

In vivo μ PIV Messungen an Zilien in Mäuseluftröhren

Jeanette Hussong^{*1}, Petra Faulhammer^{*2}, Katharina Noreikat^{*2},
Wolfgang Kummer^{*2}, Kendra V. Sharp^{*3}, Ralph Lindken^{*1}

^{*1} Laboratory for Aero and Hydrodynamics, Delft University of Technology, The Netherlands

^{*2} Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig- Universität Giessen, Germany

^{*3} The Pennsylvania State University, 157D Hammond Building, University Park, PA 16802

Schlagwörter: μ PIV, Zilien

Zusammenfassung

Schmutzstoffe, die in die Lunge geraten, setzen sich im Sekretfilm der Atemwege ab. Sie werden mit dem Sekret durch aktiv schlagende Flimmerhärchen (Zilien), die auf der Lungeninnenwand sitzen wieder aus der Lunge transportiert. Der Zusammenhang zwischen Veränderungen der Zilienfunktion und dem effektiven Sekrettransport lassen sich erkennen, wenn die Strömung in vivo gemessen werden kann. Wir stellen erste μ PIV Messungen an der Luftröhre (Lat.: trachea) einer Maus vor. Die zeitlich gemittelten Geschwindigkeitsprofile über einzelnen Ziliengruppen wurden ermittelt. Aspekte wie die Reaktion des biologischen Systems auf PEG-beschichtete Partikel sowie das Festlegen einer Referenzebene für die Bildauswertung werden diskutiert. Zielsetzung der Untersuchungen ist es durch Messung der lokalen Strömungsrichtungen und der Strömungs- sowie Partikeltransportgeschwindigkeiten auf Änderungen des Zilienschlages zu schließen.

1. Einleitung

Zilien sind 5-10 μ m lange und ca. 250 nm dicke aktiv bewegende Zellfortsätze. Sie sind bei Tieren fast jeder Art und Komplexität anzutreffen. In der Luftröhre transportieren sie Sekret und Schmutzstoffe (Partikel) aus der Lunge. Zilien bildende Zellen bedecken ca. 20% der Röhren Innenwand. Auf einer solchen Zelle bilden sich Busch ähnliche Ziliengruppen von ca. 160-200 Stück (Abbildung 1) [Brennen & Winet (1977)]. Gesunde Zilien schlagen typischerweise mit einer Frequenz von 30Hz. Die Reynoldszahl gebildet mit der kinematischen Viskosität von Wasser, der Länge der Zilien von 10 μ m und deren Zilienspitzen geschwindigkeit ergibt sich zu $Re \ll 1$.

Wenn der Zilienschlag dauerhaft gestört ist, treten chronische Erkrankungen auf, die tödlich sein können. Eine dauerhafte Störung der Zilienfunktionalität kann zum Beispiel durch das genetisch bedingte Fehlen eines Körperrezeptors verursacht sein, was als Knockout bezeichnet wird. Den für die hier vorgestellten μ PIV Messungen verwendeten Knockout Mäusen fehlte eine spezifische Muskarin-Rezeptor Untergruppe. Während sich die Zilienschlagfrequenz bei gesunden Mäusen (Wildtypen) bei Zugabe des Stimulators Muskarin erhöht, erwarten wir eine unveränderte Zilienschlagfrequenz bei den Knockout Mäusen.

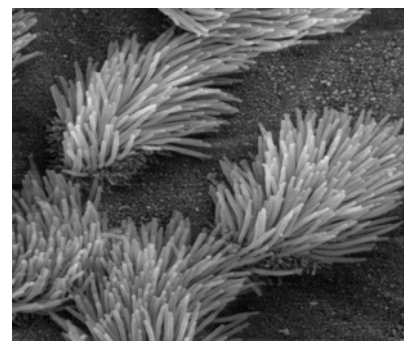


Abbildung 1: Trachea Epithelium, Charles Daglian

<http://remf.dartmouth.edu/images/mammalianLungSEM/source/9.html>

Studien der Zilienbewegung sind vielfach an mikroskopischen Wassertierchen durchgeführt worden [Machemer(1971), Blake(1971)]. Erste theoretische Modelle beschäftigen sich mit der durch den Zilienschlag induzierten zeitgemittelten Strömung [Blake(1973), Childress(1987)], wobei vielfach nur zweidimensionale Bewegungen betrachtet wurden. Aktuelle numerische Modelle versuchen den Einfluss der Synchronisierung unter verschiedenen Geometriebedingungen und Bewegungsabläufen numerisch zu erfassen [Juelicher(2006), Gueron(2001), Mayer(2001)]. Zilienströmungen in geschlossenen Systemen unterscheiden sich normalerweise dadurch, dass sie nicht Newtonische Fluide transportieren, wie zum Beispiel Körpersekrete [Brennen & Winet (1977)]. Nach in vitro Studien

