalb von 8 Stunden nach der Entnahme vermessen, während die RBK in der Malaria-Studie nach der Entnahme in einer Blutkonserve aufbewahrt, innerhalb einer Woche in die Malaria-Zellkultur überführt und erst im Anschluss vermessen wurden. Die längere Lagerung nach der Entnahme führt zu einer Defomierbarkeitsabnahme und der Kontakt mit iRBK beziehungsweise deren Stoffwechselprodukten steht auch im Verdacht, die RBK-Membran zu versteifen. Die Zelltrajektorien, die TD, der Übergang ins TT-Regime und der Anstellwinkel im TT-Zustand belegen auch die geringere Defomierbarkeit der RBK im Vergleich zu fRBK. Allerdings befinden sich die Unterschiede quantitativ knapp an der Auflösungsgrenze des verwendeten Versuchsaufbaus, weshalb für verlässlichere Schlussfolgerungen weitere Messungen notwendig sind. Deutlicher fallen hingegen die Unterschiede zwischen RBK und iRBK aus, für die der Übergang in den TT-Zustand erst bei deutlich höheren Scherspannungen vollzogen wird und die TD bei einer konstanten Scherspannung deutlich niedrigere Werte aufweist (vgl. Abb. 8.8). Beides kann über eine Versteifung des Zytoskeletts und eine Zunahme der Gesamtviskosität des iRBK erklärt werden (vgl. Abschnitt 8.1). Allerdings wird für iRBK trotz ihres höheren Viskositätskontrastes ein Anstellwinkel beobachtet, der bei konstanter Scherspannung größer ist als für nicht infizierte RBK (vgl. Abb. 8.9). Grund hierfür ist das reduzierte Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis der iRBK, wodurch diese eine sphärischere Form annehmen, welche wiederum zu einem größeren Anstellwinkel führt. Die Kombination der Messergebnisse zur Dynamik und Morphologie der iRBK lässt abschließend eine Abschätzung der Defomierbarkeitsänderung von iRBK im Trophozoiten-Stadium zu. Im Vergleich mit RBK stellte sich heraus, dass iRBK etwa 5-9-mal weniger defomierbar sind.

11. Abschließender Ausblick

If my answers frighten you Vincent, then you should cease asking scary questions.

(Jules Winnfield in Pulp Fiction)

Ergänzend zu den Ausblicken der einzelnen Kapitel, werden in diesem Abschnitt abschließend Möglichkeiten aufgezeigt, die in dieser Arbeit präsentierten Studien fortzuführen und die bisher gefundenen Ergebnisse auf neue Untersuchungsobjekte zu übertragen.

11.1. Dynamik roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss

Die in Kapitel 5 durchgeführten Experimente zeigen, dass sich die Bewegungszustände roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss durchaus von den Beobachtungen im linearen Scherfluss unterscheiden können. In der Literatur wurden mit jeweils steigender Scherspannung die Übergänge TU-SW-TT [114], RO-SP-TT [136], TU-TT [65] oder auch TU-RO-SW-TT [145] beobachtet. Während Goldsmith & Marlow sowie Forsyth *et al.* ihre Messungen im Poiseuille-Fluss durchführten, fanden die Studien von Abkarian *et al.* und Dupire *et al.* in linearen Flussfeldern statt. Doch auch die Untersuchungen in ein und demselben Flussprofil kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Um das Auftreten der einzelnen Bewegungszustände näher zu untersuchen, bietet sich die Erstellung einer Phasenlandschaft der Bewegungszustände für RBK in Abhängigkeit relevanter Parameter an (ähnlich Abb. 3.6). Dies sind der Viskositätskontrast, die angelegte Scherspannung und die Krümmung des Flussprofils. Auch das Verhältnis von Zellgröße zu Kanalquerschnitt hat einen Einfluss auf die Dynamik und sollte genauer untersucht werden. Mit den Daten einer solchen Phasenlandschaft können dann kritische Größen für das Auftreten einzelner Bewegungsformen näher untersucht und die auftretenden Phänomene im Detail mit theoretischen Vorhersagen für Vesikel (z.B. [113, 127, 137, 140, 141, 146, 186]) verglichen werden. Ein solcher Abgleich von Theorie und Experiment kann neue Erkenntnisse über den Einfluss des Zytoskeletts auf das Verhalten der RBK beziehungsweise den Beitrag der Kompositmembran zur Gesamtviskosität der RBK liefern. Zudem kann die Phasenlandschaft zur Kalibrierung von Simulationen genutzt werden. Aus der Kombination von Messung, Theorie und Simulation können schließlich viele Details der dynamischen Vorgänge aufgeklärt werden. Interessant wären z.B. eine detailliertere Beschreibung des Spinning-Zustandes, der in der Literatur bisher kaum beachtet wurde und, durch die komplexe, trilobulare Form des RBKs darin dabei helfen könnte, das Wissen über die Eigenschaften der Kompositmembran zu erweitern. Auch eine genaue Vermessung des TT-Zustandes mit der TT-Frequenz, dem Anstellwinkel und der Deformation der Zellen verspricht über den Abgleich mit Theorie und Experimenten

für Vesikel und RBK in linearen Scherfeldern neue Erkenntnisse über den Einfluss der Krümmung des Flussfeldes. Weitere interessante Punkte wären z.B. auch, ob der Kanalquerschnitt oder die Ausgangsposition des RBK im Kanal einen Einfluss auf den Bewegungszustand haben.

In weiteren Studien können dann die Eigenschaften von RBK vermessen werden, die durch äußere Einwirkungen wie z.B. Krankheiten verändert wurden. Der Vergleich zu den Messdaten für gesunde RBK kann bei bekannter Modifikation der RBK, weitere Erkenntnisse über die Funktionsweise der Deformation liefern, oder bei unbekannter Modifikation der RBK, Rückschlüsse auf die im RBK induzierten Änderungen zulassen. Dieses Vorgehen wurde beispielhaft in Kapitel 8 am Beispiel von Malaria umgesetzt. Andere Parasitenspezies (vgl. Tabelle 8.1) verfolgen allerdings davon verschiedene Überlebensstrategien, weshalb iRBK z.B. bei einer *Plasmodium vivax*-Infektion deformierbarer sind als RBK. Es bietet sich deshalb an, die Studien zur Dynamik von iRBK bei Malaria-Infektionen auszudehnen. In einem nächsten Schritt ist auch interessant, wie die Dynamik und die Rheologie der RBK Zytoadhäsionsphänomene wie z.B. Sequestration oder Rosetting beeinflussen. Mögliche weitere Krankheiten, welche die Phasenlandschaft von RBK verändern sollten und sich deshalb zur Untersuchung anbieten, sind z.B. Sichelzellanämie, Thalassämie oder Diabetes. Über die Untersuchung von Krankheiten hinaus stellen auch Alterungsprozesse roter Blutkörperchen in Blutkonserven beziehungsweise Veränderungen der RBK durch radioaktive Bestrahlung mögliche Themen für weitere Studien dar. Alterungsprozesse ändern die Deformierbarkeit der RBK, was Auswirkungen auf deren rheologische Eigenschaften hat und sich unter Umständen nachteilig für den Patienten auswirken kann. Bevor Blutkonserven Patienten mit z.B. geschwächtem Immunsystem verabreicht werden, werden sie radioaktiv bestrahlt, um darin verbliebene Zellen mit Zellkern (weiße Blutkörperchen (WBK), BP) abzutöten, die zu Komplikationen führen können. Bisher wurden die Auswirkungen radioaktiver Strahlen auf die rheologischen Eigenschaften von RBK jedoch kaum untersucht, obwohl die Blutkonserven im Anschluss an die Bestrahlung eine deutlich kürzere Haltbarkeit aufweisen als davor, was auf massive Veränderungen hindeutet.

11.2. Trägheitsunabhängiger Lift-Effekt und NILICS

Eine Alternative zur radioaktiven Bestrahlung von Blutkonserven stellt z.B. die 100%-ige Aussortierung von WBK und BP aus der Blutkonserve dar, was eine mögliche neue Anwendung für das in dieser Arbeit vorgestellte NILICS-System darstellt. Um aber 100% der WBK und BP aussortieren zu können, ohne dabei zu viele der RBK zu verlieren, müssen die Sortiereffizienz und die Probenreinheit weiter verbessert werden, z.B. über die in Abschnitt 7.3.4 beschriebene Optimierung des Kanaldesigns. Weiterhin müssen die Trajektorien von WBK charakterisiert werden, um eventuell auftretende, bisher nicht beobachtete Effekte ausschließen zu können. Z.B. zeigen vorläufige Messungen, dass der trägheitsunabhängige Lift-Effekt auf WBK sehr schwach ausgeprägt ist (vgl. Abb. 11.1). Für solche Zellen, die zwar größer sind als RBK, jedoch einen schwächeren Lift-Effekt erfahren, könnte die Vortrennung nach Größe am Kanaleingang unter Umständen zu vermehrten Wechselwirkungen zwischen den Zellen führen und die Sortiereffizienz somit verschlechtern.

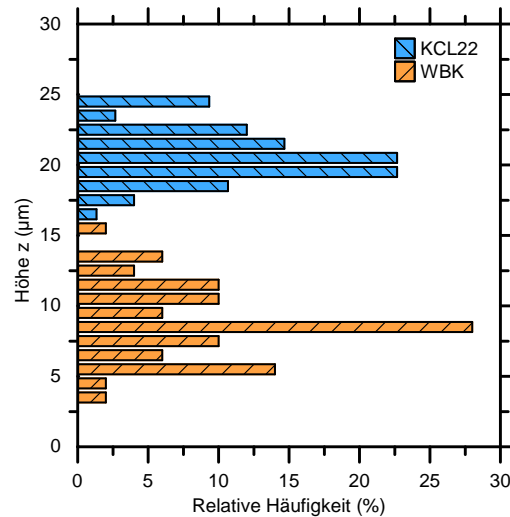


Abbildung 11.1.: Steighöhen von WBK und KCL22-Leukämiezellen. Die Zelldurchmesser sind $D_{\text{WBK}} = (8 \pm 1) \mu\text{m}$ und $D_{\text{KCL22}} = (11 \pm 1) \mu\text{m}$, der Kanalquerschnitt beträgt $66 \mu\text{m} \times 63 \mu\text{m}$, die Flussraten sind $Q_{\text{Fokus}} = 600 \mu\text{l/h} = 20 \cdot Q_{\text{Probe}}$. Die Steighöhe der WBK am Kanalende ist deutlich niedriger als die der KCL22 und die von RBK und CTCs (vgl. z.B. Abb. 7.4).

Die ebenfalls in Abb. 11.1 aufgetragenen Höhen mit der Kennzeichnung KCL22 gehören zur gleichnamigen Leukämiezelllinie. Leukämiezellen haben aufgrund ihrer Abstammung von Blutzellen etwas andere Eigenschaften als CTCs, die von Epithelzellen abstammen. Dadurch ist es noch schwerer sie mit label-basierten Methoden aus einer Blutprobe zu sortieren, was die Anwendung von NILICS wiederum interessant macht. Die in Abb. 11.1 gezeigte, vorläufige Messung für Leukämiezellen ergibt etwas niedrigere Steighöhen am Kanalende für KCL22-Zellen als für CTCs (vgl. Abb. 7.4). Die erreichte Höhe der KCL22-Zellen sollte aber immer noch ausreichen, um sie von RBK zu trennen und liegt außerdem deutlich über den für WBK gemessenen Höhen. Die Trennung von WBKs und Leukämiezellen beziehungsweise von WBKs und CTCs ist eine weitere interessante Anwendung zur Ergänzung einer zuvor erfolgten, label-basierten Trennung.

Wie mehrfach in dieser Arbeit beobachtet, erfahren auch RBK die sich nicht im TT-Zustand befinden einen trägheitsunabhängigen Lift-Effekt. Das theoretische Modell von Vlahovska *et al.* trägt dieser Tatsache Rechnung, bisher wurden aber keine systematischen, experimentellen Untersuchungen zu diesem Thema durchgeführt. Da *in vivo* TT der wohl am seltensten vorkommende Bewegungszustand ist, sind Messungen des Lift-Effektes auf RBK in anderen Bewegungszuständen für das Verständnis des Blutflusses *in vivo* von großer Relevanz.

Eine Weiterentwicklung des in dieser Arbeit benutzten experimentellen Aufbaus kann weiterhin die berührungsfreie Bestimmung mechanischer Eigenschaften von gesunden und „erkrankten“ RBK unter physiologischen Flussbedingungen ermöglichen. So ließe sich z.B.

die in Abschnitt 8.3.3 durchgeführte Abschätzung der Deformierbarkeitsänderung von iRBK deutlich präziser durchführen, wenn alle Dimensionen der Zellen bekannt wären. Solche Messungen wären von besonderer medizinischer Relevanz, da sie die Eigenschaften der Zellen im Kreislaufsystem sehr wirklichkeitsnah modellieren.

A. Zur Dynamik roter Blutkörperchen im Poiseuille-Fluss

Tabelle A.1.: Bewegungszustand roter Blutkörperchen bei verschiedenen Scherspannungen in einem Kanal mit einem Querschnitt von $110 \mu\text{m} \times 110 \mu\text{m}$ (in y- bzw. z-Richtung).

