

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

ERİTROSİT AGREGASYON KİNETİĞİNE ETKİLİ FAKTÖRLER

Mehmet ÜYÜKLÜ

Doktora Tezi

Antalya, 2012

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

ERİTROSİT AGREGASYON KİNETİĞİNE ETKİLİ FAKTÖRLER

**Mehmet ÜYÜKLÜ
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Murat CANPOLAT**

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2009.03.0122.012)

Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2012

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 16/07/2012

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat CANPOLAT
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. V.Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Filiz BASRALI
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Z. Melek KÜÇÜKATAY
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

ONAY

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2012 tarih ve/..... kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (orjinalleri ekte sunulmuştur).

1. Uyuklu M, Canpolat M, Meiselman HJ, and Baskurt OK: Wavelength selection in measuring red blood cell aggregation based on light transmittance. *Journal of Biomedical Optics* 16(11): 2011
2. Baskurt OK, Uyuklu M, Meiselman HJ: Time course of electrical impedance during red blood cell aggregation in a glass tube: comparison with light transmittance. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 57(4): 969-978, 2010.
3. Baskurt OK, Uyuklu M, Hardeman MR, Meiselman HJ: Photometric measurements of red blood cell aggregation: light transmission versus light reflectance. *Journal of Biomedical Optics*.14(5): 2009.
4. Baskurt OK, Uyuklu M, Meiselman HJ: Simultaneous monitoring of electrical conductance and light transmittance during red blood cell aggregation. *Biorheology* 46: 239-249, 2009.

ÖZET

Eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin ölçülmesiyle eritrosit agregasyonunun değerlendirilebileceğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Eritrositlerin ve plazmanın elektriksel özellikleri birbirlerinden farklıdır. Eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin ölçülmesiyle eritrosit agregasyonunun değerlendirilebileceğini, fotometrik ölçümlere benzer şekilde bir seyir gösterdiği ve eritrosit agregasyonu süreci hakkında bilgi verebileceğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda eritrosit agregasyonu ve agregasyon zaman sabitlerinin ölçüm sistemine ait geometriye bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir. Fakat küçük çaptaki kapillerdeki agregasyon kinetiği hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada, farklı geometriye sahip cam kapillerde eritrosit agregasyon kinetiğinde meydana gelebilecek değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özellikleri yatay cam kapillerde, enjektör pompasıyla oluşturulan akım sırasında ve sonrasında kaydedilmiştir. Ölçüm sistemimizde elektriksel ölçümlerin yapılabilmesi için, iki tane paslanmaz çelikten yapılmış olan elektrodlar cam kapillerin baş ve son kısımlarına yerleştirilmiştir. Bu elektrodlar, seri kapasitans (C) ölçümleri için LCR metreye bağlanmıştır. Bu çalışmada 80–800 µm arası çapa sahip cam kapiller borularda eritrosit agregasyonunun zaman seyri değerlendirilmiştir. Bu amaçla çeşitli özelliklere sahip eritrosit süspansiyonlarının cam kapillerden akımı sağlandı, akım sırasında ve akım durdurulduktan sonra, süspansiyonların agregasyon sürecini yansıttığı bilinen özellikleri izlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, eritrosit agregasyon parametreleri ölçümü yapılan kapillerin çapından etkilenmektedir. Cam kapillerin çapının azalmasıyla birlikte eritrosit agregasyonu parametrelerinde önemli değişiklikler ölçülmüştür. Özellikle, 80 ile 800 µm arasında değişen çaplara sahip kapillerde ölçümü yapılan eritrosit agregasyonu zaman sabitleri ($T_{1/2}$, T_{slow} and T_{fast}) kapillerin çapına bağlı olarak değişimler göstermektedir.

Küçük çapa sahip cam kapiller borulardaki eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin ölçülmesi, bu kapillerde eritrosit agregasyon kinetiğinin belirlenmesine yardımcı olabilir.

Anahtar kelimeler: Kapasitans, Elektriksel ölçüm, Eritrosit agregasyon kinetiği, Cam kapiller

ABSTRACT

It has been reported that electrical properties of red cell suspensions also change during aggregation. The electrical properties of blood plasma and blood cells differ from each other. Several groups suggested that monitoring electrical properties of red cell suspensions during aggregation can provide information about the time course of aggregation, in a similar way to the photometric methods. In recent years, erythrocyte aggregation and aggregation time constant is thought to vary depending on the geometry. But there is not enough information about the kinetics of aggregation of small diameter capillaries. The aim of the study is the investigation of the alterations depending on the diameter in glass capillaries with different diameters in erythrocyte aggregation kinetics. Electrical properties of red blood cell (RBC) suspensions were recorded in a horizontal glass capillary, during and after the stoppage of flow induced by a syringe pump. Two stainless steel cylinders were fitted on both ends of the capillary serving as electrodes for electrical measurements. These electrodes were connected to a LCR meter for the measurement of electrical series capacitance (C). In this study, we evaluate the time period (course) of erythrocyte aggregation of glass capillary tubes with a diameter of between 80-800 micrometers. For this purpose, a flow was provided of various properties of erythrocyte suspensions through glass capillary tubes and the process of aggregation reflect the known properties of suspensions were monitored during the flow and after the current flow was stopped. The results of the current study also confirm of time-course related parameters influenced by geometry of the capillaries used for RBC aggregation measurements. The decreased diameters of glass capillaries resulted in significant and progressive changes of all kinetics of aggregation parameters as measured by the six glass capillaries. Especially, parameters reflecting the time course of RBC aggregation ($T_{1/2}$, T_{slow} and T_{fast}) as determined between 80 and 800 μm were affected by the diameter of capillaries.

The measurement of the electrical properties of the erythrocyte suspensions in glass capillary tubes with a small diameter can help to determine the erythrocyte aggregation kinetics in these the capillaries.

Key words: Capacitance, Electrical measurements, Red blood cell aggregation kinetics, Glass capillary

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, projelendirilmesi ve gerçekleşmesinde değerli katkı ve eleştirileriyle bana yol gösteren sayın Prof. Dr. Oğuz Kerim BAŞKURT'a, öneri ve eleştirileri için tez danışmanım Prof. Dr. Murat CANPOLAT'a ve değerli hocalarıma, her zaman dostluklarını ve yardımlarını hissettiğim Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, laboratuardaki destek ve yardımlarından dolayı Akın BÜYÜKAKAR'a, sonsuz sabır ve destekleri için değerli arkadaşlarıma, aileme ve sevgili eşim Ayşe ÜYÜKLÜ'ye teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanın Akışkanlık Özellikleri ve Önemi	4
2.1.1. Kitle Halinde Kan Akımı	4
2.1.2. Kapiller Kan Akımı (Mikrodolaşım)	5
2.1.3. Kanın Akışkanlığını Belirleyen Faktörler	5
2.2. Eritrositler	6
2.2.1. Eritrosit Deformabilitesi	7
2.2.2. Eritrosit Agregasyonu	7
2.3. Eritrosit Agregasyonu Ölçüm Yöntemleri	12
2.3.1. Mikroskopik Metotlar	12
2.3.2. Eritrosit Sedimentasyon Hızı	12
2.3.3. Düşük Kayma Viskozitesi Ölçümü	13
2.3.4. Ultrasonik Yöntemler	13
2.3.5. Fotometrik Metodlar	13
2.3.6. Elektriksel Özelliklerin İzlenmesi	14
2.4. Eritrosit Agregasyonunun İn-vivo Önemi	15
2.4.1. Eritrosit Agregasyonunun İn-Vivo Değerlendirilmesi	18
2.4.2. Ölçüm Sistemi Geometrisinin Eritrosit Agregasyon Parametrelerine Etkisi	19
2.5. Eritrosit Süspansiyonlarının Elektriksel Özellikleri	20
2.5.1. Eritrosit Süspansiyonlarının Elektriksel Özelliklerinin Araştırılmasına Yönelik Yapılan Ön Çalışmalar	23
2.6. Hipotez	27
GEREÇ ve YÖNTEMLER	
3.1. Çalışmanın Genel Tanımı	28

3.2	Çalışma Planı	28
3.2.1.	Kan Örnekleri ve Eritrosit Süspansiyonunun Hazırlanması	28
3.2.2.	“Tam Kan ve Dilüsyon” Kan Örneklerinin Hazırlanması	28
3.2.3.	“Dextran 500” Kan Örneğinin Hazırlanması	28
3.2.4.	“Glutaraldehid” Kan Örneğinin Hazırlanması	29
3.2.5.	“Neuraminidase” Kan Örneğinin Hazırlanması	29
3.3.	Ölçüm Sistemi ve Eritrosit Süspansiyonlarının Elektriksel Özelliklerinin Saptanması	29
3.4.	Eritrosit Süspansiyonlarında Agregasyon Değerlendirmesi	31
3.5.	Değerlendirme ve istatistiksel Hesaplamalar	31
BULGULAR		
4.1.	Eritrosit Süspansiyonlarında Agregasyonun Değerlendirilmesi	34
4.2.	Birbirinden Farklı Çaptaki Kapiller Borularda Eritrosit Süspansiyonlarının Empedans Kayıtları	35
4.3.	Birbirinden Farklı Çaptaki Kapiller Borularda Eritrosit Süspansiyonlarının Kapasitans Kayıtları	37
4.4.	Birbirinden Farklı Çaptaki Kapiller Borularda Ölçümü Yapılan Tam Kan Örneklerine Ait Kapasitans Eğrilerinden Hesaplanan Agregasyon Parametreleri	37
4.5.	Birbirinden Farklı Çaptaki Kapiller Borularda Ölçümü Yapılan Eritrosit Süspansiyonlarına Ait Kapasitans Eğrilerinden Hesaplanan Agregasyon Parametreleri	40
4.6.	LORCA ile Farklı Çaptaki Kapiller Borulardaki Agregasyon Parametreleri Arasındaki İlişki	43
TARTIŞMA		46
SONUÇLAR		52
KAYNAKLAR		54
ÖZGEÇMİŞ		67
EKLER		68

Ek 1: Uyuklu M, Canpolat M, Meiselman HJ, and Baskurt OK: Wavelength selection in measuring red blood cell aggregation based on light transmittance. *Journal of Biomedical Optics* 16(11): 2011

Ek 2: Baskurt OK, Uyuklu M, Meiselman HJ: Time course of electrical impedance during red blood cell aggregation in a glass tube:

comparison with light transmittance. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 57(4): 969-978, 2010.

Ek 3: Baskurt OK, Uyuklu M, Hardeman MR, Meiselman HJ: Photometric measurements of red blood cell aggregation: light transmission versus light reflectance. *Journal of Biomedical Optics*.14(5): 2009.

Ek 4: Baskurt OK, Uyuklu M, Meiselman HJ: Simultaneous monitoring of electrical conductance and light transmittance during red blood cell aggregation. *Biorheology* 46: 239-249, 2009.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ca⁺⁺	:	Kalsiyum
AMP	:	Amplitüd
C	:	Kapasitans
C_m	:	Eritrosit membran kapasitansı
C_s	:	Seri kapasitans
ESH	:	Eritrosit sedimentasyon hızı
F	:	Farad
fL	:	Femtolitre
GA	:	Glutaraldehid
Hb	:	Hemoglobin
Hz	:	Hertz
I	:	Akım
KΩ	:	Kiloohm
nF	:	Nanofarad
PBS	:	İzotonik fosfat tamponu
R	:	Direnç
R_i	:	Eritrosit içi direnci
R_p	:	Plazma direnci
V	:	Voltaj
Z	:	Empedans
X	:	Reaktans
Θ	:	Faz açısı
Ω	:	Ohm
μ	:	Mikron

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Eritrositlerin basit tuz çözeltisi (A) içindeki davranışı ve plazma süspansiyonu içinde, durgun halde iken, bikonkav disklerin birbirine paralel yüzeyler oluşturması (B)	8
2.2. Artan kayma kuvvetlerinin etkisi altındaki eritrositler	9
2.3. Eritrosit süspansiyonlardan agregasyon öncesi ve sırasında yansıyan ışık şiddetindeki değişiklikler	14
2.4. Plazma içindeki eritrositlerin laminar akım çizgilerine etkileri. (a) eritrositlerin olmadığı durumda plazmanın oluşturduğu laminar akım çizgileri, (b) şekil değiştiremeyen (rijid) eritrositlerin varlığında akım çizgilerinin distorsiyonu, (c) şekil değiştirebilen eritrositlerin varlığında akım çizgilerinin azalmış distorsiyonu, (d) eritrosit agregasyonundan dolayı artmış distorsiyon	16
2.5. Kapiller sonrası venüllerde eritrosit agregasyonu A: Kapiller sonrası venüllerde agregat oluşumunun gözlemlendiği bölgelerin kapillere uzaklığı B: Kapiller sonrası venüllerde eritrosit agregat oluşumunun zaman seyri.	19
2.6. Kan bioempedansının eşdeğer devre modeli. R_p : Plazma direnci; R_i : Eritrosit iç direnci; C_m : Eritrosit membran kapasitansı.	21
2.7. Biyolojik ortamların dielektrik sabitlerinin (ϵ) frekansa bağımlı değişimi	22
2.8. Fotometrik ölçüm sistemi	23
2.9. Fotometrik ölçüm sistemi ile ölçülen ışık geçirgenliğinde agregasyon sırasında meydana değişimler.	24
2.10. Eritrosit süspansiyonlarının pompanın durdurulmasından sonraki ışık geçirgenliği (A), empedans (B) ve kapasitans (C) kayıtları. Empedans ve kapasitans kayıtları 100 kHz frekansta yapılmıştır.	25
2.11. Eritrosit agregasyon indeksi (AI) ile ışık geçirgenliği, empedans ve kapasitans ölçümlerine ait eğrilerin altında kalan alanın (SA) lineer regresyon analizi.	26

3.1.	Ölçüm sistemi	
3.2.	Eritrosit agregasyon parametrelerinin hesaplanma prosedürü.	32
4.1.	Farklı çapa sahip cam kapillerde <i>Tam Kan (P)</i> , <i>1/2 Dilüsyon (H)</i> ve <i>Dekstran (D)</i> gruplarında kullanılan eritrosit süspansiyonlarına ait Empedans (Z ; $k\Omega$) kayıtları.	35
4.2.	Farklı çapa sahip cam kapillerde <i>Tam Kan</i> grubuna ait Empedans (Z) kayıtlarından hesaplanan eritrosit agregasyon indeksi (AI) ve zaman sabitleri.	36
4.3.	Farklı çapa sahip cam kapillerde <i>Tam Kan (P)</i> , <i>1/2 Dilüsyon (H)</i> ve <i>Dekstran (D)</i> gruplarında kullanılan eritrosit süspansiyonlarına ait seri Kapasitans (C) kayıtları. Kapasitans ölçümleri 100 KHz frekansta yapılmıştır	38
4.4.	Farklı çaplara sahip cam kapillerde <i>Tam Kan</i> grubuna ait Kapasitans (C) kayıtlarından hesaplanan eritrosit agregasyon indeksi (AI).	39
4.5.	Farklı çaplara sahip cam kapillerde <i>Tam Kan</i> grubuna ait Kapasitans (C) kayıtlarından hesaplanan eritrosit agregasyonu zaman sabitlerinden T_{fast} değerleri.	40
4.6.	Farklı çaplara sahip cam kapillerde <i>Tam Kan</i> grubuna ait Kapasitans (C) kayıtlarından hesaplanan eritrosit agregasyonu zaman sabitlerinden T_{slow} değerleri.	41
4.7.	Farklı çaplara sahip cam kapillerde <i>Tam Kan</i> grubuna ait Kapasitans (C) kayıtlarından hesaplanan eritrosit agregasyonu zaman sabitlerinden $t_{1/2}$ değerleri.	41
4.8.	Farklı çaptaki kapiller borularda kaydedilen kapasitans eğrilerinden hesaplanan agregasyon indeksi ile LORCA agregasyon indeksi arasındaki lineer regresyon analizi.	43
4.9.	Farklı çaptaki kapiller borularda kaydedilen kapasitans eğrilerinden hesaplanan agregasyon zaman sabitleri ile LORCA agregasyon zaman sabitleri arasındaki lineer regresyon analizi.	44
5.1.	160 ve 320 μm çaptaki kapiller borularda ölçümü yapılan eritrosit süspansiyonlarına ait kapasitans eğrilerinden hesaplanan agregasyon indeksi (AI).	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
4.1. Tam Kan, 1/3 Dilüsyon (1/3 Dil), 1/2 Dilüsyon (1/2 Dil), Dekstran, Glutaraldehit (GA) ve Neuraminidase (NEU) gruplarında kullanılan eritrosit süspansiyonlarına ait agregasyon parametreleri.	34
4.2. Farklı çaptaki kapiller borularda ölçümü yapılan eritrosit süspansiyonlarına ait kapasitans eğrilerinden hesaplanan agregasyon parametreleri.	42
4.3. LORCA ve farklı çaptaki kapiller borularda ölçümü yapılan eritrosit süspansiyonlarına ait kapasitans eğrilerinden hesaplanan agregasyon parametrelerine ait Pearson korelasyon katsayıları.	45

GİRİŞ

Kan, çok hücreli canlılarda hayatın devamı için yaşamsal öneme sahip olan bir dokudur. Kan, plazma adı verilen sıvı ortam içinde kan hücrelerinin (eritrosit, lökosit, trombosit) süspansiyon halinde dağıldığı, damar sisteminin içini dolduran ve kalbin pompa gücü sayesinde bu sistem içinde tüm vücudu dolaşan bir dokudur. Kan dokusu, fiziksel olarak hücresel elemanların plazma içindeki bir süspansiyonundan ibarettir. Kanın hacim olarak %40–50 kadarı, esas olarak ortalama 8 µm çapında bikonkav diskoid hücreler olan eritrositlerden (36, 118), küçük bir bölümü diğer kan hücrelerinden, geri kalan %50–55’lik bölümü ise plazmadan oluşur. Kan dokusunun akışkanlığı da, birinci planda eritrosit kitlesine, plazmanın özelliklerine ve bu iki fazın birbirleriyle ilişkisine bağlı olarak değişir (75, 76, 78). Ancak eritrositlerin fiziksel özellikleri bu sistem içinde belirleyici rol oynamaktadır.

Kan dokusunun, organizmadaki homeostatik dengenin ve hücrelerin yaşamlarının sürdürebilmesi için sürekli hareket halinde olması gereklidir (103). Kan dokusunun damar sistemi içindeki hareketi her şeyden önce kendi özelliklerine ve akışkanlığına bağlıdır. Kanın akışkanlığı, tüm çok fazlı sıvılarda olduğu gibi her bir fazın reolojik özellikleri ve iki fazın birbirine oranı ile belirlenir. Bu iki fazı, kanın hücresel elemanları ve plazma oluşturur. Buna göre, kanın akışkanlığı; plazma viskozitesi, hematokrit değeri ve kan hücrelerinin reolojik davranışlarından etkilenir. Eritrositlerin şekil değiştirme yetenekleri ve tersinir kümelenme eğilimleri (agregasyon), değişik koşullarda kanın akışkanlığının belirlenmesinde önemli rollere sahiptirler (111). Akım hızının yüksek olduğu koşullarda eritrosit deformabilitesi kan viskozitesini belirleyen temel faktörler arasındadır (113). Akımın yavaşlaması halinde, hücrelere etki eden kuvvetler küçülür ve kümelenme eğilimi ön plana çıkar. Eritrosit agregatlarının oluşması, bu koşullarda viskoziteyi yükseltir (58).

Eritrositler plazma içinde, durgun halde iken, bikonkav disklerin birbirine paralel yüzeyler oluşturması şeklinde kümelenirler. Bu kümelenme aynı hücrelerin basit tuz çözeltileri içinde süspansiyon haline getirilmeleri halinde ortaya çıkmaz. Eritrosit agregasyonu, bu hücrelerin özel bir dizilim gösterdiği bir olaydır. Bu kümeler eritrosit süspansiyonu (kan) akmaya başladığında (hücreler etki eden akım kuvvetleriyle) parçalanır. Yani eritrosit agregasyonu tersinir bir kümelenmedir. Eritrosit agregasyonu gerek plazmanın, gerekse eritrositlerin hücresel özelliklerindeki değişimlerden etkilenir. Plazma bileşenlerinden özellikle fibrinojen konsantrasyonu eritrosit agregasyonunu etkileyen en önemli faktörlerden biridir (74). Fibrinojen yanında diğer akut faz reaktanları, plazma globulin fraksiyonlarındaki değişimler, osmolarite ve pH değişiklikleri, hematokrit değeriindeki artış eritrosit agregasyonunu etkiler (74, 103). Eritrositlerin karakteristikleri, deformabilite, eritrosit morfolojisi ve yüzey

yükü farklılıkları ve membrana IgG bağlanımı gibi hücresel özelliklerin, eritrositlerin intrinsik agregasyon eğilimlerini belirgin ölçülerde değiştirebileceklerine dair deneysel kanıtlar bulunmuştur (96).

Eritrosit agregasyonunun derecesi, eritrositleri bir arada tutan kuvvetlerle (agregan kuvvetler), bu kümeleri dağıtmaya çalışan kuvvetler (disagregan kuvvetler) arasındaki denge ile yakından ilişkilidir (74). Disagregan kuvvetlerin başında ortamdaki hidrodinamik kuvvetler gelir. Hücre kümelerine etki eden kayma kuvvetleri büyüdükçe, kümelenme eğilimi azalır. Bunun yanında, eritrosit membranı yüzey yüküne bağlı olarak ortaya çıkan elektrostatik itim kuvvetleri ve eritrosit rijiditesi agregasyona karşı koyan kuvvetler arasındadır (74). Eritrosit agregasyonu gerek plazmanın, gerekse eritrositlerin hücresel özelliklerindeki değişimlerden etkilenir. Eritrosit agregasyonunu in vitro belirlemek için çeşitli yaklaşımlar ve yöntemler kullanılmaktadır. Bu metodlar arasında sıklıkla kullanılanlar eritrosit süspansiyonlarından ışık geçirgenliğinin ya da ışık yansımalarının ölçümü (24, 61), eritrosit agregasyonunun mikroskopik indeksleri (5), eritrosit sedimentasyon hızı, düşük kayma viskozitesi (12) ve ultrason geri saçılımıdır.

Agregasyon sırasında eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özellikleri değişir (1, 2, 4, 89, 91, 93). Yapılan birçok çalışmada eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin kaydedilmesinin, fotometrik ölçümlere benzer şekilde agregasyon sırasında işleyen süreç hakkında bilgi verebileceği gösterilmiştir (2, 4, 90, 91). Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre direnç ve kapasitans ölçümünün süspansiyondaki fibrinojen konsantrasyonu ile arttığı gösterilmiştir (123). Yine bu çalışmaya göre eritrosit sedimentasyon hızıyla kapasitansın birbiriyle ilişkili olduğu ve kapasitansın eritrosit sedimentasyon hızına çok duyarlı olduğu söylenmektedir. Eritrositlerin ve plazmanın elektriksel özellikleri birbirlerinden oldukça farklıdır. Kan akımının olmadığı veya sabit akım koşullarında gerçekleştiği sırada ölçülen empedans ve kapasitansın akım koşullarına bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (13, 123). Eritrosit süspansiyonlarının empedans ve kapasitansları çeşitli faktörler tarafından belirlenmektedir. Bunlar: 1) Süspansiyonun özellikleri (hematokrit ve eritrositlerin özellikleri) 2) Hidrodinamik koşullar (kayma kuvvetleri) 3) Ölçüm koşulları (ölçüm sisteminin geometrisi, elektrotların özellikleri ve ölçüm frekansı)

Eritrosit süspansiyonlarının fiziksel özellikleri, örneğin elektriksel iletkenlik veya ışık geçirgenliğinin, akımın durmasından sonra yapılan kayıtlardan elde edilen eritrosit agregasyonunun iki fazını yansıtmaları beklenir. Kendi laboratuvarlarımızda yaptığımız çalışmalarda 1000 µm çapa sahip kapiller borulardaki eritrosit süspansiyonunun agregasyon ölçümü hem fotometrik hem de süspansiyonun elektriksel özelliklerinin ölçülmesiyle karşılaştırılmıştır. Eritrosit süspansiyonlarından ışık geçirgenliği ve bu yöntemin eritrosit agregasyonu ölçümü için kullanımı daha önceki çalışmalarla onaylanmıştır

(59, 105, 108). Süspansiyonun ışık geçirgenliği ve kapasitans ölçümlerinin agregasyon formasyonunu tam anlamıyla yansıttığı bulunmuştur.

İn vivo olarak kapiller sonrası venüllerdeki agregasyon formasyonunun ölçümünün yapıldığı çalışmada venüllerin ortalama çapı 12–15 μm iken, in vitro sistemlerde, fotometrik ölçümlerde genellikle hemen her zaman sabit çaplardaki (birkaç yüz mikrometre) silindirik yapılar kullanılmaktadır. Normal insan kanının rulo formasyonunun zaman sabiti 1–3 saniye, üç boyutlu agregat oluşumunun zaman sabiti ise 10–25 saniyedir (13, 14, 24). Kim ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadaki zaman sabiti ise yaklaşık 100 ms'dir (69). Tüm bu çalışmalardan da anlaşılabileceği gibi eritrosit agregasyonu, ölçüm sisteminin geometrik özelliklerinden etkilenmektedir. Eritrosit süspansiyonlarının ışık geçirgenliğinin belli çapın altındaki cam kapiller borularda ölçümü, ölçüm sisteminin yapısı gereği çokta mümkün değildir. Süspansiyonun ışık geçirgenliği ve kapasitans ölçümlerinin agregasyon formasyonunu tam anlamıyla yansıttığı bulunmuştur. Bu nedenle küçük çapa sahip cam kapiller borulardaki eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin (kapasitans) ölçülmesi, çok küçük çaptaki kapillerde eritrosit agregasyon kinetiğinin belirlenmesine yardımcı olabilir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda eritrosit agregasyonu ve agregasyon zaman sabitlerinin ölçüm sistemine ait geometriye bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir. Fakat küçük çaptaki kapillerdeki agregasyon kinetiği hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışma, eritrosit agregasyon kinetiği akımın gerçekleştiği sistemin geometrisine bağlı olarak değişir hipotezinin test edilmesi amacıyla planlanmıştır. Çalışmada bu amaçla farklı özellikteki eritrosit süspansiyonlarının değişik çaptaki kapillerdeki agregasyon ölçümleri yapılacaktır. Bu çalışma, farklı geometriye sahip cam kapillerde eritrosit agregasyon kinetiğinde meydana gelebilecek değişikliklerin anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kanın Akışkanlık Özellikleri Ve Önemi

Kan dokusu, sıvı mekaniği açısından oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Tanım olarak kan, “*non-Newtonien-shear thinning*” bir sıvıdır (48). Bu tür sıvıların viskoziteleri sabit olmayıp, akım koşullarına göre değişir. Basit (Newtonien) sıvılarda kayma hızı (shear rate) ile kayma kuvveti (shear stress) arasında doğrusal bir ilişki vardır ve bu iki parametreyi birbirine bağlayan sabit, sıvının viskozite değeridir (44, 72). Kan gibi non-Newtonien sıvılarda ise kayma hızı-kayma kuvveti arasındaki ilişki doğrusal olmayıp sıvının viskozitesi kayma hızına bağlı olarak değişir. Kan, viskozitesi kayma hızı arttıkça azaldığı için “*shear thinning*” bir sıvıdır (48).

Kanın bu çok özel reolojik davranışı iki fazlı olan özel yapısından kaynaklanır. Plazmadan oluşan bir sıvı faz ve onun içinde yer alan hücrel elamanlardan oluşan kan dokusunun akışkanlığı fazların reolojik özelliklerine ve bu iki fazın birbirine oranına bağlıdır (48, 72). Dolayısıyla hematokrit değeri kan viskozitesinin belirlenmesinde önemli bir role sahiptir. Hematokrit değeri ile kan viskozitesi arasında üstel bir ilişki vardır. Özellikle %50'nin üzerindeki hematokrit değerlerinde kan viskozitesi önemli ölçüde artar (48, 110).

Kanın akışkanlığı hücrel bölümünün %98'ini oluşturan eritrositlerin reolojik özellikleriyle de yakından ilişkilidir. Eritrositlerin şekil değiştirme (deformabilite) yetenekleri sayesinde çok yüksek hematokrit değerlerinde bile kan akışı sağlanabilmektedir (36, 114, 115). Eritrositlerin bir başka önemli özellikleri de agrege olabilmeleridir. Damar yatağında kayma kuvvetleri belli bir kritik değer altına indiğinde eritrositler agrege olarak kanın akışkanlığının azalmasına sebep olabilirler. Kayma kuvvetlerinin arttığı koşullarda ise eritrosit agregatları parçalanır (72). Belirli bir değere ulaşıncaya kadar, kayma hızı artışı kan viskozitesinde azalmaya sebep olur. Kayma hızı büyük arterlerdeki seviyesine ulaştığında ise eritrosit agregatları parçalanır ve bu noktadan sonra, kan viskozitesi kayma hızından bağımsız hale gelir; yani kan Newtonien bir sıvı gibi davranmaya başlar. Böylece eritrosit agregasyonu da kanın non-Newtonien davranışının belirlenmesinde önemli rol oynar (32).

2.1.1. Kitle Halinde Kan Akımı

Kan dokusunun bir bütün olarak davranabilmesine izin verecek ölçüde büyük boyuttaki damarlarda kan, tam olarak iki fazlı bir süspansiyon özelliğindedir (48). Bu koşullarda, damar sisteminin geometrik özelliklerine, kanın fiziksel özelliklerine ve akım hızına bağımlı olarak laminar veya türbülant karakterde akım görülebilir. Laminar akım, sıvı tabakalarının birbiri

üzerinde kayması şeklinde gerçekleşen düzenli, hidrolik direncin düşük olduğu bir akım şeklidir (71). Fizyolojik koşullarda damar sisteminin büyük bir bölümünde kan akımı laminar karakterdedir. Damar geometrisindeki yerel değişikliklere, kan akım hızındaki ani artışlara bağlı olarak kan akımı türbülant hale dönüşebilir. Bu koşullarda akım direnci de artar.