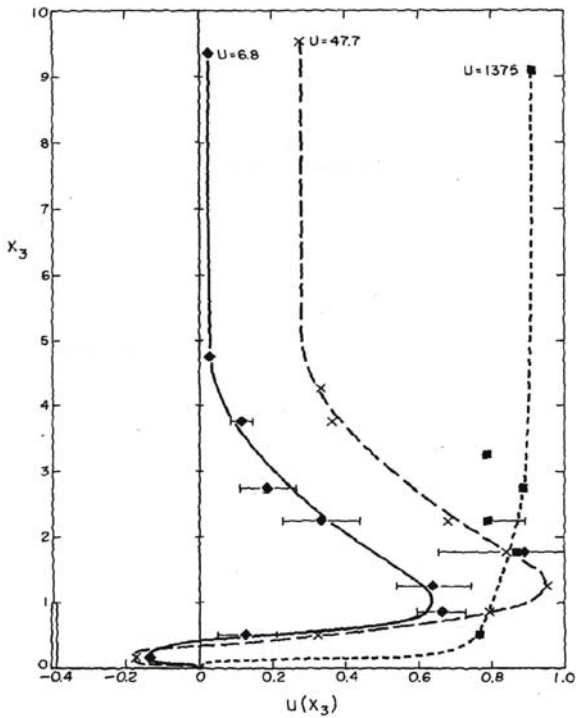


Abbildung 2: Gemessene Geschwindigkeitsprofile des Spirostomum [Cheung & Winet (1975)]

an Zilien der Mastrachea propagierten Cheung & Jahn die These, dass der Sekrettransport durch eine direkte mechanische Kraftübertragung zwischen Zilien und Sekret selbst stattfindet [Cheung & Jahn (1975)]. Quantitative in vivo Messungen von Zilien induzierten Strömungen sind von Cheung und Winet am Spirostomum, einem bis zu vier Millimeter großem Wassertierchen gemessen worden [Cheung & Winet (1975)]. Abbildung 2 zeigt die gemessenen zeitgemittelten Geschwindigkeitsprofile. Sie geben drei unterschiedliche Schwimgeschwindigkeiten des mikroskopischen Wassertieres wieder. Die Wand normale Achse ist mit der Zilienlänge entdimensioniert, die horizontalen Geschwindigkeiten sind mit der jeweils maximal gemessenen Geschwindigkeit entdimensioniert. Winet schreibt, dass Studien von Zilien in Röhren wichtige Informationen zu einigen grundlegenden Widersprüchen liefern können [Winet(1973)].

In dieser Arbeit stellen wir μ PIV Messungen an in vivo Mäuseluftröhren vor. Zielsetzung dieser Messreihen ist es durch gemessene Änderungen der lokalen Strömungsrichtungen und der Strömungs- sowie Partikeltransportgeschwindigkeiten auf Änderungen des Zilienschlages zu schließen.

2. Versuchsdurchführung

2.1. Messprinzip

Für die vorgestellte Arbeit haben wir μ PIV Messungen durchgeführt. Geschwindigkeitsfelder werden durch die Verschiebung von Partikelgruppen zweier aufeinander folgender Bildaufnahmen berechnet. Die Partikel müssen hierfür hinreichend klein sein um der Strömung zu folgen, aber groß genug um ein ausreichend hohes Intensitätssignal zu erhalten. Durch die Zugabe von kleinen Teilchen, die die Dichte des fließenden Mediums besitzen, wird die durch die Zilien induzierte Strömung visualisiert. Zusätzlich geben wir größere, schwere Teilchen hinzu, die den Partikeltransport auf der Oberfläche des Zellgewebes visualisieren. Das Verfahren ist detailliert in Kapitel 2.4 beschrieben. Die Partikelverschiebung wird mittels zweidimensionaler Kreuzkorrelation ausgewertet. Hierfür wird das Bild in kleinere Bereiche, so genannte Interrogations- oder Auswertefenster unterteilt, für die jeweils ein Geschwindigkeitsvektor ermittelt wird. Die Messebene ist die Bildebene in der die Partikel scharf abgebildet werden. Eine Messebene hat eine endliche Tiefe, die Korrelationstiefe innerhalb der alle Partikel zur statistischen Auswertung beitragen.

2.2. Tiervorbereitung

Um reproduzierbare in vivo Messungen durchzuführen muss ein genauer Zeitplan von der Tiertötung

bis zu der Messung eingehalten werden. Nach der Tötung des Tieres wird die Mäuseluftröhre entnommen. Durch einen Längsschnitt klappt die ca. 5mm lange und 2mm dicke Röhre auf. Die Trachea wird mit gepufferter Wasserlösung gereinigt und in einer Petrischale mit zwei Präparationsnadeln fixiert. Die Geometrie der Probe entspricht beim Messen einer halboffenen Röhre, in der die Zilien eine Strömung annähernd parallel zum Schnitt erzeugen. Die Petrischale wird mit einer gepufferten Wasserlösung (HEPES-Ringer Puffer) aufgefüllt und in die Halterung der Heizplatte gestellt. Diese hält die Temperatur der Petrischale konstant auf 30 Grad Celsius. Das Zellgewebe kann so noch einige Stunden leben.