η_{ext}	Q($\mu\text{l/h}$)	$z(x_2)(\mu\text{m})$	$\gamma(\text{s}^{-1})$	$\tau(\text{Pa})$	RO	SP	TT(%)
7 mPas	50	$24,9 \pm 4,0$	45	0,3	97 ± 3	3 ± 3	0
	100	$23,2 \pm 2,9$	96	0,7	86 ± 7	14 ± 7	0
	200	$21,2 \pm 1,8$	208	1,5	38 ± 10	42 ± 10	20 ± 8
	450	$20,4 \pm 1,2$	481	3,1	12 ± 6	22 ± 8	66 ± 9
	650	$20,1 \pm 1,1$	702	4,9	5 ± 4	14 ± 7	81 ± 8
	750	$19,9 \pm 1,3$	816	5,7	2 ± 3	10 ± 6	88 ± 6
27 mPas	50	$24,9 \pm 2,1$	45	1,2	0	0	100
	100	$24,2 \pm 1,8$	92	2,5	0	0	100
	200	$24,3 \pm 0,5$	185	5,0	0	0	100
	450	$23,0 \pm 1,3$	437	11,8	0	0	100
	650	$23,0 \pm 1,8$	631	17,0	0	0	100
	750	$23,6 \pm 1,8$	711	19,2	0	0	100

B. Zum trägheitsunabhängigen Lift-Effekt auf Blutzellen im Poiseuille-Fluss

Matlab-Skript zur numerischen Berechnung der durch den trägheitsunabhängigen Lift-Effekt hervorgerufenen Trajektorien

```

clear;
% Zeitvektor
t = 0 : 5e-7 : 30;
% Länge des Vektors
Nt = length(t);
dt = t(2) - t(1);
Q = (500e-9 / 3600);
d = 110e-6; % m
r = (3.5*1e-6*3.5*1e-6*1*1e-6)^(1/3);
A = 0.36 * r^3;
B = 3/8 * Q / d^4; % 1/sm
% x_punkt = -B * (y.^2 - d^2);
% gamma_punkt = - B * (2*z - 2*d);
x = zeros(Nt, 1);
z = zeros(Nt, 1);
x(1) = 0;
z(1) = 8e-6;
% Zeitschleife
for n_t = 1 : Nt-1
x(n_t + 1) = x(n_t) - dt * B * (z(n_t)^2 - 2 * z(n_t) * d);
z(n_t + 1) = z(n_t) - dt * ((2*A*B * (z(n_t) - d) / z(n_t)^2) + 2*r^2*9.81*0.1/(9*0.027));
end
x2 = x(1 : 100000 : end);
z2 = z(1 : 100000 : end);
plot(x2, z2);
xlim([0 0.02]);

```


C. Zur Sortierung zirkulierender Tumorzellen

Tabelle C.1.: Sortiereffizienz, Probenreinheit und Anreicherungsfaktor für die Messungen mit MV3-Zellen bei unterschiedlichem Hämatokrit und Flussratenverhältnis (mit $Q_{\text{Probe}} = 20 \mu\text{l/h} = \text{const.}$). Die Fehlerbereiche entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen. Sie sind nur für die im Rahmen dieser Arbeit diskutierten Werte angegeben (modifiziert aus [290]).

Hct	$\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}}$	MV3			RBK	
		E (%)	P (%)	A	E (%)	P (%)
0,4	9	$99,3 \pm 2$	$20,3 \pm 5$	10 ± 2	92,1	99,98
	19	$98,5 \pm 2$	$51,6 \pm 7$	24 ± 4	98,0	99,97
	29	$98,6 \pm 2$	$66,6 \pm 6$	35 ± 5	99,1	99,97
4	9	$83,9 \pm 11$	$10,9 \pm 4$	39 ± 14	98,1	99,95
	19	$98,1 \pm 3$	$15,1 \pm 3$	42 ± 7	98,0	99,99
	29	$96,3 \pm 5$	$15,4 \pm 4$	56 ± 10	98,5	99,99
9	9	$19,2 \pm 9$	$1,3 \pm 1$	11 ± 6	98,3	99,91
	19	$78,5 \pm 7$	$4,6 \pm 2$	41 ± 10	98,2	99,98
	29	$100,0 \pm 0$	$5,5 \pm 2$	43 ± 8	97,8	100,00
20	20	$86,7 \pm -$	$0,6 \pm -$	$22 \pm -$	99,7	100,00
	30	$94,2 \pm 5$	$0,3 \pm 0,06$	10 ± 3	99,2	100,00
	40	$90,7 \pm -$	$0,5 \pm -$	$18 \pm -$	99,6	100,00
30	20	$88,4 \pm -$	$0,6 \pm -$	$17 \pm -$	94,8	100,00
	30	$91,4 \pm 4$	$0,8 \pm 0,2$	21 ± 6	95,7	100,00
	40	-	-	-	-	-
40	20	$96,3 \pm 5$	$0,2 \pm -$	$19 \pm -$	94,9	100,00
	30	$94,2 \pm 5$	$0,1 \pm 0,03$	14 ± 4	93,0	100,00
	40	$96,0 \pm 4$	$0,2 \pm -$	$13 \pm -$	92,5	100,00
Vollblut	30	$89,6 \pm 7$	$0,2 \pm 0,05$	22 ± 6	96,0	100,00

Tabelle C.2.: Sortiereffizienz, Probenreinheit und Anreicherungsfaktor für die Messungen mit MCF-7-Zellen bei unterschiedlichem Hämatokrit und Vollblut (mit $Q_{\text{Probe}} = 20 \mu\text{l/h} = \text{const.}$). Die Fehlerbereiche entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen.

Hct	$\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}}$	MCF-7			RBK	
		E (%)	P (%)	A	E (%)	P (%)
20	30	$93,0 \pm 4$	$1,1 \pm 0,2$	24 ± 5	96,1	99,99
30	30	$90,7 \pm 7$	$0,3 \pm 0,06$	41 ± 11	97,8	100,00
40	30	$88,7 \pm 7$	$0,2 \pm 0,05$	49 ± 14	98,2	100,00
Vollblut	30	$90,0 \pm 7$	$0,2 \pm 0,05$	24 ± 7	96,2	100,00

Tabelle C.3.: Sortiereffizienz, Probenreinheit und Anreicherungsfaktor für die Messungen mit HEPG2-Zellen bei unterschiedlichem Hämatokrit und Vollblut (mit $Q_{\text{Probe}} = 20 \mu\text{l/h} = \text{const.}$). Die Fehlerbereiche entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen.

Hct	$\frac{Q_{\text{Fokus}}}{Q_{\text{Probe}}}$	HEPG2			RBK	
		E (%)	P (%)	A	E (%)	P (%)
20	30	$93,3 \pm 6$	$0,3 \pm 0,06$	19 ± 6	95,1	100,00
30	30	$92,8 \pm 3$	$0,7 \pm 0,07$	11 ± 2	91,9	99,99
40	30	$88,5 \pm 6$	$0,2 \pm 0,03$	23 ± 5	96,1	100,00
Vollblut	30	$85,5 \pm 9$	$0,2 \pm 0,07$	24 ± 9	96,4	100,00

D. Zur Dynamik *Plasmodium falciparum*-infizierter RBK im Poiseuille-Fluss

Tabelle D.1.: Höhe der Zellen am Kanalende (Pos. x_4) und die dort anliegenden Scherraten bzw. -spannungen sowie die Anzahl der tank-treadenden Zellen, der Anstellwinkel und die Taylor-Deformation bei unterschiedlichen Volumenflüssen (modifiziert aus [342]).

$Q(\mu\text{l/h})$	Zellart	$z(x_4)$ (μm)	γ (s^{-1})	τ (Pa)	TD	θ ($^\circ$)	TT(%)
105	RBK	$20,6 \pm 2,7$	145	3,9	$0,57 \pm 0,03$	$12,3 \pm 2,4$	100 ± 2
	iRBK	$17,0 \pm 2,6$	169	4,6	$0,12 \pm 0,04$	—	0 ± 2
210	RBK	$21,1 \pm 2,5$	285	7,7	$0,61 \pm 0,04$	$11,3 \pm 2,1$	100 ± 2
	iRBK	$17,4 \pm 2,3$	332	9,0	$0,21 \pm 0,09$	—	30 ± 9
420	RBK	$22,1 \pm 3,2$	545	14,7	$0,65 \pm 0,03$	$9,9 \pm 2,2$	100 ± 2
	iRBK	$17,3 \pm 2,4$	667	18,0	$0,40 \pm 0,07$	$13,8 \pm 3,6$	93 ± 5
630	RBK	$21,3 \pm 2,1$	847	22,9	$0,67 \pm 0,04$	$9,0 \pm 2,0$	100 ± 2
	iRBK	$17,2 \pm 2,0$	1004	27,1	$0,41 \pm 0,07$	$12,3 \pm 2,8$	92 ± 6
840	RBK	$21,1 \pm 3,4$	1145	30,9	$0,68 \pm 0,04$	$8,8 \pm 2,5$	100 ± 2
	iRBK	$17,4 \pm 2,3$	1320	35,6	$0,43 \pm 0,06$	$11,4 \pm 2,7$	92 ± 6

Literatur

- [1] G. D. Hart. „Description of blood and blood disorders before the advent of laboratory studies“. In: *British Journal of Haematology* 115.4 (2001), S. 719–728.
- [2] M. Bujalkova, S. Straka und A. Jureckova. „Hippocrates' humoral pathology in nowadays' reflections.“ In: *Bratislavské Lekárske Listy* 102.10 (2001), S. 489–492.
- [3] R. Fahraeus. „The suspension stability of the blood“. In: *Physiological Reviews* 9.2 (1929), S. 241–274.
- [4] I. Kushner. „The 4 Humors and Erythrocyte Sedimentation“. In: *The American Journal of the Medical Sciences* 346.2 (2013), S. 154–157.
- [5] R. M. Stelmack und A. Stalikas. „Galen and the humour theory of temperament“. In: *Personality and Individual Differences* 12.3 (1991), S. 255–263.
- [6] R. Fahraeus. „Die Grundlagen der neueren Humoralpathologie Die frühe Geschichte der Mikrozirkulation“. In: *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 333.2 (1960), S. 176–189.
- [7] F. T. Lewis. „The Shape of Mammalian Red Blood Corpuscles.“ In: *The Journal of Medical Research* 10.4 (1904), S. 513–517.
- [8] S. I. Hajdu. „A note from history: The discovery of blood cells“. In: *Annals of Clinical and Laboratory Science* 33.2 (2003), S. 237–238.
- [9] H. L. Goldsmith, G. R. Cokelet und P. Gaehtgens. „Robin Fahraeus: evolution of his concepts in cardiovascular physiology.“ In: *The American Journal of Physiology* 257.3 Pt 2 (1989), H1005–H1015.
- [10] S. P. Sutera und R. Skalak. „The History of Poiseuille's Law“. In: *Annual Review of Fluid Mechanics* 25.1 (1993), S. 1–20.
- [11] D. Meschede, Hrsg. *Gerthsen Physik*. 23. Aufl. Berlin/Heidelberg/New York: Springer, 2006.
- [12] W. R. Hess. „Gehorcht das Blut dem allgemeinen Strömungsgesetz der Flüssigkeiten?“ In: *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 162.5 (1915), S. 187–224.
- [13] R. Fahraeus. „Die Strömungsverhältnisse und die Verteilung der Blutzellen im Gefäßsystem“. In: *Klinische Wochenschrift* 7.3 (1928), S. 100–106.
- [14] R. Fahraeus und T. Lindqvist. „The Viscosity of the blood in narrow capillary tubes“. In: *American Journal of Physiology* 8 (1931), S. 562–568.