Laminer akım koşullarında sıvının akışkanlığı, sıvı tabakaları (laminar) arasındaki sürtünme kuvvetiyle yakından ilişkilidir. Kan dokusu gibi iki fazlı sıvılarda, birinci faza (plazma) ait laminar arasındaki sürtünme ikinci faza oluşturan parçacıkların bu laminarları ne ölçüde distorsiyona uğrattığı ile yakından ilişkilidir (71). Kanın hücresel elemanlarından oluşan ikinci fazdaki parçacıkların kolay şekil değiştirebilen bir özellikte olmaları onların laminar akım çizgilerine oryantasyonunu kolaylaştırarak tabakalar arasındaki sürtünmeyi, dolayısıyla sıvının viskozitesini azaltır (32, 48, 71). Zıt olarak, eğer laminar arasında yer alan parçacıkların büyüklüğü artarsa, tabakalar arasındaki sürtünme ve viskozite artar (100).

2.1.2. Kapiller Kan Akımı (Mikrodolaşım)

Dolaşım sisteminde kapiller damarlar 3–8 µm çaptadır. Bu koşullarda kanın bütün olarak iki fazlı bir sıvı sistemi gibi düşünülmesi olanaksızdır. Bunun yerine, kanın hücresel elemanlarının ve plazmanın mikrodolaşımdaki davranışları ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Yer yer kan hücrelerinin boyutlarından daha küçük bir çapa sahip olabilen bu damarlardaki akım hızı, büyük ölçüde kan hücrelerinin şekil değiştirme yetenekleri (deformabilite) ile yakından ilişkilidir (36).

2.1.3. Kanın Akışkanlığını Belirleyen Faktörler

İki fazlı bir sıvı olan kanın akışkanlığı, tüm çok fazlı sıvılarda olduğu gibi her bir fazın reolojik özellikleri ve iki fazın birbirine oranı ile belirlenir. Bu iki fazı, kanın hücresel elemanları ve plazma oluşturur. Buna göre, kanın akışkanlığı; plazma viskozitesi, hematokrit değeri ve kan hücrelerinin reolojik davranışlarından etkilenir.

Plazma Viskozitesi: Plazma kandaki hücresel elemanlar için süspansiyon ortamı olarak görev yaptığından, akışkanlığındaki bir değişiklik, doğrudan kan viskozitesine yansır. Normal plazma viskozitesi 37 °C’de 1.10-1.35 centipoise arasında bir değere sahiptir (71), ancak hastalık durumlarında daha yüksek değerler gözlemlenebilir. Genel olarak, plazma viskozitesi hastalık sürecinin nonspesifik bir belirteçidir ve akut faz reaksiyonları ile ilgili patofizyolojik durumlarda artar (97). Bu artış, plazmanın protein içeriği ile yakın bir ilişki gösterir. Fibrinojen gibi akut faz reaktanları hastalık sırasında plazma viskozitesindeki artmaya önemli ölçüde katkıda bulunur (97).

Hematokrit Değeri: Laminer akım koşullarında, sıvı tabakalarının arasındaki direnci arttıran hücresel elemanların oransal miktarı, bu iki fazlı

sıvının akışkanlığını belirleyen faktörlerin başında gelir. Hematokrit değeri ile kan viskozitesi arasında eksponansiyel bir ilişki vardır (48) (Şekil 2.2).

Kanın Hücresel Elemanlarının Reolojik Davranışı: Kanın hücresel elemanlarının büyük çoğunluğunu oluşturan eritrositler, kitle halinde akım koşullarında dikkate alınması gereken tek hücre türüdür. Ancak, mikrodolaşım düzeyinde, hücrelerin bireysel hareketleri ön plana çıktığından, her bir hücre türünün reolojik davranışının ayrı ayrı değerlendirilmesi gerekir. Eritrositlerin şekil değiştirme yetenekleri ve tersinir kümelenme eğilimleri, değişik koşullarda kanın akışkanlığının belirlenmesinde önemli rollere sahiptirler (111). Akım hızının yüksek olduğu koşullarda eritrosit deformabilitesi kan viskozitesini belirleyen temel faktörler arasındadır (113). Akımın yavaşlaması halinde, hücrelere etki eden kuvvetler küçülür ve kümelenme eğilimi ön plana çıkar. Eritrosit agregatlarının oluşması, bu koşullarda viskoziteyi yükseltir (58).

2.2. Eritrositler

Eritrositler başlıca görevleri solunum gazlarının taşınması olan ileri derecede özelleşmiş hücrelerdir (118). Ortalama hacmi yaklaşık 90 femtolitre (fL), ortalama yüzey alanı $140 \mu\text{m}^2$ olan eritrositler kemik iliğinde üretilirler ve periferik dolaşıma katılmadan önce çekirdeklerini kaybederler (36, 118). Diğer organelleri de dolaşımda birkaç gün içinde kaybolur. Çekirdek, mitokondri, ribozomlar gibi sitoplazmik organellere sahip olmayan eritrositler protein sentezi yapamaz, mitokondri ile ilişkili oksidatif reaksiyonları gerçekleştiremez ve mitozu uğrayamazlar (118). Böylece eritrositler, protein ve elektrolitleri çevreleyen basit bir membrandan ibaret olarak tanımlanabilirler. Sitoplazmik proteinlerin %95'inden fazlasını hemoglobin (Hb) oluşturur. Eritrositlerin sahip olduğu bikonkav disk şekli fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için çok uygundur. Bu özel şekil sayesinde, hücre yüzeyinin hacmine oranı mümkün olan en yüksek değere ulaşmakta ve böylece gaz transferi kolaylaşmaktadır. Ayrıca bikonkav disk yapısının küreye göre şekil değiştirme yeteneğinin daha fazla oluşu eritrositlerin mikrodolaşımda optimal hareketlerinin sağlanmasına katkıda bulunmaktadır (76, 118). Küçük damarlarda eritrosit hareketleri gözlemlendiğinde bikonkav diskin akım yönünde oriente olarak, yandan bakıldığında paraşüte benzer bir şekilde ilerlediği görülür. Böylece şekil değiştirebilen eritrositler, maksimum çapı $4 \mu\text{m}$ olan damarlardan rahatça geçebilmektedirler (118).

Normal eritrosit bikonkav disk şeklinin sağlanması ve korunmasında rol oynayan faktörler şunlardır: 1) membrandaki elastik güçler 2) yüzey gerilimi 3) membran yüzeyindeki elektriksel potansiyel 4) ozmotik veya hidrostatik basınçlar ve 5) yüzey alanı/hacim ilişkisi. Ayrıca hücre şeklinin korunmasında eritrositlerin içinde bulundukları ortamın özellikleri de büyük önem taşımaktadır (118).

Eritrosit membranının akışkan yapısı, sahip olduğu lipid matriksten kaynaklanmaktadır. Bu tabakanın lipid kompozisyonu membran akışkanlığını

değiştirmektedir (107). Fakat bu değişimin membranın bütün olarak visko-elastik yapısı üzerine önemli bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (36, 112). Eritrosit membranının viskoelastik özellikleri hemen bütünüyle eritrosit membran iskeletinin yapısı ve proteinler arasındaki ilişkiler ile belirlenir (33, 106).

2.2.1. Eritrosit Deformabilitesi

Eritrosit deformabilitesi, bu hücrenin belli bir kuvvetin etkisi altında şeklini tersinir olarak değiştirebilme yeteneğini ifade eder (36). Eritrosit deformabilitesi; eritrositin geometrik özellikleri, sitoplazmik viskozitesi ve eritrosit membranının mekanik özellikleri tarafından belirlenir (36, 62, 77, 79).

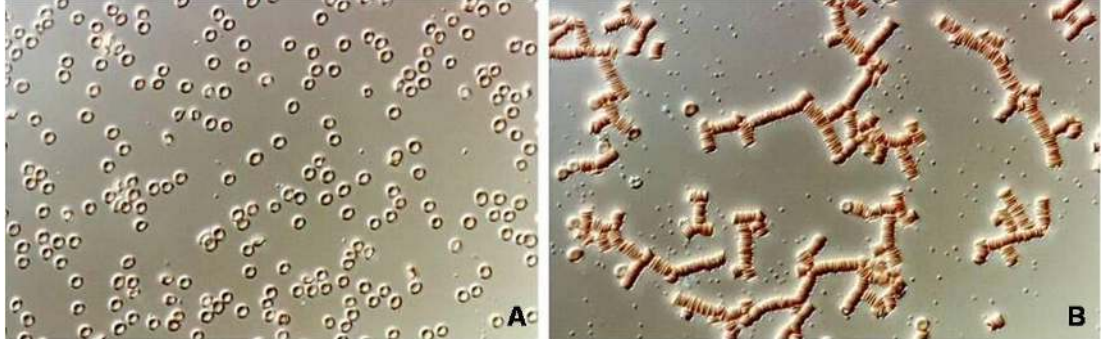
Eritrositlerin normal bikonkav-disk şeklinin korunması deformabilite yeteneği açısından çok önemlidir. Bu özel geometrik şekil, hücreye yüzey alanını genişletmeksizin şekil değiştirme olanağı sağlar. Eritrosit şeklinde meydana gelen bozukluklar deformabilite yeteneğinde önemli bir azalmalara neden olur (76, 77) .

Eritrosit sitoplazmasının akışkanlığı da eritrositlerin mekanik özelliğini etkilemektedir. Sitoplazmanın önemli bir içeriği olan hemoglobin konsantrasyonu sitoplazma akışkanlığını belirler (62, 77). Normal bireylerde eritrositlerin hemoglobin konsantrasyonu yaklaşık 27-37 g/dL arasındadır. Bu aralıkta sitoplazmik viskozite 5-15 centipoise kadardır (43). Bu normal sınırlarda, sitoplazmik viskozitenin eritrosit deformabilitesi üzerinde etkisi ihmal edilebilir. Ancak, bu değerlerin üzerindeki konsantrasyonlarda sitoplazmik viskozitede büyük artışlar meydana getirir. Olgun eritrositlerde hemoglobin sentezi ve yıkımı olmadığından konsantrasyon değişimleri hücrenin su kapsamındaki değişimlere bağlıdır.

Eritrosit membranı esnek yapısından dolayı dış kuvvetlerin etkilerini sitoplazmaya aktararak eritrositlerin bütün içerikleriyle akıma katılmalarını sağlar. Eritrosit membranının şekil değiştirmeye izin vermesi yanında bir başka önemli özelliği de elastik yapıya sahip olmasıdır (36). Eritrositlerin hidrodinamik kuvvetlerin etkisindeki şekil değiştirmeleri geri dönüşümlüdür. Şekil değişimine neden olan etkinin ortadan kalkması ile hücre diskoid şekline geri döner. Bu özelliğin hemen bütünüyle membran ve membran iskeletine bağlı olduğu açıktır (49, 76, 77).

2.2.2. Eritrosit Agregasyonu

Agregasyon, eritrositlerin birbirlerine paralel yüzeyler oluşturarak, özel bir şekilde kümelenmeleridir. Eritrosit agregasyonu sadece süspansiyon ortamında belli büyüklük ve yapıdaki makromoleküllerin varlığında ortaya çıkar. Bu kümelenme aynı hücrelerin basit tuz çözeltileri içinde süspansiyon haline getirilmeleri halinde görülmez (Şekil 2.1). Eritrosit agregasyonu, bu hücrelerin özel bir dizilim gösterdiği bir olaydır. Bu kümeler eritrosit süspansiyonu (kan) akmaya başladığında (hücreler etki eden akım kuvvetleriyle) parçalanır. Yani eritrosit agregasyonu tersinir bir kümelenmedir.

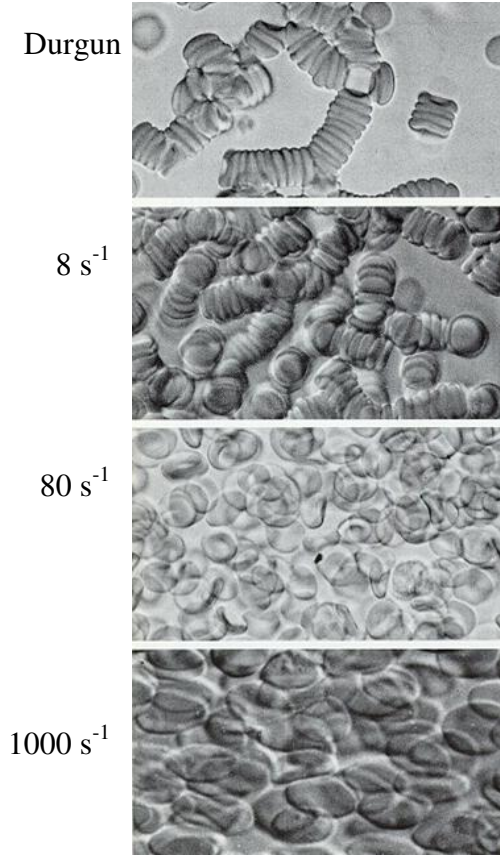


Şekil 2.1. Eritrositlerin basit tuz çözeltisi (A) içindeki davranışı ve plazma süspansiyonu içinde, durgun halde iken, bikonkav disklerin birbirine paralel yüzeyler oluşturması (B)

Eritrosit agregasyonunun derecesi şu faktörler tarafından belirlenir:

- *Süspansiyon ortamının (plazmanın) bileşimi:* Süspansiyon ortamındaki fibriller yapıdaki moleküllerin konsantrasyonu eritrosit agregasyonunun hızı ve büyüklüğünü etkileyen önemli bir faktördür. Plazmada fibrinojen proteini eritrosit agregasyonunun derecesini belirler.
- *Eritrosit membranı yüzey özellikleri:* Eritrosit membranının yüzey yükü eritrosit agregasyonunu etkileyen önemli bir faktördür. Bunun nedeni, negatif yüzey yükü nedeniyle eritrositlerin kümelenme sırasında birbirini itmeleridir. Yüzey yükünün azalması agregasyonun derecesini artırır.
- *Eritrositlere etki eden akım kuvvetleri:* Eritrosit agregasyonu tersinir bir kümelenmedir. Bu nedenle sıvı akımı bu kümeleri parçalar. Sıvı akışı ile ilgili kuvvetler büyükse eritrosit kümelerinin büyüklüğü küçük olur. Belirli bir akış kuvvetinin üzerinde bütün eritrosit kümeleri parçalanacak, eritrositler birbirinden bağımsız hareket etmeye başlayacaklardır. Şekil 2.2'de yukarıdan aşağıya doğru, giderek artan kuvvetlerin etkisi altında eritrositler görülmektedir. Kümelenmenin kuvvetler büyüdükçe azaldığı görülmektedir.

Eritrositlerin hücresel özellikleri (şekil, deformabilite ve membran yüzey özellikleri), süspansiyon ortamının özellikleri (plazma fibrinojen ve makroglobinler gibi proteinlerin konsantrasyonu, hematokrit, pH ve ozmolarite) ve ortamdaki kayma kuvvetleri eritrosit agregasyonunu etkiler (74, 96, 103). Hücreler yıkanıp protein ya da polimer içermeyen tamponlarda tekrar süspansiyon edilirse, eritrosit agregasyonu ortadan kalkar.



Şekil 2.2. Artan kayma kuvvetlerinin etkisi altındaki eritrositler.

Eritrosit agregasyonunun derecesi, eritrositleri bir arada tutan kuvvetlerle (agregan kuvvetler), bu kümeleri dağıtmaya çalışan kuvvetler (disagregan kuvvetler) arasındaki denge ile yakından ilişkilidir (11, 74).

Disagregan kuvvetler; Disagregan kuvvetlerin başında ortamdaki hidrodinamik kuvvetler gelir. Kayma kuvveti mekanik güçlerin örneğin rotasyonel vizkometre ya da boru içindeki akım sırasında ortaya çıkabilir. Bu kuvvetler rulo formasyonunun oluşmasına engel olur ya da var olan agregatların dağılmasına neden olur. Bu nedenle kayma kuvvetinin büyüklüğü ile eritrosit agregatlarının boyutu arasında ters bir ilişki vardır. Normal şartlarda, patolojik olmayan kanda, düşük kayma hızlarında (20-40 s⁻¹) agregatlar genellikle dağınıktır. Patolojik kanda ise hücreler arasındaki çekim güçlerinin fazla olmasından ya da büyük polimerler içeren eritrosit süspansiyonlarında disagregasyonun gerçekleşebilmesi için daha büyük bir kayma kuvveti gereklidir. Hücre kümelerine etki eden kayma kuvvetleri büyüdükçe, kümelenme eğilimi azalır. Bunun yanında, eritrosit membranı yüzey yüküne bağlı olarak ortaya çıkan elektrostatik itim kuvvetleride agregasyona karşı koyan kuvvetler arasındadır (11). Eritrositler membran yüzeyindeki sialik asid rezidülerinden dolayı genellikle net negatif yüzey yüküne sahiptirler. Bundan dolayı itici elektrostatik güçler eritrositlerin birbirini itmesine ve ayrı kalmasına neden olur. Eritrositler arasındaki bu elektrostatik itici güç rulo formasyonunun oluşmasına karşı koyar. Ayrıca eritrosit rijiditesi

de agregasyona karşı koyan kuvvetler arasındadır Eritrositlerin birbirleriyle yakın temasta bulunabilmesi için şekil değişikliğine ihtiyaç duyar ve bundan dolayı da agregasyona izin verir. Membran gerilimi ise bu şekil değişikliğine karşı koyar. Genel olarak eritrosit deformabilitesinin bozulmasıyla, eritrosit agregasyonunun azalacağı kabul edilir (37) ve deneysel olarak eritrosit deformabilitesinin değiştirilmesi agregasyon yeteneğinde değişikliklere neden olabilir.

Eritrosit agregasyonunu etkileyen faktörler; Eritrosit agregasyonunun derecesini hem süspansiyonun içeriği hem de eritrositlerin özelliği belirler. Eritrositlerin tipik bikonkav-diskoid şekli, eritrositlerin rulo formasyonu için çok önemli bir özelliktir. Bu şekilden herhangi bir uzaklaşma normal agregasyon davranışında sapmalara neden olur. Örneğin oval eritrositlere sahip olan develerde neredeyse hiç agregasyon gözlenmez (87). Ayrıca ozmotik basınç nedeniyle eritrositlerin şeklindeki çok az değişiklikler (örneğin hücre volümünün azalması veya artması) ya da eritrositlerin serbest radikallere maruz kalması eritrosit agregasyonunu önemli derecede etkiler (40). İzovolemik şekil değişikliklerinde ise, örneğin eritrositlerin ekinosit olması agregasyonu önemli derecede azaltır veya engeller (73). Hematokrit, agregasyon sürecinde önemli bir belirleyici faktördür. Düşük hematokrit hücrelerin temas etmesini ve buna bağlı olarak rulo formasyonunu engeller. Hematokrit artışı ise agregasyonu artırır (14, 59, 104), ayrıca hematokrit *in vivo* agregasyonu etkileyen önemli faktörlerden biridir (69, 70).

Eritrosit agregasyonuna makromoleküllerin etkisi; Eritrosit agregasyonu deneysel amaçla plazma (süspansiyon ortamı) kapsamı değiştirilerek modifiye edilebilir. Bu amaçla yüksek molekül ağırlıklı ve fibriler yapıdaki biyomoleküller (örneğin dekstran) birçok deneysel çalışmada kullanılmıştır(9, 28, 30, 47). Genellikle, bu biyomoleküllerin çözeltilerinin deney sırasında dolaşıma enjekte edilmesiyle gerçekleştirilen eritrosit agregasyonu artışı, beraberinde plazma viskozitesi yükselmesini de getirir. Buna karşılık, son birkaç yılda kullanılmaya başlanan yeni bir teknik eritrosit hücresel özelliklerinin değiştirilmesiyle, süspansiyon ortamında herhangi bir değişiklik yapılmaksızın eritrosit agregasyonunun modifiye edilmesine olanak vermektedir (3, 23, 122). Bu yöntemle, eritrosit yüzeyine kovalan olarak bağlanabilen, uçlarında özel reaktif gruplara sahip polietilenglikol esaslı ko-polimerler kullanılarak, eritrosit yüzey özellikleri değiştirilmektedir. İyi kontrol edilen koşullarda eritrositlerle birlikte inkübe edilen reaktif ko-polimerin konsantrasyonu değiştirilerek, inkübasyon sonrası yıkanarak otolog plazmalarında süspansiyon haline getirilen hücrelerin agregasyon dereceleri ayarlanabilmektedir. Bu şekilde, eritrosit agregasyonunun kademeli olarak değiştirilebilmesi ve bu değişimlerin hemodinamik etkilerinin incelenebilmesi olanaklı hale gelmiştir.

Eritrosit agregasyonuna etkili hücresel faktörler; Hücresel özelliklerin, eritrositlerin intrinsik agregasyon eğiliminde bireyler arası, hatta türler arasında da belirgin farklılıklar oluşturabilecek düzeylerde etkili olabildikleri,

bazı durumlarda patolojik süreçlerde gözlenenden daha yüksek düzeylerde agregasyon değişikliklerinden sorumlu olabilecekleri anlaşılmaktadır (96)

Eritrosit yaşının agregasyon üzerine etkileriyle ilgili ilk çalışma Nordt'a (84) aittir. Bu çalışmada, eritrositler yüksek hızda santrifügasyon tekniğiyle yaşlarına göre, yüksek dansiteli (yaşlı), orta dansiteli ve düşük dansiteli (genç) olmak üçe ayrılmıştır. Yaşına göre ayrılan bu hücrelerin otolog plazmada resüspanse edilmesinden sonra yapılan agregasyon ölçümünde yüksek dansiteli hücrelerin düşük dansitelilere göre iki kat daha fazla agregasyonu olduğunu, orta dansiteli hücrelerin ise agregasyonunun limitler arasında olduğu saptanmıştır (84). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise eritrosit popülasyonu santrifüj sonrası üstte kalan %10'luk kısım (genç), ortadaki %80'lik kısım ve dipteki son kısım (yaşlı) olarak üçe ayrılıyor. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre dipteki hücrelere ait agregasyonunun üstteki hücrelere göre iki kat fazla gösterilmiştir (81, 95, 117). Bu çalışmaların sonuçları göstermiştir ki hücrenin yaşı arttıkça agregasyon derecesi de artıyor.

Fibrinojen gibi akut faz reaktanları hastalık sırasında plazma viskozitesindeki artmaya önemli ölçüde katkıda bulunur (28). Eritrosit agregasyonu akut faz reaksiyonları gibi plazma içeriğindeki değişimler ve hücresel faktörlerdeki modifikasyonların görüldüğü patofizyolojik süreçlerde değişir (7, 11, 103, 115). Eritrosit agregasyonuna hücresel faktörlerin etkilerinin araştırılmasında hücrelerin membran yüzeylerinde değişikliğe neden olan enzimlerde kullanılmaktadır. Bunların arasında eritrosit membranındaki sialik asitlerin uzaklaştırılmasını sağlayarak membran yükünde değişikliğe neden olan neuraminidase (66) ve eritrosit glikokalikslerini parçalayan proteolitik (kimotripsin, tripsin ve bromelain) enzimler sayılabilir (86). Bu enzimlerin hepside eritrosit membran yüzeyinin özelliklerini değiştirerek agregasyonun artmasına neden olur. Bunun yanı sıra deneysel olarak eritrosit deformabilitesinin azaltılması da, eritrosit agregasyonunda azalmaya neden olmaktadır (15, 80, 81).

Eritrositlerin, madeni para yığınının benzer şekilde oluşturdukları ve rulo formasyonu olarak tanımlanan agregatlarını bir arada tutan agregan kuvvetler ile ilgili olarak iki hipotez öne sürülmüştür (11).

1. *Köprüleme hipotezi*: Bu hipoteze göre, birbirine komşu hücrelerin yüzeylerine adsorbe olan ve bu hücreler arasında köprüler oluşturan makromoleküller, agregatları bir arada tutarlar (37).
2. *Kemiozmotik hipotez*: Makromoleküllerin eritrosit yüzeyinden fiziko-kimyasal mekanizmalarla uzak tutulması bir osmotik gradient ve hücrelerarası boşlukta bir sıvı hareketi oluşturur. Bu sıvı hareketinin yarattığı basınç farklılıkları komşu hücreleri birbirine doğru iter (17, 83).

Eritrosit agregasyonu tersinir bir kümelenmedir ve kan akımı ile ilgili kuvvetler büyüdükçe eritrosit kümelerinin büyüklüğü azalır. Durgun koşullarda meydana gelen eritrosit agregatları, kan akımının başlamasıyla, uygulanan kayma gerilimi ile dağılırlar. Belirli bir kayma kuvvetinin üzerinde bütün eritrosit kümeleri dağılır ve eritrositler birbirinden bağımsız hareket etmeye başlar. Bu kuvvetlerin ortadan kalkmasıyla oluşan durgun koşullarda tekrar oluşurlar.

Kan akımının durmasıyla eritrosit agregasyonunun oluşumu anlık bir olay olmayıp, zaman içinde belirli bir seyre sahiptir. Normal akım koşullarında eritrositler şekil değiştirerek laminer akım çizgilerine uyum sağlarlar. Akımın durdurulmasıyla eritrositler başlangıçtaki normal bikonkav diskoid şekline geri dönerler ve bu olay yaklaşık birkaç yüz milisaniyede gerçekleşir (13). Bu olayın hemen arkasından agregasyon süreci başlar. Sağlıklı insan kanının *in vitro* koşullarda eritrosit agregatlarının oluşumu ile ilgili zaman sabitleri saniyeler mertebesinde (21, 24).

2.3. Eritrosit Agregasyonu Ölçüm Yöntemleri

Eritrosit agregasyonu gerek plazmanın, gerekse eritrositlerin hücresel özelliklerindeki değişimlerden etkilenir. Bu değişimler bir dizi fizyopatolojik süreçle ilişkilendirilebilir (15, 16, 34, 39, 85, 98). Bu nedenle eritrosit agregasyonunun ölçümü klinik bir öneme sahiptir. Eritrosit agregasyonunu *in vitro* koşullarda belirlemek için çeşitli yaklaşımlar ve yöntemler kullanılmaktadır:

2.3.1. Mikroskopik Metotlar

Genel olarak bu yöntemler durgun koşullarda veya belirli akım kuvvetleri altında agregat başına düşen hücre sayısını saptamaya dayanır (35, 38). Bu işlem, basit bir hemasitometre kullanılarak mikroskop altında agregat ve hücre sayılarının saptanmasıyla yapılabileceği gibi, video-mikroskopi ve bilgisayarlı analiz teknikleri kullanılarak da yapılabilir (5). Örneğin, hücre sayısı bilinen bir dilüe eritrosit süspansiyonu (%1 hematokritte) standart hemasitometre haznesine yerleştirilir ve belirli bir süre (5-10dk) dağıtılmadan bırakılır. Alanın birçok bölgesi video mikroskopi ile kayıt edilir ve birim hacimdeki hücresel ünitelerin (tek-dağılmış hücre ya da tek hücresel agregatlar) sayısı belirlenir. Daha sonra mikroskobik indeks, birim hacimdeki total hücre sayısının birim hacimdeki hücresel ünitelere oranından hesaplanır. Bu değer agregasyon derecesi ile artar.

2.3.2. Eritrosit Sedimentasyon Hızı

Birçok hastalıkta tanıya yardımcı bir inceleme yöntemi olan eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), oldukça yaygın kullanılan, basit ancak duyarlılığı düşük bir testtir (60). Kan dik bir tüpe alındığında, eritrositler dibe doğru çökmeye meyillidir. Belirli bir süre içerisinde eritrositlerin çökme mesafesinin ölçümü ESH olarak adlandırılır. ESH agregasyonun derecesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

2.3.3. Düşük Kayma Viskozitesi Ölçümü

Genel olarak, $1-5 \text{ s}^{-1}$ 'in altındaki kayma hızlarındaki kan viskozitesi eritrosit agregasyonu ile artar ve bu nedenle düşük kayma hızındaki viskozite eritrosit agregasyon indeksi olarak kullanılır (12).

2.3.4. Ultrasonik Yöntemler

Tek bir eritrosit ya da eritrosit agregatları ultrasonu geri saçan nesneler olarak davranırlar. Burada geri saçılımın derecesi hücrenin ya da agregatın hacmine bağlıdır. Geri saçılım katsayısı kan ya da eritrosit süspansiyonlarındaki parçacık büyüklüğünü tanımlamak için kullanılır (29, 41). Burada katsayının büyüklüğü agregasyon derecesi ile artar.

2.3.5. Fotometrik Metodlar

Bir eritrosit süspansiyonuna gönderilen ışığın süspansiyondan geçişinin veya yansımalarının ölçülmesini esas alan metotlardır (14, 24, 59). Eritrosit agregasyonu ile birlikte süspansiyondan geçen ışık miktarı artarken, yansıyan ışık miktarı azalır. Çünkü agregatlar arasındaki boşluklar daha çok ışığın süspansiyondan geçmesine izin verirken daha az ışığın yansımaya neden olurlar.

Eritrosit agregasyonunun lazer ışık-geri saçılımı (LORCA; RR Mechatronics, Hoorn, Hollanda) yöntemi ile analiz yapan bir cihazda bir mililitre eritrosit süspansiyonu aralarında 0.3 mm boşluk kalacak şekilde birbirine uyan iki cam silindirden oluşan bir sistemine yerleştirilmektedir. Lazer ışınları direk örneğe verilmekte ve yansıyan ışınlar iki fotodiyot aracılığıyla kaydedilmekte ve bilgisayar aracılığıyla analizi yapılmaktadır.