2.3. Experimenteller Aufbau

Abbildung 3 ist eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Die Probe befindet sich in der Petrischale unter dem aufrechten Mikroskop. Die Schale sitzt in einer passformen Heizplatte, die wiederum auf dem Objektträger des Mikroskops montiert ist. Die Epi-Fluoreszenz Aufnahmen wurden mit einem Wassertauchobjektiv hoher numerischer Apertur (NA=0.8) mit vierzigfacher Vergrößerung und einem Arbeitsabstand von 3mm durchgeführt. Über einen dichroitischen Spiegel wird der Doppelpuls-Nd:YAG Laserstrahlengang in das Mikroskop eingekoppelt. Die Wellenlänge mit der die Rh-B Fluoreszenz Beschichtung der Streuteilchen angeregt wird beträgt 560nm. Das von den beschichteten Teilchen emittierte, rote Licht passiert den dichroitischen Spiegel und wird von einer 9.9Hz Doppel-Bild CCD Kamera, die eine Auflösung von 1000x1300 Pixel hat, aufgenommen. Der Laserpuls und die Kamera Aufnahmezeit werden von einer Trigger und Timing Einheit koordiniert. 5 Minuten vor jeder Messung wird die Wasserlösung in der Petrischale gerührt, um zu vermeiden, dass sich die schweren Partikel in der Flüssigkeit absetzen. Vierzig Minuten nach der Tiertötung werden die ersten Durchlichtbilder nahe der Oberfläche aufgenommen um den Partikeltransport der schweren Teilchen zu messen. Direkt danach werden in 7 Ebenen die Partikelbewegungen der leichten Polyesterolteilchen aufgenommen, welche die Fluidströmung repräsentieren. Die Messreihe wird 5min nach Muskarinzugabe (10^{-4} M) wiederholt. Eine zweite Wiederholung der Messprozedur erfolgt schließlich nach Zugabe des Stimulators ATP. Insgesamt wurden für jeden Maustyp vier Wiederholungsmessungen durchgeführt, um trotz biologischer Variationen eine minimale statistische Sicherheit der Messergebnisse zu erlangen.

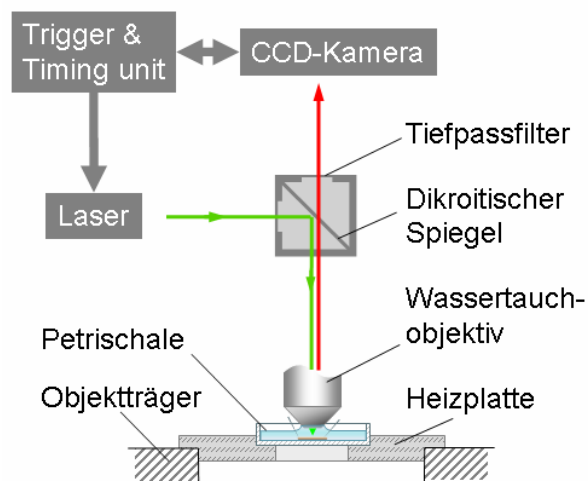


Abbildung 3: Schematischer Versuchsaufbau

2.4. Tracerpartikel

Zilien transportieren Feststoffe, so wie Flüssigkeit. Durch die Zugabe und quasi zeitgleiche Messung zweier, verschiedener Partikelarten können beide Transportprozesse gemessen und direkt miteinander verglichen werden. 560nm große Polyesterolteilchen einer relativen Dichte zu Wasser von 1.05 wurden verwendet. Sie bleiben in Suspension und folgen der Strömung. Mit dem Transport der Polyesterolteilchen werden die zeitgemittelten Stromlinien bestimmt. 2,8 µm große Dynabead-Partikel werden verwendet, um den Partikeltransport zu messen. Mit einer relative Dichte von ~2 sind sie schwerer als Wasser und sinken auf den Boden des Zellgewebes.

Sowohl die schweren Teilchen, als auch die Polyesterolteilchen befinden sich während der Messungen in der Wasserlösung. Die schweren Teilchen sind Protein G gekoppelt. Dadurch sind sie nicht toxisch. Sie lösen während der Messungen keine sichtbare Reaktion der Probe aus. Die Polyesterolteilchen sind PEG (Polyethylenglycol) beschichtet [Lindken et al. (2006)]. Eine PEG Beschichtung erzeugt eine hydrophile Oberfläche. Dadurch baut sich ein Wassermantel um die Teilchen auf. Dieser soll verhindern, dass das biologische System den Fremdkörper wahrnimmt. Beobachtungen dieser Art konnten bei in vivo Messungen an Hühner Embryos gemacht werden [Vennemann (2006)]. Andere

Tracer fuer biologische Systeme wurden von Kowalczyk (2007) und Hartmann (2007) beschrieben. Eine PEG Beschichtung der Teilchen erhöhte die Lebensspanne von Hühnerembryos denen die Tracer Lösung injiziert worden war [Vennemann et al. (2007), Poelma et al. (2008)]. Während unserer Messungen jedoch wurde die Produktion der Sekret bildenden Zellen durch die Präsenz der PEG Teilchen stimuliert. Wir beobachteten einen wesentlich stärkeren Effekt für 1.05µm große Teilchen als für 0.56µm große Tracer. Darum entschieden wir uns für die Streuteilchen mit geringerem Durchmesser, obwohl diese ein deutlich schlechteres Signal liefern und die µPIV-Auswertung erschwerten.

Die Anzahldichte der verwendeten Partikel wurde durch den langen Arbeitsabstand des verwendeten Tauchobjektives von 3mm im Arbeitsmedium eingeschränkt. Bei einer für die µPIV üblichen Partikeldichte war die Transparenz des Fluid so weit eingeschränkt, dass Fluoreszenzsignale von Streuteilchen in der Messebene nicht mehr von dem Hintergrund-Fluoreszenzsignal aller defokussierten Teilchen zwischen Objektiv und Messebene zu unterscheiden waren. Die Partikelkonzentration musste daher beschränkt werden. Es wurden 2,3 µl schwere Partikel und 2,3 µl Polyesterollösung auf 1,5 ml Pufferflüssigkeit gegeben. Dies entspricht jeweils ca. 0,003 Volumenprozent Teilchen in Lösung.