- [15] T. M. Geislinger und T. Franke. „Hydrodynamic lift of vesicles and red blood cells in flow - from Fahraeus-Lindqvist to microfluidic cell sorting“. In: *Advances in Colloid and Interface Science* 208 (2014), S. 161–176.
- [16] L. Dintenfass. „Inversion of the Fahraeus–Lindqvist Phenomenon in Blood Flow through Capillaries of Diminishing Radius“. In: *Nature* 215.5105 (1967), S. 1099–1100.
- [17] S. R. Whittaker und F. R. Winton. „The apparent viscosity of blood flowing in the isolated hindlimb of the dog, and its variation with corpuscular concentration.“ In: *The Journal of Physiology* 78.4 (1933), S. 339–369.
- [18] S. Chien, S. Usami, R. J. Dellenback, M. I. Gregersen, L. B. Nanninga und M. M. Guest. „Blood Viscosity: Influence of Erythrocyte Aggregation“. In: *Science* 157.3790 (1967), S. 829–831.
- [19] S. Chien. „Red Cell Deformability and its Relevance to Blood Flow“. In: *Annual Review of Physiology* 49.1 (1987), S. 177–192.
- [20] A. Einstein. „Eine neue Bestimmung der Moleküldimensionen“. In: *Annalen der Physik* 324.2 (1906), S. 289–306.
- [21] M. Mooney. „The viscosity of a concentrated suspension of spherical particles“. In: *Journal of Colloid Science* 6.2 (1951), S. 162–170.
- [22] G. Segré und A. Silberberg. „Radial Particle Displacements in Poiseuille Flow of Suspensions“. In: *Nature* 189.4760 (1961), S. 209–210.
- [23] H. L. Goldsmith und S. G. Mason. „Axial Migration of Particles in Poiseuille Flow“. In: *Nature* 190.4781 (1961), S. 1095–1096.
- [24] P. G. Saffman. „The lift on a small sphere in a slow shear flow“. In: *Journal of Fluid Mechanics* 22.02 (1965), S. 385.
- [25] P. Tabeling. *Introduction to microfluidics*. Oxford University Press, 2005.
- [26] H. A. Stone und S. Kim. „Microfluidics: Basic issues, applications, and challenges“. In: *AIChE Journal* 47.6 (2001), S. 1250–1254.
- [27] X. M. Zhao, Y. Xia und G. M. Whitesides. „Soft lithographic methods for nanofabrication“. In: *J. Mater. Chem.* 7 (1997), S. 1069–1074.
- [28] Y. Xia und G. M. Whitesides. „Soft Lithography“. In: *Annual Review of Materials Science* 28.1 (1998), S. 153–184.
- [29] G. M. Whitesides. „The origins and the future of microfluidics“. In: *Nature* 442.7101 (2006), S. 368–373.
- [30] H. Yin und D. Marshall. „Microfluidics for single cell analysis“. In: *Current Opinion in Biotechnology* 23.1 (2012), S. 110–119.
- [31] E. Brouzes, M. Medkova, N. Savenelli, D. Marran, M. Twardowski, J. B. Hutchison, J. M. Rothberg, D. R. Link, N. Perrimon und M. L. Samuels. „Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.34 (2009), S. 14195–14200.

- [32] T. Franke und A. Wixforth. „Das Labor auf dem Chip: Mikrofluidik“. In: *Physik in unserer Zeit* 38.2 (2007), S. 88–94.
- [33] T. A. Franke und A. Wixforth. „Microfluidics for Miniaturized Laboratories on a Chip“. In: *ChemPhysChem* 9.15 (2008), S. 2140–2156.
- [34] P. Abgrall und A.-M. Gué. „Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem-a review“. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 17.5 (2007), R15–R49.
- [35] P. S. Dittrich und A. Manz. „Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery“. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 5.3 (2006), S. 210–218.
- [36] A. M. Streets und Y. Huang. „Chip in a lab: Microfluidics for next generation life science research“. In: *Biomicrofluidics* 7.1 (2013), S. 011302.
- [37] S.-Y. Teh, R. Lin, L.-H. Hung und A. P. Lee. „Droplet microfluidics“. In: *Lab on a Chip* 8.2 (2008), S. 198.
- [38] C. J. Easley, J. M. Karlinsey, J. M. Bienvenue, L. A. Legendre, M. G. Roper, S. H. Feldman, M. A. Hughes, E. L. Hewlett, T. J. Merkel, J. P. Ferrance und J. P. Landers. „A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.51 (2006), S. 19272–19277.
- [39] E. M. Purcell. „Life at Low Reynolds Number“. In: *American Journal of Physics* 45.June 1976 (1977), S. 3–11.
- [40] T. M. Squires und S. R. Quake. „Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale“. In: *Reviews of Modern Physics* 77.3 (2005), S. 977–1026.
- [41] D. J. Beebe, G. A. Mensing und G. M. Walker. „Physics and Applications of Microfluidics in Biology“. In: *Annual Review of Biomedical Engineering* 4.1 (2002), S. 261–286.
- [42] H. A. Stone, A. D. Stroock und A. Ajdari. „Engineering Flows in Small Devices“. In: *Annual Review of Fluid Mechanics* 36.1 (2004), S. 381–411.
- [43] M. Abkarian, M. Faivre, R. Horton, K. Smistrup, C. A. Best-Popescu und H. A. Stone. „Cellular-scale hydrodynamics“. In: *Biomedical Materials* 3.3 (2008), S. 034011.
- [44] Y.-C. Chen, G.-Y. Chen, Y.-C. Lin und G.-J. Wang. „A lab-on-a-chip capillary network for red blood cell hydrodynamics“. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 9.2-3 (2010), S. 585–591.
- [45] D. Abreu, M. Levant, V. Steinberg und U. Seifert. „Fluid vesicles in flow.“ In: *Advances in Colloid and Interface Science* 208 (2014), S. 129–141.
- [46] L. Landau und E. Lifshitz. *Lehrbuch der Theoretischen Physik Vol. VI Hydrodynamik*. 2. Aufl. Pergamon Press, 1987.
- [47] G. K. Batchelor. *An Introduction to Fluid Mechanics*. Cambridge: Cambridge University Press, 1967.
- [48] T. E. Faber. *Fluid Mechanics for Physicists*. Cambridge University Press, 1995.

- [49] S. Braunmüller. „Untersuchung des dynamischen Verhaltens roter Blutkörperchen in mikrofluidischen Systemen“. Diss. Universität Augsburg, 2011, S. 166.
- [50] O. K. Baskurt und H. J. Meiselman. „Blood Rheology and Hemodynamics“. In: *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 29.5 (2003), S. 435–450.
- [51] T. Mezger. *Das Rheologie-Handbuch: für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern*. Hrsg. von U. Zorll. 1. Aufl. Hannover: Curt R. Vincentz Verlag, 2000.
- [52] M. Gad-el Hak. „The Fluid Mechanics of Microdevices-The Freeman Scholar Lecture“. In: *Journal of Fluids Engineering* 121.1 (1999), S. 5.
- [53] D. Di Carlo. „Inertial microfluidics“. In: *Lab on a Chip* 9.21 (2009), S. 3038.
- [54] J. W. Prothero und A. C. Burton. „The Physics of Blood Flow in Capillaires“. In: *Biophysical Journal* 2.2 (1962), S. 199–212.
- [55] D. N. Ku. „Blood Flow in Arteries“. In: *Annual Review of Fluid Mechanics* 29.1 (1997), S. 399–434.
- [56] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins und M. Toner. „Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.48 (2007), S. 18892–18897.
- [57] E. Sackmann und R. Merkel. *Lehrbuch der Biophysik*. Hrsg. von Wiley-VCH. 2. Aufl. 2010.
- [58] H. Heimpel, D. Hoelzer, H.-P. Lohrmann, E. Seifried und E. Kleihauer. *Hämatologie in der Praxis*. 2. Aufl. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1996.
- [59] F. Lang und P. Lang. *Basiswissen Physiologie*. 2. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007, S. 487.
- [60] J. S. Schwegler. *Der Mensch, Anatomie und Physiologie*. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1998.
- [61] J. S. Gibson, A. R. Cossins und J. C. Ellory. „Oxygen-sensitive membrane transporters in vertebrate red cells.“ In: *The Journal of Experimental Biology* 203.Pt 9 (2000), S. 1395–1407.
- [62] C. Geers und G. Gros. „Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle.“ In: *Physiological reviews* 80.2 (2000), S. 681–715.
- [63] J. C. Arciero, B. E. Carlson und T. W. Secomb. „Theoretical model of metabolic blood flow regulation: roles of ATP release by red blood cells and conducted responses“. In: *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 295.4 (2008), H1562–H1571.
- [64] M. L. Ellsworth, C. G. Ellis, D. Goldman, A. H. Stephenson, H. H. Dietrich und R. S. Sprague. „Erythrocytes: Oxygen Sensors and Modulators of Vascular Tone“. In: *Physiology* 24.2 (2009), S. 107–116.
- [65] A. M. Forsyth, J. Wan, P. D. Owrutsky, M. Abkarian und H. A. Stone. „Multiscale approach to link red blood cell dynamics, shear viscosity, and ATP release“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.27 (2011), S. 10986–10991.

- [66] I. Safeukui, J.-M. Correias, V. Brousse, D. Hirt, G. Deplaine, S. Mule, M. Lesurtel, N. Goasguen, A. Sauvanet, A. Couvelard, S. Kerneis, H. Khun, I. Vigan-Womas, C. Ottone, T. J. Molina, J.-M. Treluyer, O. Mercereau-Puijalon, G. Milon, P. H. David und P. A. Buffet. „Retention of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen“. In: *Blood* 112.6 (2008), S. 2520–2528.
- [67] E. Sackmann. „Mikromechanik der Zelle“. In: *Physik Journal* 3.2 (2004), S. 35–42.
- [68] E. Sackmann. „Thermo-elasticity and adhesion as regulators of cell membrane architecture and function“. In: *Journal of Physics: Condensed Matter* 18.45 (2006), R785–R825.
- [69] N. Mohandas und E. Evans. „Mechanical Properties of the Red Cell Membrane in Relation to Molecular Structure and Genetic Defects“. In: *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 23.1 (1994), S. 787–818.
- [70] N. Mohandas und P. G. Gallagher. „Red cell membrane: past, present, and future“. In: *Blood* 112.10 (2008), S. 3939–3948.
- [71] M. Edidin. „Timeline: Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers“. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4.5 (2003), S. 414–418.
- [72] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, R. Keith und P. Walter. *Molekularbiologie der Zelle*. Hrsg. von L. Jaenicke. 3. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, 2004.
- [73] M. E. Reid und N. Mohandas. „Red blood cell blood group antigens: structure and function“. In: *Seminars in Hematology* 41.2 (2004), S. 93–117.
- [74] J. P. Cartron und Y. Colin. „Structural and functional diversity of blood group antigens“. In: *Transfusion Clinique et Biologique* 8.3 (2001), S. 163–199.
- [75] G. Daniels. „Functional aspects of red cell antigens“. In: *Blood Reviews* 13.1 (1999), S. 14–35.
- [76] M. J. Telen. „Erythrocyte blood group antigens: not so simple after all.“ In: *Blood* 85.2 (1995), S. 299–306.
- [77] A. S. Popel und P. C. Johnson. „Microcirculation and Hemorheology“. In: *Annual Review of Fluid Mechanics* 37.1 (2005), S. 43–69.
- [78] J. E. Hall. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Elsevier Health Sciences, 2010.
- [79] H. Lipowsky. „Microvascular Rheology and Hemodynamics“. In: *Microcirculation* 12.1 (2005), S. 5–15.
- [80] P. W. Rand, E. Lacombe, H. E. Hunt und W. H. Austin. „Viscosity of Normal Human Blood Under Normothermic and Hypothermic Conditions.“ In: *Journal of Applied Physiology* 19 (1964), S. 117–122.
- [81] G. W. Schmid-Schönbein, S. Usami, R. Skalak und S. Chien. „The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels“. In: *Microvascular Research* 19.1 (1980), S. 45–70.

- [82] S. Chien, S. Usami, R. J. Dellenback und M. I. Gregersen. „Shear-dependent interaction of plasma proteins with erythrocytes in blood rheology.“ In: *The American Journal of Physiology* 219.1 (1970), S. 143–153.
- [83] S. Chien und K.-M. Jan. „Ultrastructural basis of the mechanism of rouleaux formation“. In: *Microvascular Research* 5.2 (1973), S. 155–166.
- [84] H. Noguchi, G. Gompper, L. Schmid, A. Wixforth und T. Franke. „Dynamics of fluid vesicles in flow through structured microchannels“. In: *Europhysics Letters* 89.2 (2010), S. 28002.
- [85] I. Safeukui, P. A. Buffet, S. Perrot, A. Sauvanet, B. Aussilhou, S. Dokmak, A. Couvelard, D. C. Hatem, N. Mohandas, P. H. David, O. Mercereau-Puijalon und G. Milon. „Surface Area Loss and Increased Sphericity Account for the Splenic Entrapment of Subpopulations of Plasmodium falciparum Ring-Infected Erythrocytes“. In: *PLoS ONE* 8.3 (2013), e60150.
- [86] S. P. Sutera und D. J. Krogstad. „Reduction of the surface-volume ratio: a physical mechanism contributing to the loss of red cell deformability in malaria.“ In: *Biorheology* 28.3-4 (1991), S. 221–229.
- [87] P. D. Ross und A. P. Minton. „Analysis of non-ideal behavior in concentrated hemoglobin solutions“. In: *Journal of Molecular Biology* 112.3 (1977), S. 437–452.
- [88] R. Tran-Son-Tay, S. P. Sutera und P. R. Rao. „Determination of red blood cell membrane viscosity from rheoscopic observations of tank-treading motion“. In: *Biophysical Journal* 46.1 (1984), S. 65–72.
- [89] R. M. Hochmuth, K. L. Buxbaum und E. A. Evans. „Temperature dependence of the viscoelastic recovery of red cell membrane“. In: *Biophysical Journal* 29.1 (1980), S. 177–182.
- [90] J. M. Skotheim und T. W. Secomb. „Red Blood Cells and Other Nonspherical Capsules in Shear Flow: Oscillatory Dynamics and the Tank-Treading-to-Tumbling Transition“. In: *Physical Review Letters* 98.7 (2007), S. 078301.
- [91] S. Svetina, D. Kuzman, R. E. Waugh, P. Zihnerl und B. Zeks. „The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells“. In: *Bioelectrochemistry* 62.2 (2004), S. 107–113.
- [92] L. Landau und E. Lifshitz. *Lehrbuch der Theoretischen Physik Vol. VII Elastizitätstheorie*. Berlin: Akademie Verlag, 1983.
- [93] W. Helfrich. „Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments.“ In: *Zeitschrift für Naturforschung. Teil C: Biochemie, Biophysik, Biologie, Virologie* 28c.11 (1973), S. 693–703.
- [94] E. A. Evans. „Bending Resistance and Chemically Induced Moments in Membrane Bilayers“. In: *Biophysical Journal* 14.12 (1974), S. 923–931.
- [95] G. Lenormand, S. Hénon, A. Richert, J. Siméon und F. Gallet. „Direct Measurement of the Area Expansion and Shear Moduli of the Human Red Blood Cell Membrane Skeleton“. In: *Biophysical Journal* 81.1 (2001), S. 43–56.