Eritrosit agregasyonunun fotometrik olarak ölçümünü yapan başka bir cihaz (Myrenne aggregometer; Myrenne GmbH, Roetgen, Almanya) ise, aralarında 50 μm mesafe bulunan, birbirine paralel iki cam plaka ve bunlardan birisini belirli bir hızda döndüren bir adet motordan oluşmaktadır. Bu iki cam plaka arasına yerleştirilen kan örneğine bir diyot (LED) tarafından gönderilen infrared ışık demetinin, kan örneğinin diğer tarafındaki fotosensör tarafından algılanıp hesaplanmasını sağlar. Ölçümün başlangıcında cam plaklardan birisi döndürülerek, kan örneği ölçüm noktasında 500 s^{-1} kayma hızında 10 saniye hareket ettirilmektedir. Kan örneği içerisindeki eritrosit agregatlarını parçalayan (disagregasyon) bu hareketi izleyen ani bir durma sonrasında kan örneğinin ışık geçirgenliği kaydedilmektedir. Kayma kuvvetlerinin ortadan kaldırılmasından sonra ortaya çıkan eritrosit agregasyonu sırasındaki ışık geçirgenliği değişikliğinin zaman içindeki seyri izlenerek agregasyonun büyüklüğü ve dinamiği saptanabilir.

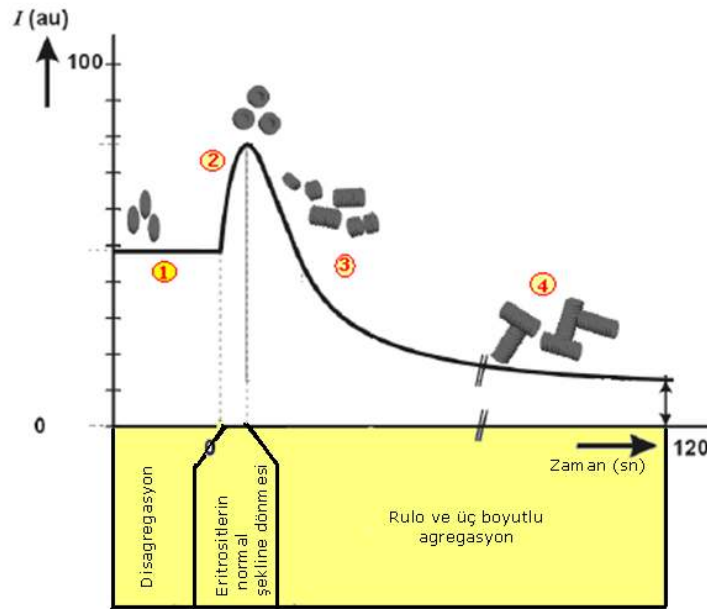
2.3.5.1. Eritrosit Agregasyonu Zaman Seyri: Kan akımının aniden durdurulmasından sonra ışık yansımadaki zamana bağlı değişiminin kaydedilmesi "syllectogram" olarak bilinir ve agregasyonun zaman seyrini yansıtır (124). Syllectogram veya benzer şekilde ışık geçirgenliğinin zaman seyri matematiksel olarak analiz edilerek, eritrosit agregasyonu zaman sabitleri ve çeşitli indeksler hesaplanabilir (14, 24, 59). Syllectogram dört

evreden oluşmaktadır (Şekil 2.3): 1) Disagregasyon evresini oluşturan ve eritrositlerin akım doğrultusunda şekil değiştirerek uzadığı başlangıç platosu 2) Akımın durmasıyla bu şekil değişikliğinin ortadan kalktığı evre (*shape-recovery*) 3) Eritrosit agregasyonun başladığı rulo formasyonu evresi, ışık yansımada azalış 4) Üç boyutlu agregatların meydana gelmesi.

Fotometrik ölçümler eritrosit süspansiyonlarında agregasyonunun araştırılması için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (14, 60, 104). Bu yaklaşımla eritrosit agregasyonu ölçen cihazlar ticari amaçla üretilmiştir. Fotometrik ölçüm yapan bu cihazlar özellikle agregatların dağıtılması (disagregasyon) sürecinde önem taşıyan, çeşitli akım geometrileri (iç içe geçmiş silindirler, koni-plak, paralel yüzeyler, dikdörtgen akım kanalı gibi) kullanırlar (14, 59, 60, 105). Bu ölçüm sistemlerine ait geometriler genellikle birkaç yüz mikrometre genişliğinde bir akım alanına sahip yapılardan oluşmaktadır.

2.3.6. Elektriksel Özelliklerin İzlenmesi

Eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özellikleri de agregasyonun izlenmesinde kullanılabilir. Plazmanın ve kan hücrelerinin elektriksel özelliklerinin birbirinden farklı olduğu ve agregasyon sırasında eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin değiştiği bilinmektedir (2, 4, 19, 21, 88-91). Eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin izlenmesinin, fotometrik ölçümlere benzer şekilde agregasyon sırasında işleyen süreç hakkında bilgi verebileceği öne sürülmüştür (21, 90, 91).



Şekil 2.3. Eritrosit süspansiyonlardan agregasyon öncesi ve sırasında yansıyan ışık şiddetindeki değişiklikler (Syllectogram). Açıklama metin içindedir. “ Kaynak (60)’ den yeniden çizilmiştir”

2.4. Eritrosit Agregasyonunun İn-vivo Önemi:

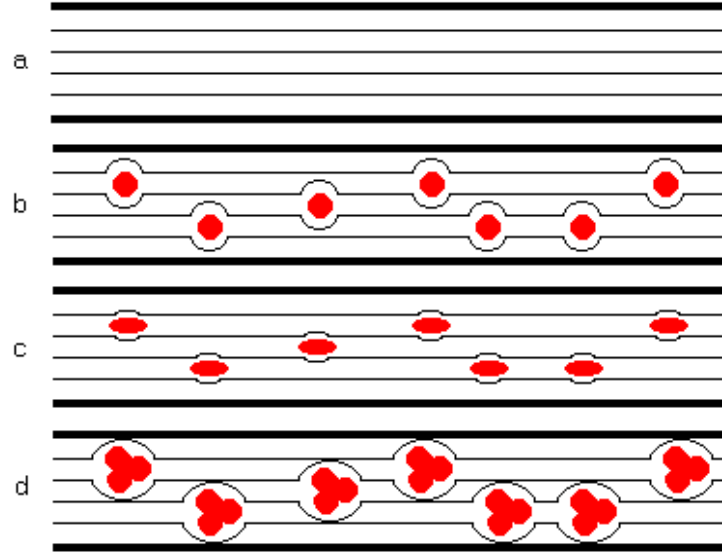
Eritrosit agregasyonu, kanın “shear thinning” (artan kayma hızı ile kan viskozitesinin düşmesi) davranışından sorumludur. Laminer akım koşullarında sıvının akışkanlığı, sıvı tabakaları (laminalar) arasındaki sürtünme kuvvetiyle belirlenir. Plazmaya ait laminalar arasındaki sürtünme, eritrositlerin bu laminaları ne ölçüde distorsiyona uğrattığı ile yakından ilişkilidir (Şekil 2.4) (11). Eritrositlerin kolay şekil değiştirebilen bir özellikte olmaları, onların laminer akım çizgilerine oriyantasyonunu kolaylaştırarak, tabakalar arasındaki sürtünmeyi, dolayısıyla sıvının viskozitesini azaltır (32). Tersine, eğer laminalar arasında yer alan parçacıkların büyüklüğü, yani eritrositlerin agregasyonu artarsa tabakalar arasındaki sürtünme ve viskozite artar (12). Bu tablo, kanın iki fazlı bir süspansiyon gibi davrandığı büyük boyutlu damarlarda geçerlidir (32, 48).

Ama iş bütün dolaşım sistemini değerlendirmeye gelince çeşitli boyuttaki damarlarda kan akımları birbirinden farklı karakterler gösterebilir. Örneğin, mikrodolaşımda her iki fazın akışkanlık özellikleri ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Kanın *in vivo* reolojik davranışı ile ilgili ilk çalışmalardan birisi 1933 yılında Whittaker ve Winton tarafından yayınlanmıştır (116). Bu çalışmada, *in vivo* koşullarda belirlenen viskozitenin *in vitro* koşullarda ölçülen değerden daha düşük olduğu gösterilmiştir (116). Bu nedenle *in vivo* akım direncini sadece *in vitro* koşullardaki hemoreolojik verilere dayanarak tahmin etmek isabetli sonuçlar vermeyebilir. *In vivo* kan akımının belirlenmesinde eritrosit agregasyonu ve onun etkilediği mekanizmalar önemli bir rol oynamaktadır.

Eritrosit agregasyonunun derecesi damar sisteminin çeşitli bölümlerinde farklı büyüklüklerde olabilir. Bu büyüklüğü belirleyen en önemli faktör bu bölümlerde hüküm süren hemodinamik koşullarla ilgili olmak üzere, yerel kayma kuvvetleridir (92, 122). Eritrosit agregatlarının düşük kayma kuvvetlerinin hakim olduğu venöz damarlarda ve çeşitli nedenlerle kan akımının yavaşladığı damar bölümlerinde yoğunluk kazanması ve bu bölümlerde kan viskozitesinin artışına neden olarak akım direncini yükseltmeleri beklenir (27, 30). Genel olarak arteriyel damarlardaki kayma kuvvetleri venöz dolaşımdan çok yüksektir (32). Yüksek olan bu kayma kuvvetlerinin arteriyel damarlarda agregasyon oluşumunu engelleyeceği düşünülebilir. Ancak, bütün silindirik akım sistemlerinde olduğu gibi, arteriyel damarlarda da, kayma hızı ve kayma gerilimi damar kesitinin her yerinde aynı değildir (42, 57). Kayma hızı, damarın merkezindeki akım alanında minimum, kenarlarındaki sıvı akımında ise maksimumdur (57). Bu durumda, merkezi akım içinde eritrosit agregasyonunun oluşmasına izin verecek hemodinamik koşulların oluşabileceği düşünülebilir.

Öte yandan, eritrositler akım sırasında, kayma kuvvetleri yönünden daha kararlı olan merkezi akım içine kayma eğilimi gösterirler. Bu olay aksiyal migrasyon olarak bilinir (57, 99). Bu olayın sonucu olarak, özellikle 1000 mikrometrenin altında çapa sahip olan damarların belli bir kesitinde kanın bileşiminin her yerde aynı olmadığı, eritrosit yoğunluğunun merkezi akım

bölgesinde daha yüksek olduğu, damar duvarına yakın bölgede ise plazmadan zengin bir sıvı tabakası olduğu (faz ayrılması) görülebilir (42, 57). Aksiyal migrasyon sonucu eritrositlerin merkezde toplanması, hücreler arası temasın ve agregasyonun artmasına neden olabilir.



Şekil 2.4. Plazma içindeki eritrositlerin laminar akım çizgilerine etkileri. (a) eritrositlerin olmadığı durumda plazmanın oluşturduğu laminar akım çizgileri, (b) şekil değiştiremeyen (rijid) eritrositlerin varlığında akım çizgilerinin distorsiyonu, (c) şekil değiştirebilen eritrositlerin varlığında akım çizgilerinin azalmış distorsiyonu, (d) eritrosit agregasyonundan dolayı artmış distorsiyon (kaynak (11)'dan alınmıştır).

İn vivo çalışmaların sonuçlarına göre, eritrosit agregasyonunun farklı organ ve dokularda kan akımının belirlenmesinde önemli rolleri vardır. Ama bu çalışmaların sonuçları genel olarak birbirleriyle tam bir uyum içinde değildir. İntravital mikroskopi yöntemi kullanılan çalışmalarda, izotonik fosfat tamponunda (PBS) hazırlanmış dextran 500 (500 kDa) ile agregasyon derecesi artırılmış eritrosit süspansiyonlarının rat mezenterine infüzyonundan sonra (plazma konsantrasyonu $75 \mu\text{M L}^{-1}$) dokunun kan akımı azalmıştır (47). Diğer bir çalışmada ise dekstran 70'in (70 kDa) PBS içinde hazırlanmış %0-4'lük çözeltileri tavşan mezenterine infüze edilmiş ve plazmada artan dekstran 70 konsantrasyonu ile beraber eritrosit agregasyonun ve buna paralel olarak kan akımı direncinin arttığı gösterilmiştir (109). Bunun aksine izole-perfüze organ preparatlarının kullanıldığı çalışmalarda eritrosit agregasyonu artışının kan akımı iyileştirdiği (31) ve akım direncini düşürdüğü gösterilmiştir (8). Polietilenglikol esaslı bir poloxamer (Pluronic F98-SC) molekülüyle modifiye edilerek eritrosit agregasyonu artırılmış süspansiyonla izole kobay kalbi perfüzyonu yapılan bir çalışmada, agregasyon derecesinde

yaklaşık %100'lük bir artışın fizyolojik perfüzyon basıncının ve vazomotor kontrol mekanizmalarının sürdürülmesi halinde kan akım direncinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir (120).

Intravital mikroskopi ve izole organ çalışmaları arasındaki en önemli farklılıklardan birisi, incelenen dokuya ait damarların yerçekimi ile oryantasyonuna ilişkindir. İntravital mikroskopi yönteminin kullanıldığı çalışmalarda, doku genellikle yatay doğrultulu bir tablanın üzerine serilmiş durumdadır. Bu durumda damarların tümü yatay pozisyondayken, izole organ preparatlarda damarlar her doğrultuda yerçekimi oryantasyonuna sahip olabilirler. *İn vivo* koşullarda eritrosit agregasyonunun zamana bağımlı değişimleri, aksiyal migrasyon ve damarın çapı direncin belirlenmesinde önemlidir (26, 28, 68).

Eritrosit agregasyonu *in vivo* kan akımını aşağıdaki mekanizmalarla etkileyebilir:

- Eritrosit agregasyonundaki artış, büyük çapa sahip damarlarda hareket eden parçacıkların boyutlarında artışa, sıvı tabakaları arasındaki sürtünme kuvvetinin büyümesine ve kanın daha viskoz hale gelmesine neden olur.
- Arteriyel dolaşım sisteminde bulunan agregat oluşturmuş eritrositlerin kapiller damarlardan geçebilmesi için bu agregatların dağılması gerekmektedir. Bu disagregasyon süreci enerji gerektirir ve bu da *in vivo* akım direncine katkıda bulunur.
- Aksiyal migrasyon, faz ayrılması ve damar duvarının yakınında marjinal bölgenin oluşması *in vivo* kan akımında önemli rol oynar (99). Artmış eritrosit agregasyonu ve aksiyal migrasyon, damar duvarına yakın bölgede plazmadan zengin, daha düşük viskozite ve hematokrite sahip, hücreden fakir bir marjinal zon oluşturur ve damar duvarına uygulanan sürtünme direncini azaltır (42, 57).
- Damarlardan ayrılan yan dallar plazmadan zengin düşük hematokrite sahip kan akımıyla besleneceğinden, daha küçük çapa sahip bu dallardaki hematokrit değeri, ana damardakinden daha düşüktür. Buna plazma sıyrılması denir (57, 99). Bu durumda, bu dallardaki kan daha akışkan olacaktır. Doku düzeyindeki damarlarda hematokrit değeri bu nedenle büyük damarlardaki hematokrit değerinden daha düşüktür. Yani agregasyonun derecesi doku hematokritini belirleyebilir (10, 22, 119)
- Eritrosit agregasyonundaki artış, endotel hücrelerine etkide bulunan mekanik kuvvetleri değiştirerek vasküler fonksiyonların değişmesine neden olur (121)

2.4.1. Eritrosit Agregasyonun In-Vivo Değerlendirilmesi

Eritrosit agregasyonunun vücut dışında incelenmesiyle elde edilen bilgilerin, bu fenomenin *in vivo* kan akımı üzerindeki etkisiyle ilgili değerlendirmelere doğrudan uygulanması mümkün değildir. Çünkü eritrosit agregasyonunun *in vivo* koşullardaki etkisi kanın belirli bir damar segmentindeki geçiş süresi ve segmentin uzunluğu, agregasyonun zaman seyri, damarın oryantasyonu ve mikrodolaşım düzeyinde kanın akım hızı gibi çeşitli *in vivo* faktörlere bağlıdır (6). Özellikle eritrosit agregasyonunun mikrodolaşım yatağı çevresinde ne ölçüde etkili olacağı tartışmalıdır. Agregasyon zaman sabitleri genel olarak damar dışında, çeşitli geometriye sahip akım sistemlerinde ölçülür. Kim ve arkadaşları ise *in vivo* eritrosit agregasyonunu kapiller sonrası venüllerde yüksek hızlı video mikroskopi yöntemi kullanarak incelemişlerdir (Şekil 2.5) (69). Buna göre, kapiller sonrası venüllerde agregat oluşumu ilk 15 μm 'lik giriş bölgesinden sonra başlamıştır (Şekil 2.5A). Eritrositler bu mesafeyi yaklaşık 30 milisaniye içinde kat etmişlerdir. Kim ve arkadaşları ayrıca eritrosit agregasyonunun bu koşullarda yaklaşık 100 milisaniye içinde tamamlandığını da göstermişlerdir (Şekil 2.5B).

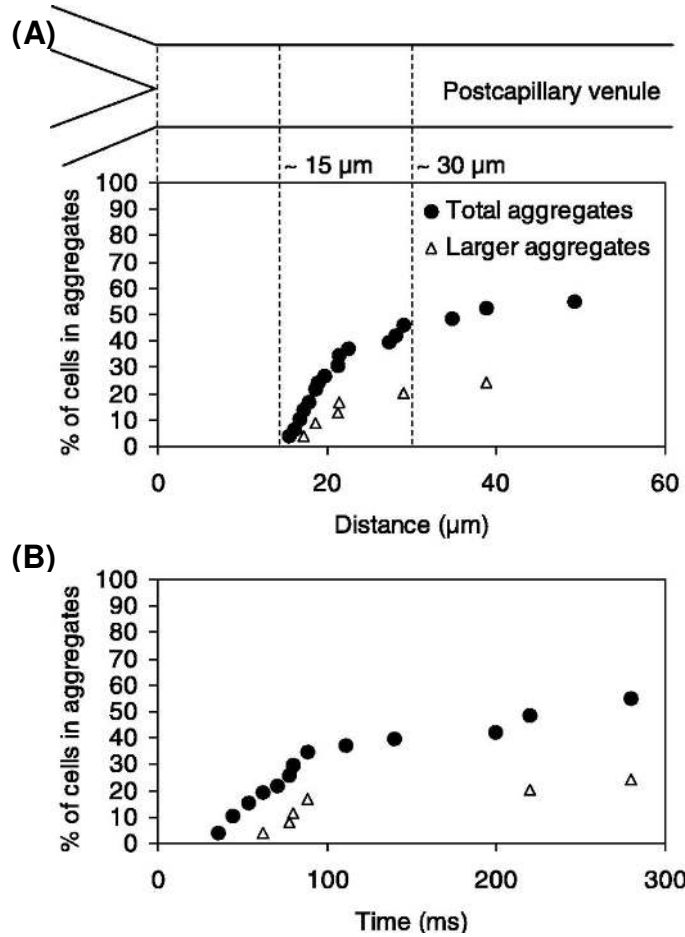
Kapiller sonrası venüllerin ilk 15 μm 'lik giriş bölgesinde laminar akımın ve aksiyal migrasyonun yeteri kadar gerçekleşmemesi (45), kapillerden geçebilmek için eritrositlerde meydana gelen geçici şekil değişikliğinin venülün ilk giriş bölgesinde de devam etmesi ve agregasyonun zamana ihtiyacı olmasından dolayı agregat oluşumu gözlenmemiştir (70).

Kapiller sonrası venüllerdeki eritrositlerin birbirleriyle çarpışma sıklığı hücrelerin içinde bulunduğu sıvının kayma gerilimine ve bu hücrelerin bağıl vektörel hızlarına ve açısal hareketlerine bağlıdır. Tüm bu faktörlerle hesaplanan çarpışma frekansı eritrosit agregasyonunun derecesini belirler (70). Çarpışma frekansındaki azalma agregat oluşumunu azaltır (70). Kim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kapiller sonrası venüllerdeki eritrositlerin birbirleriyle çarpışmaya başladıktan yaklaşık 30-35 milisaniye sonra agregat oluşumunun gerçekleştiği gösterilmiştir (70). Agregatların gözlenmesinden önce geçen bu 30-35 milisaniye, aynı zamanda venülün ilk 15 μm 'lik giriş bölgesinin kat edildiği süredir (69).

In vivo olarak kapiller sonrası venüllerdeki eritrosit agregat oluşumunun incelendiği çalışmada damarların ortalama çapı 12–15 μm iken, *in vitro* sistemlerde, fotometrik ölçüm sistemlerine ait geometriler genellikle birkaç yüz mikrometre genişliğinde bir akım alanına sahip yapılardan oluşmaktadır. *In vitro* ölçümlerde eritrosit rulo formasyonunun zaman sabiti birkaç saniyedir (24). Kim ve arkadaşlarının yapmış oldukları *in vivo* çalışmalarda ise eritrosit agregasyonunun yaklaşık 100 milisaniye içinde tamamlandığı gösterilmiştir. (69, 70). Bu çalışmaların sonuçlarına göre *in vivo* ve *in vitro* eritrosit agregasyonu zaman seyirleri birbirinden oldukça farklıdır. Bu zaman seyirlerindeki farklılıkların agregasyonun gerçekleştiği akım sisteminin (*in vivo* koşullarda damarlar, *ex vivo* koşullarda ölçüm sistemi) geometrik özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

2.4.2. Ölçüm Sistemi Geometrisinin Eritrosit Agregasyon Parametrelerine Etkisi

Dobbe ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ölçüm sistemine ait geometrinin değişmesinin eritrosit agregasyon parametrelerinde değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir (46). Bu çalışmada LORCA Couette Agregometre (LORCA; RR Mechatronics, Hoorn, Hollanda) kullanılmıştır. Bu agregometre agregasyon özelliklerini lazer ışık-geri saçılımı yöntemi ile analiz yapan bir cihazdır. Sistem içeride bulunan sabit bir silindir (bob) ve bunun dışında bulunan dönen bir silindirden (cup) oluşmaktadır. Bu iki silindirin arasında da ölçümü yapılacak olan numunenin tamamen doldurduğu bir boşluk bulunmaktadır. Dobbe ve arkadaşları, işte bu numunenin tamamen doldurduğu aralığın çapını, hazırladıkları dört farklı silindire (0.37, 0.60, 1.05, 2.00 mm) değiştirerek ölçüm yapmışlardır.



Şekil 2.5. Kapiller sonrası venüllerde eritrosit agregasyonu (kaynak (69) 'den alınmıştır). A: Kapiller sonrası venüllerde agregat oluşumunun gözlemlendiği bölgelerin kapillere uzaklığı B: Kapiller sonrası venüllerde eritrosit agregat oluşumunun zaman seyri.

Yaptıkları ölçümlerin sonuçlarına göre çaptaki artışla beraber eritrosit agregasyonu yarı zaman sabitinin ($t_{1/2}$) arttığını, bunun yanı sıra agregasyon indeksinin azaldığını bulmuşlardır (46). Yapılan başka bir çalışmanın sonuçlarına göre de, agregasyon ölçüm sisteminin çapındaki artışla birlikte M indeksinin değerinin ve amplitüdünün azaldığı, agregasyon indeksi ve $t_{1/2}$ değerinin değişmediği gösterilmiştir [75]. Ölçüm sistemine ait çapın artmasıyla kan örneğinden geçen ışığın yoğunluğunun etkileneceği ve bununla agregasyon parametrelerini etkileyeceği söylenmektedir.

Kapiller sonrası venüllerdeki agregasyon formasyonunun ölçümünün yapıldığı yapının çapı 12–15 μm iken, fotometrik ölçümlerde yaklaşık birkaç yüz mikrometre çapındaki silindirik yapı kullanılmaktadır. Silindirik tüplerde kan akımı eritrosit agregasyonuna, eritrosit deformabilitesine, tüpün çapına ve oriyantasyonuna bağlıdır. Normal insan kanının rulo formasyonunun zaman sabiti 1–3 saniye, üç boyutlu agregat oluşumunun zaman sabiti ise 10–25 saniyedir (24). Kim ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadaki zaman sabiti ise yaklaşık 100 ms'dir (69). Bu çalışmaların en önemli farklılıklarından biri ölçüm sistemindeki geometrik farklardır. Tüm bu çalışmalardan da anlaşılacağı gibi eritrosit agregasyonu, ölçüm sisteminin geometrik özelliklerinden etkilenmektedir.

2.5. Eritrosit Süspansiyonlarının Elektriksel Özellikleri

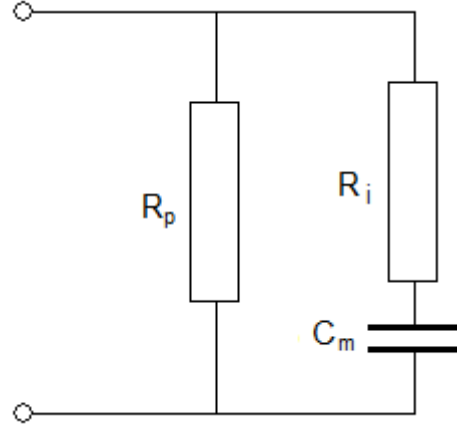
Eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin ölçülmesiyle eritrosit agregasyonunun değerlendirilebileceğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (88-91). Çeşitli araştırma grupları tarafından plazmanın ve eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özellikleri empedans ve dielektrik spektroskopi ile değerlendirilmiştir (55, 89, 90, 123). Eritrositlerin ve plazmanın elektriksel özellikleri birbirlerinden farklıdır. Plazma ve hücre içeriği iletken sıvılardır. Bunların elektriksel özellikleri birer dirençle temsil edilebilir (R_p ve R_i) Hücre membranı lipid tabakası ise yalıtkandır ve bir kapasitans (C_m) ile temsil edilebilir. Eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özellikleri bu faktörleri dikkate alan modellerle incelenebilir. Üzerinde fikir birliğine varılmış modellerden birisi bu üç parametreyi dikkate almaktadır (Şekil 2.6).

Eritrosit süspansiyonlarının empedans ve kapasitansları çeşitli faktörler tarafından belirlenmektedir. Bunlar arasında, süspansiyonun özellikleri (süspansiyon ortamı, hematokrit ve eritrositlerin özellikleri), hidrodinamik koşullar (kayma kuvvetleri), ölçüm koşulları (ölçüm sisteminin geometrisi, elektrotların özellikleri ve ölçüm frekansı) sayılabilir.

Hematokrit ve eritrositlerin şekilleri, kan örneklerinin elektriksel parametrelerinin ölçümüne etki eden önemli faktörler arasındadır (25, 51, 53, 64). Kanın direncinin (ρ_b) hesaplanmasında plazmanın direnci ve hematokritin kullanıldığını söyleyen çeşitli yaklaşımlar vardır (52, 56). Bunların içinde en iyi bilineni aşağıda gösterilen Maxwell-Fricke eşitliğidir.

$$\rho_b = \rho_p \frac{1 + k.H}{1 - H} \quad (1)$$

Eşitlikteki ρ_p ; plazma direncini, H ; hematokriti, k ise eritrositlerin oryantasyonu ve geometrisine bağlı faktörü ifade etmektedir.



Şekil 2.6. Kan bioempedansının eşdeğer devre modeli. R_p : Plazma direnci; R_i : Eritrosit iç direnci; C_m : Eritrosit membran kapasitansı.

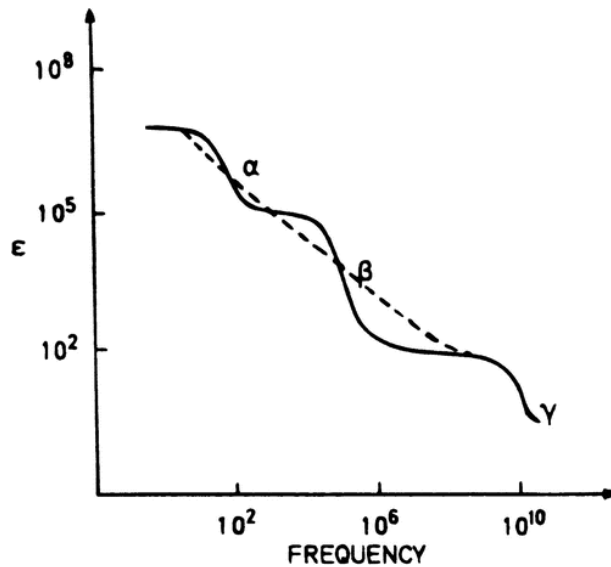
Eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin kan akımı sırasında veya akımın durduğu şartlardan etkilenip etkilenmediği (55, 64), ve Hoetink ve arkadaşları (64) silindirik tüpte kanın elektriksel iletkenliğinin kan akımına bağımlılığını teorik analizlerle test etmişlerdir. Yapılan bu teorik çalışmalarda Maxwell-Fricke teorisine dayanılarak, eritrositlerin geometrisi ve oryantasyonuyla ilgili faktörlerin kanın elektriksel özelliklerini etkilediği söylenmektedir. Bu faktörlerde akım sırasında uygulanan kayma kuvvetleri ve hücrelerin mekanik özellikleridir (örneğin; eritrosit deformabilitesi) (36). Hoetink ve arkadaşlarının bu teorik çalışmanın sonuçlarında sonra iletkenliğin kan akımına bağlı değişiminin eritrosit oryantasyonu ve şekil değişikliği ile açıklanmaya çalışılmıştır (64). Bununla birlikte, bu kuramsal modelde eritrositlerin diğer bir reolojik davranışı olan hücresel agregasyonu göz ardı etmişlerdir (82).

Zhao ve Jacobson, elektriksel empedans ve kapasitans değerlerinin süspansiyondaki fibrinojen konsantrasyonu ile arttığını göstermişlerdir. (123). Yine bu çalışmada eritrosit sedimentasyon hızının kapasitans ile korele olduğu, kapasitansın eritrosit sedimentasyon hızına çok duyarlı olduğu bildirilmiştir (123). Pribush ve arkadaşları eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin agregasyon sırasında değiştiğini göstermişlerdir (89-91). Bu süspansiyonların elektriksel özelliklerinin izlenmesinin agregasyon süreci hakkında bilgi vereceği öne sürülmüştür. (88, 89) Tam kan ve eritrosit süspansiyonlarıyla yapılan çalışmada, sistemdeki kan akımının aniden durdurulmasından sonra ölçülen kapasitans değerlerinin değiştiği ve bu değişime de eritrosit agregasyonunun neden olduğu bildirilmiştir (90). Eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin fotometrik ölçümlere benzer

şekilde bir seyir gösterdiği ve agregasyonla ilgili parametrelerin bu kayıtlar kullanılarak hesaplanabileceği bildirilmiştir (19, 21, 88, 91).