2.5. Bildauswertung

Die Qualität der Messergebnisse ist maßgeblich durch das Signal zu Rauschverhältnis der Partikelbilder bestimmt. Die folgend beschriebenen Bildverarbeitungsschritte dienen dazu Hintergrundintensitätsschwankungen gegenüber den Partikelbildintensitäten zu minimieren. Fehlerhafte Signale die in der Strömung auftreten können sind zum Beispiel Reflektionen des Hintergrundes, Zellen, die Fluoreszenzfarbstoff absorbiert haben, relativ hohe Pixelintensitäten durch defokussierte Fluoreszenzteilchen zwischen Objektiv und Messebene aber vor allem Partikel, die an Zilien haften und so nicht der Strömung folgen können, oder Partikel, die sich in Sekret ansammeln, dass auf der Probenoberfläche transportiert wird. Die Bildvorbearbeitung und Bildnachbearbeitung wurde mit der kommerziellen Software DAVIS durchgeführt. Zunächst wird der Bildhintergrund mit einem zeitlichen „sliding minimum“ über eine zeitlich Bildserie von 11 Bildern entfernt, so dass Grauwerte, die über die gesamte Aufnahmezeit hinweg konstant bleiben, verschwinden. Im zweiten Bildbearbeitungsschritt wird ein 3x3 Glättungsfilter angewandt um eine Gausche Intensitätsverteilung über ein Partikelbild zu erzielen. Der Partikeldurchmesser erhöht sich damit auf 5 Pixel. Gleichzeitig reduziert der 3x3 Glättungsfilter das Rauschen des Hintergrundes („salt and pepper noise“). Als dritter Bildverarbeitungsschritt wird ein räumliches „sliding minimum“ mit einer Filterkantenlänge von 9 Pixel angewandt. Großflächige Hintergrundintensitätsschwankungen werden ausgeglichen. Ein Anwenden des 3x3 Glättungsfilters vor dem räumlichen „sliding minimum“ ist deshalb vorteilhaft, weil die gemittelten Hintergrundintensitätswerte die durch den letzten Bearbeitungsschritt subtrahiert werden höher sind als bei einer umgekehrten Anwendungsreihenfolge der Filter. Die Partikelverschiebung betrug vor Medikamentenzugabe typischerweise 6-18 Pixel vor und bis zu 40 Pixel nach Muskarin oder ATP Zugabe für ein konstantes dt von dt=30 ms. Eine Korrelationsfenstergröße vor bzw. nach Medikamentenzugabe von 64x64 Pixel bzw. 128x128 Pixel wurde daher im ersten Iterationsschritt und 32x32 bzw. 64x64 Pixel große im zweiten Iterationsschritt gewählt. Um trotz geringer Partikelstredichte eine hohe Vektorfeldauflösung zu erlangen haben wir über 160 Bilder eine Korrelationsmittlung („Ensemble Correlation“ oder „Correlation Averaging“) durchgeführt. So konnte das Signal zu Rauschverhältnis verbessert und die Zuverlässigkeit der Messergebnisse erhöht werden [Meinhart (2000)]. Die in den sich ergebenden Vektorbildern vorhandenen Fehlvektoren wurden mit einem Medianfilter detektiert. Fehlende Vektoren werden durch eine bilineare Interpolation ersetzt.

2.6. Bestimmung der Referenzebene

Durch die Oberflächentopographie der Abstand der Organwand zur Messebene variabel. Jede Ziliengruppe befindet sich auf einem unterschiedlichen Höhenniveau relativ zur Messebene. Eine Referenzebene wird durch fokussierte Fluoreszenzpartikel bestimmt, die an Zilien haften. In der ersten

Messebene werden drei Ziliengruppen maskiert, an denen fokussierte Tracer haften und auf alle weiteren Messebenen übertragen. Für diese drei Zilienzellen kann die erste Messebene als Referenzebene definiert werden. Die Referenzebene liegt aufgrund der Art Ihrer Positionsbestimmung zwischen Zilienwurzel und Spitze, abhängig davon, wo Partikel an den Zilien haften. Anhand der schwingenden Bewegung der haftenden Partikel, die wir während der Messung beobachtet haben, vermuten wir, dass diese sich an den Zilienspitzen festsetzen. Eine Ziliengruppe erstreckt sich über eine Abbildungsfläche von etwa $12 \times 12 \mu\text{m}^2$. Ein Geschwindigkeitsvektor wurde aus einem Auswertefenster von $9,6 \times 9,6 \mu\text{m}^2$ ermittelt. Mit 50% Überlappung der Auswertefenster ergibt sich ein Abstand der Geschwindigkeitsvektoren von $4,8 \mu\text{m}$. Wir erhalten somit 4-9 Geschwindigkeitsvektoren über einem Zilienbusch für eine Auswertefenstergröße von 64×64 Pixel.