- [96] S. Hénon, G. Lenormand, A. Richert und F. Gallet. „A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membrane Using Optical Tweezers“. In: *Biophysical Journal* 76.2 (1999), S. 1145–1151.
- [97] Y. Park, M. Diez-Silva, G. Popescu, G. Lykotrafitis, W. Choi, M. S. Feld und S. Suresh. „Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.37 (2008), S. 13730–13735.
- [98] G. Popescu, Y. Park, W. Choi, R. R. Dasari, M. S. Feld und K. Badizadegan. „Imaging red blood cell dynamics by quantitative phase microscopy“. In: *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 41.1 (2008), S. 10–16.
- [99] Q. Guo, S. J. Reiling, P. Rohrbach und H. Ma. „Microfluidic biomechanical assay for red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*“. In: *Lab on a Chip* 12.6 (2012), S. 1143.
- [100] R. M. Hochmuth. „Micropipette aspiration of living cells“. In: *Journal of Biomechanics* 33.1 (2000), S. 15–22.
- [101] E. A. Evans. „Bending elastic modulus of red blood cell membrane derived from buckling instability in micropipet aspiration tests“. In: *Biophysical Journal* 43.1 (1983), S. 27–30.
- [102] S. Chien, K. L. Sung, R. Skalak, S. Usami und A. Tözeren. „Theoretical and experimental studies on viscoelastic properties of erythrocyte membrane“. In: *Biophysical Journal* 24.2 (1978), S. 463–487.
- [103] S. Sen, S. Subramanian und D. E. Discher. „Indentation and Adhesive Probing of a Cell Membrane with AFM: Theoretical Model and Experiments“. In: *Biophysical Journal* 89.5 (2005), S. 3203–3213.
- [104] R. Waugh und E. A. Evans. „Thermoelasticity of red blood cell membrane“. In: *Biophysical Journal* 26.1 (1979), S. 115–131.
- [105] D. Needham und R. S. Nunn. „Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol“. In: *Biophysical Journal* 58.4 (1990), S. 997–1009.
- [106] I. Dulińska, M. Targosz, W. Strojny, M. Lekka, P. Czuba, W. Balwierz und M. Szymoński. „Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy“. In: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 66.1-3 (2006), S. 1–11.
- [107] D. A. Fedosov, B. Caswell und G. E. Karniadakis. „A Multiscale Red Blood Cell Model with Accurate Mechanics, Rheology, and Dynamics“. In: *Biophysical Journal* 98.10 (2010), S. 2215–2225.
- [108] S. R. Keller und R. Skalak. „Motion of a tank-treading ellipsoidal particle in a shear flow“. In: *Journal of Fluid Mechanics* 120 (1982), S. 27.
- [109] T. M. Fischer. „On the energy dissipation in a tank-treading human red blood cell“. In: *Biophysical Journal* 32.2 (1980), S. 863–868.

- [110] E. A. Evans. „Structure and deformation properties of red blood cells: concepts and quantitative methods.“ In: *Methods in Enzymology* 173 (1989), S. 3–35.
- [111] E. A. Evans und R. M. Hochmuth. „Membrane viscoelasticity“. In: *Biophysical Journal* 16.1 (1976), S. 1–11.
- [112] S. Braunmüller, L. Schmid, E. Sackmann und T. Franke. „Hydrodynamic deformation reveals two coupled modes/time scales of red blood cell relaxation“. In: *Soft Matter* 8.44 (2012), S. 11240.
- [113] V. Kantsler und V. Steinberg. „Orientation and Dynamics of a Vesicle in Tank-Treading Motion in Shear Flow“. In: *Physical Review Letters* 95.25 (2005), S. 258101.
- [114] M. Abkarian, M. Faivre und A. Viallat. „Swinging of Red Blood Cells under Shear Flow“. In: *Physical Review Letters* 98.18 (2007), S. 188302.
- [115] T. M. Geislinger, B. Eggart, S. Braunmüller, L. Schmid und T. Franke. „Separation of blood cells using hydrodynamic lift“. In: *Applied Physics Letters* 100.18 (2012), S. 183701.
- [116] X. Grandchamp, G. Couplier, A. Srivastav, C. Minetti und T. Podgorski. „Lift and Down-Gradient Shear-Induced Diffusion in Red Blood Cell Suspensions“. In: *Physical Review Letters* 110.10 (2013), S. 108101.
- [117] C. Pozrikidis. „Numerical Simulation of Cell Motion in Tube Flow“. In: *Annals of Biomedical Engineering* 33.2 (2005), S. 165–178.
- [118] C. D. Eggleton und A. S. Popel. „Large deformation of red blood cell ghosts in a simple shear flow“. In: *Physics of Fluids* 10.8 (1998), S. 1834.
- [119] A. M. Forsyth, J. Wan, W. D. Ristenpart und H. A. Stone. „The dynamic behavior of chemically “stiffened” red blood cells in microchannel flows“. In: *Microvascular Research* 80.1 (2010), S. 37–43.
- [120] P. Olla. „The Lift on a Tank-Treading Ellipsoidal Cell in a Shear Flow“. In: *Journal de Physique II* 7.10 (1997), S. 1533–1540.
- [121] E. Witzleb. „Funktionen des Gefäßsystems“. In: *Physiologie des Menschen*. Hrsg. von R. F. Schmidt und G. Thews. 21. Aufl. Berlin/Heidelberg/Tokyo/New York: Springer, 1985.
- [122] U. Seifert. „Configurations of fluid membranes and vesicles“. In: *Advances in Physics* 46.1 (1997), S. 13–137.
- [123] W. Helfrich und R. M. Servuss. „Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes“. In: *Il Nuovo Cimento D* 3.1 (1984), S. 137–151.
- [124] T. Biben und C. Misbah. „Tumbling of vesicles under shear flow within an advected-field approach“. In: *Physical Review E* 67.3 (2003), S. 031908.
- [125] J. Beaucourt, F. Rioual, T. Séon, T. Biben und C. Misbah. „Steady to unsteady dynamics of a vesicle in a flow“. In: *Physical Review E* 69.1 (2004), S. 011906.
- [126] F. Rioual, T. Biben und C. Misbah. „Analytical analysis of a vesicle tumbling under a shear flow“. In: *Physical Review E* 69.6 (2004), S. 061914.

- [127] H. Noguchi und G. Gompper. „Dynamics of fluid vesicles in shear flow: Effect of membrane viscosity and thermal fluctuations“. In: *Physical Review E* 72.1 (2005), S. 011901.
- [128] H. Zhao und E. S. G. Shaqfeh. „The dynamics of a vesicle in simple shear flow“. In: *Journal of Fluid Mechanics* 674 (2011), S. 578–604.
- [129] K. H. de Haas, C. Blom, D. van den Ende, M. H. G. Duits und J. Mellema. „Deformation of giant lipid bilayer vesicles in shear flow“. In: *Physical Review E* 56.6 (1997), S. 7132–7137.
- [130] M. Abkarian, C. Lartigue und A. Viallat. „Tank Treading and Unbinding of Deformable Vesicles in Shear Flow: Determination of the Lift Force“. In: *Physical Review Letters* 88.6 (2002), S. 068103.
- [131] M. Abkarian und A. Viallat. „Dynamics of Vesicles in a Wall-Bounded Shear Flow“. In: *Biophysical Journal* 89.2 (2005), S. 1055–1066.
- [132] T. M. Fischer, M. Stöhr-Lissen und H. Schmid-Schönbein. „The red cell as a fluid droplet: tank tread-like motion of the human erythrocyte membrane in shear flow“. In: *Science* 202.4370 (1978), S. 894–896.
- [133] P. M. Vlahovska und R. S. Gracia. „Dynamics of a viscous vesicle in linear flows“. In: *Physical Review E* 75.1 (2007), S. 016313.
- [134] G. Danker, T. Biben, T. Podgorski, C. Verdier und C. Misbah. „Dynamics and rheology of a dilute suspension of vesicles: Higher-order theory“. In: *Physical Review E* 76.4 (2007), S. 041905.
- [135] G. B. Jeffery. „The Motion of Ellipsoidal Particles Immersed in a Viscous Fluid“. In: *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 102.715 (1922), S. 161–179.
- [136] H. L. Goldsmith und J. Marlow. „Flow Behaviour of Erythrocytes. I. Rotation and Deformation in Dilute Suspensions“. In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 182.1068 (1972), S. 351–384.
- [137] V. Kantsler und V. Steinberg. „Transition to Tumbling and Two Regimes of Tumbling Motion of a Vesicle in Shear Flow“. In: *Physical Review Letters* 96.3 (2006), S. 036001.
- [138] J. Deschamps, V. Kantsler und V. Steinberg. „Phase Diagram of Single Vesicle Dynamical States in Shear Flow“. In: *Physical Review Letters* 102.11 (2009), S. 118105.
- [139] M. A. Mader, V. Vitkova, M. Abkarian, A. Viallat und T. Podgorski. „Dynamics of viscous vesicles in shear flow“. In: *The European Physical Journal E* 19.4 (2006), S. 389–397.
- [140] C. Misbah. „Vacillating Breathing and Tumbling of Vesicles under Shear Flow“. In: *Physical Review Letters* 96.2 (2006), S. 028104.
- [141] H. Noguchi und G. Gompper. „Swinging and Tumbling of Fluid Vesicles in Shear Flow“. In: *Physical Review Letters* 98.12 (2007), S. 128103.

- [142] B. Kaoui, A. Farutin und C. Misbah. „Vesicles under simple shear flow: Elucidating the role of relevant control parameters“. In: *Physical Review E* 80.6 (2009), S. 061905.
- [143] T. M. Fischer. „Shape Memory of Human Red Blood Cells“. In: *Biophysical Journal* 86.5 (2004), S. 3304–3313.
- [144] H. Noguchi und G. Gompper. „Shape transitions of fluid vesicles and red blood cells in capillary flows“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.40 (2005), S. 14159–14164.
- [145] J. Dupire, M. Socol und A. Viallat. „Full dynamics of a red blood cell in shear flow“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.51 (2012), S. 20808–20813.
- [146] H. Noguchi und G. Gompper. „Fluid Vesicles with Viscous Membranes in Shear Flow“. In: *Physical Review Letters* 93.25 (2004), S. 258102.
- [147] G. I. Taylor. „The Formation of Emulsions in Definable Fields of Flow“. In: *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 146.858 (1934), S. 501–523.
- [148] C. Pfafferoth, G. B. Nash und H. J. Meiselman. „Red blood cell deformation in shear flow. Effects of internal and external phase viscosity and of in vivo aging“. In: *Biophysical Journal* 47.5 (1985), S. 695–704.
- [149] O. K. Baskurt, M. R. Hardeman, M. Uyklu, P. Ulker, M. Cengiz, N. Nemeth, S. Shin, T. Alexy und H. J. Meiselman. „Parameterization of red blood cell elongation index – shear stress curves obtained by ektacytometry“. In: *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 69.7 (2009), S. 777–788.
- [150] W. R. Dodson und P. Dimitrakopoulos. „Tank-Treading of Erythrocytes in Strong Shear Flows via a Nonstiff Cytoskeleton-Based Continuum Computational Modeling“. In: *Biophysical Journal* 99.9 (2010), S. 2906–2916.
- [151] P. Olla. „The role of tank-treading motions in the transverse migration of a spheroidal vesicle in a shear flow“. In: *Journal of Physics A: Mathematical and General* 30.1 (1997), S. 317–329.
- [152] G. Segré und A. Silberberg. „Behavior of macroscopic spheres in Poiseuille flow Part 2. Experimental results and interpretation“. In: *Journal of Fluid Mechanics* 14.1 (1962), S. 136–157.
- [153] J.-P. Matas, J. F. Morris und E. Guazzelli. „Inertial migration of rigid spherical particles in Poiseuille flow“. In: *Journal of Fluid Mechanics* 515.2004 (2004), S. 171–195.
- [154] E. Guth und R. Simha. „Untersuchungen über die Viskosität von Suspensionen und Lösungen“. In: *Kolloid-Zeitschrift* 74.3 (1936), S. 266–275.
- [155] H. Brenner und J. Happel. „Slow viscous flow past a sphere in a cylindrical tube“. In: *Journal of Fluid Mechanics* 4.02 (1958), S. 195.