Biyolojik materyallerin dielektrik özellikleri: İçlerinde, katılardaki gibi elektron şeklinde, elektrolitler veya biyolojik sıvılardaki gibi iyonlar şeklinde serbest yüklerin bol bulunduğu bir ortama *iletken*, bulunmadığı bir ortama ise *yalıtkan* (veya dielektrik) denir. Bu ikisinin arasında yarı-iletken diye adlandırılan bir sınıf daha tanımlanmıştır. İçerisinde serbest yüklerin bulunmadığı ortamlara *dielektrik* adı verilir. Dielektrik maddeler elektrik alan içerisine konulduklarında nötral olan atom veya moleküllerin elektrik yük dağılımlarının merkezi ayrılır ve bu ögeler elektriksel kutuplanmaya uğrarlar (*polarizasyon*). Ortamda kalıcı dipol momente sahip moleküller var ise bunlar da alan doğrultusunda yönelerek polarizasyona katkıda bulunurlar. Ortamın birim hacminde oluşan elektriksel dipol moment miktarı polarizasyon (P) olarak tanımlanır ve ortamın dielektrik sabiti (ϵ) ve elektrik alana bağlı değişebilir.

Dielektrik ortamlar çok şiddetli elektriksel alanlarda kaldıklarında elektronlar moleküllerden ayrılabilir ve ortam iletken hale gelebilir. Bu kritik alan şiddetine ortamın *dielektrik dayanıklılığı* denir. Dielektrik ortamı oluşturan kalıcı veya etki ile oluşan dipoller düşük frekanslı alternatif alanları izleyebilirler. Alternatif alan serbest yüklere hareket verdiği gibi dipolleri de titreşime geçirir ve ortam bu yolla da alandan enerji soğurur. Ancak frekans arttıkça alanı izleyemezler ve dielektrik sabiti frekansla azalır.



Şekil 2.7. Biyolojik ortamların dielektrik sabitlerinin (ϵ) frekansa bağımlı değişimi (101).

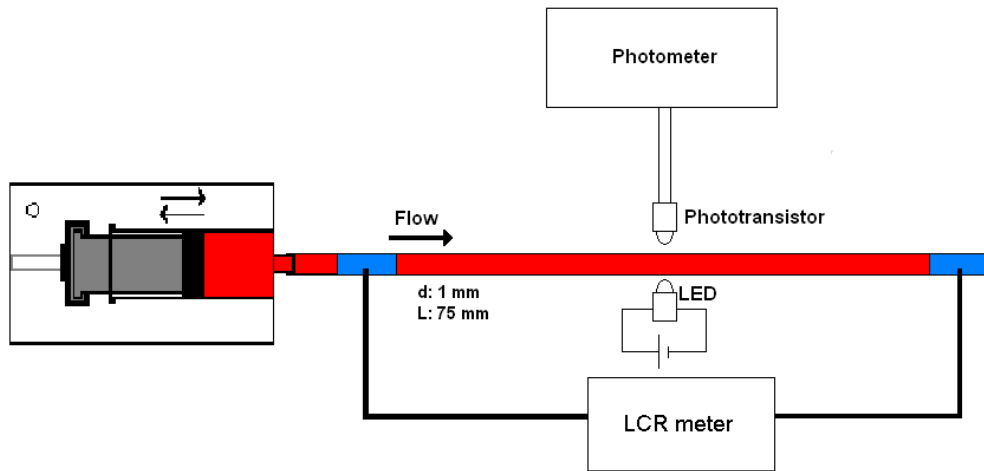
Dokuların iletkenliği ve dielektrik özelliklerinin frekansa bağımlı olmasına *dispersiyon* denir. Dispersiyon; dipollerin oryantasyonu ve yüklerin hareketi

olarakta tanımlanabilir. Biyolojik ortamların dielektrik sabitleri ise üç farklı mekanizma ile üç farklı bölgede dispersiyon vermektedir (50, 101, 102) (Şekil 2.7). α dispersion; Düşük frekans bölgesindedir (<10 kHz). Hücre membranından iyonların difüzyonu ve zıt yüklerin dokunun yüzeyinde polarizasyonu ile ilgilidir. Dokunun dielektrik sabiti çok yüksek değerlerdedir. γ dispersion; Gigahertz düzeylerindedir ve su moleküllerinin polarizasyonu ile ilgilidir. β dispersion; 0.1-10 MHz arasındadır. İntraselüler ve ekstraselüler bölgedeki iyonların membrandan geçişine karşı bir bariyer gibi davranır. Yani hücre membranı yüksek frekansların geçişine izin veren fakat düşük frekanslı akımları geçirmeyen bir filtre gibi davranır. Eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin ölçülmesinde kullanılacak olan frekans β dispersion bölgesindedir.

Dokuların dielektrik sabiti ve iletkenlik gibi dielektrik özellikleri baskın olarak su içeriği tarafından belirlenir. Dokuların dielektrik özellikleri, frekans ve sıcaklığa bağlı olarak da değişim göstermektedir. Frekans arttıkça, dielektrik sabiti (ϵ) düşerken, iletkenlik (σ) değeri yükselir (Şekil 2.7.)

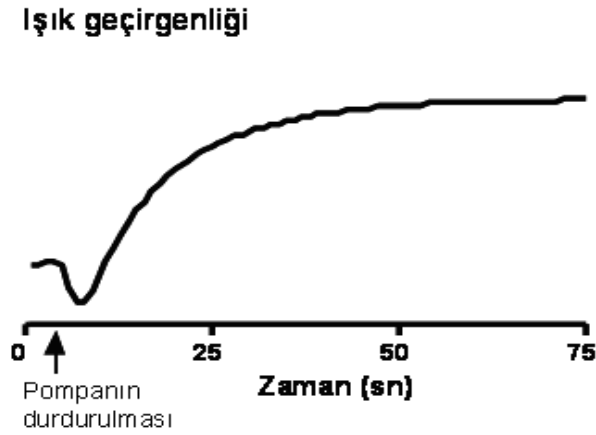
2.5.1. Eritrosit Süspansiyonlarının Elektriksel Özelliklerinin Araştırılmasına Yönelik Yapılan Ön Çalışmalar

Yapılan ilk ön çalışmalarda kullanılan ölçüm sistemi Şekil 2.8’de gösterilmiştir. Öncelikle, eritrosit agregasyonu 1000 μ m çapında 75 mm uzunluğundaki cam kapiller boruda fotometrik yöntemle izlenmiştir. Bu işlem, kan örneği ile dolu kapiller boruya bir ışık kaynağı (LED) tarafından gönderilen ışık demetinin, borunun diğer tarafına yerleştirilen bir fototransistör tarafından algılanıp kaydedilmesi yoluyla gerçekleştirilmiştir. Ölçüm işleminin başlangıcında kan örneği bir enjektör pompası (Model NE1000; New Era Pump Systems Inc.; Wantagh, NY, ABD) kullanılarak, eritrosit agregatlarının tümüyle parçalanmasına yetecek hızda (42 ml/dakika) pompalanmış, pompanın ani olarak durdurulmasını takiben ışık geçirgenliği izlenmiştir (Şekil 2.9).



Şekil 2.8. Fotometrik ölçüm sistemi

Kaydedilen ışık geçirgenliği-zaman eğrileri eritrosit agregasyon sürecini yansıtan tipik eğrilerle büyük bir benzerlik göstermektedir (14, 59, 67, 104, 105). Çalışmanın bu bölümünde, 1000 mikrometre iç çapa sahip kapiller borularda eritrosit süspansiyonlarının ışık geçirgenliğinin kolaylıkla kaydedilebileceği, bu yolla eritrosit agregasyonunun zaman seyrinin izlenebileceği onaylanmıştır. Ancak, kapiller çapının 80 μm ye kadar küçülmesi halinde, bu yöntemin uygulanmasında teknik güçlüklerle karşılaşılmaktadır. Küçük çaplı kapillerlerin optik özellikleri yöntemin uygulanmasına izin vermemektedir. Bu nedenle, küçük çaplı kapiller borularda eritrosit agregasyonunun izlenebilmesine olanak sağlayacak bir başka yöntem arayışına girilmiştir.

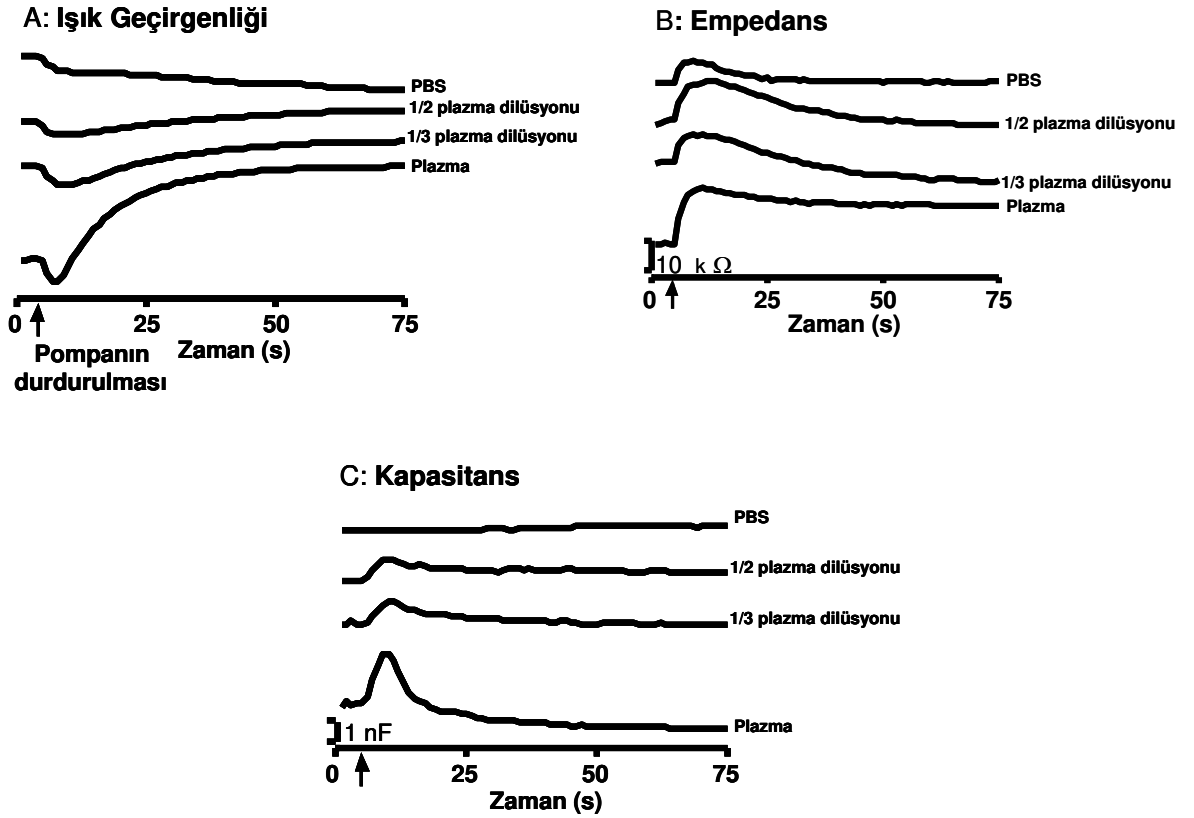


Şekil 2.9. Fotometrik ölçüm sistemi ile ölçülen ışık geçirgenliğinde agregasyon sırasında meydana değişimler.

Bunun için 1000 μm çapa sahip kapiller borulardaki eritrosit agregasyonu sırasında, süspansiyonun hem fotometrik hem de elektriksel özellikleri eş zamanlı olarak kaydedilmiştir. Bunun için kullanılan ölçüm sistemi Şekil 2.8'de gösterilmiştir. Fotometrik sisteme ek olarak, kapiller borunun iki ucuna, 16 G'lik paslanmaz çelik iğneler monte edilmiş ve elektrod olarak kullanılmıştır. Elektriksel empedans (Z) ve seri kapasitans (C) ölçümleri için bu elektrotlar bir LCR metre ile (Hioki, 3532 LCR HiTester, Nagano, Japonya) irtibatlanmıştır. LCR metre RS-232 bağlantısı ile bilgisayar tarafından kontrol edilmiştir.

Yukarıda anlatılan ölçüm sistemi kullanılarak yapılan ön çalışmalarda süspansiyon ortamının özelliklerinin değiştirilmesiyle eritrosit agregasyonu modifikasyonu yapılan örneklerle ait ışık geçirgenliği, kapasitans ve empedans ölçümleri Şekil 2.10'de gösterilmiştir. Eritrosit süspansiyonlarının akımın durdurulmasından sonraki ışık geçirgenliği kayıtları syllectogram benzeri bir süreç gösterir ve eritrosit agregasyonu zaman seyrini yansıtır. Pompanın durdurulmasından sonra, PBS ile dilüe edilmiş plazmayla

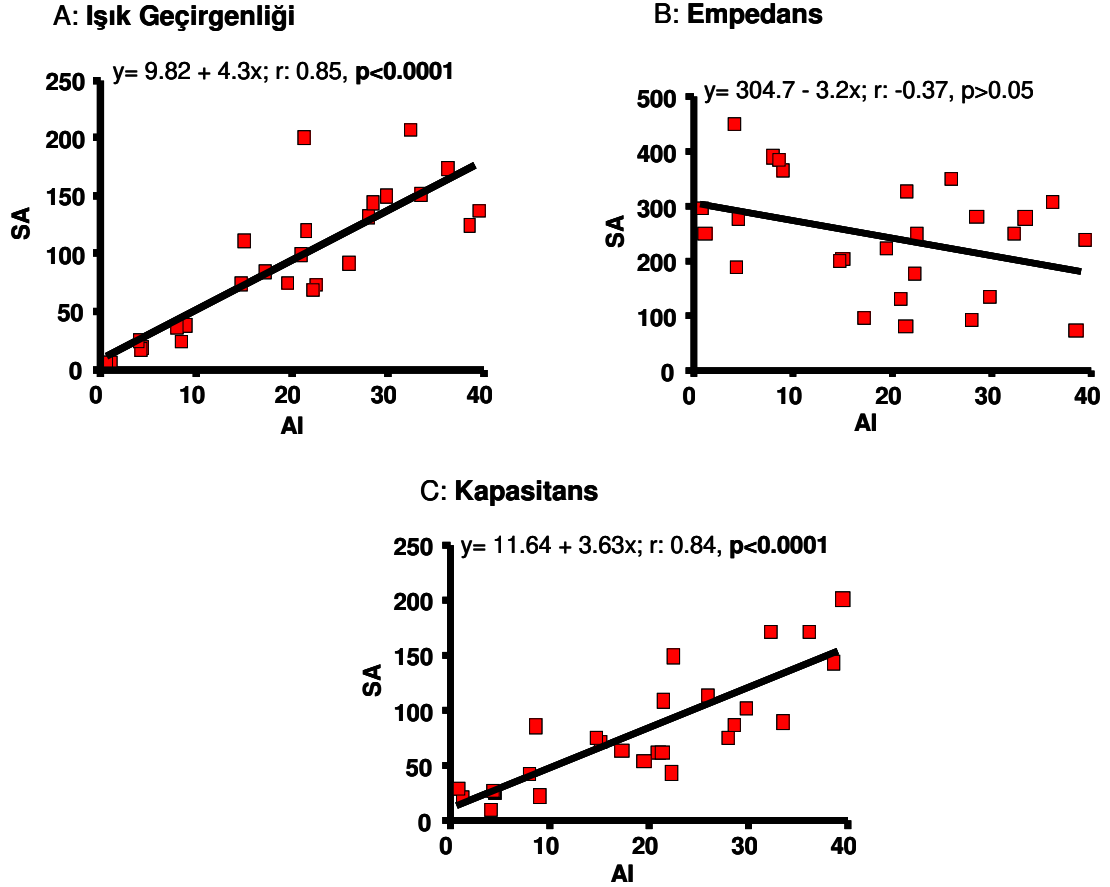
hazırlanmış örneklerde ışık geçirgenliğindeki değişiklikler küçülmektedir. PBS içinde hazırlanmış eritrosit süspansiyonunun ışık geçirgenliğinde ise diğer örneklerle karşılaştırabilecek bir değişiklik gözlenmemiş, ışık geçirgenliğinde zaman içinde bir azalma gözlenmiştir. Plazmayla süspanse edilen örnekte akımın durdurulmasından sonra ışık geçirgenliğinde keskin bir azalma ve hemen arkasından birkaç saniye sonra artış gözlenmektedir. Işık geçirgenliğinde gözlenen bu değişimin aksine kapasitans ve empedans ölçümlerinde ise akımın durdurulmasından sonra yukarıya doğru bir artış ve arkasından bir azalma gözlenmektedir. Empedans ölçümlerinde tüm örneklerde belirgin değişiklikler söz konusudur. Kapasitans ölçümünde ise PBS ile dilüe edilmiş plazma örneklerinde akımın durdurulmasından sonra meydana gelen değişiklikler, dilüe edilmemiş plazmayla hazırlanan örneklerle karşılaştırıldığında daha küçük bir tepe noktasının olduğu gözlenmektedir. PBS içinde hazırlanmış süspansiyonun kapasitans ölçümünde hesaplanabilir bir değişiklik gözlenmemektedir.



Şekil 2.10. Eritrosit süspansiyonlarının pompanın durdurulmasından sonraki ışık geçirgenliği (A), empedans (B) ve kapasitans (C) kayıtları. Empedans ve kapasitans kayıtları 100 kHz frekansta yapılmıştır.

Eritrosit süspansiyonlarının fotometrik agregometre (Myrenne) kullanılarak ölçülen agregasyon indeksi ile ışık geçirgenliği, empedans ve

kapasitans ölçümlerine ait eğrilerin altında kalan alanın hesaplanmasıyla elde edilen agregasyon indeksinin (SA) korelasyonu yapıldığı zaman, ışık geçirgenliği ve kapasitans SA değeri ile M indeks arasında pozitif ve istatistiksel olarak önemli bir korelasyonun ($p<0.0001$) bulunduğu gösterilmiştir. Empedans SA değeri ile M indeks arasında ise önemli bir korelasyon bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Eritrosit agregasyon indeksi (AI) ile ışık geçirgenliği, empedans ve kapasitans ölçümlerine ait eğrilerin altında kalan alanın (SA) lineer regresyon analizi.

Sonuç olarak, ön çalışmalar sonucunda, kapiller borulardaki eritrosit agregasyonu sırasında izlenen seri kapasitans değerlerinin agregasyonun zaman seyrini yansıttığı saptanmıştır (19, 21). Bu kanaate eş zamanlı olarak yapılan ışık geçirgenliği kayıtları ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda varılmıştır. Elektriksel empedans değerleri ise bu özellikte bulunmamıştır. Küçük çapa sahip cam kapiller borulardaki eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin ölçülmesi, bu kapillerde eritrosit agregasyon kinetiğinin belirlenmesine yardımcı olabilir. Fotometrik ölçüm sistemlerine ait geometriler genellikle birkaç yüz mikrometre genişliğinde bir akım alanına

sahip yapılardan oluşmaktadır. Bu ölçüm sistemlerinden çok daha küçük geometriye sahip sistemlerde fotometrik olarak ölçümün mümkün olmadığı koşullarda, eritrosit süspansiyonunun elektriksel özelliklerinin, özellikle de kapasitansın ölçümü agregasyonun değerlendirilmesi için kullanılabilir

2.6. Hipotez

Agregasyon zaman sabitleri genel olarak damar dışında, çeşitli geometriye sahip akım sistemlerinde ölçülür. Bu ölçüm sistemlerine ait geometriler genellikle birkaç yüz mikrometre genişliğinde bir akım alanına sahip yapılardan oluşmaktadır ve eritrosit rulo formasyonunun zaman sabiti birkaç saniyedir (24). Kim ve arkadaşları ise *in vivo* eritrosit agregasyonunu kapiller sonrası venüllerde yüksek hızlı video mikroskopi yöntemi kullanarak incelemişlerdir. Bu çalışmada ölçüm yapılan damarların ortalama çapı 12–15 μm 'dir. Kim ve arkadaşları eritrosit agregasyonunun bu koşullarda yaklaşık 100 milisaniye içinde tamamlandığını göstermişlerdir (69). Bu çalışmaların sonuçlarına göre *in vivo* ve *in vitro* eritrosit agregasyonu zaman seyirleri birbirinden oldukça farklıdır. Bu zaman seyirlerindeki farklılıkların agregasyonun gerçekleştiği akım sisteminin (*in vivo* koşullarda damarlar, *ex vivo* koşullarda ölçüm sistemi) geometrik özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Birkaç yüz mikrometre genişliğindeki ölçüm sistemlerinden çok daha küçük geometriye sahip sistemlerde fotometrik olarak ölçümün mümkün olmadığı koşullarda, eritrosit süspansiyonunun elektriksel özelliklerinin, özellikle de kapasitansın ölçümü agregasyonun değerlendirilmesi için kullanılabilir. Eritrosit agregasyonu ve agregasyon zaman sabitlerinin ölçüm sistemine ait geometriye bağlı olarak değişebileceği düşünülmekte, fakat küçük çaptaki kapillerdeki agregasyon kinetiği hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışma, eritrosit agregasyon kinetiği akımın gerçekleştiği sistemin geometrisine bağlı olarak değişir hipotezinin test edilmesi amacıyla planlanmıştır. Bu çalışma, farklı geometriye sahip cam kapillerde eritrosit agregasyon kinetiğinde meydana gelebilecek değişikliklerin anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

GEREÇLER ve YÖNTEMLER

3.1. Çalışmanın Genel Tanımı

Çalışmada 80–800 µm arası çapa sahip cam kapiller borularda eritrosit agregasyonunun zaman seyri değerlendirilmiştir. Bu amaçla çeşitli özelliklere sahip eritrosit süspansiyonlarının cam kapillerden akımı sağlanmış, akım sırasında ve akım durdurulduktan sonra, süspansiyonların agregasyon sürecini yansıttığı bilinen özellikleri izlenmiştir. Bu sistemde kullanılan cam kapillerlerle dolaşım sisteminin çeşitli düzeylerindeki, farklı çaplara sahip damarların modellenmesi amaçlanmıştır.

3.2. Çalışma Planı

3.2.1. Kan Örnekleri ve Eritrosit Süspansiyonunun Hazırlanması

Çalışmada erişkin, gönüllülerden alınan venöz kan örnekleri kullanılmıştır. Vericiler arasında hikaye ile tespit edilebilen herhangi bir sağlık sorunu olanların bulunmamasına dikkat edilmiştir. Akdeniz Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 17.11.2009 tarihli toplantısında çalışmamızın yapılmasında etik açıdan sakınca olmadığı kararı alınmıştır. Örnek alımından önceki 24 saat içinde herhangi bir ilaç kullanmış olanlardan verici olarak yararlanılmamıştır. Kan örnekleri antikoagülan olarak sodyum heparin (15 IU/ml) içeren enjektörlere, dirsek önü venlerinden alınmıştır. Örnekler kan alımını takiben hemen değerlendirilmiş ve her örnek üzerindeki çalışmalar kan alımını izleyen dört saat içinde tamamlanmıştır.

3.2.2. “Tam Kan ve Dilüsyon” Kan Örneklerinin Hazırlanması

Gönüllülerden elde edilen kan örnekleri, 1400 g’de 5 dakika santrifüj edilerek plazma ve eritrosit paketi birbirinden ayrılmıştır. Eritrosit paketi, 3 kez PBS ile yıkanmış ve bir kısmı otolog plazmada (tam kan) hematokrit 0.4 l/l olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir. Yıkanmış eritrosit paketinin kalan kısmı ise PBS ile 1/3 ve 1/2 oranında (sırasıyla %66 ve %50 plazma içeren) dilüe edilmiş plazmayla hematokrit değerleri 0.4 l/l olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir.

3.2.3. “Dextran 500” Kan Örneğinin Hazırlanması

Gönüllülerden elde edilen kan örnekleri, 1400 g’de 5 dakika santrifüj edilerek plazma ve eritrosit paketi birbirinden ayrılmıştır. Plazmaya %1 konsantrasyonda olacak şekilde dextran 500 (MW: 500 kD, D5251; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, ABD) eklendikten sonra, 3 kez PBS ile yıkanmış olan eritrosit paketi, bu plazma içinde hematokrit 0.4 l/l olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir.

3.2.4. “Glutaraldehid” Kan Örneğinin Hazırlanması

Gönüllülerden elde edilen kan örnekleri, 1400 g'de 5 dakika santrifüj edilerek plazma ve eritrosit paketi birbirinden ayrılmıştır. Eritrosit paketi, 3 kez PBS ile yıkanmış ve PBS içerisinde hematokrit 0.05 l/l olacak şekilde resüspanse edilmiştir. Son konsantrasyonu %0.003 olacak şekilde Glutaraldehid (GA, Merck, Darmstadt, Germany) ile oda sıcaklığında (22°C) 30 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında örnekler 1400 g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernetant uzaklaştırılmıştır. Eritrosit paketi, 3 kez PBS ile yıkanmış ve otolog plazmada hematokrit 0.4 l/l olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir. Eritrositlerin düşük konsantrasyonda (%0.003) Glutaraldehid ile 30 dakika inkübasyonu eritrosit deformabilitesini azaltır. Bu muameleden sonra da eritrosit agregasyonunun etkilendiği bilinmektedir (12).

3.2.5. “Neuraminidase” Kan Örneğinin Hazırlanması

Gönüllülerden elde edilen kan örnekleri, 1400 g'de 5 dakika santrifüj edilerek plazma ve eritrosit paketi birbirinden ayrılmıştır. Eritrosit paketi, 3 kez PBS ile yıkanmış ve PBS içerisinde hematokrit 0.2 l/l olacak şekilde resüspanse edilmiştir. Süspansiyon haline getirilen eritrositler Neuraminidase enzimi varlığında (75 mU/mL) bir saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında örnekler 1400 g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernetant uzaklaştırılmıştır. Eritrosit paketi, 3 kez PBS ile yıkanmış ve otolog plazmada hematokrit 0.4 l/l olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir. Eritrosit hücresel özelliklerin değiştirilmesi yoluyla, örneğin Neuraminidase enziminin kullanılmasıyla eritrositlerin membran yüzey yükünü azaltılmasıyla eritrositlerin agregasyon eğiliminin artırıldığı bilinmektedir (65, 94).

3.3. Ölçüm Sistemi ve Eritrosit Süspansiyonlarının Elektriksel Özelliklerinin Saptanması

Eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özellikleri farklı çaptaki yatay cam kapillerlerde (80,160,320,480,640 ve 800 μm çapında, 75 mm uzunluğunda) enjektör pompası (Model NE1000; New Era Pump Systems Inc. Wantagh, NY, USA) aracılığıyla oluşturulan akım sırasında ve akımın durmasından hemen sonra kaydedilmiştir. Cam kapiller ve elektrotlar sıcaklık kontrollü bir kutuya yerleştirilmiştir ve ölçümler 37°C sıcaklıkta yapılmıştır.

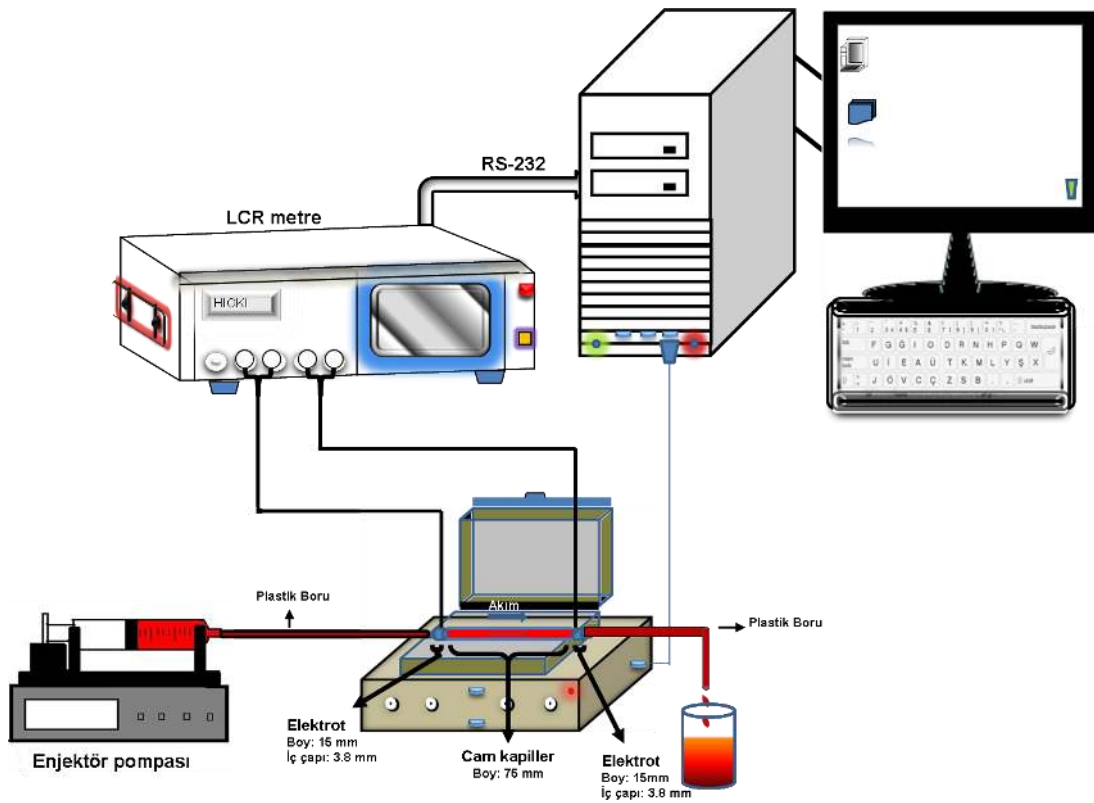
Bu çalışmada kullandığımız ölçüm sistemi Şekil.3.2.2.1'de gösterilmektedir. Ölçüm sistemimizde elektriksel ölçümlerin yapılabilmesi için, iki tane paslanmaz çelikten yapılmış olan elektrodlar (Dış çapı:7 mm; İç çapı:3.8 mm; Boyu:15 mm) cam kapillerin baş ve son kısımlarına yerleştirilmiştir. Bu elektrodlar, elektriksel empedans (Z) ve seri kapasitans (C) ölçümleri için LCR metreye (Hioki, 3532 LCR HiTester, Nagano, Japan) bağlanmıştır. LCR metre de RS-232 bağlantısıyla bilgisayara bağlanmıştır. LCR metreyle ölçümün yapılacağı sisteme belirlenmiş bir frekansta ve sabit voltajda (V) bir test sinyali uygulandığında sonuç olarak akım (I) ve akımla voltaj arasındaki faz açısı (θ) ölçülür. Ölçülen bu değerlerden ve uygulanan voltajdan Empedans (Z), Reaktans (X) ve Seri Kapasitans (C_s) değerleri

aşağıda verilen eşitlikler kullanılarak ölçümü yapan LCR metre tarafından hesaplanır (63).

$$|Z| = \frac{V}{I} \quad (2)$$

$$X = ||Z|. \sin \Theta| \quad (3)$$

$$C_s = \frac{1}{\omega X} \quad (4)$$



Şekil 3.1 Ölçüm sistemi

Elektriksel kapasitans ve empedans ölçümleri 100 kHz frekans değerinde, enjektör pompası aracılığıyla kapiller içine gönderilen kanın akımı sırasında ve akım durduktan sonraki 2 dakika boyunca birer saniye aralıklarla, LCR metreyi kontrol eden bilgisayara kaydedilmiştir. Özel bir yazılım üretme programı olan LabView 8.6 (National Instruments, Austin, Texas, USA) ile yazılan program kullanılarak kaydedilen kapasitans ve empedans eğrilerinden eritrosit agregasyon parametreleri analiz edilmiştir.