3. Ergebnisse

Die Messungen wurden mit zwei Partikelarten verschiedener Eigenschaften durchgeführt. Dies ermöglicht das Transportverhalten der schweren Partikel dem Strömungstransport, der durch die Stromlinien der zeitgemittelten Polyesterolpartikelbahnen repräsentiert wird, gegenüber zu stellen. Abbildung 4 sind einige schwere Teilchen zu mehreren Zeitpunkten abgebildet. Dies veranschaulicht wie die Partikel die Bildebene passieren. Gelb gestrichelt sind die Bahnlinien einzelner Teilchen beispielhaft nachgezeichnet. Das Bild ist mit den überlagert. Sowohl die Stromlinienlinien als auch die Partikelbahnen weisen Richtungsschwankungen auf. Die Teilchenbahnen der schweren Partikel weichen von den Stromlinien ab. Es sind Teilchen zu erkennen, die sich zeitweise entlang den Stromlinien bewegen, streckenweise jedoch Richtungsänderungen entgegen der Stromlinienkrümmung vornehmen oder sich gerade fortbewegen während die Stromlinien seitlich weglaufen. Es können Richtungsabweichungen der Partikelbahnen zu beiden Seiten der Stromlinienrichtungen beobachtet werden. Die Partikeltransportgeschwindigkeiten vor Muskarin Zugabe wurden in vorhergehenden Partikel-tracking Messungen zu $20-70 \mu\text{m/s}$ bestimmt [Kummer et al.].

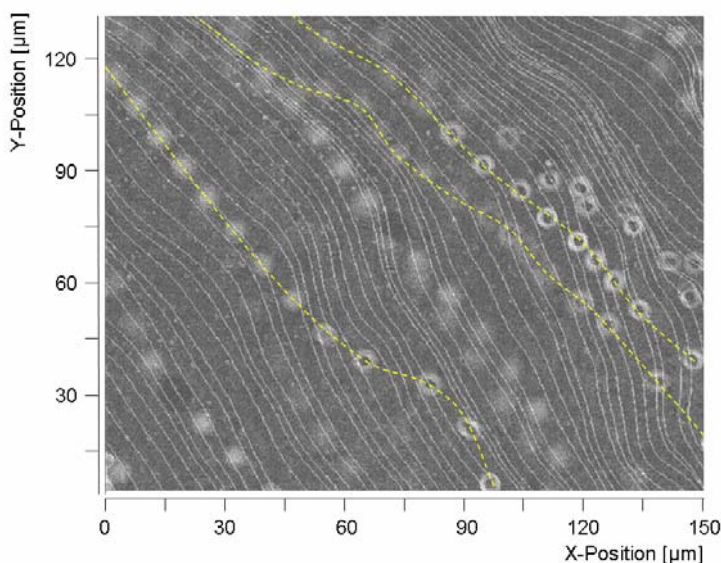


Abbildung 4: Stromlinien überlagert mit den Partikelbahnen schwerer Tracer (weiße Ringe)

Abbildung 5 links zeigt die Zilienstruktur unter einem μPIV Messvolumen. Da die Zilien nahezu transparent sind, ist für das gezeigte Bild die Durchlichtaufnahme invertiert und das „sliding minimum“ subtrahiert worden. Hohe Intensitätswerte kommen dort zustande wo sich die Zilien bewegen. Mit Hilfe dieses Bildes sind alle Zilien bedeckten Bildflächen markiert worden. Die Markierungen sind im Vektorbild rechts der Abbildung 5 als gestrichelte Umrandung zu sehen. Die Messebene des Vektorfeldes liegt ca. $25 \mu\text{m}$ oberhalb der Messebene des linken Bildes. Die auf das Vektorfeld gelegte Markierung zeigt, ob sich Bereiche höherer Strömungsgeschwindigkeit mit Zilien bedeckten Bereichen zur Deckung kommen. An der gekennzeichneten Position 1 befindet sich ein größerer Zilien freier Oberflächenbereich der Probe. Im rechten Bild sind die Geschwindigkeiten im selben Bildbereich gering. Im Umgebungsbereich der mit 2 gekennzeichnet ist liegen mehrere Ziliengruppen dicht zusammen, so dass sich eine größere zusammenhängende Fläche ergibt. Im Vektorfeld des rechten Bildes entspricht dies dem Strömungsbereich maximaler Geschwindigkeiten. An der mit 3 gekennzeichneten Position ist die Strömungsgeschwindigkeit jedoch gering, obwohl anhand der Maske deutlich wird, dass sich in diesem Bildfeldbereich Zilien befinden.