- [156] P. G. Saffman. „The lift on a small sphere in a slow shear flow“. In: *Journal of Fluid Mechanics* 22.02 (1965), S. 385.
- [157] R. G. Cox und H. Brenner. „The lateral migration of solid particles in Poiseuille flow - I theory“. In: *Chemical Engineering Science* 23.2 (1968), S. 147–173.
- [158] B. P. Ho und L. G. Leal. „Inertial migration of rigid spheres in two-dimensional unidirectional flows“. In: *Journal of Fluid Mechanics* 65.02 (1974), S. 365.
- [159] J. A. Schonberg und E. J. Hinch. „Inertial migration of a sphere in Poiseuille flow“. In: *Journal of Fluid Mechanics* 203 (1989), S. 517.
- [160] E. S. Asmolov. „The inertial lift on a spherical particle in plane Poiseuille flow at large Reynolds number“. In: *Journal of Fluid Mechanics* 381.1999 (1999), S. 63–87.
- [161] J. Zhou und I. Papautsky. „Fundamentals of inertial focusing in microchannels“. In: *Lab on a Chip* 13.6 (2013), S. 1121.
- [162] J. S. Halow und G. B. Wills. „Radial migration of spherical particles in couette systems“. In: *AIChE Journal* 16.2 (1970), S. 281–286.
- [163] M. Tachibana. „On the behaviour of a sphere in the laminar tube flows“. In: *Rheologica Acta* 12.1 (1973), S. 58–69.
- [164] A. J. Goldman, R. G. Cox und H. Brenner. „Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall-I Motion through a quiescent fluid“. In: *Chemical Engineering Science* 22.4 (1967), S. 637–651.
- [165] D. Di Carlo, J. F. Edd, K. J. Humphry, H. A. Stone und M. Toner. „Particle Segregation and Dynamics in Confined Flows“. In: *Physical Review Letters* 102.9 (2009), S. 094503.
- [166] H. L. Goldsmith und S. G. Mason. „The flow of suspensions through tubes. I. Single spheres, rods, and discs“. In: *Journal of Colloid Science* 17.5 (1962), S. 448–476.
- [167] R. Zhou und H.-C. Chang. „Capillary penetration failure of blood suspensions“. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 287.2 (2005), S. 647–656.
- [168] R. Zhou, J. Gordon, A. F. Palmer und H.-C. Chang. „Role of erythrocyte deformability during capillary wetting“. In: *Biotechnology and Bioengineering* 93.2 (2006), S. 201–211.
- [169] W. Helfrich. „Steric interaction of fluid membranes in multilayer systems.“ In: *Zeitschrift für Naturforschung A* 33 (1978), S. 305.
- [170] R. M. Servuss und W. Helfrich. „Mutual adhesion of lecithin membranes at ultralow tensions“. In: *Journal de Physique* 50.7 (1989), S. 809–827.
- [171] R. Lipowsky und S. Leibler. „Unbinding Transitions of Interacting Membranes“. In: *Physical Review Letters* 56.23 (1986), S. 2541–2544.
- [172] R. Lipowsky. „Lines of Renormalization Group Fixed Points for Fluid and Crystalline Membranes“. In: *Europhysics Letters* 7.3 (1988), S. 255–261.
- [173] G. Gompper und D. M. Kroll. „Steric Interactions in Multimembrane Systems: A Monte Carlo Study“. In: *Europhysics Letters* 9.1 (1989), S. 59–64.

- [174] R. R. Netz und R. Lipowsky. „Unbinding of symmetric and asymmetric stacks of membranes“. In: *Physical Review Letters* 71.21 (1993), S. 3596–3599.
- [175] R. Lipowsky. „Generic Interactions of Flexible Membranes“. In: *Handbook of Biological Physics Vol. 1: Structure and Dynamics of Membranes*. Hrsg. von R. Lipowsky und E. Sackmann. Amsterdam: Elsevier, 1995. Kap. 11.
- [176] H.-G. Döbereiner, G. Gompper, C. K. Haluska, D. M. Kroll, P. G. Petrov und K. A. Riske. „Advanced Flicker Spectroscopy of Fluid Membranes“. In: *Physical Review Letters* 91.4 (2003), S. 048301.
- [177] T. Franke, R. Lipowsky und W. Helfrich. „Adhesion of lipid membranes induced by CrCl₃“. In: *Europhysics Letters* 76.2 (2006), S. 339–345.
- [178] S. A. Safran. *Statistical thermodynamics of surfaces, interfaces, and membranes*. Reading, MA: Addison-Wesley, 1994.
- [179] N. S. Gov und S. A. Safran. „Red Blood Cell Membrane Fluctuations and Shape Controlled by ATP-Induced Cytoskeletal Defects“. In: *Biophysical Journal* 88.3 (2005), S. 1859–1874.
- [180] U. Seifert. „Hydrodynamic Lift on Bound Vesicles“. In: *Physical Review Letters* 83.4 (1999), S. 876–879.
- [181] B. Lorz, R. Simson, J. Nardi und E. Sackmann. „Weakly adhering vesicles in shear flow: Tanktreading and anomalous lift force“. In: *Europhysics Letters* 51.4 (2000), S. 468–474.
- [182] Z.-H. Huang, M. Abkarian und A. Viallat. „Sedimentation of vesicles: from pear-like shapes to microtether extrusion“. In: *New Journal of Physics* 13.3 (2011), S. 035026.
- [183] T. Gruhn, T. Franke, R. Dimova und R. Lipowsky. „Novel Method for Measuring the Adhesion Energy of Vesicles“. In: *Langmuir* 23.10 (2007), S. 5423–5429.
- [184] N. Callens, C. Minetti, G. Coupier, M.-A. Mader, F. Dubois, C. Misbah und T. Podgorski. „Hydrodynamic lift of vesicles under shear flow in microgravity“. In: *Europhysics Letters* 83.2 (2008), S. 24002.
- [185] S. Messlinger, B. Schmidt, H. Noguchi und G. Gompper. „Dynamical regimes and hydrodynamic lift of viscous vesicles under shear“. In: *Physical Review E* 80.1 (2009), S. 011901.
- [186] G. Danker, P. M. Vlahovska und C. Misbah. „Vesicles in Poiseuille Flow“. In: *Physical Review Letters* 102.14 (2009), S. 148102.
- [187] B. Kaoui, G. H. Ristow, I. Cantat, C. Misbah und W. Zimmermann. „Lateral migration of a two-dimensional vesicle in unbounded Poiseuille flow“. In: *Physical Review E* 77.2 (2008), S. 021903.
- [188] G. Coupier, B. Kaoui, T. Podgorski und C. Misbah. „Noninertial lateral migration of vesicles in bounded Poiseuille flow“. In: *Physics of Fluids* 20.11 (2008), S. 111702.
- [189] L. G. Leal. „Particle Motions in a Viscous Fluid“. In: *Annual Review of Fluid Mechanics* 12.1 (1980), S. 435–476.

- [190] E. Bennett-Guerrero, T. H. Veldman, A. Doctor, M. J. Telen, T. L. Ortel, T. S. Reid, M. A. Mulherin, H. Zhu, R. D. Buck, R. M. Califf und T. J. McMahon. „Evolution of adverse changes in stored RBCs“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.43 (2007), S. 17063–17068.
- [191] J. Roth. „Funktionalisierung von Silikonoberflächen“. Diss. 2009, S. 1–145.
- [192] M. D. Abràmoff, P. J. Magalhaes und S. J. Ram. „Image processing with ImageJ“. In: *Biophotonics International* 11.7 (2004), S. 36–42.
- [193] H. A. Cranston, C. W. Boylan, G. L. Carroll, S. P. Sutura, J. R. Williamson, I. Y. Gluzman und D. J. Krogstad. „Plasmodium falciparum maturation abolishes physiologic red cell deformability“. In: *Science* 223.4634 (1984), S. 400–403.
- [194] T. Ye, N. Phan-Thien, B. Cheong Khoo und C. Teck Lim. „Numerical modelling of a healthy/malaria-infected erythrocyte in shear flow using dissipative particle dynamics method“. In: *Journal of Applied Physics* 115.22 (2014), S. 224701.
- [195] M. M. Frojmovic und J. G. Milton. „Human platelet size, shape, and related functions in health and disease.“ In: *Physiological reviews* (1982).
- [196] J. Diessenbacher. „Hydrodynamischer Lift roter Blutkörperchen“. Bachelorarbeit. Universität Augsburg, 2012.
- [197] H. L. Goldsmith und S. Spain. „Margination of leukocytes in blood flow through small tubes“. In: *Microvascular Research* 27.2 (1984), S. 204–222.
- [198] D. A. Fedosov und G. Gompper. „White blood cell margination in microcirculation“. In: *Soft Matter* 10.17 (2014), S. 2961–2970.
- [199] P. A. Aarts, S. A. van den Broek, G. W. Prins, G. D. Kuiken, J. J. Sixma und R. M. Heethaar. „Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood.“ In: *Arteriosclerosis* 8.6 (1988), S. 819–824.
- [200] H. Zhao, E. S. G. Shaqfeh und V. Narsimhan. „Shear-induced particle migration and margination in a cellular suspension“. In: *Physics of Fluids* 24.1 (2012), S. 011902.
- [201] WHO. *Fact Sheet No. 297*. 2015. url: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (besucht am 21. 07. 2015).
- [202] D. Hanahan und R. A. Weinberg. „The Hallmarks of Cancer“. In: *Cell* 100.1 (2000), S. 57–70.
- [203] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. Parkin, D. Forman und F. Bray. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. 2013.
- [204] V. Plaks, C. D. Koopman und Z. Werb. „Circulating Tumor Cells“. In: *Science* 341.6151 (2013), S. 1186–1188.
- [205] A. F. Chambers, A. C. Groom und I. C. MacDonald. „Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites“. In: *Nature Reviews Cancer* 2.8 (2002), S. 563–572.

- [206] D. Hanahan und R. A. Weinberg. „Hallmarks of Cancer: The Next Generation“. In: *Cell* 144.5 (2011), S. 646–674.
- [207] C. L. Chaffer und R. A. Weinberg. „A Perspective on Cancer Cell Metastasis“. In: *Science* 331.6024 (2011), S. 1559–1564.
- [208] C. Alix-Panabières und K. Pantel. „Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer.“ In: *Clinical Chemistry* 59.1 (2013), S. 110–118.
- [209] K. Pantel und R. H. Brakenhoff. „Dissecting the metastatic cascade“. In: *Nature Reviews Cancer* 4.6 (2004), S. 448–456.
- [210] N. J. Caixeiro, N. Kienzle, S. H. Lim, K. J. Spring, A. Tognela, K. F. Scott, P. de Souza und T. M. Becker. „Circulating tumour cells-a bona fide cause of metastatic cancer“. In: *Cancer and Metastasis Reviews* 33.2-3 (2014), S. 747–756.
- [211] M. Cristofanilli, G. T. Budd, M. J. Ellis, A. Stopeck, J. Matera, M. C. Miller, J. M. Reuben, G. V. Doyle, W. J. Allard, L. W.M. M. Terstappen und D. F. Hayes. „Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer“. In: *New England Journal of Medicine* 351.8 (2004), S. 781–791.
- [212] S. J. Cohen, C. J. A. Punt, N. Iannotti, B. H. Saidman, K. D. Sabbath, N. Y. Gabrail, J. Picus, M. Morse, E. Mitchell, M. C. Miller, G. V. Doyle, H. Tissing, L. W.M. M. Terstappen und N. J. Meropol. „Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer“. In: *Journal of Clinical Oncology* 26.19 (2008), S. 3213–3221.
- [213] J. S. de Bono, H. I. Scher, R. B. Montgomery, C. Parker, M. C. Miller, H. Tissing, G. V. Doyle, L. W. Terstappen, K. J. Pienta und D. Raghavan. „Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer“. In: *Clinical Cancer Research* 14.19 (2008), S. 6302–6309.
- [214] N. H. Stoecklein und C. A. Klein. „Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis“. In: *International Journal of Cancer* 126.3 (2010), S. 589–598.
- [215] I. Baccelli, A. Schneeweiss, S. Riethdorf, A. Stenzinger, A. Schillert, V. Vogel, C. Klein, M. Saini, T. Bäuerle, M. Wallwiener, T. Holland-Lenz, T. Höfner, M. Sprick, M. Scharpff, F. Marme, H.-P. Sinn, K. Pantel, W. Weichert und A. Trumpp. „Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay“. In: *Nature Biotechnology* 31 (2013), S. 539–544.
- [216] R. Luengo-Fernandez, J. Leal, A. Gray und R. Sullivan. „Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis“. In: *The Lancet Oncology* 14.12 (2013), S. 1165–1174.
- [217] A. B. Mariotto, K. Robin Yabroff, Y. Shao, E. J. Feuer und M. L. Brown. „Projections of the Cost of Cancer Care in the United States: 2010-2020“. In: *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 103.2 (2011), S. 117–128.