3.4. Eritrosit Süspansiyonlarında Agregasyon Değerlendirmesi

Hazırlanan tüm örneklerin agregasyon özellikleri lazer ışık-geri saçılımı (LORCA; RR Mechatronics, Hoorn, Hollanda) yöntemi ile analiz yapan bir cihaz yardımıyla değerlendirilmiştir. Bilgisayar kontrollü bu cihaz aralarında 0.3 mm mesafe bulunan, iç içe geçmiş iki tane silindirden ve bilgisayar tarafından belirlenen hızda döndüren bir adet motordan oluşmaktadır. İki silindir arasında bulunan 0.3 mm'lik mesafeye konulan yaklaşık 1 mililitre kan örneği ölçümün başlangıcında 400 sn⁻¹ kayma hızında 5 saniye hareket ettirilmiştir. Kan örneği içerisindeki eritrosit agregatlarını parçalayan (disagregasyon) bu hareketi izleyen ani bir durma sonrasında kan örneğinin ışık yansımadaki değişimleri 120 saniye süresince 11 farklı kayma hızında (10-800 s⁻¹) bilgisayar tarafından kaydedilmiştir. Kayma kuvvetlerinin ortadan kaldırılmasından sonra ortaya çıkan eritrosit agregasyonu sırasındaki ışık yansımadaki değişimlerin zaman içindeki seyri (syllectogram) izlenerek, agregasyonun büyüklüğü (derecesi) ve dinamiği saptanabilir. Bilgisayar, eritrosit süspansiyonunda agregasyon sürecinde ışık yansımadaki değişimleri izleyerek, agregasyon kinetiğini yansıtan bir dizi parametre hesaplamaktadır. Bu parametreler eritrosit agregasyonun derecesi (agregatlardaki ortalama eritrosit sayısı) yanında agregasyonun zaman seyri ile ilgili bilgileri de içermektedir. Bu parametreler: 1) Agregasyon İndeksi, eğrinin altında kalan alanın, eğrinin altında ve üstündeki alanların toplamına bölümü; 2) Agregasyon yarı zamanı ($t_{1/2}$), 120 sn'lik periyot sırasındaki ışık yansımadaki toplam değişikliğin (amplitüd) %50'si kadarı için geçen süre; 3) Agregasyon zaman sabitleri (T_{fast} ve T_{slow}). Bu zaman sabitleri bir double-exponential eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm ölçümler 37°C sıcaklıkta yapılmıştır.

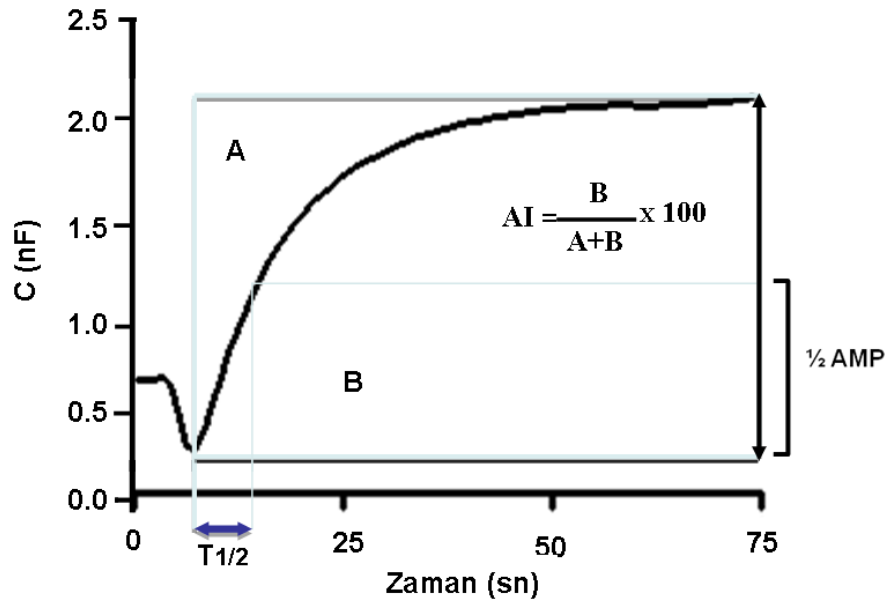
$$(I(t) = a + b.e^{-t/T_{fast}} + c.e^{-t/T_{slow}}) \quad (5)$$

3.5. Değerlendirme ve istatistiksel Hesaplamalar

Eritrosit agregasyonunun ışık yansımaları veya ışık geçirgenliği özellikleriyle incelenmesi halinde zaman seyrinin çift-eksponansiyel bir eğriyle modellenemediği bilinmektedir. Bu ilişkideki zaman sabitleri eritrosit agregasyonunun erken ve geç iki ayrı fazını yansıtmaktadır. Bu çalışmada

elde edilen elektriksel parametrelerin zaman seyri kullanılarak da benzer bir eksponansiyel değişimi temsil eden zaman sabitleri hesaplanmıştır.

Şekil 3.2’de kapasitans eğrilerinden eritrosit agregasyon indeksi (AI) ve zaman sabiti $t_{1/2}$ ’nin nasıl hesaplandığı gösterilmektedir. Hesaplama işlemine enjektör pompasının aniden durdurulmasından sonra meydana gelen eritrositlerin şekil değiştirmesinin tamamlanmasının ardından başlanmıştır. Eritrositlerin şekil değiştirmesinden sonra meydana gelen kapasitans artışı, eritrosit agregasyon sürecini yansıtmaktadır. Agregasyon indeksi (AI); eğrinin altında kalan alanın (B), eğrinin üstünde (A) ve altında kalan alanların (A+B) toplamına bölünmesiyle hesaplanmıştır (Şekil 3.2). Zaman sabiti $t_{1/2}$ ise kapasitanstaki toplam değişikliğin yarısı kadarı (1/2 amplitüd) için geçen süredir. Diğer zaman sabitleri ise (Tslow ve Tfast) bölüm 3.2.3.’de anlatıldığı gibi hesaplanmıştır. Tüm hesaplama işlemleri hem kapasitans hem de empedans eğrilerinden LabView 8.6 (National Instruments, Austin, Texas, USA) ile yazılan özel bir program kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 3.2. Eritrosit agregasyon parametrelerinin hesaplanma prosedürünün şematik olarak gösterilmesi. A; eğrinin üstünde kalan alanı, B; eğrinin altında kalan alanı temsil etmektedir.

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. Çoklu gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir. 0.05’den küçük p değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

Pearson korelasyon katsayısı ve lineer regresyon analizleri yapılmıştır. Bu modellerde farklı çapa ait kapasitans eğrilerinden hesaplanan agregasyon parametreleriyle, aynı parametrelerin LORCA'da ölçülmüş eşdeğerleri kullanılmıştır. 0.05'den küçük p değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1.Eritrosit Süspansiyonlarında Agregasyonun Değerlendirilmesi

Eritrosit agregasyon parametreleri hazırlanan tüm eritrosit süspansiyonlarında LORCA'da ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda elde edilen eğrilerin analizlerinin sonuçlarına göre agregasyon indeksleri (AI) büyükten küçüğe doğru Dextran > Neuraminidase > Tam Kan > Glutaraldehit > 1/3 Dilüsyon > 1/2 Dilüsyon şeklinde sıralanmaktadır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Tam Kan, 1/3 Dilüsyon (1/3 Dil), 1/2 Dilüsyon (1/2 Dil), Dekstran, Glutaraldehit (GA) ve Neuraminidase (NEU) gruplarında kullanılan eritrosit süspansiyonlarına ait agregasyon parametreleri. (Sonuçlar $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=10. *:p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0,001 tam kan grubundan fark.

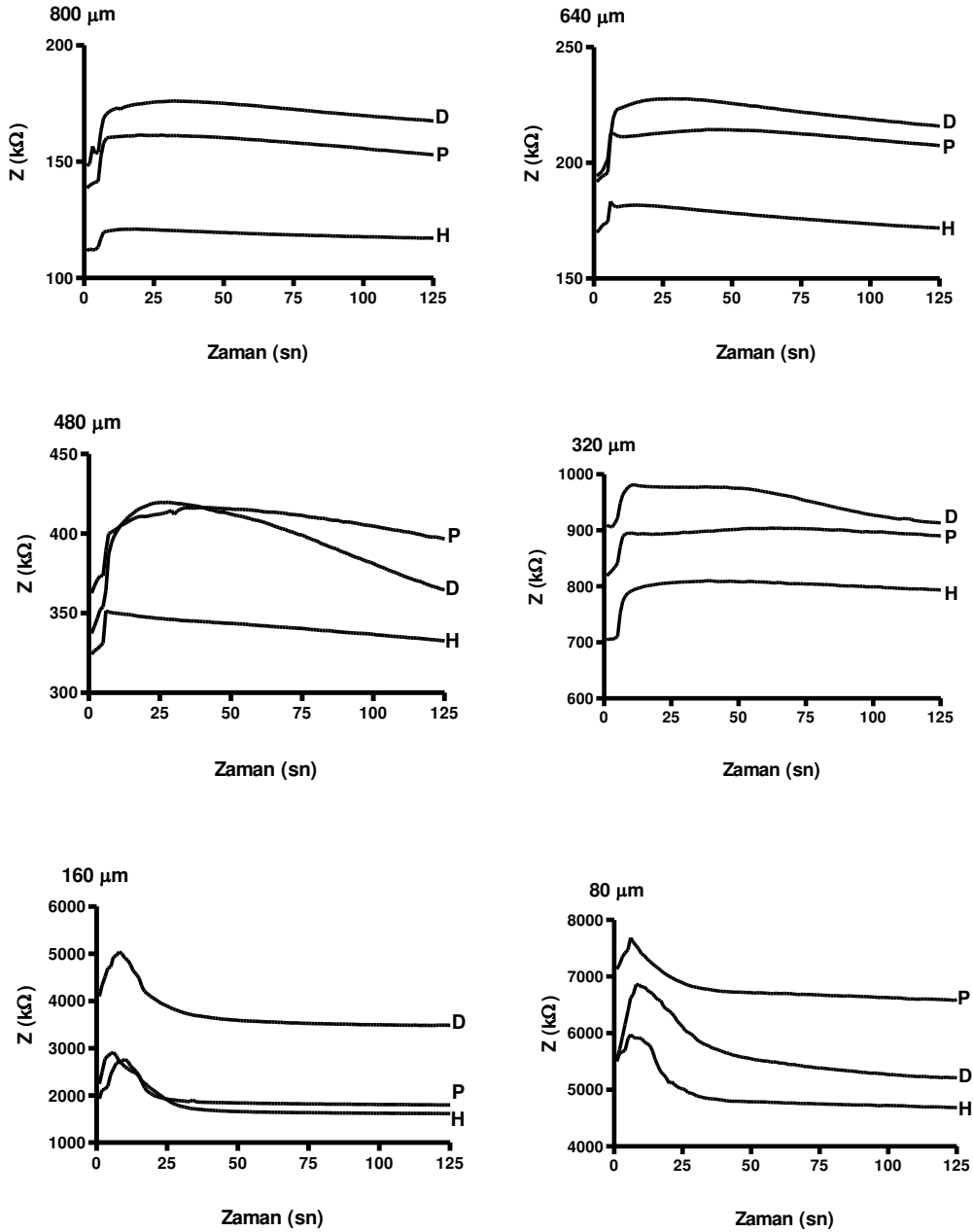
	AI	T _{fast} (s)	T _{slow} (s)	T _{1/2} (s)
Tam kan	70.3 $\pm$ 2.3	2.4 $\pm$ 0.1	32.5 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.08
1/3 dilüsyon	48.7 $\pm$ 2.8**	4.1 $\pm$ 0.3*	29.9 $\pm$ 0.4**	5.2 $\pm$ 0.6*
1/2 dilüsyon	32.6 $\pm$ 2.4***	7.4 $\pm$ 0.8***	28.8 $\pm$ 0.5***	9.0 $\pm$ 0.9***
1% Dextran 500	82.1 $\pm$ 1.5*	0.6 $\pm$ 0.04*	32.6 $\pm$ 0.6	0.4 $\pm$ 0.02*
Glutaraldehit	51.1 $\pm$ 1.1***	5.1 $\pm$ 0.6***	29.5 $\pm$ 0.4***	5.3 $\pm$ 0.4*
Neuraminidase	79.1 $\pm$ 1.3*	1.8 $\pm$ 0.02	33.1 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.03

Çizelge 4.1'de gösterilen eritrosit agregasyonu zaman sabiti $t_{1/2}$ değerlerinin ise "Dextran < Neuraminidase < Tam Kan < 1/3 Dilüsyon < Glutaraldehit < 1/2 Dilüsyon" verilen sırayla arttığı görülmektedir. Eritrosit agregasyonu zaman sabiti T_{fast} 'a ait grafikte, $T_{1/2}$ grafiğine benzer şekilde aynı sırayla dextran örneğinden 1/2 dilüsyon örneğine doğru bir artışın olduğu görülmektedir. Hem T_{fast} hemde $T_{1/2}$ değerlerine bakıldığında dilüsyon grupları, dekstran ve glutaraldehid değerlerinin tam kan değerlerinden istatistiksel olarak önemli düzeyde farkın olduğu saptanmıştır. Aynı çizelgedeki eritrosit agregasyonu zaman sabiti T_{slow} değerlerine bakıldığında ise 1/2 Dilüsyon, 1/3 Dilüsyon ve Glutaraldehit gruplarına ait T_{slow} değerlerinin Tam Kan grubuna ait verilerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğu görülmektedir. LORCA'da farklı eritrosit süspansiyonlarına ait bu ölçümlerle deney günü hazırlanan bütün örneklerin agregasyon derecelerinin doğruluğu test edilmiştir. Birbirinden farklı çaptaki kapillerin kullanıldığı her deneyde yukarıda söz edilen bütün ölçümler

yapılmıştır. Bu ölçümlerin sonunda elde edilen verilerdeki sonuçlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır.

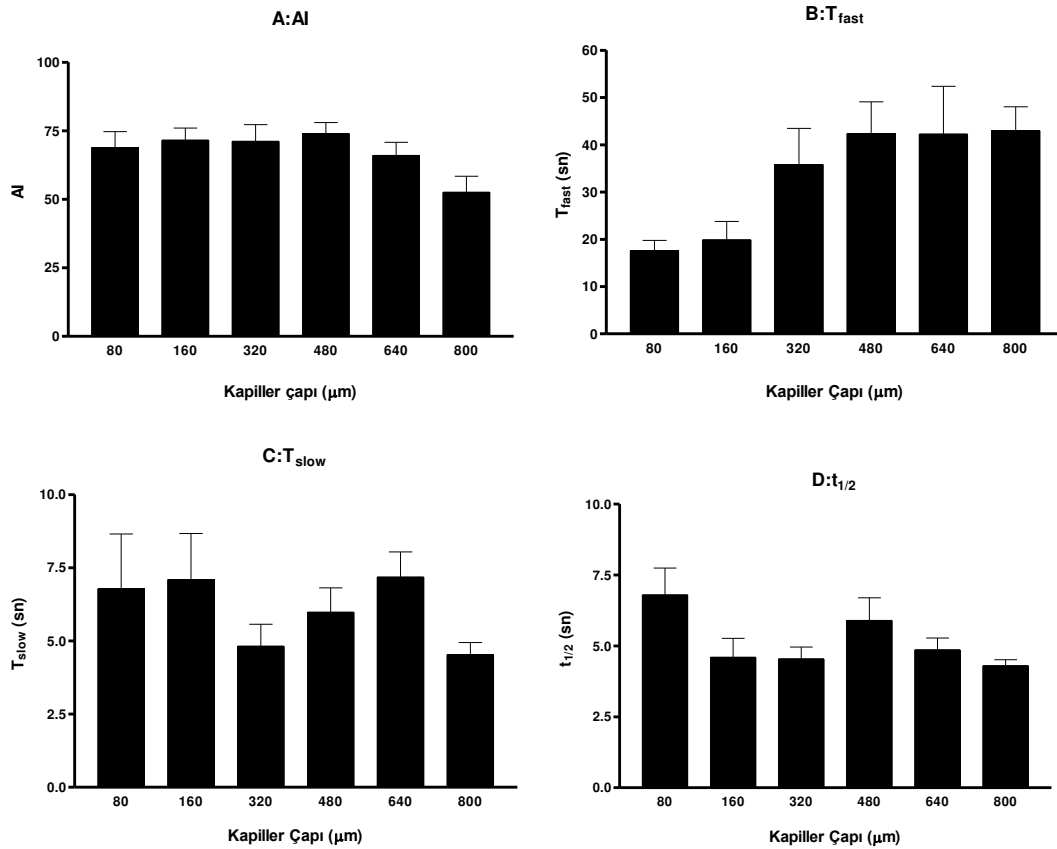
4.2. Birbirinden Farklı Çaptaki Kapiller Borularda Eritrosit Süspansiyonlarının Empedans Kayıtları

Şekil 4.1.'de çapları 800 ile 80 μm arasında değişen altı farklı cam kapillerde tam kan (P), 1/2 dilüsyon (H) ve dekstran (D) gruplarına ait empedans (Z) kayıtları verilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı çapa sahip cam kapillerde *Tam Kan (P)*, *1/2 Dilüsyon (H)* ve *Dekstran (D)* gruplarında kullanılan eritrosit süspansiyonlarına ait Empedans (Z; kΩ) kayıtları. Empedans ölçümleri 100 KHz frekansta yapılmıştır.

Şekildeki tüm çaplara ait kayıtlarda enjektör pompasının durdurulmasından sonra empedans değerlerinde ani bir artışın olduğu, bunu takip eden birkaç saniye içinde de küçük azalma ve eğrinin yatay pozisyonda seyrettiği gözlenmektedir. Şekildeki eğrilerle gösterilen empedans ölçümlerinde tüm örneklerde belirgin değişiklikler söz konusudur. Meydana gelen bu değişikliklerin yani elde edilen elektriksel parametrelere ait bu eğrilerin daha iyi yorumlanabilmesi için bu ölçümlere ait agregasyon parametrelerinin ve zaman sabitlerinin hesaplanması gerekmektedir.



Şekil 4.2. Farklı çapa sahip cam kapillerde *Tam Kan* grubuna ait Empedans (Z) kayıtlarından hesaplanan eritrosit agregasyon indeksi (AI) ve zaman sabitleri. (Sonuçlar $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. n=10, Gruplar arasında fark bulunmamaktadır).

Tam kan grubunun empedans kayıtlarına ait eğrilerden hesaplanan agregasyon zaman sabitleri ve agregasyon indeksleri Şekil 4.2.'de verilmiştir. Eritrosit agregasyon indeksi, T_{slow} ve $t_{1/2}$ verilerine ait grafiklere bakıldığında zaman kapiller çapının değişmesine rağmen agregasyon parametrelerinde fark bulunmamıştır. T_{fast} 'a ait grafikte ise azalan çapla birlikte (80 ve 160 µm çaplar için) T_{fast} değerinin de azaldığı görülmektedir. Fakat diğer çaplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Yapılan

bu çalışmanın sonucunda, kapiller borulardaki eritrosit agregasyonu sırasında izlenen empedans (Z) eğrilerinin agregasyonun zaman seyrini yansıtmadığı söylenebilir. Bu kanaate daha önceden de yapmış olduğumuz çalışmalarda elde edilen verilerin sonucuna paralellik göstermesinden de varılmıştır.

4.3. Birbirinden Farklı Çaptaki Kapiller Borularda Eritrosit Süspansiyonlarının Kapasitans Kayıtları

Eritrosit agregasyon derecelerinin birbirinden farklı olduğu bilinen PBS ile %50 oranında dilüe edilmiş plazmayla hazırlanan 1/2 dilüsyon grubu (azalan), %1 Dextran 500 ile hazırlanmış plazmayla resüspanse edilen Dextran grubu (artan) ve otolog plazmayla hazırlanan tam kan grubuna ait birbirinden farklı çaptaki cam kapillerde kaydı yapılan seri kapasitans (C) eğrileri Şekil 4.3.'de verilmiştir. Tüm çaplarda pompanın durdurulmasından hemen sonra ani bir azalma ve hemen arkasından bir artış gözlenmektedir. Bu değişim 800 ve 640 μm çapa sahip kapillerde daha belirgin olarak gözlenmektedir. 480 ve 320 μm çaplarında ise bu değişim yeteri kadar izlenmemektedir. 160 ve 80 μm 'de ise değişim gözlenmekte fakat pompanın durdurulmasından sonra 800 ve 640 μm 'lik çaplarda gözlenen hızlı değişimin yerine daha yavaş bir azalma ve artış periyodu gözlenmektedir.

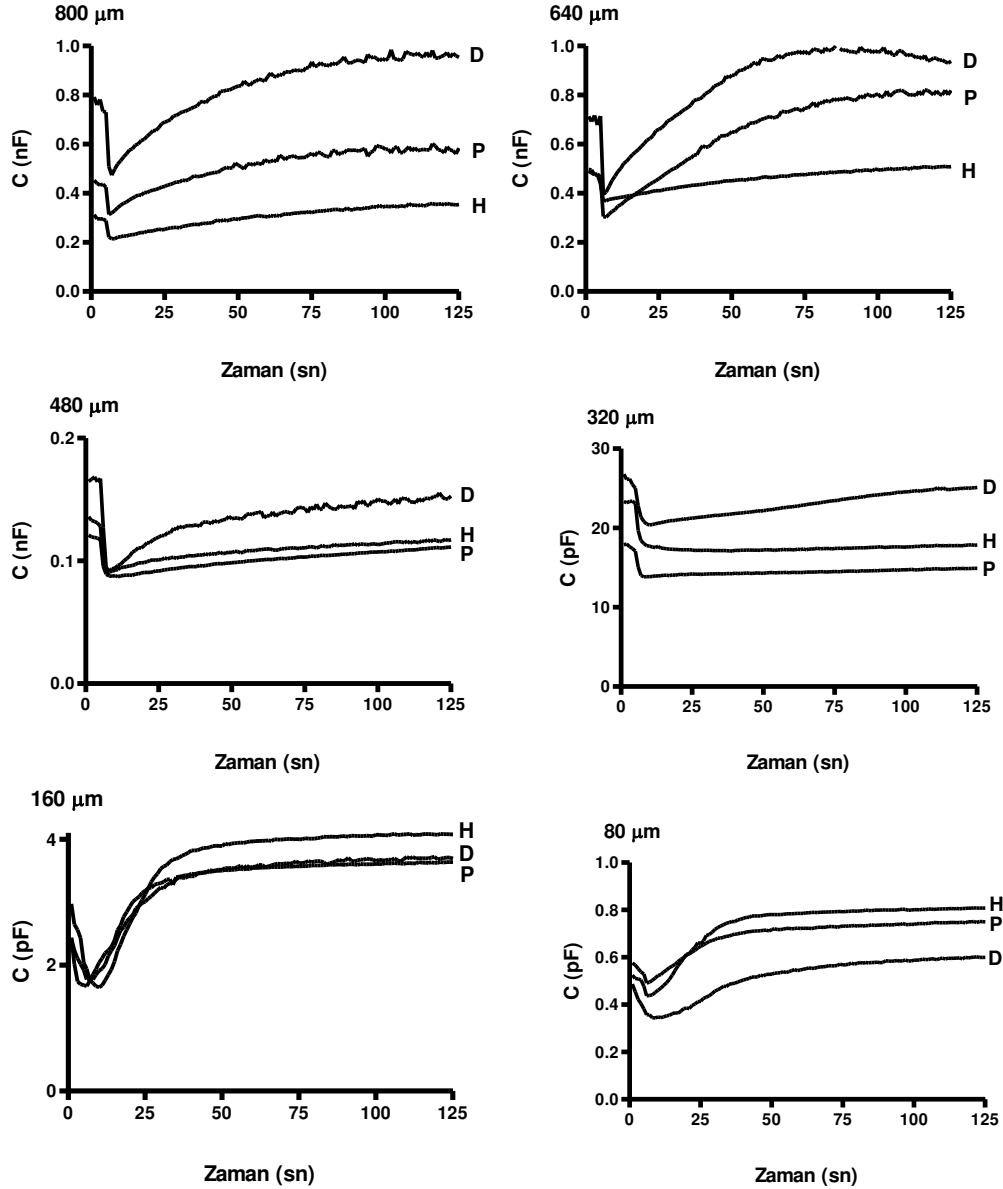
800 ve 640 μm çaplarda ölçümü yapılan eritrosit süspansiyonlarına ait kapasitans eğrilerinde, örneklerin agregasyon davranışları net bir şekilde gözlenmektedir. Her iki çapta da (640-800) agregasyon parametreleri arasındaki fark, özellikle zaman sabitlerindeki değişim net bir şekilde izlenmektedir. Tam kan ile karşılaştırıldığında dextran grubunda zaman sabitlerinde bir hızlanma, dilüsyon grubunda ise azalma gözlenmektedir. Fakat diğer çaplarda gruplar arasındaki bu değişim ortadan kalkmakta ve eğrilerin davranışları birbirine benzerlik göstermektedir.

4.4. Birbirinden Farklı Çaptaki Kapiller Borularda Ölçümü Yapılan Tam Kan Örneklerine Ait Kapasitans Eğrilerinden Hesaplanan Agregasyon Parametreleri

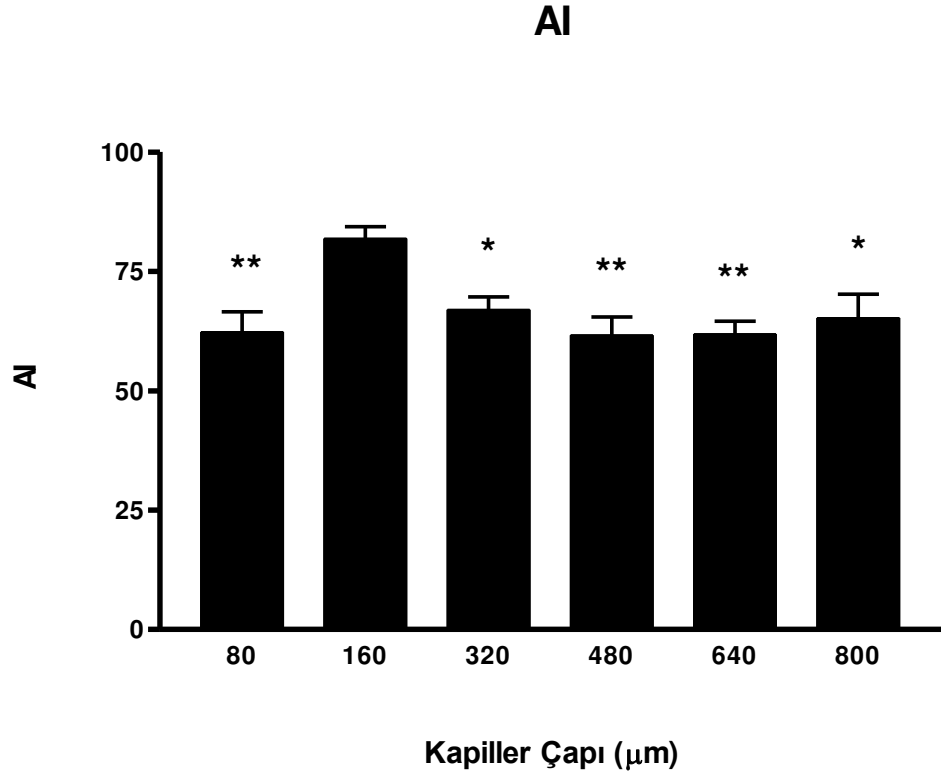
Tam kan grubuna ait kapasitans eğrilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için eritrosit agregasyonu parametrelerinin analizi yapılmıştır. Bu analizler sonucunda hesaplanan eritrosit agregasyonu indeksi (AI) Şekil 4.4.'de gösterilmiştir. Şekildeki grafik incelendiği zaman 160 μm dışındaki diğer bütün çaplar karşılaştırıldığı zaman agregasyon indekslerinde fark bulunmamıştır. Ama bütün çapların agregasyon indeksleri 160 μm 'ye ait değerden istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bütün çaplar arasında değil de sadece bir kapillerde bu farkın ortaya çıkması, yeterli sayıda örnekte ölçüm yapılmasına rağmen, agregasyon indeksinin çapa bağlı olarak değişmediğini akıllara getirmektedir.