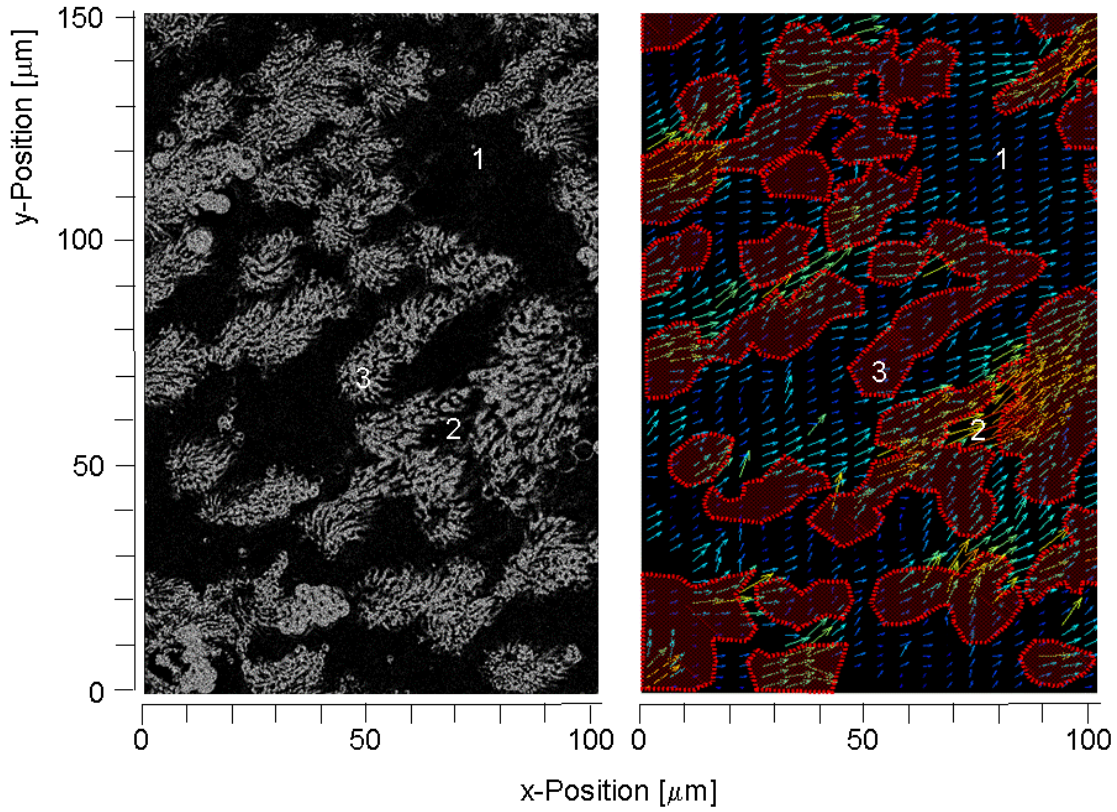


Abbildung 5: Links: Bildbearbeitete Durchlichtaufnahme der Gewebeoberfläche mit Ziliengruppen; Rechts: Zugehöriges Vektorfeld in einer Messebene ca. 25µm darüber

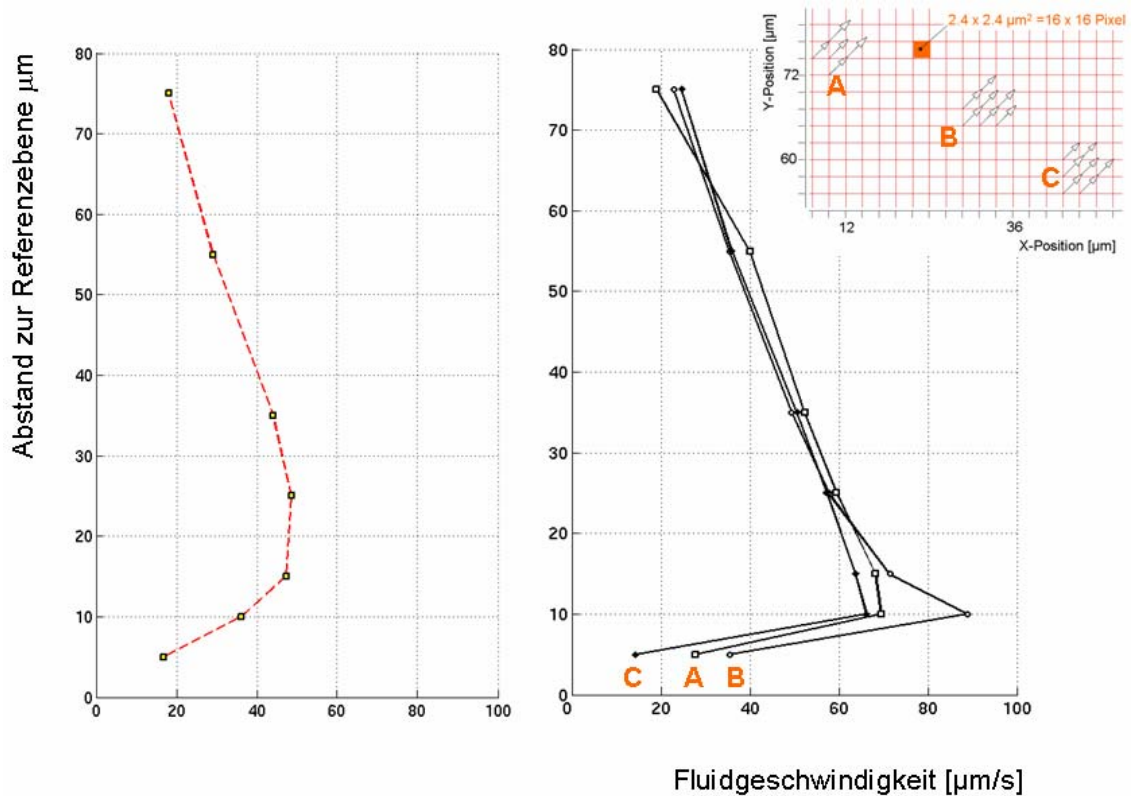


Abbildung 6: Zeitgemittelte Geschwindigkeitsprofile ueber der Zilienzelloberflaeche (andere Messung als in Abbildung 5) Links: Durchschnittsgeschwindigkeiten der Messebenen; Rechts: Zeitgemittelte Geschwindigkeiten über drei Ziliengruppen