- [218] P. Yager, G. J. Domingo und J. Gerdes. „Point-of-Care Diagnostics for Global Health“. In: *Annual Review of Biomedical Engineering* 10.1 (2008), S. 107–144.
- [219] R. N. Zare und S. Kim. „Microfluidic Platforms for Single-Cell Analysis“. In: *Annual Review of Biomedical Engineering* 12.1 (2010), S. 187–201.
- [220] M. Toner und D. Irimia. „Blood-on-a-Chip“. In: *Annual Review of Biomedical Engineering* 7.1 (2005), S. 77–103.
- [221] A. A. S. Bhagat, H. Bow, H. W. Hou, S. J. Tan, J. Han und C. T. Lim. „Microfluidics for cell separation“. In: *Medical & Biological Engineering & Computing* 48.10 (2010), S. 999–1014.
- [222] A. Lenshof und T. Laurell. „Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems“. In: *Chemical Society Reviews* 39.3 (2010), S. 1203.
- [223] D. R. Gossett, W. M. Weaver, A. J. Mach, S. C. Hur, H. T. K. Tse, W. Lee, H. Amini und D. Di Carlo. „Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems“. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397.8 (2010), S. 3249–3267.
- [224] X. Xuan, J. Zhu und C. Church. „Particle focusing in microfluidic devices“. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 9.1 (2010), S. 1–16.
- [225] M. Kersaudy-Kerhoas und E. Sollier. „Micro-scale blood plasma separation: from acoustophoresis to egg-beaters“. In: *Lab on a Chip* 13.17 (2013), S. 3323.
- [226] P. Sajeesh und A. K. Sen. „Particle separation and sorting in microfluidic devices: a review“. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 17.1 (2014), S. 1–52.
- [227] E. L. Jackson und H. Lu. „Advances in microfluidic cell separation and manipulation“. In: *Current Opinion in Chemical Engineering* 2.4 (2013), S. 398–404.
- [228] C. Wyatt Shields IV, C. D. Reyes und G. P. López. „Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation“. In: *Lab Chip* 15.5 (2015), S. 1230–1249.
- [229] A. Karimi, S. Yazdi und A. M. Ardekani. „Hydrodynamic mechanisms of cell and particle trapping in microfluidics“. In: *Biomicrofluidics* 7.2 (2013), S. 021501.
- [230] P. Li, Z. S. Stratton, M. Dao, J. Ritz und T. J. Huang. „Probing circulating tumor cells in microfluidics“. In: *Lab on a Chip* 13.4 (2013), S. 602.
- [231] P. Augustsson, C. Magnusson, M. Nordin, H. Lilja und T. Laurell. „Microfluidic, Label-Free Enrichment of Prostate Cancer Cells in Blood Based on Acoustophoresis“. In: *Analytical Chemistry* 84.18 (2012), S. 7954–7962.
- [232] J. Nam, H. Lim, D. Kim und S. Shin. „Separation of platelets from whole blood using standing surface acoustic waves in a microchannel“. In: *Lab on a Chip* 11.19 (2011), S. 3361.
- [233] V. Skowronek, R. W. Rambach, L. Schmid, K. Haase und T. Franke. „Particle Deflection in a Poly(dimethylsiloxane) Microchannel Using a Propagating Surface Acoustic Wave: Size and Frequency Dependence“. In: *Analytical Chemistry* 85.20 (2013), S. 9955–9959.

- [234] X. Ding, Z. Peng, S.-C. S. Lin, M. Geri, S. Li, P. Li, Y. Chen, M. Dao, S. Suresh und T. J. Huang. „Cell separation using tilted-angle standing surface acoustic waves“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.36 (2014), S. 12992–12997.
- [235] J.-C. Baret, O. J. Miller, V. Taly, M. Ryckelynck, A. El-Harrak, L. Frenz, C. Rick, M. L. Samuels, J. B. Hutchison, J. J. Agresti, D. R. Link, D. A. Weitz und A. D. Griffiths. „Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity“. In: *Lab on a Chip* 9.13 (2009), S. 1850.
- [236] T. Franke, S. Braumüller, L. Schmid, A. Wixforth und D. A. Weitz. „Surface acoustic wave actuated cell sorting (SAWACS)“. In: *Lab on a Chip* 10.6 (2010), S. 789.
- [237] L. Schmid, D. A. Weitz und T. Franke. „Sorting drops and cells with acoustics: acoustic microfluidic fluorescence-activated cell sorter“. In: *Lab on a Chip* 14.19 (2014), S. 3710.
- [238] X.-B. Wang, J. Yang, Y. Huang, J. Vykoukal, F. F. Becker und P. R. C. Gascoyne. „Cell Separation by Dielectrophoretic Field-flow-fractionation“. In: *Analytical Chemistry* 72.4 (2000), S. 832–839.
- [239] U. Kim, C.-W. Shu, K. Y. Dane, P. S. Daugherty, J. Y. J. Wang und H. T. Soh. „Selection of mammalian cells based on their cell-cycle phase using dielectrophoresis“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.52 (2007), S. 20708–20712.
- [240] H.-S. Moon, K. Kwon, S.-I. Kim, H. Han, J. Sohn, S. Lee und H.-I. Jung. „Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP)“. In: *Lab on a Chip* 11.6 (2011), S. 1118.
- [241] S. Shim, K. Stemke-Hale, A. M. Tsimberidou, J. Noshari, T. E. Anderson und P. R. C. Gascoyne. „Antibody-independent isolation of circulating tumor cells by continuous-flow dielectrophoresis“. In: *Biomicrofluidics* 7.1 (2013), S. 011807.
- [242] N. Xia, T. P. Hunt, B. T. Mayers, E. Alsberg, G. M. Whitesides, R. M. Westervelt und D. E. Ingber. „Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow“. In: *Biomedical Microdevices* 8.4 (2006), S. 299–308.
- [243] N. Pamme und C. Wilhelm. „Continuous sorting of magnetic cells via on-chip free-flow magnetophoresis“. In: *Lab on a Chip* 6.8 (2006), S. 974.
- [244] C. Ribaut, A. Berry, S. Chevalley, K. Reybier, I. Morlais, D. Parzy, F. Nepveu, F. Benoit-Vical und A. Valentin. „Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human *Plasmodium* species“. In: *Malaria Journal* 7.1 (2008), S. 45.
- [245] S. R. Quake, A. Y. Fu, C. Spence, A. Scherer und F. H. Arnold. „A microfabricated fluorescence-activated cell sorter“. In: *Nature Biotechnology* 17.11 (1999), S. 1109–1111.

- [246] I. Cima, C. Wen Yee, F. S. Ilescu, W. Min Phyoo, K. Hon Lim, C. Ilescu und M. Han Tan. „Label-free isolation of circulating tumor cells in microfluidic devices: Current research and perspectives“. In: *Biomicrofluidics* 7.1 (2013), S. 011810.
- [247] C. Jin, S. M. McFaul, S. P. Duffy, X. Deng, P. Tavassoli, P. C. Black und H. Ma. „Technologies for label-free separation of circulating tumor cells: from historical foundations to recent developments“. In: *Lab on a Chip* 14.1 (2014), S. 32–44.
- [248] L. Hajba und A. Guttman. „Circulating tumor-cell detection and capture using microfluidic devices“. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 59 (2014), S. 9–16.
- [249] J. Chen, J. Li und Y. Sun. „Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation“. In: *Lab on a Chip* 12.10 (2012), S. 1753.
- [250] L. Yu, S. R. Ng, Y. Xu, H. Dong, Y. J. Wang und C. M. Li. „Advances of lab-on-a-chip in isolation, detection and post-processing of circulating tumour cells“. In: *Lab on a Chip* 13.16 (2013), S. 3163.
- [251] M. Yu, S. Stott, M. Toner, S. Maheswaran und D. A. Haber. „Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization“. In: *The Journal of Cell Biology* 192.3 (2011), S. 373–382.
- [252] G. Vona, A. Sabile, M. Louha, V. Sitruk, S. Romana, K. Schütze, F. Capron, D. Franco, M. Pazzagli, M. Vekemans, B. Lacour, C. Bréchet und P. Paterlini-Bréchet. „Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells“. In: *The American Journal of Pathology* 156.1 (2000), S. 57–63.
- [253] L. S. Lim, M. Hu, M. C. Huang, W. C. Cheong, A. T. L. Gan, X. L. Looi, S. M. Leong, E. S.-C. Koay und M.-H. Li. „Microsieve lab-chip device for rapid enumeration and fluorescence in situ hybridization of circulating tumor cells“. In: *Lab on a Chip* 12.21 (2012), S. 4388.
- [254] H. Mohamed, L. D. McCurdy, D. H. Szarowski, S. Duva, J. N. Turner und M. Caggana. „Development of a Rare Cell Fractionation Device: Application for Cancer Detection“. In: *IEEE Transactions on Nanobioscience* 3.4 (2004), S. 251–256.
- [255] H. Mohamed, M. Murray, J. N. Turner und M. Caggana. „Isolation of tumor cells using size and deformation“. In: *Journal of Chromatography A* 1216.47 (2009), S. 8289–8295.
- [256] K. Louthback, J. D’Silva, L. Liu, A. Wu, R. H. Austin und J. C. Sturm. „Deterministic separation of cancer cells from blood at 10 mL/min“. In: *AIP Advances* 2.4 (2012), S. 042107.
- [257] T. Krüger, D. Holmes und P. V. Coveney. „Deformability-based red blood cell separation in deterministic lateral displacement devices—A simulation study“. In: *Biomicrofluidics* 8.5 (2014), S. 054114.
- [258] S. A. Berger, L. Talbot und L. S. Yao. „Flow in Curved Pipes“. In: *Annual Review of Fluid Mechanics* 15.1 (1983), S. 461–512.

- [259] J. Hansson, J. M. Karlsson, T. Haraldsson, H. Brismar, W. van der Wijngaart und A. Russom. „Inertial microfluidics in parallel channels for high-throughput applications“. In: *Lab on a Chip* 12.22 (2012), S. 4644.
- [260] S. C. Hur, H. T. K. Tse und D. Di Carlo. „Sheathless inertial cell ordering for extreme throughput flow cytometry“. In: *Lab on a Chip* 10.3 (2010), S. 274–280.
- [261] S. C. Hur, T. Z. Brinckerhoff, C. M. Walthers, J. C. Y. Dunn und D. Di Carlo. „Label-Free Enrichment of Adrenal Cortical Progenitor Cells Using Inertial Microfluidics“. In: *PLoS ONE* 7.10 (2012), e46550.
- [262] J. Zhou, P. V. Giridhar, S. Kasper und I. Papautsky. „Modulation of aspect ratio for complete separation in an inertial microfluidic channel“. In: *Lab on a Chip* 13.10 (2013), S. 1919.
- [263] V. Parichehreh, K. Medepallai, K. Babbarwal und P. Sethu. „Microfluidic inertia enhanced phase partitioning for enriching nucleated cell populations in blood“. In: *Lab on a Chip* 13.5 (2013), S. 892.
- [264] E. Sollier, D. E. Go, J. Che, D. R. Gossett, S. O’Byrne, W. M. Weaver, N. Kummer, M. Rettig, J. Goldman, N. Nickols, S. McCloskey, R. P. Kulkarni und D. Di Carlo. „Size-selective collection of circulating tumor cells using Vortex technology“. In: *Lab on a Chip* 14.1 (2014), S. 63–77.
- [265] A. A. S. Bhagat, H. W. Hou, L. D. Li, C. T. Lim und J. Han. „Pinched flow coupled shear-modulated inertial microfluidics for high-throughput rare blood cell separation“. In: *Lab on a Chip* 11.11 (2011), S. 1870.
- [266] H.-S. Moon, K. Kwon, K.-A. Hyun, T. Seok Sim, J. Chan Park, J.-G. Lee und H.-I. Jung. „Continual collection and re-separation of circulating tumor cells from blood using multi-stage multi-orifice flow fractionation“. In: *Biomicrofluidics* 7.1 (2013), S. 014105.
- [267] M. G. Lee, J. H. Shin, C. Y. Bae, S. Choi und J.-k. Park. „Label-Free Cancer Cell Separation from Human Whole Blood Using Inertial Microfluidics at Low Shear Stress“. In: *Analytical Chemistry* 85.13 (2013), S. 6213–6218.
- [268] H. K. Moffatt. „Viscous and resistive eddies near a sharp corner“. In: *Journal of Fluid Mechanics* 18.01 (1964), S. 1.
- [269] W. Cherdron, F. Durst und J. H. Whitelaw. „Asymmetric flows and instabilities in symmetric ducts with sudden expansions“. In: *Journal of Fluid Mechanics* 84.01 (1978), S. 13.
- [270] S. C. Hur, A. J. Mach und D. Di Carlo. „High-throughput size-based rare cell enrichment using microscale vortices“. In: *Biomicrofluidics* 5.2 (2011), S. 022206.
- [271] J. Zhou, S. Kasper und I. Papautsky. „Enhanced size-dependent trapping of particles using microvortices“. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 15.5 (2013), S. 611–623.