Eritrosit agregasyonu zaman sabitlerine ait grafiklerde ise çapa bağlı değişimler daha net bir şekilde gözlenmektedir. Şekil 4.5.'de kapasitans eğrilerinden hesaplanan T_{fast} değerlerine ait grafikte 320 μm 'den daha büyük çaptaki kapillere gidildikçe zaman sabitlerinin azaldığı gözlenmektedir

(320>480>640>800). 160 μm 'lik kapillerde en düşük T_{fast} değeri ($7,8 \pm 1,1$) hesaplanmıştır. 320 μm ise en büyük değer hesaplanmıştır ($59,3 \pm 12,1$) ve diğer bütün çaplarla karşılaştırıldığında önemli bulunmuştur ($p < 0.001$). Şekilde 800 μm 'den 320 μm 'ye doğru çap değişimiyle birlikte T_{fast} değerinde artış gözlenmektedir. Fakat 320 μm 'nin altına inildiğinde zaman sabitinde belirgin bir hızlanma gözlenmektedir. Bu gözlenen hızlı değişim örneğe ait kapasitans eğrilerinde de net bir şekilde gözlenmektedir.



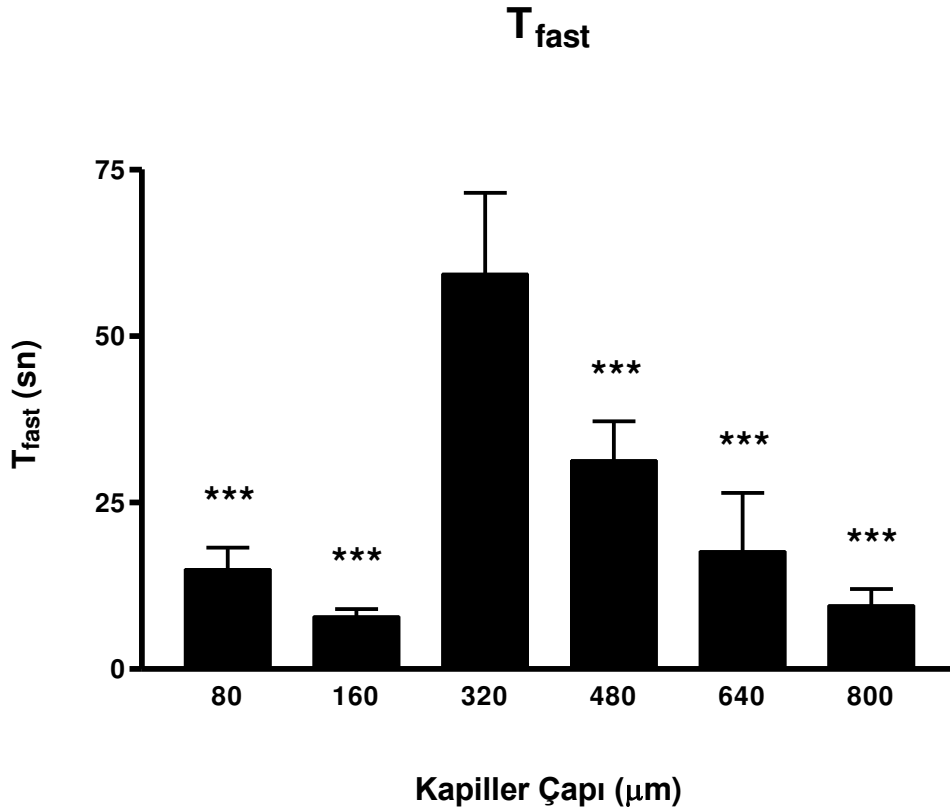
Şekil 4.3. Farklı çapa sahip cam kapillerde *Tam Kan (P)*, *1/2 Dilüsyon (H)* ve *Dekstran (D)* gruplarında kullanılan eritrosit süspansiyonlarına ait seri Kapasitans (C) kayıtları. Kapasitans ölçümleri 100 KHz frekansta yapılmıştır



Şekil 4.4. Farklı çaplara sahip cam kapillerde *Tam Kan* grubuna ait Kapasitans (C) kayıtlarından hesaplanan eritrosit agregasyon indeksi (AI). (Sonuçlar $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. n=10, 160 μm grubundan fark, *:p<0.05; **:p<0,01).

Diğer bir zaman sabiti olan T_{slow} değerlerine ait veriler Şekil 4.6'de verilmiştir. T_{fast} grafiğinde görülen benzer davranış burada da gözlenmektedir. 320 μm 'den itibaren artan çapa bağlı olarak azalan T_{slow} değerleri bar grafiğinde açıkça görülmektedir. 320, 480 ve 640 μm çaplara ait T_{slow} değerleri 160 μm ile karşılaştırıldığında, ayrıca 800 ve 80 μm değerleri 320 μm ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmuştur ($p<0.05$). Çapların birbirleriyle olan diğer karşılaştırılmasında önemli farklar bulunmamıştır. Benzer bir şekilde T_{fast} 'te gözlenen 160 μm 'deki ani hızlanma T_{slow} grafiğinde de gözlenmektedir.

Şekil 4.7'de gösterilen eritrosit agregasyonu yarı zaman sabiti $t_{1/2}$ grafiğinde de diğer zaman sabitlerine benzeyen bir grafik elde edilmiştir. En büyük zaman sabiti değeri diğerlerinde olduğu gibi 320 μm çapta elde edilmiştir. Yine aynı şekilde 320 μm 'den itibaren artan çapa bağlı olarak azalan $t_{1/2}$ değeri hesaplanmıştır. 80, 320, 480, 640 ve 800 μm çaplara ait $t_{1/2}$ değerleri 160 μm ile karşılaştırdığı zaman istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

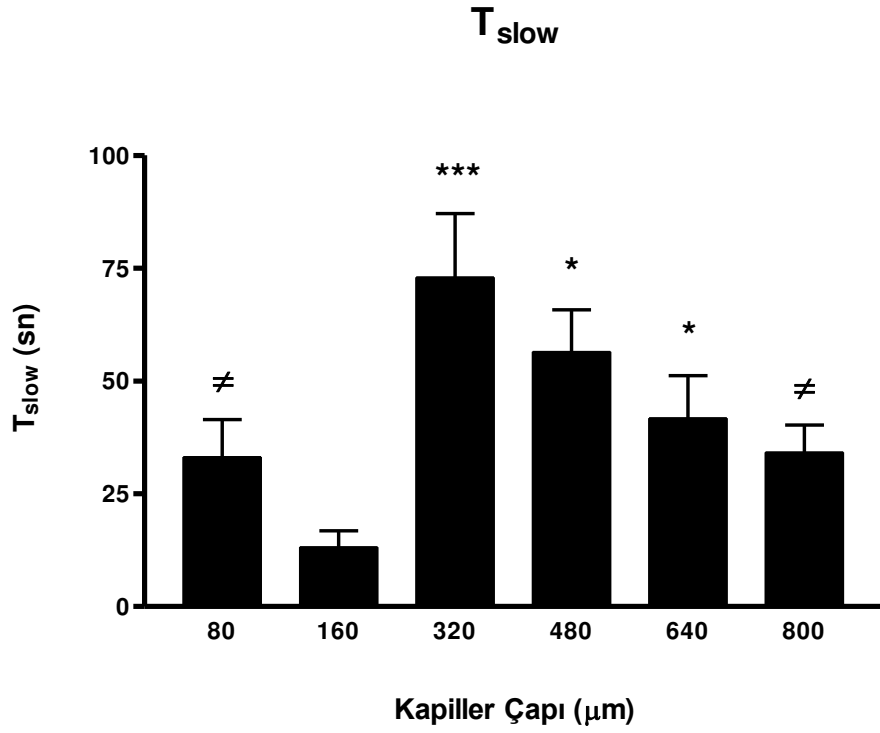


Şekil 4.5. Farklı çaplara sahip cam kapillerde *Tam Kan* grubuna ait Kapasitans (C) kayıtlarından hesaplanan eritrosit agregasyonu zaman sabitlerinden T_{fast} değerleri. (Sonuçlar $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. $n=10$, 320 μm grubundan fark, ***: $p<0,001$).

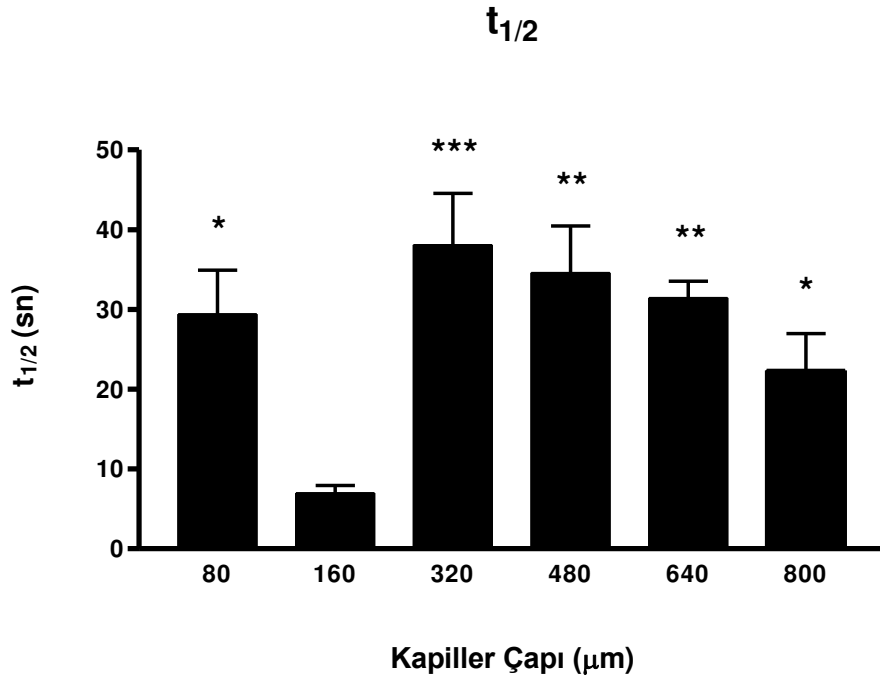
Tam kan için hesaplanan tüm eritrosit agregasyonu zaman sabitlerine ait grafiklere bakıldığında 320 μm 'den itibaren ölçüm sisteminde kullanılan cam kapillerin çapındaki artış, zaman sabitlerinin azalmasına neden olmuştur. Ama tüm zaman sabitleri için bakıldığında 160 μm 'de önemli bir hızlanmanın olduğu göze çarpmaktadır. Şekil 4.1.3'deki 160 μm 'ye ait kapasitans eğrilerine bakıldığında sinyalde de bir hızlanmanın olduğu gözlenmektedir. Bu da boru çapının kritik bir değerin altına inmesi halinde zaman sabitlerinin azaldığını göstermektedir.

4.5. Birbirinden Farklı Çaptaki Kapiller Borularda Ölçümü Yapılan Eritrosit Süspansiyonlarına Ait Kapasitans Eğrilerinden Hesaplanan Agregasyon Parametreleri

Çizelge 4.2.'de 800, 640, 480, 320, 160 ve 80 μm 'lik cam kapillerde akımın durdulmasından hemen sonra 1/3 Dilüsyon, 1/2 Dilüsyon, Dekstran, Glutaraldehit ve Neuraminidase gruplarına ait seri kapasitans (C) eğrilerinden hesaplanan agregasyon parametreleri gösterilmektedir. Tüm gruplardaki agregasyon indeksi değerlerine bakıldığı zaman Dekstran grubu hariç 320 μm 'de en küçük, 160 μm 'de ise en büyük agregasyon indeksi hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. Farklı çaplara sahip cam kapillerde *Tam Kan* grubuna ait Kapasitans (C) kayıtlarından hesaplanan eritrosit agregasyonu zaman sabitlerinden T_{slow} değerleri. (Sonuçlar $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. $n=10$, 160 μm grubundan fark, *: $p<0.05$; ***: $p<0.001$, 320 μm grubundan fark, ≠: $p<0.05$).



Şekil 4.7. Farklı çaplara sahip cam kapillerde *Tam Kan* grubuna ait Kapasitans (C) kayıtlarından hesaplanan eritrosit agregasyonu zaman sabitlerinden $t_{1/2}$ değerleri. (Sonuçlar $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. $n=10$, 160 μm grubundan fark, *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$).

Çizelge 4.2. Farklı çaptaki kapiller borularda ölçümü yapılan eritrosit süspansiyonlarına ait kapasitans eğrilerinden hesaplanan agregasyon parametreleri. (Sonuçlar $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=10. *:p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0,001 160 μm 'den fark, †:p<0.05; ††:p<0.01; †††:p<0,001 320 μm 'den fark)

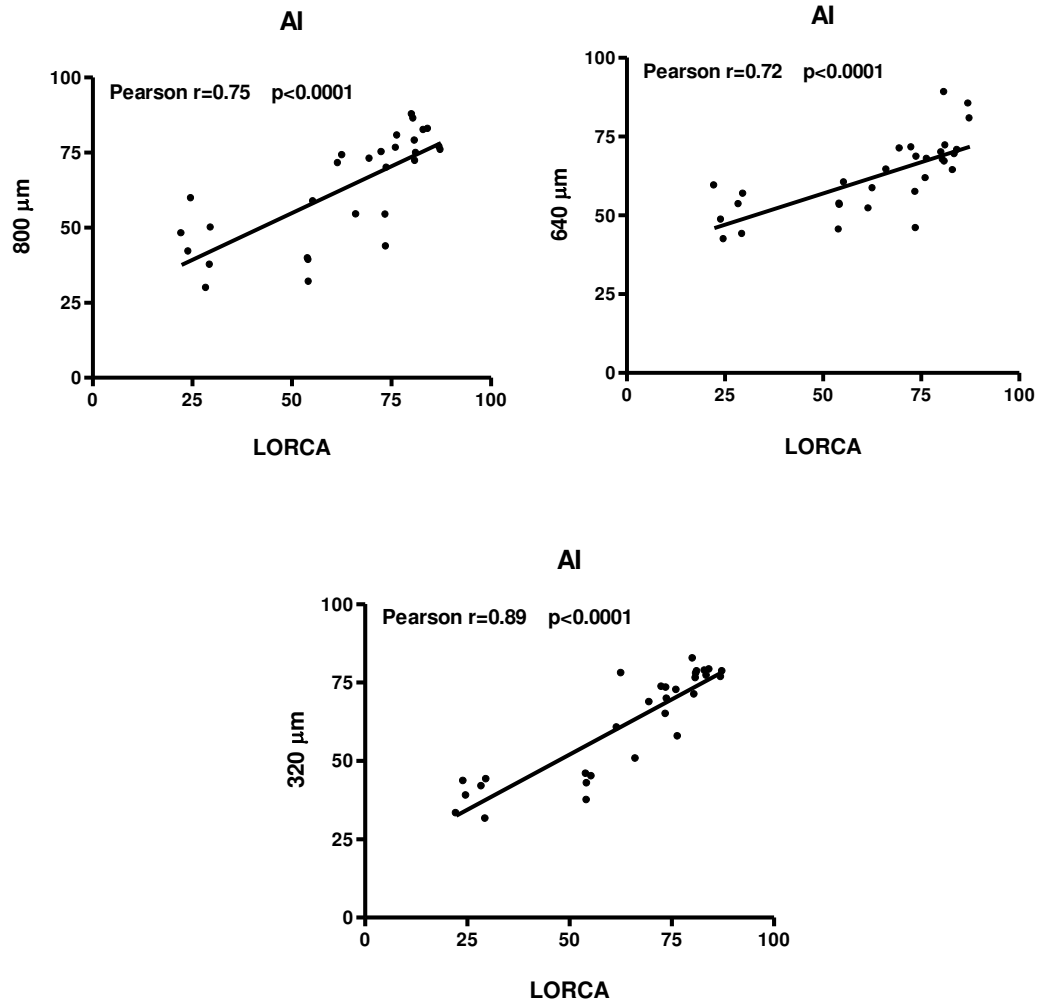
<i>1/3 dilüsyon</i>	AI	t_{1/2} (s)	T_{fast} (s)	T_{slow} (s)
800 μm	56.6 $\pm$ 3.5**	26.4 $\pm$ 4.1	11.2 $\pm$ 1.3††	38.1 $\pm$ 8.0
640 μm	66.4 $\pm$ 2.2†	29.6 $\pm$ 2.2	13.3 $\pm$ 2.4††	42.8 $\pm$ 4.5
480 μm	56.2 $\pm$ 3.0**	28.1 $\pm$ 4.7	38.0 $\pm$ 7.5	32.6 $\pm$ 5.9
320 μm	49.9 $\pm$ 1.9***	41.7 $\pm$ 4.5**	52.4 $\pm$ 13.9**	47.8 $\pm$ 8.4
160 μm	78.3 $\pm$ 4.1	14.8 $\pm$ 4.5	9.4 $\pm$ 2.3	24.7 $\pm$ 8.1
80 μm	66.1 $\pm$ 6.1	29.3 $\pm$ 6.4	35.6 $\pm$ 7.3	42.8 $\pm$ 9.9
<i>1/2 dilüsyon</i>	AI	t_{1/2} (s)	T_{fast} (s)	T_{slow} (s)
800 μm	43.7 $\pm$ 3.2***	46.6 $\pm$ 3.4***	23.9 $\pm$ 1.3†††	45.6 $\pm$ 5.8
640 μm	51.7 $\pm$ 2.1***	45.5 $\pm$ 3.0***	56.3 $\pm$ 7.5	61.9 $\pm$ 5.3
480 μm	62.5 $\pm$ 3.3**†††	32.5 $\pm$ 3.7***	46.6 $\pm$ 5.2†	91.9 $\pm$ 15.8***
320 μm	40.4 $\pm$ 1.6***	41.4 $\pm$ 1.9***	94.4 $\pm$ 22.5***	90.9 $\pm$ 18.2**
160 μm	83.8 $\pm$ 2.6	10.3 $\pm$ 1.6	14.2 $\pm$ 4.1	22.7 $\pm$ 6.1
80 μm	66.0 $\pm$ 6.3*†††	23.5 $\pm$ 3.1*†††	25.0 $\pm$ 5.4†††	43.8 $\pm$ 8.4
<i>1%Dextran500</i>	AI	t_{1/2} (s)	T_{fast} (s)	T_{slow} (s)
800 μm	79.7 $\pm$ 1.8	16.3 $\pm$ 1.8	8.2 $\pm$ 1.2†††	21.3 $\pm$ 1.7
640 μm	73.5 $\pm$ 2.7†	17.9 $\pm$ 2.9	10.5 $\pm$ 1.3†††	44.4 $\pm$ 5.1***
480 μm	63.4 $\pm$ 4.3**	25.9 $\pm$ 5.6	26.9 $\pm$ 4.9**	36.9 $\pm$ 7.4*
320 μm	77.6 $\pm$ 1.1	30.8 $\pm$ 5.1*	40.3 $\pm$ 4.7***	38.8 $\pm$ 4.1*
160 μm	80.1 $\pm$ 2.2	11.9 $\pm$ 1.9	5.7 $\pm$ 1.1	13.5 $\pm$ 3.4
80 μm	67.6 $\pm$ 3.5*	23.7 $\pm$ 3.3	25.6 $\pm$ 5.5**	38.0 $\pm$ 6.4*
<i>Glutaraldehit</i>	AI	t_{1/2} (s)	T_{fast} (s)	T_{slow} (s)
800 μm	64.4 $\pm$ 1.3*	25.3 $\pm$ 1.8†	13.8 $\pm$ 3.4†††	34.8 $\pm$ 8.7
640 μm	67.6 $\pm$ 2.6†	27.7 $\pm$ 4.2†	8.6 $\pm$ 1.7†††	39.3 $\pm$ 10.0
480 μm	60.6 $\pm$ 3.2**	30.5 $\pm$ 4.6*	22.2 $\pm$ 8.7††	44.8 $\pm$ 9.3
320 μm	51.6 $\pm$ 2.4***	45.9 $\pm$ 3.0***	51.2 $\pm$ 9.7***	48.3 $\pm$ 8.2*
160 μm	79.8 $\pm$ 5.2	11.8 $\pm$ 4.4	8.3 $\pm$ 0.6	14.5 $\pm$ 3.5
80 μm	74.7 $\pm$ 3.8†††	20.1 $\pm$ 5.8†††	14.8 $\pm$ 1.8†††	22.4 $\pm$ 4.6
<i>Neuraminidase</i>	AI	t_{1/2} (s)	T_{fast} (s)	T_{slow} (s)
800 μm	70.2 $\pm$ 0.7†††	17.8 $\pm$ 3.5	5.1 $\pm$ 0.8†††	36.1 $\pm$ 7.9
640 μm	69.8 $\pm$ 0.7†††	20.9 $\pm$ 3.2	7.3 $\pm$ 0.6††	36.1 $\pm$ 8.6
480 μm	66.5 $\pm$ 1.3††	19.4 $\pm$ 2.7	11.9 $\pm$ 2.3†	32.7 $\pm$ 7.5
320 μm	48.1 $\pm$ 2.1***	29.7 $\pm$ 4.5*	35.5 $\pm$ 7.2*	32.5 $\pm$ 3.9
160 μm	79.1 $\pm$ 3.7	11.9 $\pm$ 1.9	12.5 $\pm$ 3.6	26.7 $\pm$ 8.1
80 μm	66.2 $\pm$ 5.9*††	26.9 $\pm$ 6.3	25.2 $\pm$ 8.4	39.8 $\pm$ 10.2

Tam kan örneğinde olduğu gibi buradaki eritrosit süspansiyonlarında da 160 μm ' ve 320 μm deki agregasyon indeksleri diğer çaplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmuştur. Eritrosit agregasyonu zaman sabiti T_{slow} değerlerinde 1/3 Dilüsyon ve Neuraminidase gruplarında çaplar arasında önemli farklar bulunmamışken, diğer gruplarda 160 μm 'de önemli bir azalma saptanmıştır. Diğer zaman sabitleri T_{fast} ve

$t_{1/2}$ 'ye bakıldığı zaman 320 μm 'den daha büyük çaplara gidildikçe hesaplanan zaman sabitlerinin azaldığı saptanmıştır. Bu zaman sabitleri için 320 μm 'den daha küçük olan 160 μm 'ye geçildiğinde ise zaman sabitlerinde önemli bir hızlanmanın olduğu gözlenmektedir. Tam kan örneklerinde gözlenen bu değişim, ortamın süspansiyon özelliklerinin veya eritrositlerin hücresel özelliklerinin değiştirilmesiyle hazırlanan, agregasyon derecesi birbirinden farklı örneklerde de gözlenmektedir. Böylelikle tam kan içinde saptanan geometrinin etkisi bu örneklerde de doğrulanmıştır.

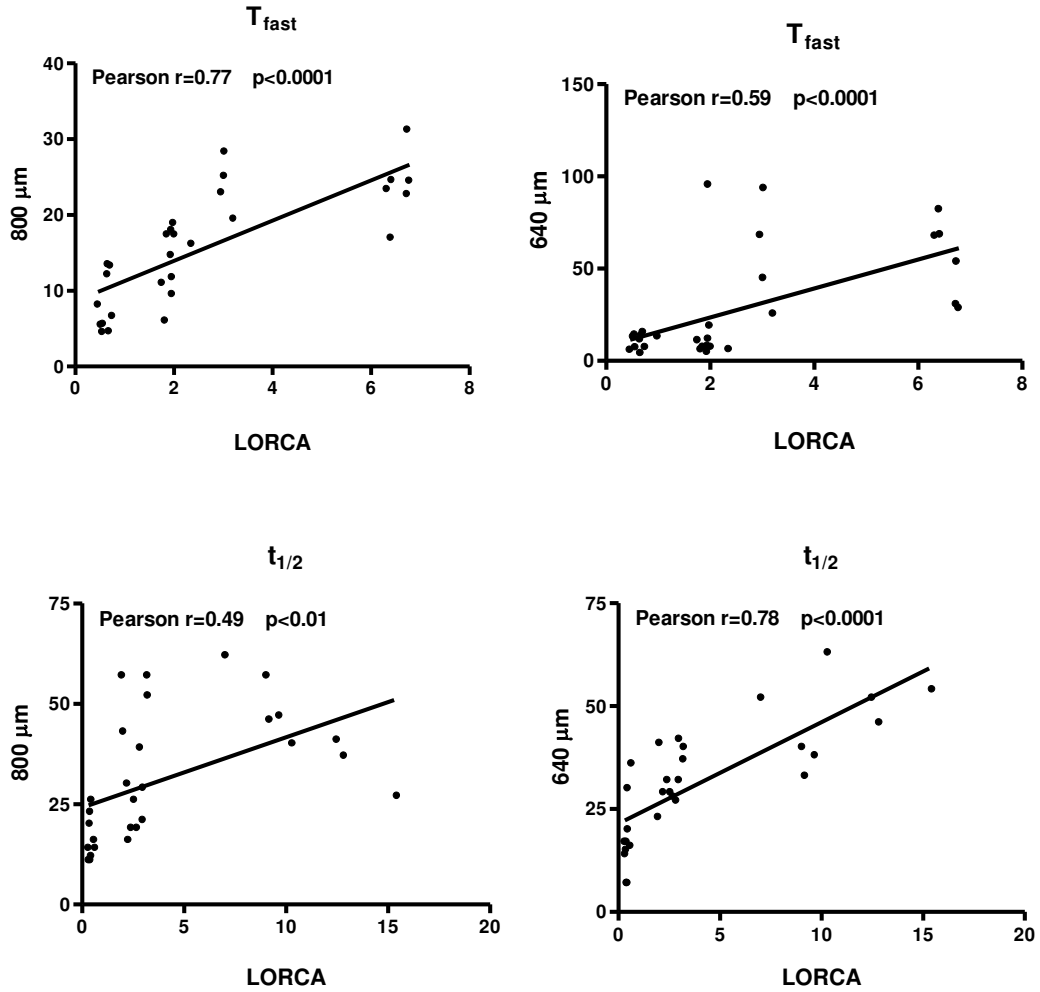
4.6. LORCA ile Farklı Çaptaki Kapiller Borulardaki Agregasyon Parametreleri Arasındaki İlişki

Şekil 4.8.'de dört tip eritrosit süspansiyonuna (Tam kan, 1/3 Dilüsyon, 1/2 Dilüsyon ve %1 Dekstran 500) ait LORCA'da ölçülen agregasyon indeksi değerleriyle 800, 640 ve 320 μm 'ye ait kapasitans eğrilerinden hesaplanan agregasyon indekslerinin korelasyonu gösterilmektedir.



Şekil 4.8. Farklı çaptaki kapiller borularda kaydedilen kapasitans eğrilerinden hesaplanan agregasyon indeksi ile LORCA agregasyon indeksi arasındaki lineer regresyon analizi.

Her üç çap için hesaplanan agregasyon indeksleriyle, LORCA'ya ait indeks arasında güçlü ve pozitif bir korelasyon bulunmaktadır (800: $r=0.75$; 640: $r=0.72$; 320: $r=0.89$). Diğer çaplarda ise (480, 160 ve 80 μm) istatistiksel olarak önemli bir korelasyon saptanmamıştır. Bu çaplara ait korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 4.3'de gösterilmektedir.



Şekil 4.9. Farklı çaptaki kapiller borularda kaydedilen kapasitans eğrilerinden hesaplanan agregasyon zaman sabitleri ile LORCA agregasyon zaman sabitleri arasındaki lineer regresyon analizi.

Şekil 4.9.'de dört tip eritrosit süspansiyonuna (Tam kan, 1/3 Dilüsyon, 1/2 Dilüsyon ve %1 Dekstran 500) ait LORCA'da ölçülen agregasyon zaman sabitleri T_{fast} ve $t_{1/2}$ değerleriyle 800 ve 640 μm 'ye ait kapasitans eğrilerinden hesaplanan agregasyon zaman sabitlerinin korelasyonu gösterilmektedir. Her iki çap için hesaplanan agregasyon zaman sabitleri ile, LORCA'ya ait değerler arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır ($T_{fast}= 800$: $r=0.77$ $p<0.0001$; 640 : $r=0.59$ $p<0.0001$; $t_{1/2}= 800$: $r=0.49$ $p<0.01$; 640 : $r=0.78$ $p<0.0001$).

$p < 0.0001$). Diğer çaplarda ise (480, 320, 160 ve 80 μm) istatistiksel olarak önemli bir korelasyon saptanmamıştır. Bu çaplara ait korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 4.3.'de gösterilmektedir. Diğer bir zaman sabiti olan T_{slow} 'da ise bütün çaplar için önemli bir korelasyon saptanmamıştır (Çizelge 4.3.)