In Abbildung 6 links ist der Messebenenabstand über den zeitgemittelten, mittleren Geschwindigkeiten jeder Messebene aufgetragen. Die Kurve hat ein Maximum von ca. $50\mu\text{m/s}$ zwischen der 3. und 4. Messebene. Dies entspricht einem ungefähren Abstand zur Oberfläche von $15\text{-}20\mu\text{m}$. In allen weiteren Messebenen sinkt der Geschwindigkeitsbetrag linear ab. In Abbildung 6 rechts sind die Geschwindigkeitsprofile über drei Ziliengruppen dreier Zilienzellen der gleichen Messreihe dargestellt. Die Maxima liegen für alle Kurven zwischen der 2. und 3. Messebene, also bei einem Abstand von 5 bis $10\mu\text{m}$ über den Referenzebene. Die Geschwindigkeiten liegen hier je nach Messkurve zwischen 70 und $90\mu\text{m/s}$. Für einen Abstand von $15\mu\text{m}$ und mehr über der Referenzebene ergibt sich ein linearer Geschwindigkeitsabfall. Alle drei Geschwindigkeitsprofile kommen in diesem Bereich gut zur Deckung.

4. Diskussion

Wir haben erfolgreich Geschwindigkeitsmessungen an Mauszilien durchgeführt. Das μPIV / PTV System, das wir aufgebaut haben, erlaubt uns simultane Messungen der Strömungsgeschwindigkeit sowie des Partikeltransportes durchzuführen. Die Berechnung der Stromlinien und der Partikelbahnen in Abbildung 4 hat gezeigt, dass der Partikeltransport durch Tracheazilien signifikant von der durch die Zilien induzierten Strömung abweicht (Abbildung 4). Wir konnten in Einzelfällen Richtungsabweichungen der Teilchen von der Strömung von bis zu 90 Grad beobachten.

Richtungsschwankungen der Stromlinien der zeitgemittelten Strömung in Abbildung 5 zeigten, dass der Fluidtransport im wandnahen Bereich Richtungsänderungen aufweist, die durch die Topographie des Zellgewebes sowie durch den Einfluss des Zilienschlages verursacht werden. Stärkere Geschwindigkeitsänderungen nahe der Oberfläche können auf Zilienzellgruppierungen zurück geführt werden, indem die Lage von Ziliengruppen manuell bestimmt und dem Geschwindigkeitsfeld gegenüber gestellt wurden. Es zeigte sich, dass Gruppierungen von Zilien-tragenden Zellen sich in Hauptströmungsrichtung hintereinander ausrichten. Größere Gruppierungen mehrerer Ziliengruppen rufen eine deutliche zeitgemittelte, räumlich begrenzte Geschwindigkeitszunahme hervor. Die an Position 2 in Abbildung 5 rechts gezeigte Geschwindigkeitszunahme einer Gruppierung von ca. 12 Zilienzellen betrug bis zu $2,5$ fach dem gemittelten Geschwindigkeitsbetrag der Messebene. Einzelne Zilienzellen und kleine Gruppierungen weniger Zilienzellen hatten einen wesentlich geringeren und stärker variierenden Einfluss auf die Strömung. Dies zeigt, dass eine Zunahme der Ziliendichte sich proportional zur induzierten Strömungsgeschwindigkeit verhält.

Eine Herausforderung stellte die unbekannte Oberfläche der Trachea dar. Auf Grund der schlagenden Zilien auf der Oberfläche ist es nicht möglich mittels einer Extrapolation der Geschwindigkeitsprofile den Ort der Nullgeschwindigkeiten an der Probenoberfläche zu bestimmen [Rossi et al. (2006), Lindken et al. (2006)]. Unser Ansatz bei unbekannter Topographie räumlich aufgelöste Regionen gleicher Höhe zu detektieren und so eine Referenzebene für darüber liegende Messungen zu definieren, basiert auf der Detektion von Tracerpartikeln, die an den Zilien hafteten und charakteristische Muster nach der Bildverarbeitung generieren. Die Lage dieser Muster wurde manuell bestimmt. Bezogen auf Referenzebenen haben wir Geschwindigkeitsprofile über den Zilien ermittelt wie in Abbildung 6 rechts dargestellt ist. Es ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung der gemessenen Profile einzelner Ziliengruppen. Ein Vergleich mit dem zeitlichen und räumlichen Mittel (Abbildung 6 links), bei dem nicht für jeden einzelnen Messpunkt die Referenzebene bestimmt wurde, zeigt, dass die Geschwindigkeitsgradienten durch die Mittelung kleiner sind. Da der Durchschnittswert aller Profile den allgemeinen Trend deutlich wiedergibt, kann dieser für vergleichende Messungen des Zilientransportes vor und nach Medikamentenzugabe benutzt werden. Messungen nach Muskarinzugabe zeigten $2.5\text{-}8$ fache Geschwindigkeitszunahmen. Zurzeit werten wir die Messergebnisse nach Medikamentenzugabe aus.