- [272] J. Guck, S. Schinkinger, B. Lincoln, F. Wottawah, S. Ebert, M. Romeyke, D. Lenz, H. M. Erickson, R. Ananthakrishnan, D. Mitchell, J. Käs, S. Ulvick und C. Bilby. „Optical Deformability as an Inherent Cell Marker for Testing Malignant Transformation and Metastatic Competence“. In: *Biophysical Journal* 88.5 (2005), S. 3689–3698.
- [273] V. Swaminathan, K. Mythreya, E. T. O’Brien, A. Berchuck, G. C. Blobe und R. Superfine. „Mechanical Stiffness Grades Metastatic Potential in Patient Tumor Cells and in Cancer Cell Lines“. In: *Cancer Research* 71.15 (2011), S. 5075–5080.
- [274] W. R. Dean. „Fluid Motion in a Curved Channel“. In: *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 121.787 (1928), S. 402–420.
- [275] E. W. M. Kemna, R. M. Schoeman, F. Wolbers, I. Vermes, D. A. Weitz und A. van den Berg. „High-yield cell ordering and deterministic cell-in-droplet encapsulation using Dean flow in a curved microchannel“. In: *Lab on a Chip* 12.16 (2012), S. 2881.
- [276] J. M. Martel und M. Toner. „Particle Focusing in Curved Microfluidic Channels“. In: *Scientific Reports* 3 (2013), S. 1–8.
- [277] X. Mao, J. R. Waldeisen und T. J. Huang. „Microfluidic drifting-implementing three-dimensional hydrodynamic focusing with a single-layer planar microfluidic device“. In: *Lab on a Chip* 7.10 (2007), S. 1260.
- [278] X. Mao, S.-C. S. Lin, C. Dong und T. J. Huang. „Single-layer planar on-chip flow cytometer using microfluidic drifting based three-dimensional (3D) hydrodynamic focusing“. In: *Lab on a Chip* 9.11 (2009), S. 1583.
- [279] A. A. Nawaz, X. Zhang, X. Mao, J. Rufo, S.-C. S. Lin, F. Guo, Y. Zhao, M. Lapsley, P. Li, J. P. McCoy, S. J. Levine und T. J. Huang. „Sub-micrometer-precision, three-dimensional (3D) hydrodynamic focusing via “microfluidic drifting”“. In: *Lab on a Chip* 14.2 (2014), S. 415–423.
- [280] A. A. S. Bhagat, S. S. Kuntaegowdanahalli und I. Papautsky. „Continuous particle separation in spiral microchannels using dean flows and differential migration“. In: *Lab on a Chip* 8.11 (2008), S. 1906.
- [281] S. S. Kuntaegowdanahalli, A. A. S. Bhagat, G. Kumar und I. Papautsky. „Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels“. In: *Lab on a Chip* 9.20 (2009), S. 2973.
- [282] G. Guan, L. Wu, A. A. Bhagat, Z. Li, P. C. Y. Chen, S. Chao, C. J. Ong und J. Han. „Spiral microchannel with rectangular and trapezoidal cross-sections for size based particle separation“. In: *Scientific Reports* 3 (2013), S. 1475.
- [283] H. W. Hou, M. E. Warkiani, B. L. Khoo, Z. R. Li, R. a. Soo, D. S.-W. Tan, W.-T. Lim, J. Han, A. A. S. Bhagat und C. T. Lim. „Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces“. In: *Scientific Reports* 3 (2013), S. 1259.

- [284] M. E. Warkiani, G. Guan, K. B. Luan, W. C. Lee, A. A. S. Bhagat, P. Kant Chaudhuri, D. S.-W. Tan, W. T. Lim, S. C. Lee, P. C. Y. Chen, C. T. Lim und J. Han. „Slanted spiral microfluidics for the ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells“. In: *Lab on a Chip* 14.1 (2014), S. 128–137.
- [285] H. Amini, E. Sollier, M. Masaeli, Y. Xie, B. Ganapathysubramanian, H. A. Stone und D. Di Carlo. „Engineering fluid flow using sequenced microstructures“. In: *Nature Communications* 4.May (2013), S. 1826.
- [286] S. Suresh. „Biomechanics and biophysics of cancer cells“. In: *Acta Materialia* 55.12 (2007), S. 3989–4014.
- [287] M. Faivre, M. Abkarian, K. Bickraj und H. A. Stone. „Geometrical focusing of cells in a microfluidic device: an approach to separate blood plasma.“ In: *Biorheology* 43.2 (2006), S. 147–159.
- [288] D. A. Fedosov, J. Fornleitner und G. Gompper. „Margination of White Blood Cells in Microcapillary Flow“. In: *Physical Review Letters* 108.2 (2012), S. 028104.
- [289] H. W. Hou, A. A. S. Bhagat, A. G. Lin Chong, P. Mao, K. S. Wei Tan, J. Han und C. T. Lim. „Deformability based cell margination-A simple microfluidic design for malaria-infected erythrocyte separation“. In: *Lab on a Chip* 10.19 (2010), S. 2605.
- [290] T. M. Geislinger und T. Franke. „Sorting of circulating tumor cells (MV3-melanoma) and red blood cells using non-inertial lift“. In: *Biomicrofluidics* 7.4 (2013), S. 044120.
- [291] B. Neu und H. J. Meiselman. „Depletion-Mediated Red Blood Cell Aggregation in Polymer Solutions“. In: *Biophysical Journal* 83.5 (2002), S. 2482–2490.
- [292] 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.
- [293] B. Neu, R. Wenby und H. J. Meiselman. „Effects of Dextran Molecular Weight on Red Blood Cell Aggregation“. In: *Biophysical Journal* 95.6 (2008), S. 3059–3065.
- [294] A. Srivastav, T. Podgorski und G. Couplier. „Efficiency of size-dependent particle separation by pinched flow fractionation“. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 13.5 (2012), S. 697–701.
- [295] C. Cupelli, T. Borchardt, T. Steiner, N. Paust, R. Zengerle und M. Santer. „Leukocyte enrichment based on a modified pinched flow fractionation approach“. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 14.3-4 (2013), S. 551–563.
- [296] S. Meng, D. Tripathy, E. P. Frenkel, S. Shete, E. Z. Naftalis, J. F. Huth, P. D. Beitsch, M. Leitch, S. Hoover, D. Euhus, B. Haley, L. Morrison, T. P. Fleming, D. Herlyn, L. W.M. M. Terstappen, T. Fehm, T. F. Tucker, N. Lane, J. Wang und J. W. Uhr. „Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy.“ In: *Clinical Cancer Research* 10 (2004), S. 8152–8162.

- [297] H. K. Lin, S. Zheng, A. J. Williams, M. Balic, S. Groshen, H. I. Scher, M. Fleisher, W. Stadler, R. H. Datar, Y.-C. Tai und R. J. Cote. „Portable Filter-Based Microdevice for Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells“. In: *Clinical Cancer Research* 16.20 (2010), S. 5011–5018.
- [298] G. N. van Muijen, K. F. Jansen, I. M. Cornelissen, D. F. Smeets, J. L. Beck und D. J. Ruiter. „Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice.“ In: *International Journal of Cancer* 48.1 (1991), S. 85–91.
- [299] S. Schmitz. *Der Experimentator - Zellkultur*. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011.
- [300] T. M. Geislinger, M. E. M. Stamp, A. Wixforth und T. Franke. „Hydrodynamic and label-free sorting of circulating tumor cells from whole blood“. In: *Applied Physics Letters* 107.20 (2015), S. 203702.
- [301] WHO. *World Malaria Report 2013*. 2013.
- [302] WHO. „Severe and complicated malaria“. In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84.Supplement 2 (1990). Hrsg. von D. A. Warrell, M. E. Molyneux und P. F. Beales, S. 1–65.
- [303] R. W. Snow, E. L. Korenromp und E. Gouws. „Pediatric mortality in Africa: Plasmodium falciparum malaria as a cause or risk?“ In: *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71.2 SUPPL. (2004), S. 16–24.
- [304] J. Sachs und P. Malaney. „The economic and social burden of malaria“. In: *Nature* 415.6872 (2002), S. 680–685.
- [305] R. Tuteja. „Malaria - an overview“. In: *FEBS Journal* 274.18 (2007), S. 4670–4679.
- [306] *Centers for Disease Control and Prevention, Division of Parasitic Diseases and Malaria*. 2015. url: <http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/> (besucht am 30.06.2015).
- [307] N. J. White. „Plasmodium knowlesi: The Fifth Human Malaria Parasite“. In: *Clinical Infectious Diseases* 46.2 (2008), S. 172–173.
- [308] A. Stich. „Malaria. Die wichtigste tropische Infektionskrankheit“. In: *Pharmazie in unserer Zeit* 38.6 (2009), S. 508–511.
- [309] A. F. Cowman und B. S. Crabb. „Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites“. In: *Cell* 124.4 (2006), S. 755–766.
- [310] L. H. Bannister, J. M. Hopkins, R. E. Fowler, S. Krishna und G. H. Mitchell. „A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages“. In: *Parasitology Today* 16.10 (2000), S. 427–433.
- [311] B. Cooke, N. Mohandas und R. Coppel. „The malaria-infected red blood cell: Structural and functional changes“. In: *Advances in Parasitology* 50 (2001), S. 1–86.
- [312] A. G. Maier, B. M. Cooke, A. F. Cowman und L. Tilley. „Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte“. In: *Nature Reviews Microbiology* 7.5 (2009), S. 341–354.

- [313] S. Glushakova, D. Yin, T. Li und J. Zimmerberg. „Membrane Transformation during Malaria Parasite Release from Human Red Blood Cells“. In: *Current Biology* 15.18 (2005), S. 1645–1650.
- [314] M. Abkarian, G. Massiera, L. Berry, M. Roques und C. Braun-Breton. „A novel mechanism for egress of malarial parasites from red blood cells“. In: *Blood* 117.15 (2011), S. 4118–4124.
- [315] T. Hadley. „Invasion of Erythrocytes by Malaria Parasites: A Cellular and Molecular Overview“. In: *Annual Review of Microbiology* 40.1 (1986), S. 451–477.
- [316] A. Esposito, J.-B. Choimet, J. N. Skepper, J. M. A. Mauritz, V. L. Lew, C. F. Kaminski und T. Tiffert. „Quantitative Imaging of Human Red Blood Cells Infected with *Plasmodium falciparum*“. In: *Biophysical Journal* 99.3 (2010), S. 953–960.
- [317] X. Pei, X. Guo, R. Coppel, S. Bhattacharjee, K. Haldar, W. Gratzer, N. Mohandas und X. An. „The ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of *Plasmodium falciparum* stabilizes spectrin tetramers and suppresses further invasion“. In: *Blood* 110.3 (2007), S. 1036–1042.
- [318] J. P. Mills, M. Diez-Silva, D. J. Quinn, M. Dao, M. J. Lang, K. S. W. Tan, C. T. Lim, G. Milon, P. H. David, O. Mercereau-Puijalon, S. Bonnefoy und S. Suresh. „Effect of plasmodial RESA protein on deformability of human red blood cells harboring *Plasmodium falciparum*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.22 (2007), S. 9213–9217.
- [319] M. Foley und L. Tilley. „Home improvements: Malaria and the red blood cell“. In: *Parasitology Today* 11.11 (1995), S. 436–439.
- [320] B. M. Cooke, J. Stuart und G. B. Nash. „The cellular and molecular rheology of malaria.“ In: *Biorheology* 51.2-3 (2014), S. 99–119.
- [321] C. A. Moxon, G. E. Grau und A. G. Craig. „Malaria: modification of the red blood cell and consequences in the human host“. In: *British Journal of Haematology* 154.6 (2011), S. 670–679.
- [322] F. K. Glenister. „Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells“. In: *Blood* 99.3 (2002), S. 1060–1063.
- [323] S. Sanyal, S. Egee, G. Bouyer, S. Perrot, I. Safeukui, E. Bischoff, P. Buffet, K. W. Deitsch, O. Mercereau-Puijalon, P. H. David, T. J. Templeton und C. Lavazec. „*Plasmodium falciparum* STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties“. In: *Blood* 119.2 (2012), e1–e8.
- [324] A. M. Dondorp, P. A. Kager, J. Vreeken und N. J. White. „Abnormal Blood Flow and Red Blood Cell Deformability in Severe Malaria“. In: *Parasitology Today* 16.6 (2000), S. 228–232.
- [325] P. A. Buffet, I. Safeukui, G. Deplaine, V. Brousse, V. Prendki, M. Thellier, G. D. Turner und O. Mercereau-Puijalon. „The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology“. In: *Blood* 117.2 (2011), S. 381–392.

- [326] G. B. Nash, E. O'Brien, E. C. Gordon-Smith und J. A. Dormandy. „Abnormalities in the mechanical properties of red blood cells caused by *Plasmodium falciparum*.“ In: *Blood* 74.2 (1989), S. 855–861.
- [327] S. Suresh, J. Spatz, J. P. Mills, A. Micoulet, M. Dao, C. T. Lim, M. Beil und T. Seufferlein. „Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria“. In: *Acta Biomaterialia* 1.1 (2005), S. 15–30.
- [328] J. P. Shelby, J. White, K. Ganesan, P. K. Rathod und D. T. Chiu. „A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.25 (2003), S. 14618–14622.
- [329] J. Carlson, H. Helmby, M. Wahlgren, J. Carlson, H. Helmby, M. Wahlgren, A. V. S. Hill, D. Brewster und B. M. Greenwood. „Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies“. In: *The Lancet* 336.8729 (1990), S. 1457–1460.
- [330] J. Normark, D. Nilsson, U. Ribacke, G. Winter, K. Moll, C. E. Wheelock, J. Bayarugaba, F. Kironde, T. G. Egwang, Q. Chen, B. Andersson und M. Wahlgren. „PfEMP1-DBL1alpha 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.
- [331] L. H. Miller, M. F. Good und G. Milon. „Malaria pathogenesis“. In: *Science* 264.5167 (1994), S. 1878–1883.
- [332] D. I. Baruch, J. A. Gormely, C. Ma, R. J. Howard und B. L. Pasloske. „*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.
- [333] B. Cooke, R. Coppel und M. Wahlgren. „*Falciparum* Malaria: Sticking up, Standing out and Out-standing“. In: *Parasitology Today* 16.10 (2000), S. 416–420.
- [334] Q. Chen, M. Schlichtherle und M. Wahlgren. „Molecular Aspects of Severe Malaria“. In: *Clinical Microbiology Reviews* 13.3 (2000), S. 439–450.
- [335] M. Niang, A. K. Bei, K. G. Madnani, S. Pelly, S. Dankwa, U. Kanjee, K. Gunalan, A. Amaladoss, K. P. Yeo, N. S. Bob, B. Malleret, M. T. Duraisingh und P. R. Preiser. „STEVOR Is a *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Binding Protein that Mediates Merozoite Invasion and Rosetting“. English. In: *Cell Host & Microbe* 16.1 (2014), S. 81–93.
- [336] A. M. Dondorp, M. Nyanoti, P. A. Kager, S. Mithwani, J. Vreeken und K. Marsh. „The role of reduced red cell deformability in the pathogenesis of severe *falciparum* malaria and its restoration by blood transfusion“. In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96.3 (2002), S. 282–286.