Çizelge 4.3. LORCA ve farklı çaptaki kapiller borularda ölçümü yapılan eritrosit süspansiyonlarına ait kapasitans eğrilerinden hesaplanan agregasyon parametrelerine ait Pearson korelasyon katsayıları. (**: $p < 0.01$; ***: $p < 0,001$)

		Kapasitans (C)					
		800 μm	640 μm	480 μm	320 μm	160 μm	80 μm
LORCA	AI	0.75***	0.72***	-0.08	0.89***	-0.30	0.03
	T_{fast}	0.77***	0.59***	0.35	0.34	0.19	-0.07
	T_{slow}	-0.28	-0.05	-0.06	0.04	-0.20	-0.05
	$T_{1/2}$	0.49**	0.78***	-0.04	0.24	-0.10	0.02

TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçları göstermiştir ki, çapları birbirinden farklı cam kapillerde yapılan seri kapasitans ölçümlerine ait eğrilerden hesaplanan eritrosit agregasyonu zaman sabitlerinde (T_{slow} , T_{fast} ve $t_{1/2}$) kapiller çapına bağlı olarak değişim meydana gelmektedir. Kapiller borulardaki eritrosit agregasyonu sırasında izlenen seri kapasitans değerlerinin agregasyonun zaman seyrini yansıttığı saptanmıştır. Ayrıca empedans verilerinin hesaplanmasıyla elde edilen agregasyon parametrelerinin kapiller çapına bağlı olarak değişmediği gösterilmiştir (Şekil 4.2.) Kendi laboratuvarlarımızda daha önceden yaptığımız çalışmalarda 1000 μm çapa sahip kapiller borulardaki eritrosit süspansiyonun agregasyon ölçümü hem fotometrik hem de süspansiyonun elektriksel özelliklerinin ölçülmesiyle karşılaştırılmıştır. Süspansiyonun ışık geçirgenli ve kapasitans ölçümlerinin agregasyon formasyonunu tam anlamıyla yansıttığı bulunmuştur. Elektriksel empedans değerleri ise bu özellikte bulunmamıştır (19).

Eritrosit agregasyonu gerek plazmanın, gerekse eritrositlerin hücresel özelliklerindeki değişimlerden etkilenir. Plazma bileşenlerinden özellikle fibrinojen konsantrasyonu eritrosit agregasyonunu etkileyen en önemli faktörlerden biridir (74). Fibrinojen yanında diğer akut faz reaktanları, plazma globulin fraksiyonlarındaki değişimler, osmolarite ve pH değişiklikleri, hematokrit değerindeki artış eritrosit agregasyonunu etkiler (74, 103). Bu çalışmada, eritrosit süspansiyonlarının agregasyon özelliklerine farklı yaklaşımlarla (süspansiyon ortamının değiştirilmesi, eritrosit yüzey özelliklerinin değiştirilmesi gibi) müdahale edilmesiyle hazırlanan örneklerin agregometrede ölçülmesiyle birbirlerinden farklı olan agregasyon özellikleri ortaya konmuştur (Çizelge 4.1).

Zhao ve Jacobson, elektriksel empedans ve kapasitans değerlerinin süspansiyondaki fibrinojen konsantrasyonu ile arttığı göstermişlerdir. (123). Yine bu çalışmada eritrosit sedimentasyon hızının kapasitans ile korele olduğu, kapasitansın eritrosit sedimentasyon hızına çok duyarlı olduğu bildirilmiştir (123). Pribush ve arkadaşları eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin agregasyon sırasında değiştiğini göstermişlerdir (89-91). Bu süspansiyonların elektriksel özelliklerinin izlenmesinin agregasyon süreci hakkında bilgi vereceği öne sürülmüştür (88, 89). Tam kan ve eritrosit süspansiyonlarıyla yapılan çalışmada, sistemdeki kan akımının aniden durdurulmasından sonra ölçülen kapasitans değerlerinin değiştiği ve bu değişime de eritrosit agregasyonunun neden olduğu bildirilmiştir (19, 21, 90).

Fotometrik ölçüm sistemlerine ait geometriler genellikle birkaç yüz mikrometre genişliğinde bir akım alanına sahip yapılardan oluşmaktadır. Bu

ölçüm sistemlerinden çok daha küçük geometriye sahip sistemlerde fotometrik olarak ölçümün mümkün olmadığı koşullarda, eritrosit süspansiyonunun elektriksel özelliklerinin, özellikle de kapasitansın ölçümü agregasyonun değerlendirilmesi için kullanılabilir. Eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin fotometrik ölçümlere benzer şekilde bir seyir gösterdiği ve agregasyonla ilgili parametrelerin bu kayıtlar kullanılarak hesaplanabileceği bildirilmiştir (19, 21, 88, 91).

Bu çalışmada, birbirinden farklı çapa sahip cam kapiller borularda eritrosit süspansiyonlarının empedans (Z) ve seri kapasitans (C) özellikleri ölçülmüştür. Bu süspansiyonlara ait elektriksel özelliklerin ölçülmesiyle elde edilen kayıtlardan eritrosit agregasyonuna ait parametreler (AI , T_{slow} , T_{fast} , $t_{1/2}$) hesaplanmıştır. Birbirinden farklı cam kapillerde (80, 160, 320, 480, 640 ve 800 μm) yapılan seri kapasitans ölçümlerine ait eğrilerde, kapiller çapındaki azalma ile beraber 320 μm 'lik kapillere kadar kaydedilen sinyalin giderek yavaşladığı gözlenmektedir. Kapiller çapının 160 μm 'ye inmesiyle birlikte sinyalde bir hızlanmanın olduğu görülmektedir. Kaydedilen sinyal 160 μm 'nin altında ve üstündeki çaplarda farklı davranışlar sergilemektedir (Şekil 4.3). Yani ölçüm sistemine ait geometrinin değişmesiyle seri kapasitans ölçümlerinden elde edilen eğrilerin değiştiği gösterilmiştir. Bu kayıtlardan hesaplanan eritrosit agregasyonu zaman sabitlerinin (T_{slow} , T_{fast} ve $t_{1/2}$) cam kapillerin çapındaki azalışa paralel olarak, kademeli bir şekilde arttığı bulunmuştur (Şekil 4.4-7). Fakat bu artış 320 μm 'den sonra gözlenmemektedir. Aksine 160 μm 'de her üç zaman sabitinde hızlı bir azalmanın yani hızlanmanın olduğu görülmektedir.

Eritrosit süspansiyonlarının LORCA kullanılarak ölçülen agregasyon indeksi ile kapasitans ölçümlerine ait eğrilerden hesaplanan aynı parametrenin korelasyonu yapıldığı zaman, LORCA ve kapasitans (800, 640 ve 320 μm 'deki) agregasyon indeksi değerleri arasında pozitif ve istatistiksel olarak önemli bir korelasyonun ($p < 0.0001$) bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 4.8). Ayrıca eritrosit süspansiyonlarının LORCA kullanılarak ölçülen zaman sabitleri T_{fast} ve $t_{1/2}$ ile kapasitans ölçümlerine ait eğrilerden hesaplanan aynı parametrelerin korelasyonu yapıldığı zaman, LORCA ve kapasitans (800 ve 640 μm 'deki) zaman sabitleri değerleri arasında pozitif ve istatistiksel olarak önemli bir korelasyonun ($p < 0.0001$) bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 4.9). Kapasitans T_{slow} değeri ve diğer çaplar için önemli bir korelasyon bulunmamaktadır (Çizelge 4.3).

Eritrosit agregasyonunun vücut dışında incelenmesiyle elde edilen bilgilerin, bu fenomenin *in vivo* kan akımı üzerindeki etkisiyle ilgili değerlendirmelere doğrudan uygulanması mümkün değildir. Çünkü eritrosit agregasyonunun *in vivo* koşullardaki etkisi kanın belirli bir damar segmentindeki geçiş süresi ve segmentin uzunluğu, agregasyonun zaman seyri, damarın oryantasyonu ve mikrodolaşım düzeyinde kanın akım hızı gibi çeşitli *in vivo* faktörlere bağlıdır (6). *In vivo* olarak kapiller sonrası venüllerdeki eritrosit agregat oluşumunun incelendiği çalışmada damarların ortalama çapı

12–15 μm iken, *in vitro* sistemlerde, fotometrik ölçüm sistemlerine ait geometriler genellikle birkaç yüz mikrometre genişliğinde bir akım alanına sahip yapılardan oluşmaktadır. *In vitro* ölçümlerde eritrosit rulo formasyonunun zaman sabiti birkaç saniyedir (24). Kim ve arkadaşlarının yapmış oldukları *in vivo* çalışmalarda ise eritrosit agregasyonunun yaklaşık 100 milisaniye içinde tamamlandığı gösterilmiştir. (69, 70). Bu zaman seyirlerindeki farklılıkların agregasyonun gerçekleştiği akım sisteminin (*in vivo* koşullarda damarlar, *ex vivo* koşullarda ölçüm sistemi) geometrik özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, birbirinden farklı özellikteki eritrosit süspansiyonlarının birbirinden farklı agregasyon özelliklerinden faydalanılarak, ölçüm sistemi geometrisi ile agregasyon kinetiği ilişkisinin nasıl değişeceği araştırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla altı farklı çapa sahip cam kapillerde (80, 160, 320, 480, 640 ve 800 μm) agregasyon özellikleri farklı olan süspansiyonlarla, agregasyon sürecini yansıttığını önceden bildiğimiz kapasitans ölçümü yapılmıştır. Özellikle küçük çapa sahip cam kapiller borulardaki eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin ölçülmesiyle, bu kapillerde eritrosit agregasyon kinetiğinin belirlenmesine yardımcı olabileceğimizi, *in vivo* ve *in vitro* eritrosit agregasyonu zaman seyirleri arasındaki farklılığa bir açıklık getirilebileceği düşünülmüştür. Tüm bu bilgilerden yola çıkarak bu çalışmamızda ölçüm sistemi geometrisinin, yani kullanılan cam kapiller çapının değişmesiyle özellikle eritrosit agregasyon kinetiğine ilişkin zaman sabitlerinin değişebileceği düşünülmüştür. Bu yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre eritrosit agregasyon kinetiğine ilişkin zaman sabitleri ölçüm yaptığımız sistemin geometrisinden etkilenmektedir. Ölçüm sistemine ait geometrinin değişmesiyle seri kapasitans ölçümlerinden hesaplanan parametrelerinin değiştiği gösterilmiştir. Bu kayıtlardan hesaplanan eritrosit agregasyonu zaman sabitlerinin (T_{slow} , T_{fast} ve $t_{1/2}$) cam kapillerin çapındaki azalışla birlikte bu parametrelerin arttığı bulunmuştur (Şekil 4.4-7). Fakat bu değişim 320 μm 'den sonra yani 160 μm 'ye inildiğinde zaman sabitlerinde hızlı bir azalmanın yani hızlanmanın olduğu görülmektedir.

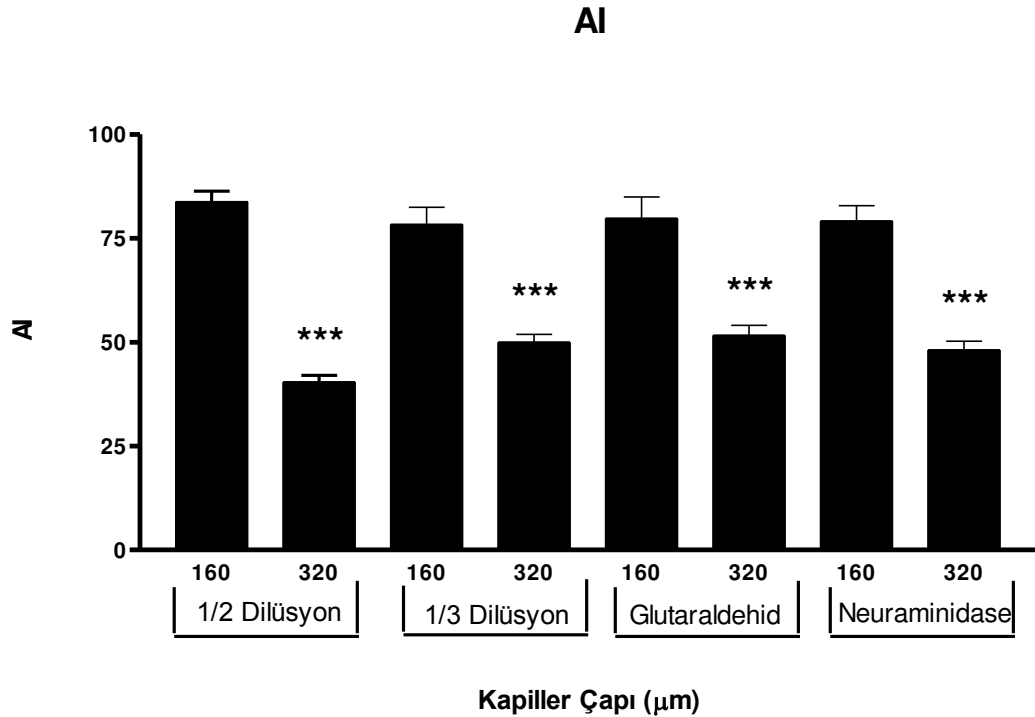
Ticari amaçlarla üretilen eritrosit agregometreleri özellikle agregatların dağıtılması (disagregasyon) sürecinde önem taşıyan, çeşitli akım geometrileri (iç içe geçmiş silindirler, koni-plak, paralel yüzeyler, dikdörtgen akım kanalı gibi) kullanırlar. Bu agregometreler genellikle eritrosit süspansiyonundan yansıyan ya da geçen ışık miktarının ölçülmesi prensibine dayanır. Her iki ölçüm yöntemi de agregasyon sürecini yansıtmaya rağmen, birbirleriyle karşılaştırıldığında önemli farklılıkları da bulunmaktadır (18, 20, 54, 105). Bunun yanı sıra bu ölçüm sistemlerine ait geometriler genellikle birkaç yüz mikrometre genişliğinde bir akım alanına sahip yapılardan oluşmaktadır. Dobbe ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da ölçüm sistemine ait geometrinin değişmesinin eritrosit agregasyon parametrelerinde değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir (46). Bu çalışmada kullandıkları agregometre agregasyon özelliklerini lazer ışık-geri saçılımı yöntemi ile analiz yapan bir cihazdır. Araştırmacılar hazırlanan numunenin tamamen doldurduğu ölçüm sisteminin çapını, hazırladıkları dört farklı silindirle (0.37, 0.60, 1.05, 2.00

mm) değiştirerek ölçüm yapmışlardır. Yaptıkları ölçümlerin sonuçlarına göre çaptaki artışla beraber eritrosit agregasyonu yarı zaman sabitinin ($t_{1/2}$) arttığını, bunun yanı sıra agregasyon indeksinin azaldığını bulmuşlardır (46). Bizim çalışmamızda ise 320 μm 'den 800 μm 'ye gidildikçe yani çap artışıyla beraber $t_{1/2}$ değerinde azalma gözlenmektedir. Bizim bu bulgularımız Dobbe ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarıyla ters düşmektedir. Fakat çalışmamızdaki tam kan örneğine ait $t_{1/2}$ zaman sabitine bakıldığında (Şekil.4.7) 160 μm 'ye ait değer diğer bütün çaplardan küçük olduğu göze çarpmaktadır. 800, 640, 480 ve 320 μm 'ye ait $t_{1/2}$ değerleri sırasıyla 22.3 ± 4.6 ; 31.4 ± 2.1 ; 34.6 ± 5.8 ve 38.1 ± 6.4 şeklindedir. Oysaki 160 μm 'deki $t_{1/2}$ değeri ise 7.0 ± 0.9 'dur. Her bir çapı ayrı ayrı 160 μm 'deki değerle karşılaştırdığımızda çap artışıyla birlikte zaman sabitinde arttığını görmekteyiz. Yapılan analizlerin sonucunda da bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (640 ve 800 μm ; $p < 0.01$, 320 ve 480 μm ; $p < 0.001$ 160 μm 'den fark). Çalışmanın sonuçlarını bu şekilde değerlendirince Dobbe ve arkadaşlarının bulduğu gibi çaptaki artışla beraber eritrosit agregasyonu yarı zaman sabitinin ($t_{1/2}$) arttığını söyleyebiliriz.

Yapılan başka bir çalışmanın sonuçlarına göre de, agregasyon ölçüm sisteminin çapındaki artışla birlikte M indeks değerinin (ışık geçirgenliği eğrisinin altında kalan alan) ve amplitüdünün azaldığı, agregasyon indeksi ve $t_{1/2}$ değerinin değişmediği gösterilmiştir [75]. Ölçüm sistemine ait çapın artmasıyla kan örneğinden geçen ışığın süspansiyon içinde kat ettiği mesafenin, geçen ışığın yoğunluğunun etkileneceği ve bununda agregasyon parametrelerini etkileyeceği söylenmektedir. Bu çalışma gibi yapılan in vitro ölçümlerde eritrosit rulo formasyonunun zaman sabiti birkaç saniyedir (24). Oysaki Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise ölçüm yapılan damarların ortalama çapı 12–15 μm 'dir ve eritrosit agregasyonunun yaklaşık 100 milisaniye içinde tamamlandığı gösterilmiştir. (69, 70). Yapılmış olan bu çalışmalara göre eritrosit agregasyonu ve agregasyon zaman sabitinin geometriye bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir. Fakat küçük çaptaki kapillerdeki agregasyon kinetiği hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Birbirinden farklı çapa sahip cam kapillerde eritrosit agregasyonun kinetiğinde, çapa bağlı olarak meydana gelen değişiklikler bu çalışmayla gösterilmeye çalışılmıştır.

Tam kan örneğine ait $t_{1/2}$ zaman sabiti için geçerli olan 160 ve 320 μm arasındaki ilişki diğer zaman sabitleri içinde geçerlidir. 160 μm 'den 320 μm 'ye geçince, yani çap artışıyla birlikte T_{slow} ve T_{fast} zaman sabitlerinde de istatistiksel olarak önemli artışlar saptanmıştır. Çizelge 4.2'de ise tam kan dışındaki, agregasyon dereceleri birbirinden farklı olan beş eritrosit süspansiyonuna ait (1/3 dilüsyon, 1/2 dilüsyon, %1 Dextran 500, Gutaraldehyd ve Neuraminidase) kapasitans eğrilerinden hesaplanan zaman sabitleri gösterilmektedir. Tüm eritrosit süspansiyonları için hesaplanan özellikle $t_{1/2}$ ve T_{fast} değerlerinin, diğer örnekte (tam kan) olduğu gibi 160 μm 'den 320 μm 'ye geçince, yani çap artışıyla birlikte bu zaman sabitlerinde de istatistiksel olarak önemli artışlar saptanmıştır ($p < 0.05$). Yukarıda anlatılan çalışmalarda ayrıca çaptaki artışla beraber agregasyon indeksinin azaldığı da

söylenmekteydi. Tam kan örneğinde yine benzer şekilde 160 μm 'den 320 μm 'ye geçince, yani çap artışıyla birlikte agregasyon indeksinde istatistiksel olarak önemli bir azalma saptanmıştır (Şekil.4.4) ($p<0.05$). Şekil 5.1'de ise çizelge 4.2.'deki 160 ve 320 μm çaptaki agregasyon indeklerinin hepsinin birden gösterilmesi amaçlanmıştır. Şekilde verilen tüm eritrosit süspansiyonları için çap büyüdüğünde eritrosit agregasyon indekslerinde (AI) istatistiksel olarak önemli azalma gözlenmektedir ($p<0.001$). Dextran grubunda ise istatistiksel olarak önemli değişim bulunmamıştır.



Şekil 5.1. 160 ve 320 μm çaptaki kapiller borularda ölçümü yapılan eritrosit süspansiyonlarına ait kapasitans eğrilerinden hesaplanan agregasyon indeksi (AI). (***: $p<0,001$, 160 μm 'den fark)

Birkaç yüz mikrometre genişliğindeki ölçüm sistemlerinden çok daha küçük geometriye sahip sistemlerde fotometrik olarak ölçümün mümkün olmadığı koşullarda, eritrosit süspansiyonunun elektriksel özelliklerinin, özellikle de kapasitansın ölçümü agregasyonun değerlendirilmesi için kullanılabilir. Eritrosit agregasyonu ve agregasyon zaman sabitlerinin ölçüm sistemine ait geometriye bağlı olarak değişebileceği düşünülmekte, fakat küçük çaptaki kapillerlerdeki agregasyon kinetiği hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre; birbirinden farklı çapa sahip cam kapillerde yapılan ölçümlerin sonucuna göre, eritrosit agregasyon kinetiği akımın gerçekleştiği sistemin geometrisine bağlı olarak

değişmektedir. Özellikle 320 μm 'nin altında ve üstündeki çaplarda eritrosit agregasyon kinetiğine ait zaman sabitlerinin davranışı değişmektedir. Bu nedenle 320 μm 'nin kritik bir eşik olduğu söylenebilir. Böylelikle bu çalışmayla, farklı geometriye sahip cam kapillerde eritrosit agregasyon kinetiğinde meydana gelebilecek değişikliklerin anlaşılmasına katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.

SONUÇLAR

1. Agregasyon derecelerinin birbirinden farklı olduğu daha önceden bilinen Tam Kan, 1/3 Dilüsyon, 1/2 Dilüsyon, %1 Dekstran 500, Glutaraldehit ve Neuraminidase gruplarına ait hazırlanan eritrosit süspansiyonlarının LORCA ile ölçümü sonrası elde edilen agregasyon parametreleriyle, örneklerin agregasyon derecelerinin birbirinden farklı olduğu teyit edilmiştir (Çizelge 4.1).
2. Birbirinden farklı cam kapillerde (80, 160, 320, 480, 640 ve 800 μm) yapılan empedans ölçümlerine ait eğrilerde, birbirinden farklı agregasyon derecesine sahip süspansiyonların kullanılmasına rağmen benzer eğriler elde edilmiştir (Şekil 4.1). Bu eğrilerden hesaplanan agregasyon parametreleri arasında da hiçbir fark bulunmamasıyla eğrilerin benzer özellikte oldukları ve empedans verilerinin hesaplanmasıyla elde edilen agregasyon parametrelerinin kapiller çapına bağlı olarak değişmediği gösterilmiştir (Şekil 4.2).
3. Birbirinden farklı cam kapillerde (80, 160, 320, 480, 640 ve 800 μm) yapılan seri kapasitans ölçümlerine ait eğrilerde, kapiller çapındaki azalma ile beraber 320 μm 'lik kapillere kadar kaydedilen sinyalin giderek yavaşladığı gözlenmektedir. Kapiller çapının 160 μm 'ye inmesiyle birlikte sinyalde bir hızlanmanın olduğu görülmektedir. Kaydedilen sinyal 160 μm 'nin altında ve üstündeki çaplarda farklı davranışlar sergilemektedir (Şekil 4.3).
4. Çapları birbirinden farklı cam kapillerde Tam Kan örneği için yapılan seri kapasitans ölçümlerine ait eğrilerden hesaplanan eritrosit agregasyonu zaman sabitlerinde (T_{slow} , T_{fast} ve $t_{1/2}$) kapiller çapına bağlı olarak değişimler saptanmıştır. Ölçüm sistemine ait geometrinin değişmesiyle seri kapasitans ölçümlerinden hesaplanan parametrelerinin değiştiği gösterilmiştir. Bu kayıtlardan hesaplanan eritrosit agregasyonu zaman sabitlerinin (T_{slow} , T_{fast} ve $t_{1/2}$) cam kapillerin çapındaki azalışa paralel olarak, kademeli bir şekilde arttığı bulunmuştur (Şekil 4.4-7). Fakat bu artış 320 μm 'den sonra gözlenmemektedir. Aksine 160 μm 'de her üç zaman sabitinde hızlı bir azalmanın yani hızlanmanın olduğu görülmektedir.
5. 1/3 Dilüsyon, 1/2 Dilüsyon, %1 Dekstran 500, Glutaraldehit ve Neuraminidase gruplarına ait hazırlanan eritrosit süspansiyonlarıyla yapılan kapasitans eğrilerden hesaplanan eritrosit agregasyonu zaman

sabitlerinde ve agregasyon indekslerinde de Tam Kan örneğinde olduğu gibi çapa bağımlılık görülmektedir. Yine benzer şekilde zaman sabitlerinde 160 μm 'de hesaplanan değerlerde bir azalmanın olduğu yani sinyalde bir hızlanmanın olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2).

6. Eritrosit süspansiyonlarının LORCA kullanılarak ölçülen agregasyon indeksi ile kapasitans ölçümlerine ait eğrilerden hesaplanan aynı parametrenin korelasyonu yapıldığı zaman, LORCA ve kapasitans (800, 640 ve 320 μm 'deki) agregasyon indeksi değerleri arasında pozitif ve istatistiksel olarak önemli bir korelasyonun ($p<0.0001$) bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 4.8).
7. Eritrosit süspansiyonlarının LORCA kullanılarak ölçülen zaman sabitleri T_{fast} ve $t_{1/2}$ ile kapasitans ölçümlerine ait eğrilerden hesaplanan aynı parametrelerin korelasyonu yapıldığı zaman, LORCA ve kapasitans (800 ve 640 μm 'deki) zaman sabitleri değerleri arasında pozitif ve istatistiksel olarak önemli bir korelasyonun ($p<0.0001$) bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 4.9). Kapasitans T_{slow} değeri ve diğer çaplar için önemli bir korelasyon bulunmamaktadır (Çizelge 4.3).

KAYNAKLAR

1. **Alonso C, Pries AR, and Gaehtgens P.** Time-dependent rheological behavior of blood at low shear in narrow vertical tubes. *Am J Physiol* 265: H553-561, 1993.
2. **Antonova N, Riha P, and Ivanov I.** Time dependent variation of human blood conductivity as a method for an estimation of RBC aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc* 39: 69-78, 2008.
3. **Armstrong JK, Meiselman HJ, Wenby RB, and Fisher TC.** Modulation of red blood cell aggregation and blood viscosity by the covalent attachment of Pluronic copolymers. *Biorheology* 38: 239-247, 2001.
4. **Balan C, Balut C, Gheorghe L, Gheorghe C, Gheorghiu E, and Ursu G.** Experimental determination of blood permittivity and conductivity in simple shear flow. *Clin Hemorheol Microcirc* 30: 359-364, 2004.
5. **Barshtein G, Wajnblum D, and Yedgar S.** Kinetics of linear rouleaux formation studied by visual monitoring of red cell dynamic organization. *Biophys J* 78: 2470-2474, 2000.
6. **Baskurt OK.** In vivo correlates of altered blood rheology. *Biorheology* 45: 629-638, 2008.
7. **Baskurt OK.** "Mechanisms of blood rheology alterations": In: Handbook Hemorheology and Hemodynamics, Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW and Meiselman HJ, Eds. IOS Press, Amsterdam, 170-190, 2007.
8. **Baskurt OK, Bor-Kucukatay M, and Yalcin O.** The effect of red blood cell aggregation on blood flow resistance. *Biorheology* 36: 447-452, 1999.

9. **Baskurt OK, Bor-Kucukatay M, and Yalcin O.** The effect of red blood cell aggregation on blood flow resistance. *Biorheology* 36: 447-457, 2000.
10. **Baskurt OK, Edremitlioglu M.** Myocardial tissue hematocrit: existence of a transmural gradient and alterations after fibrinogen infusions. *Clin Hemorheol* 15: 97-105, 1995.
11. **Baskurt OK and Meiselman HJ.** Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 29: 435-450, 2003.
12. **Baskurt OK and Meiselman HJ.** Cellular determinants of low-shear blood viscosity. *Biorheology* 34: 235-247, 1997.
13. **Baskurt OK and Meiselman HJ.** Determination of red blood cell shape recovery time constant in a Couette system by the analysis of light reflectance and ektacytometry. *Biorheology* 33: 489-503, 1996.
14. **Baskurt OK, Meiselman HJ, and Kayar E.** Measurement of red blood cell aggregation in a "plate-plate" shearing system by analysis of light transmission. *Clin Hemorheol Microcirc* 19: 307-314, 1998.
15. **Baskurt OK, Temiz A, and Meiselman HJ.** Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Radic Biol Med* 24: 102-110, 1998.
16. **Baskurt OK, Temiz A, and Meiselman HJ.** Red blood cell aggregation in experimental sepsis. *J Lab Clin Med* 130: 183-190, 1997.
17. **Baskurt OK, Tugral E, Neu B, and Meiselman HJ.** Particle electrophoresis as a tool to understand the aggregation behavior of red blood cells. *Electrophoresis* 23: 2103-2109, 2002.
18. **Baskurt OK, Uyuklu M, Hardeman MR, and Meiselman HJ.** Photometric measurements of red blood cell aggregation: light transmission versus light reflectance. *J Biomed Opt* 14: 054044, 2009.
19. **Baskurt OK, Uyuklu M, and Meiselman HJ.** Time course of electrical impedance during red blood cell aggregation in a glass tube:

comparison with light transmittance. *IEEE Trans Biomed Eng* 57: 969-978, 2010.

20. **Baskurt OK, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Nemeth N, Alexy T, Shin S, Hardeman MR, and Meiselman HJ.** Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc* 43: 283-298, 2009.
21. **Baskurt OK, Uyuklu M, and Meiselman HJ.** Simultaneous monitoring of electrical conductance and light transmittance during red blood cell aggregation. *Biorheology*, 46: 239-249, 2009.
22. **Baskurt OK, Yalcin O, Gungor F, and Meiselman HJ.** Hemorheological parameters as determinants of myocardial tissue hematocrit values. *Clin Hemorheol Microcirc* 35: 45-50, 2006.
23. **Baskurt OK, Yalcin O, Ozdem S, Armstrong JK, and Meiselman HJ.** Modulation of endothelial nitric oxide synthase expression by red blood cell aggregation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H222-229, 2004.
24. **Bauersachs RM, Wenby RB, and Meiselman HJ.** Determination of specific red blood cell aggregation indices via an automated system. *Clin Hemorheol Microcirc* 9: 1-25, 1989.
25. **Beving H, Eriksson LE, Davey CL, and Kell DB.** Dielectric properties of human blood and erythrocytes at radio frequencies (0.2-10 MHz); dependence on cell volume fraction and medium composition. *Eur Biophys J* 23: 207-215, 1994.
26. **Bishop JJ, Nance PR, Popel AS, Intaglietta M, and Johnson PC.** Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H222-236, 2001.
27. **Bishop JJ, Nance PR, Popel AS, Intaglietta M, and Johnson PC.** Erythrocyte margination and sedimentation in skeletal muscle venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H951-958, 2001.
28. **Bishop JJ, Popel AS, Intaglietta M, and Johnson PC.** Effects of erythrocyte aggregation and venous network geometry on red blood cell axial migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H939-950, 2001.