5. Dankesworte

Die Arbeit wird finanziert vom Projekt ARTIC (STRP 033274) im 6. EU Rahmenprogramm.

6. Literatur

- Blake, J. (1972), *J. Fluid Mech.*, "A model for the micro-structure in ciliated organisms", vol. 55, part 1, pp. 1-23
- Blake, J. (1973), "A Finite Model for ciliated Micro-Organisms", *J. Biomechanics*, Vol. 6 pp. 133-140
- Blake, J. (1974), "Hydrodynamic Calculations on the Movements of Cilia and Flagella", *I. Paramecium*, *J. Theor. Biol.* 45, 183-203
- Brennen, C.; Winet, H. (1977), "Fluid Mechanics of Propulsion by Cilia and Flagella", *Ann. Rev. Fluid. Mech.*, 9' 339-98
- Cheung, A. T., Jahn, T. L. (1975), "Determination of the movement pattern of the epithelial cilia of rabbit trachea and the clearance mechanism of the tracheal muco-ciliary clearance system", in *Swimming and Flying in Nature*, New York:Plenum, Vol. I, pp.289-300.
- Cheung, A. T. W., Winet, H. (1975), "Flow velocity profile over a ciliated surface", in *Swimming and Flying in Nature*, New York:Plenum, Vol. I, pp.223-234
- Childress, S., Koehl, M. A. R., Miksis, M. (1987), "Scanning currents in Stokes flow and the efficient feeding of small organisms", *J. Fluid Mech.*, vol. 177, pp. 407-436
- Childress, S. (1981), "Mechanics of swimming and flying", *Cambridge Studies in Mathematical Biology*, ISBN 0 521 23613 4
- Cosentino Lagomarsino, M., Bassetti, B., Jona, P. (2003) , "Metachronal waves for deterministic switching two-state oscillators with hydrodynamic interaction", *Physical Review E* 68, 021908
- Güron, S. and Levit-Gurevich, K. (2001), "A three-dimensional model for ciliary motion based on the internal 9+2 structure", *Proc. R. Soc. Lond. B* 268, 599-607
- Hartmann, C., Özmutlu Ö., Petermeier, H., Fried, J., Delgado, A. (2007), „Analysis of the flow field induced by the sessile peritrichous ciliate *Opercularia asymmetrica*“, *Journal of Biomechanics* 40, 137-148
- Kowalczyk, W., Zima, B. E., Delgado, A. (2007), „A biological seeding particle approach from μ -PIV measurements of a fluid flow provoked by microorganisms“, *Exp. Fluids* 43, 147-150
- Kummer, W., zu publizierende Messergebnisse
- Lindken, R.; Westerweel, J.; Wieneke, B. (2006), „Stereoscopic Micro Particle Image Velocimetry. Experiments in Fluids“, 41:161-171.
- Lindken, R.; Rossi, M.; Ekeberg, I.; Vennemann, P.; Hierck, B.P.; Westerweel, J. (2006), „In vitro Messung der Wandschubspannungsverteilung auf einer Endothel Zellschicht mittels Micro Particle Image Velocimetry (μ PIV)“, *Proc. of 14. Fachtagung Lasermethoden in der Strömungsmesstechnik, GALA, Braunschweig, Germany, September 5-7.*
- Lindken, R.; Rossi, M.; Hierck, B.P.; Vennemann, P.; Westerweel, J. (2006), "Measurement of Shear Stress on Endothelium in a Flow Chamber and its Gene Expression Response", *Journal of Biomechanics*, 39:S303.
- Machemer, H. (1972), "Ciliary Activity and the origin of the Metachrony in Paramecium: Effects of increased viscosity", *J. Exp. Biol.*, 57, 239-259
- Poelma, C.; Vennemann, P.; Lindken, R.; Westerweel, J., „In vivo blood flow and wall shear stress measurements in the vitelline network“, *Experiments in Fluids*, available online first
- Vennemann, P., Kiger, K. T., Lindken, R., Groenendijk, B. C. W., Stekelenburg-de Vos, S., ten Hagen, T. L. M., Ursem, N. T. C., Poelmann, R. E., Westerweel, J., Hierck, B. P. (2006), "In vivo micro particle image velocimetry measurements of blood-plasma in the embryonic avian heart", *Journal of Biomechanics* 39, 1191-1200
- Rossi, M.; Ekeberg, I.; Vennemann, P.; Lindken, R.; Westerweel, J.; Hierck, BP.; Tomasini, EP. (2006), „In vitro study of shear stress over endothelial cells by Micro Particle Image Velocimetry (μ PIV)“, 13th Int Symp on Applications of Laser Techniques to Fluid Mechanics, paper 14.4, Lisbon, Portugal, June 26-29.
- Vennemann, P.; Lindken, R.; Westerweel, J. (2007), „In Vivo Whole-Field Blood Velocity Measurement Techniques“, *Experiments in Fluids*, 42:495-511
- Vilfan, A. and Jülicher, F. (2006), "Hydrodynamic Flow Patterns and Synchronization of Beating Cilia", *PRL* 96, 058102
- Wu, T. Y., Brokaw, C. J., Brennen, C., eds. (1975), "Ciliary Propulsion in the Proceedings of the Symposium on Swimming and Flying in Nature", Pasadena, California, July 8-12, 1974, ISBN 0-306-37088-3 (v.1)