- [337] C. Raventos-Suarez, D. K. Kaul, F. Macaluso und R. L. Nagel. „Membrane knobs are required for the microcirculatory obstruction induced by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82.11 (1985), S. 3829–3833.
- [338] D. A. Fedosov, H. Lei, B. Caswell, S. Suresh und G. E. Karniadakis. „Multiscale Modeling of Red Blood Cell Mechanics and Blood Flow in Malaria“. In: *PLoS Computational Biology* 7.12 (2011). Hrsg. von D. A. Beard, e1002270.
- [339] T. Wu und J. J. Feng. „Simulation of malaria-infected red blood cells in microfluidic channels: Passage and blockage“. In: *Biomicrofluidics* 7.4 (2013), S. 044115.
- [340] J. H. Barbee und G. R. Cokelet. „The Fahraeus effect“. In: *Microvascular Research* 3.1 (1971), S. 6–16.
- [341] T. Shiga, N. Maeda und K. Kon. „Erythrocyte rheology“. In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 10.1 (1990), S. 9–48.
- [342] T. M. Geislinger, K. Moll, C. Westerhausen, S. Chan, A. Wixforth, M. Wahlgren und T. Franke. „Impaired non-inertial lift of Plasmodium falciparum infected red blood cells impacts sequestration“. In Vorbereitung.
- [343] K. Moll, A. Kaneko, A. Scherf und M. Wahlgren, Hrsg. *Methods in Malaria Research*. 6. Aufl. Glasgow, Manassas, UK und USA, 2013.
- [344] K. Kirk. „Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte.“ In: *Physiological Reviews* 81.2 (2001), S. 495–537.
- [345] S. Suresh. „Mechanical response of human red blood cells in health and disease: Some structure-property-function relationships“. In: *Journal of Materials Research* 21.08 (2006), S. 1871–1877.
- [346] S. Huang, H. W. Hou, T. Kaniyas, J. T. Sertorio, H. Chen, D. Sinchar, M. T. Gladwin und J. Han. „Towards microfluidic-based depletion of stiff and fragile human red cells that accumulate during blood storage“. In: *Lab on a Chip* 15.2 (2015), S. 448–458.
- [347] A. M. Dondorp, B. J. Angus, K. Chotivanich, K. Silamut, R. Ruangveerayuth, M. R. Hardeman, P. A. Kager, J. Vreeken und N. J. White. „Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria.“ In: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60.5 (1999), S. 733–737.
- [348] N. Maeda, Y. Suzuki, J. Tanaka und N. Tateishi. „Erythrocyte flow and elasticity of microvessels evaluated by marginal cell-free layer and flow resistance.“ In: *The American Journal of Physiology* 271.6 Pt 2 (1996), H2454–H2461.
- [349] C. Flatt, S. Mitchell, B. Yipp, S. Looareesuwan und M. Ho. „Attenuation of cytoadherence of Plasmodium falciparum to microvascular endothelium under flow by hemodilution“. In: *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72.6 (2005), S. 660–665.
- [350] A. Jain und L. L. Munn. „Determinants of Leukocyte Margination in Rectangular Microchannels“. In: *PLoS ONE* 4.9 (2009). Hrsg. von W.-L. Zhou, e7104.

- [351] J. E. Mrema, G. H. Campbell, R. Miranda, A. L. Jaramillo und K. H. Rieckmann. „Concentration and separation of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* by gradient centrifugation“. In: *Bulletin of the World Health Organization* 57.1 (1979), S. 133–138.
- [352] E. M. Rivadeneira, M. Wasserman und C. T. Espinal. „Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by Percoll gradients.“ In: *The Journal of Protozoology* 30.2 (1983), S. 367–370.
- [353] H. Ginsburg, S. Kutner, M. Krugliak und Z. Ioav Cabantchik. „Characterization of permeation pathways appearing in the host membrane of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells“. In: *Molecular and Biochemical Parasitology* 14.3 (1985), S. 313–322.
- [354] I. D. Goodyer, J. Johnson, R. Eisenthal und D. J. Hayes. „Purification of mature-stage *Plasmodium falciparum* by gelatine flotation.“ In: *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 88.2 (1994), S. 209–211.
- [355] T. M. Geislinger, S. Chan, K. Moll, A. Wixforth, M. Wahlgren und T. Franke. „Label-free microfluidic enrichment of ring-stage *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells using non-inertial hydrodynamic lift“. In: *Malaria Journal* 13.1 (2014), S. 375.
- [356] B. Kaoui, T. Krüger und J. Harting. „Complex dynamics of a bilamellar vesicle as a simple model for leukocytes“. In: *Soft Matter* 9.33 (2013), S. 8057.

Eigene Publikationen

1. T. M. Geislinger, K. Moll, C. Westerhausen, S. Chan, A. Wixforth, M. Wahlgren, & T. Franke. „Impaired non-inertial lift of Plasmodium falciparum infected red blood cells impacts sequestration“. *In Vorbereitung*.
2. T. M. Geislinger, M. E. M. Stamp, A. Wixforth, & T. Franke, „Hydrodynamic and label-free sorting of circulating tumor cells out of whole blood“. *Applied Physics Letters* 107 (2015), 203702.
3. T. M. Geislinger, S. Chan, K. Moll, A. Wixforth, M. Wahlgren, & T. Franke. „Label-free microfluidic enrichment of ring-stage Plasmodium falciparum-infected red blood cells using non-inertial hydrodynamic lift“. *Malaria Journal* 13:375 (2014).
4. T. M. Geislinger & T. Franke, „Hydrodynamic lift of vesicles and red blood cells in flow - from Fåhræus-Lindqvist to microfluidic cell sorting“. *Advances in Colloid and Interface Science* 208 (2014), S. 161–176.
5. T. M. Geislinger & T. Franke. „Sorting of circulating tumor cells (MV3-melanoma) and red blood cells using non-inertial lift“. *Biomicrofluidics* 7 (2013), S. 044120
6. T. M. Geislinger, B. Eggart, S. Braunmüller, L. Schmid, & T. Franke. „Separation of blood cells using hydrodynamic lift“. *Applied Physics Letters*. 100 (2012), 183701.

Danksagung

Danke für meine guten Freunde
 Danke, oh Herr, für jedermann
 Danke, wenn auch dem größten Feinde ich
 verzeihen kann.
 Danke für meine Arbeitsstelle
 Danke für jedes kleine Glück
 Danke für alles Frohe, Helle und für die Musik.

(Die Ärzte, Danke für jeden guten Morgen)

In diesem, allerletzten Abschnitt meiner Arbeit ist die Zeit gekommen, mich mal so richtig zu bedanken. Dass dies mehr als angebracht ist, zeigt die erste Version dieser Danksagung. Sie war über drei Seiten lang und dabei noch lange nicht vollständig. Auch wenn ich am liebsten alle die mir geholfen haben hier erwähnen möchte, muss ich mich doch etwas kürzer fassen, verspreche aber, das Danke sagen bei nächster Gelegenheit persönlich nachzuholen!

Ich hatte das große Glück, meine Doktorarbeit in einer Art Mehrfachbetreuung anfertigen zu können. Das ursprüngliche Thema und die damit einhergehende „Lizenz zum Paper-Schreiben“ bekam ich von meinem (noch jungen) Doktorvater **Thomas Franke** überreicht. Danke Thomas, für die zahlreichen, intensiven Diskussionen, die Einführung in die Geheimnisse der Paper-Schreiberei, ohne die mir die Lizenz dazu nicht viel gebracht hätte und, last but not least, die Bekanntmachung mit dem Bossel-Sport. Gleichzeitig konnte ich von der Erfahrung von **Achim Wixforth** profitieren, an dessen Lehrstuhl ich den größten Teil meiner Arbeiten durchgeführt habe. Danke Achim für den starken Rückhalt in allen Lebens- und Forschungslagen („And the preacher said, ‚You know you always have the Lord by your side‘; And I was so pleased to be informed of this that I ran twenty red lights in his honor.“) und für die Gewährung von Urlaub jeden zweiten Sonntag im Jahr.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an **Malte Peter, Erich Sackmann** und **Ulrich Eckern**. Danke Malte für das Zweitgutachten zu meiner Arbeit, das konstruktive Feedback und Deine erfrischende Art. Danke Herr Sackmann und Danke Herr Eckern, dass sie sich als Prüfer zur Verfügung gestellt haben.

Mein Dank gilt der Arbeitsgruppe von **Mats Wahlgren**, allen voran **Kirsten Moll** und **Davide Angeletti**, in der ich die Experimente mit Malaria-infizierten RBK durchführen durfte. Mein Aufenthalt in Stockholm war eine wunderbare Erfahrung in einer herrlichen Stadt mit klasse Kollegen und, ganz nebenbei, ja auch wissenschaftlich recht erfolgreich. Danke für die großartige Unterstützung!

Mein Aufenthalt am Karolinska Institutet wäre dabei ohne **NIM** und das **NIM-GP** niemals zustande gekommen. Den Kontakt zu **Nicolas Joannin**, der bei Mats promovierte und mich ihm vorstellte, knüpfte ich nämlich auf der Nano Health-Konferenz in Kyoto, deren Besuch

mir von NIM ermöglicht wurde. Auch wenn dies sicherlich das Highlight war, möchte ich mich beim NIM-GP zudem für die langfristige Förderung und die Möglichkeit des Erfahrungsaustausches mit anderen Doktoranden bedanken. Stellvertretend für NIM möchte ich **Peter Sonntag, Chris Hohmann, Birgit Ziller, Barbara Pinto, Jonathan Finley, Tim Liedl** und meinem Zweitbetreuer **Joachim Rädler** danken.

Danke an **Susanne Schmid** (geb. Braunmüller), **Lothar Schmid** (nicht verwandt, nicht verschwägert) und **Benjamin Eggart**. Danke Susanne für die geduldige Einführung in die mikrofluidischen Pritscheleien mit roten Blutkörperchen, danke Lothar für die zahlreichen hilfreichen Diskussionen und danke Benni für das Eggart, die Nacht im King Size Half Double Bed und dafür, dass Du einfach der „Benni“ bist. Ohne Euch wäre ich nicht weit gekommen.

Danke liebe Forschungsabschnittsgefährtinnen **Janina Diessenbacher** und **Melanie Stamp**. Es war schön mit Euch und ja, bei mir hat das immer so funktioniert.

Mein Dank gilt weiterhin meinen Bürokollegen **Rudolf Herrmann, Mohammad „Babak“ Fallah** und **Christoph Westerhausen**. Danke euch für die klasse Zeit im Büro und die Hilfe in allen Lebenslagen. Schade, dass ich nur den Beginn der „Herreneckära“ mitbekomme, die wird sicherlich großartig.

Danke **Dominik Breyer** für Deine Matlab-Skripte, danke **Florian Schüle** für die Hilfe bei der Erstellung meines eigenen Matlab-Skriptes und seinen Kühlschränke, danke **Raum 308** in all seinen unterschiedlichen Besetzungen und danke **ethikfreie Zone**.

Danke an das wissenschaftsstützende Personal am Lehrstuhl. Danke **Funda Cevik, Sidonie Lieber, Olga Ustinov, Alexander Hupfer** und **Andreas Spörhase** für die unkomplizierte Zusammenarbeit, Eure Unterstützung und die Erfüllung aller (realistischen) Wünsche.

Danke an **Hubert Krenner** für die Laufeinheiten, ich hoffe wir behalten das bei!

Danke an alle anderen Mitglieder der **Mikrofluidik-Gruppe** und des **Lehrstuhls für Experimentalphysik I**, die ich bisher nicht aufgezählt habe. Es waren tolle Jahre mit super Kollegen, die mir viel geholfen haben und die ich definitiv vermissen werde. Ihr bekommt das Danke dafür nochmal in Großbuchstaben: DANKE!!!111!

Mein letzter und größter Dank geht an meine **Familie** für den steten Rückhalt und besonders an meine Frau **Patricia** für ihr Verständnis und ihre Geduld, wenn es mal wieder etwas länger gedauert hat als geplant. Danke!