29. **Bot H, Kok WEM, Hardeman MR, and Goedhart PT.** Comparison of high frequency ultrasound and laser backscatter during erythrocyte aggregation. *Biorheology* 27: 239, 1995.
30. **Cabel M, Meiselman HJ, Popel AS, and Johnson PC.** Contribution of red blood cell aggregation to venous vascular resistance in skeletal muscle. *Am J Physiol* 272: H1020-1032, 1997.
31. **Charansonney O, Mouren S, Dufaux J, Duvelleroy M, and Vicaut E.** Red blood cell aggregation and blood viscosity in an isolated heart preparation. *Biorheology* 30: 75-84, 1993.
32. **Charm SE, Kurland GS.** *Blood flow and microcirculation*: Newyork: John Willy-Sons, 164: 3-210, 1974.
33. **Chasis JA and Shohet SB.** Red cell biochemical anatomy and membrane properties. *Annu Rev Physiol* 49: 237-248, 1987.
34. **Chen S, Eldor A, Barshtein G, Zhang S, Goldfarb A, Rachmilewitz E, and Yedgar S.** Enhanced aggregability of red blood cells of beta-thalassemia major patients. *Am J Physiol* 270: H1951-1956, 1996.
35. **Chien S.** *Biophysical behaviour of red cells in suspensions*: In: The red blood cell. Surgenor DM. , Ed., Academic Press, New York, 1031-1133, 1975.
36. **Chien S.** Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu Rev Physiol* 49: 177-192, 1987.
37. **Chien S, and Sug LA.** Physicochemical basis and clinical implications of red cell aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc* 7: 71-91, 1987.
38. **Chien S and Jan K.** Ultrastructural basis of the mechanism of rouleaux formation. *Microvasc Res* 5: 155-166, 1973.
39. **Chong-Martinez B, Buchanan TA, Wenby RB, and Meiselman HJ.** Decreased red blood cell aggregation subsequent to improved glycaemic control in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 20: 301-306, 2003.

40. **Cicha I, Suzuki Y, Tateishi N, and Maeda N.** Changes of RBC aggregation in oxygenation-deoxygenation: pH dependency and cell morphology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H2335-2342, 2003.
41. **Cloutier G and Qin Z.** Ultrasound backscattering from non-aggregating and aggregating erythrocytes--a review. *Biorheology* 34: 443-470, 1997.
42. **Cokelet GR and Goldsmith HL.** Decreased hydrodynamic resistance in the two-phase flow of blood through small vertical tubes at low flow rates. *Circ Res* 68: 1-17, 1991.
43. **Cokelet GR and Meiselman HJ.** Rheological comparison of hemoglobin solutions and erythrocyte suspensions. *Science* 162: 275-277, 1968.
44. **Cromer AH.** *Physics for the life sciences*: McGraw-Hill; 152–154, , 1981.
45. **Das B, Enden G, and Popel AS.** Stratified multiphase model for blood flow in a venular bifurcation. *Ann Biomed Eng* 25: 135-153, 1997.
46. **Dobbe JG, Streekstra GJ, Strackee J, Rutten MC, Stijnen JM, and Grimbergen CA.** Sylectometry: the effect of aggregometer geometry in the assessment of red blood cell shape recovery and aggregation. *IEEE Trans Biomed Eng* 50: 97-106, 2003.
47. **Durussel JJ, Berthault MF, Guiffant G, and Dufaux J.** Effects of red blood cell hyperaggregation on the rat microcirculation blood flow. *Acta Physiol Scand* 163: 25-32, 1998.
48. **Errill EW.** Rheology of blood. *Physiol Rev* 49: 863-888, 1969.
49. **Evans EA and La Celle PL.** Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicated by mechanical analysis of deformation. *Blood* 45: 29-43, 1975.
50. **Foster K, Schwan HP.** *Dielectric properties of tissues and biological materials*:: A critical review, CRC Critical Reviews in Biomedical Engineering 17:1, pp.25-104, 1989.

51. **Fricke H.** The Electric Capacity of Suspensions with Special Reference to Blood. *J Gen Physiol* 9: 137-152, 1925.
52. **Fricke H.** A Mathematical Treatment of the Electrical Conductivity of Colloids and Cell Suspensions. *J Gen Physiol* 6: 375-384, 1924.
53. **Fricke H and Morse S.** The Electric Resistance and Capacity of Blood for Frequencies between 800 and 4(1/2) Million Cycles. *J Gen Physiol* 9: 153-167, 1925.
54. **Gaspar-Rosas A, Thurston, G.B.** Erythrocyte aggregate rheology by transmitted and reflected light. *Biorheology* 25: 471-487, 1988.
55. **Gaw RL, Cornish BH, and Thomas BJ.** The electrical impedance of pulsatile blood flowing through rigid tubes: a theoretical investigation. *IEEE Trans Biomed Eng* 55: 721-727, 2008.
56. **Geddes LA and Sadler C.** The specific resistance of blood at body temperature. *Med Biol Eng* 11: 336-339, 1973.
57. **Goldsmith HL, Cokelet GR, and Gaehtgens P.** Robin Fahraeus: evolution of his concepts in cardiovascular physiology. *Am J Physiol* 257: H1005-1015, 1989.
58. **Gordon RJ and Ravin MB.** Rheology and anesthesiology. *Anesth Analg* 57: 252-261, 1978.
59. **Hardeman MR, Dobbe JG, and Ince C.** The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clin Hemorheol Microcirc* 25: 1-11, 2001.
60. **Hardeman MR, Goedhart PT, and Shin S.** "Methods in hemorheology": In: Handbook Hemorheology and Hemodynamics, Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW and Meiselman HJ, Eds. IOS Press, Amsterdam, 242-266, 2007.
61. **Hardeman MR, Goedhart PT, Dobbe JGG, and Lettinga KP.** Laser-assisted optical rotatinal cell analyzer (LORCA).I. A new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters. *Clin Hemorheol Microcirc* 14: 605-618, 1994.

62. **Heath BP, Mohandas N, Wyatt JL, and Shoet SB.** Deformability of isolated red blood cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 691: 211-219, 1982.
63. **Hioki EE.** *Corporation Instruction manual 3532-50 LCR Hitester*. Nagano: Hioki EE Corporation, pp. 1-180, 2006.
64. **Hoetink AE, Faes TJ, Visser KR, and Heethaar RM.** On the flow dependency of the electrical conductivity of blood. *IEEE Trans Biomed Eng* 51: 1251-1261, 2004.
65. **Jan KM and Chien S.** Influence of the ionic composition of fluid medium on red cell aggregation. *J Gen Physiol* 61: 655-668, 1973.
66. **Jan KM and Chien S.** Role of surface electric charge in red blood cell interactions. *J Gen Physiol* 61: 638-654, 1973.
67. **Kiesewetter H, Radtke H, Schneider R, Mussler K, Scheffler A, and Schmid-Schonbein H.** The mini-erythrocyte aggregometer: a new apparatus for the rapid quantification of the extent of erythrocyte aggregation. *Biomed Tech* 27: 209-213, 1982.
68. **Kim S, Kong RL, Popel AS, Intaglietta M, and Johnson PC.** Temporal and spatial variations of cell-free layer width in arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1526-1535, 2007.
69. **Kim S, Popel AS, Intaglietta M, and Johnson PC.** Aggregate formation of erythrocytes in postcapillary venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H584-590, 2005.
70. **Kim S, Zhen J, Popel AS, Intaglietta M, and Johnson PC.** Contributions of collision rate and collision efficiency to erythrocyte aggregation in postcapillary venules at low flow rates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1947-1954, 2007.
71. **Lowe GDO.** *Clinical Blood Rheology*. Boca Raton FL: CRC Press, 95-117, 1988.
72. **Matrai A, Whittington, R. B, Skalak, R.** *Biophysics*. In: Chien S., Dormandy J., Ernst E., Matrai A: *Clinical Hemorheology*. Dordrecht-Boston-Lancaster: Martinus Nijhoff Publishers; 9-71, 1987.

73. **Meiselman HJ.** Red blood cell aggregation: 45 years being curious. *Biorheology* 46: 1-19, 2009.
74. **Meiselman HJ.** Red blood cell role in RBC aggregation: 1963-1993 and beyond. *Clin Hemorheol Microcirc* 13: 575-592, 1993.
75. **Mohandas N.** Molecular basis for red cell membrane viscoelastic properties. *Biochem Soc Trans* 20: 776-782, 1992.
76. **Mohandas N and Chasis JA.** Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 30: 171-192, 1993.
77. **Mohandas N, Chasis JA, and Shohet SB.** The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. *Semin Hematol* 20: 225-242, 1983.
78. **Mohandas N and Evans E.** Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23: 787-818, 1994.
79. **Mohandas N and Shohet SB.** The role of membrane-associated enzymes in regulation of erythrocyte shape and deformability. *Clin Haematol* 10: 223-237, 1981.
80. **Nash GB and Meiselman HJ.** Alteration of red cell membrane viscoelasticity by heat treatment: effect on cell deformability and suspension viscosity. *Biorheology* 22: 73-84, 1985.
81. **Nash GB, Wenby RB, Sowememo-Coker SO, and Meiselman HJ. .** Influence of cellular properties on red cell aggregation *Clin Hemorheol* 7: 93-108, 1987.
82. **Neu B, and Meiselman HJ.** "Red blood cell aggregation": In:Handbook of Hemorheology and Hemodynamics. Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, and Meiselman HJ, Eds: IOS Press, Amsterdam, 114-136,2007
83. **Neu B and Meiselman HJ.** Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions. *Biophys J* 83: 2482-2490, 2002.

84. **Nordt FJ.** Hemorheology in cerebrovascular diseases: approaches to drug development. *Ann N Y Acad Sci* 416: 651-661, 1983.
85. **Ozanne P, Francis RB, and Meiselman HJ.** Red blood cell aggregation in nephrotic syndrome. *Kidney Int* 23: 519-525, 1983.
86. **Pearson MJ.** *An investigation into the mechanism of rouleaux formation and the development of improved methods for its quantitation*: Ph.D. Dissertation, London University, 1996.
87. **Plasenzotti R, Windberger U, Ulberth F, Osterode W, and Losert U.** Influence of fatty acid composition in mammalian erythrocytes on cellular aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc* 37: 237-243, 2007.
88. **Pribush A, Hatzkelson L, Meyerstein D, and Meyerstein N.** A novel technique for quantification of erythrocyte aggregation abnormalities in pathophysiological situations. *Clin Hemorheol Microcirc* 36: 121-132, 2007.
89. **Pribush A, Meiselman HJ, Meyerstein D, and Meyerstein N.** Dielectric approach to investigation of erythrocyte aggregation. II. Kinetics of erythrocyte aggregation-disaggregation in quiescent and flowing blood. *Biorheology* 37: 429-441, 2000.
90. **Pribush A, Meiselman HJ, Meyerstein D, and Meyerstein N.** Dielectric approach to the investigation of erythrocyte aggregation: I. Experimental basis of the method. *Biorheology* 36: 411-423, 1999.
91. **Pribush A, Meyerstein D, and Meyerstein N.** Conductometric study of shear-dependent processes in red cell suspensions. I. Effect of red blood cell aggregate morphology on blood conductance. *Biorheology* 41: 13-28, 2004.
92. **Pries AR, Secomb TW, and Gaehtgens P.** Biophysical aspects of blood flow in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 32: 654-667, 1996.
93. **Rampling MW.** Haemorheology and the inflammatory process. *Clin Hemorheol Microcirc* 19: 129-132, 1998.

94. **Rampling MW, and Pearson MJ.** Enzymatic degradation of the red cell surface and its affect on rouleaux formation. *Clin Hemorheol* 14: 531-538, 1994.
95. **Rampling MW, and Whittingstall P.** *The effect of cell age on the aggregating ability of erythrocytes*: 6th International Congress of Biorheology, Vancouver, p. 30., 1986.
96. **Rampling MW, Meiselman HJ, Neu B, and Baskurt OK.** Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation. *Biorheology* 41: 91-112, 2004.
97. **Rand PW, Barker N, and Lacombe E.** Effects of plasma viscosity and aggregation on whole-blood viscosity. *Am J Physiol* 218: 681-688, 1970.
98. **Samocha-Bonet D, Ben-Ami R, Shapira I, Shenkerman G, Abu-Abeid S, Stern N, Mardi T, Tulchinski T, Deutsch V, Yedgar S, Barshtein G, and Berliner S.** Flow-resistant red blood cell aggregation in morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 1528-1534, 2004.
99. **Schmid-Schonbein H.** *Fluid dynamics and hemorheology in vivo: the interactions of hemodynamic parameters and hemorheological 'properties' in determining the flow behavior of blood in microvascular networks*: In: Lowe GDO, ed. *Clinical Blood Rheology*. Boca Raton, FL: CRC Press:129-219, 1988.
100. **Schmid-Schonbein H, Wells RE, and Goldstone J.** Fluid drop-like behaviour of erythrocytes--disturbance in pathology and its quantification. *Biorheology* 7: 227-234, 1971.
101. **Schwan HP.** *Electrical properties of tissue and cell suspensions* in: *Advances in Biological and Medical Physics*. Vo1.5, Editors: J.H.Lawrence and C.A.Tobias. Academic Press, New York, pp. 147-209, 1957
102. **Schwan HP.** Electrical Properties Of Tissues And Cell Suspensions: Mechanisms And Models. *IEEE*: 70a-71a, 1994.
103. **Shiga T, Maeda N, and Kon K.** Erythrocyte rheology. *Crit Rev Oncol Hematol* 10: 9-48, 1990.

104. **Shin S, Yang Y, and Suh JS.** Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip-based stirring system by light transmission. *Clin Hemorheol Microcirc* 41: 197-207, 2009.
105. **Shin S, Yang Y, and Suh JS.** Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip-based stirring-system by analysis of light transmission and backscattering. *Biorheology* 45: 71-72, 2008.
106. **Shohet SB, Card RT, Clark M, Greenquist AC, Mohandas N, Shelton D, and Wyatt J.** The erythrocyte "cytoskeleton" and its apparent role in cellular functions. *Prog Clin Biol Res* 51: 35-58, 1981.
107. **Singer SJ.** The molecular organization of membranes. *Annu Rev Biochem* 43: 805-833, 1974.
108. **Sosa M, Bernal-Alvarado J, Jimenez-Moreno M, Hernandez JC, Gutierrez-Juarez G, Vargas-Luna M, Huerta R, Villagomez-Castro JC, and Palomares P.** Magnetic field influence on electrical properties of human blood measured by impedance spectroscopy. *Bioelectromagnetics* 26: 564-570, 2005.
109. **Soutani M, Suzuki Y, Tateishi N, and Maeda N.** Quantitative evaluation of flow dynamics of erythrocytes in microvessels: influence of erythrocyte aggregation. *Am J Physiol* 268: H1959-1965, 1995.
110. **Stoltz JF.** Hemorheology: pathophysiological significance. *Acta Med Port* 6: S4-13, 1985.
111. **Sweeley CC and Dawson G.** *Lipids of erythrocyte in red cell membrane*: eds GA Jamieson, TJ Greenwalt; Philadelphia; JB Lipponcott, 213-267, 1969.
112. **Uyuklu M, Meiselman HJ, and Baskurt OK.** Effect of decreased plasma cholesterol by atorvastatin treatment on erythrocyte mechanical properties. *Clin Hemorheol Microcirc* 36: 25-33, 2007.
113. **Ways P and Hanahan DJ.** Characterization and quantification of red cell lipids in normal man. *J Lipid Res* 5: 318-328, 1964.

114. **Wells R, Goldstone J. .** *Rheology of the red cell and capillary blood flow. In: Gabelnick H.L., Litt M. (Eds.): Rheology of biological systems. Springfield: Charles C Thomas; 5–11, 1973.*
115. **Wells R and Schmid-Schonbein H.** Red cell deformation and fluidity of concentrated cell suspensions. *J Appl Physiol* 27: 213-217, 1969.
116. **Whittekarr SR, Winton FR.** The apparent viscosity of blood in the isolated hind limb of the dog and its variation with corpuscular concentration. *J Physiol London* 78: 339-368, 1933.
117. **Whittingstall P, Toth K, Wenby RB, and Meiselman HJ. .** *Cellular factors in RBC aggregation: effect of autologous plasma and various polymers, in: Hemorheologie et Aggregation Erythrocytaire: J.F. Stoltz, ed., Editions Medicales Internationales, Paris, pp. 21–29., 1992.*
118. **Wintrobe MM, Lee GR, Boggs DR, Bithell TC, and Foerster RJ.** *The mature erythrocyte: eds GA Jamieson, TJ Greenwalt: Philadelphia:JB Lipponcott, 123-144, 1981.*
119. **Yalcin O, Aydin F, Ulker P, Uyuklu M, Gungor F, Armstrong JK, Meiselman HJ, and Baskurt OK.** Effects of red blood cell aggregation on myocardial hematocrit gradient using two approaches to increase aggregation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H765-771, 2006.
120. **Yalcin O, Meiselman HJ, Armstrong JK, and Baskurt OK.** Effect of enhanced red blood cell aggregation on blood flow resistance in an isolated-perfused guinea pig heart preparation. *Biorheology* 42: 511-520, 2005.
121. **Yalcin O, Ulker P, Yavuzer U, Meiselman HJ, and Baskurt OK.** Nitric oxide generation by endothelial cells exposed to shear stress in glass tubes perfused with red blood cell suspensions: role of aggregation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2098-2105, 2008.
122. **Yalcin O, Uyuklu M, Armstrong JK, Meiselman HJ, and Baskurt OK.** Graded alterations of RBC aggregation influence in vivo blood flow resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2644-2650, 2004.

123. **Zhao TX and Jacobson B.** Quantitative correlations among fibrinogen concentration, sedimentation rate and electrical impedance of blood. *Med Biol Eng Comput* 35: 181-185, 1997.
124. **Zijlstra WG.** Syllectometry, a new method for studying rouleaux formation of red blood cells. *Acta Phys Pharm Neerl* 7: 153-154, 1958.

ÖZGEÇMİŞ

Mehmet ÜYÜKLÜ 29.06.1977 tarihinde Kahramanmaraş'ın Pazarcık ilçesinde dünyaya geldi. İlköğrenimini Pazarcık Cumhuriyet İlkokulunda, orta öğrenimini Pazarcık Ortaokulunda ve lise öğrenimini de Pazarcık lisesinde tamamladı. Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden lisans derecesi ile 2001 yılında mezun oldu. 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamlayıp, 2006 yılında aynı bölümde doktora başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

EKLER

Journal of Biomedical Optics

SPIEDigitalLibrary.org/jbo

Wavelength selection in measuring red blood cell aggregation based on light transmittance

Mehmet Uyuklu
Murat Canpolat
Herbert J. Meiselman
Oguz K. Baskurt

Wavelength selection in measuring red blood cell aggregation based on light transmittance

Mehmet Uyuklu,^a Murat Canpolat,^b Herbert J. Meiselman,^c and Oguz K. Baskurt^d

^aAkdeniz University Faculty of Medicine, Department of Physiology, Antalya, Turkey

^bAkdeniz University Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Antalya, Turkey

^cUniversity of Southern California, Keck School of Medicine, Department of Physiology and Biophysics, Los Angeles, California

^dKoc University School of Medicine, Istanbul, Turkey

Abstract. The reversible aggregation of red blood cells (RBC) is of current basic science and clinical interest. Using a flow channel and light transmittance (LT) through RBC suspensions, we have examined the effects of wavelength (500 to 900 nm) on the static and dynamic aspects of RBC aggregation for normal blood and suspensions with reduced or enhanced aggregation; the effects of oxygenation were also explored. Salient observations include: 1. significant effects of wavelength on aggregation parameters reflecting the extent of aggregation (i.e., number of RBC per aggregate); 2. no significant effects of wavelength on parameters reflecting the time course of RBC aggregation; 3. a prominent influence of hemoglobin oxygen saturation on both extent and time-course related aggregation parameters measured at wavelengths less than 700 nm, but only on the time-course at 800 nm; and 4. the power of parameters in detecting a given alteration of RBC aggregation is affected by wavelength, in general being greater at higher wavelengths. It is recommended that light sources with wavelengths around 800 nm be used in instruments for measuring RBC aggregation via LT. © 2011 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE). [DOI: 10.1117/1.3652712]

Keywords: erythrocyte aggregation; syllectometry; wavelength; hemoglobin absorption spectrum.

Paper 11296R received Jun. 12, 2011; revised manuscript received Aug. 17, 2011; accepted for publication Sep. 26, 2011; published online Oct. 28, 2011.

1 Introduction

Aggregation is a characteristic behavior of red blood cells (RBC) which occurs under specific conditions such as the presence of large macromolecules and low shear forces.^{1,2} RBC aggregation is a reversible process: an increase of shear forces, such as an increased flow rate in a cylindrical tube, results in disaggregation of aggregates into individual RBC, while aggregates are formed again at lower shear forces or at stasis. The extent (i.e., average number of RBC per aggregate) and the time course (i.e., rate of aggregate growth) of aggregation under defined conditions are determined by both suspending phase and cellular properties.³ The concentration of certain macromolecules in the suspending medium (e.g., plasma) is an important determinant of RBC aggregation, with fibrinogen being the most important pro-aggregant in plasma.⁴ An increased concentration of fibrinogen occurs in clinical states that cause acute phase reactions, resulting in enhanced RBC aggregation; RBC aggregation is thus a good indicator of acute phase reactions and has been successfully used to monitor the inflammatory response during a variety of disease processes.^{5–8}

RBC aggregation is a measurable property of blood and has been found to be significantly altered during disease processes.¹ In addition to conventional clinical laboratory procedures such as the measurement of erythrocyte sedimentation rate, specially developed RBC aggregometers can be used to quantitate various aspects of the aggregation process.⁹ As reviewed elsewhere,

most instruments built for this purpose monitor light transmittance (LT) or light reflectance (LR) during the course of aggregation. The LT or LR time courses during RBC aggregation are known as “syllectograms” (Ref. 10) and are widely used to derive aggregation parameters by mathematical analysis.^{1,11} An important element of such instruments is the shearing apparatus used for complete disaggregation of RBC in suspension in order to provide a defined starting time point for monitoring light intensity; the geometry of the shearing apparatus and the aggregation chamber are important determinants of the calculated aggregation parameters.^{12–15} Instruments using LT and LR monitoring have been compared in terms of calculated aggregation parameters and their power in detecting various experimental alterations of RBC aggregation, with different sensitivities reported for various types of instruments.¹⁶

It has been suggested that the properties of light projected onto RBC suspensions to monitor LT or LR should influence the results of the aggregation measurements.¹ It is well known that hemoglobin, which is the main constituent of RBC cytoplasm, has a characteristic absorbance spectrum that depends on its oxygenation status.¹⁷ It can thus be predicted that measured aggregation parameters may also depend on the degree of hemoglobin oxygenation. In fact, it has been previously shown that the oxygenation level of a RBC suspension significantly affected measured aggregation parameters, including those sensitive to the extent of aggregation as well as its time course.¹⁸ However, this influence of oxygenation status was only observed if the parameters were measured using a specific instrument (i.e., LORCA, Mechatronics, The Netherlands) but not if another

Address all correspondence to: Dr. Oguz K. Baskurt, Koc University School of Medicine, Rumelifeneri yolu, Sariyer, Istanbul, Turkey; Tel: +90 212 338 1160; Fax: +90 212 338 1168; E-mail: obaskurt@ku.edu.tr.

aggregometer (i.e., Myrenne Aggregometer, Myrenne, Roetgen, Germany) was used. These two instruments have technical differences: 1. in order to calculate aggregation parameters, the LORCA monitors backscattered light intensity while the Myrenne aggregometer uses LT data and 2. the LORCA uses a laser beam of 670 nm wavelength while the Myrenne employs an infrared light-emitting diode. Therefore, the different effects of oxygenation level on the sensitivity of parameters provided by these instruments may be due to both measuring method and wavelength.

Although methods based on the analysis of LR and LT data recorded during RBC aggregation have been previously compared and discussed in detail,^{13,14,16} very little information is available on the effects of light wavelength. This study was thus designed to investigate the influence of wavelength (500 to 900 nm) by monitoring LT during RBC aggregation in a rectangular flow chamber for both normal human blood and RBC suspensions with different levels of aggregation tendency. Of particular interest were possible effects of wavelength on static and dynamic aggregation parameters derived from LT-time data and on the effects of hemoglobin oxygen saturation.

2 Materials and Methods

2.1 Blood Sampling and Preparation of Test Samples

Thirty ml of venous blood samples were obtained from 10 healthy, human male volunteers, aged between 25 to 52 years, following oral informed consent. A tourniquet was applied to locate the antecubital vein prior to venipuncture and kept in place during the blood sampling that was completed within 90 s after the application of the tourniquet.¹⁹ The samples were anticoagulated with ethylenediamine-tetraacetic acid (1.5 mg/ml).

Blood samples were centrifuged at $1400 \times g$ for 6 min, plasma was aspirated and saved, and the RBC pellet was washed twice with isotonic phosphate-buffered saline (PBS, pH = 7.4, 290 mOsm/kg). An aliquot of plasma was diluted with PBS at a 1/3 ratio so that it contained only 66% of plasma components compared to the original plasma. Washed RBC from each donor were resuspended in either their autologous plasma, in diluted plasma, or in 0.5% dextran 500 (500 kDa, D-5251, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) dissolved in PBS; the hematocrit of these suspensions was adjusted to 0.4 l/l by adding or removing suspending media and confirmed by the microhematocrit method. Note that compared to RBC in undiluted plasma, RBC in 1/3 diluted plasma have reduced aggregation while RBC in 0.5% dextran 500 are characterized by enhanced aggregation.⁹

RBC suspensions were either oxygenated or deoxygenated by equilibration with air or 100% nitrogen prior to being used by rolling 3 ml of suspension in a 15-ml polypropylene tube for 15 min at room temperature. Nitrogen was moisturized by bubbling through distilled water prior to being introduced into the tube containing the blood. The oxygen partial pressure of RBC suspensions was measured using a blood gas analyzer (Stat Profile Critical Care Xpress, Nova Biomedical, Waltham, MA, USA).

2.2 Measurement System

LT through the RBC suspensions described above was measured in a plastic rectangular flow chamber (0.25 mm high $\times$ 4 mm

wide $\times$ 40 mm long). The transparent flow chamber was positioned between two optical fiber probes, one attached to the light source and the other to a spectrometer.

A syringe pump was used to maintain blood flow through the flow channel for 10 s at the start of each measurement procedure at a volumetric rate to generate a wall shear rate of $\sim 500 \text{ s}^{-1}$. This high shear rate was sufficient for complete disaggregation in all blood samples, either in plasma or in the dextran solution.

LT spectra were recorded over the wavelength range of 500 to 900 nm using a miniature spectrometer (HR4000CGV, Ocean Optics, Florida); data were obtained at 1 s intervals for 100 s following flow stoppage. Note that the maximum recording time of 100 s was selected based upon our previous work showing that aggregation is essentially complete within this time period and that sedimentation of RBC starts to affect measurements for times $> 100 \text{ s}$.²⁰ A tungsten halogen lamp (HL-2000, Ocean Optics, Florida) was used as the light source and a 400- μm diameter optical fiber cable was used to deliver light to the flow chamber. A collimating lens (74-VIS collimating lens, Ocean Optics, Florida) was connected to the end of the fiber to focus the light on the flow chamber. Transmitted light through the flow chamber was focused by another collimating lens located at the opposite side of the chamber onto an optical fiber connected to the spectrometer. LT spectra during flow and aggregation were recorded for each RBC suspension (i.e., in native plasma, diluted plasma, or 0.5% dextran 500) prepared using blood from a given donor. Prior to using RBC suspensions, the chamber was filled with deionized water and the spectrum recorded in order to standardize the transmittance data; LT at each wavelength is expressed as a percentage of transmittance through water at the same wavelength.

2.3 Data Analysis

The minimum LT level observed within seconds after the sudden stop of flow represented the start of the aggregation process. The following aggregation parameters were calculated using LT time courses during aggregation at 500-, 600-, 700-, and 800-nm wavelengths as described elsewhere:^{15,16,21,22} 1. amplitude (AMP), the total change in intensity of transmitted light during the 100 s period; 2. aggregation half time ($T_{1/2}$), the time required to reach an LT level corresponding to 50% of AMP; 3. surface area (SA), the area below the time course curve during the first 10 s; and 4. aggregation index (AI), the ratio of the area below the time course curve to the sum of the areas above and below the curve during the first 10 s. Additionally, time constants for the fast (T_{fast}) and slow (T_{slow}) components of RBC aggregation were calculated by fitting the 100 s LT versus time data to a double-exponential equation

$$I_t = a + b \cdot e^{-t/T_{\text{fast}}} + c \cdot e^{-t/T_{\text{slow}}}, \quad (1)$$

where T_{fast} reflects the time course of two-dimensional rouleaux formation while T_{slow} represents the formation of three-dimensional structures resulting from secondary aggregation.¹

2.4 Measurement of Red Blood Cell Aggregation in the Samples

Aggregation parameters were measured in the three suspensions prepared from each blood sample using a photometric

reoscope with a Couette shearing apparatus (LORCA, Mechatronics, Hoorn, The Netherlands). The instrument reports aggregation parameters calculated in a manner similar to that previously described in Sec. 2.3.

2.5 Calculations and Statistics

The results of the measurements in RBC suspensions with normal and modified aggregation are expressed as mean $\pm$ standard error (SE) with statistical comparisons done using one-way ANOVA followed by appropriate post-tests. Additionally, standardized differences from control values were calculated for the data obtained for suspensions with modified aggregation by dividing the mean difference between control and these suspensions by the pooled standard deviation (SD_p) of the control plus modified data

$$St.Diff. = \frac{(M_c - M_m)}{SD_p}. \quad (2)$$

M_c and M_m are the means of the selected parameter for control and modified samples prepared using RBC from 10 donors. SD_p was calculated as the square root of the average of the squared standard deviations (SD_c and SD_m) of the data from the control and modified samples being compared²³

$$SD_p = \sqrt{\frac{(SD_c^2 + SD_m^2)}{2}}. \quad (3)$$

The standardized difference has been accepted as a measure of the power of each measurement condition to detect a difference between two groups.²⁴

3 Results and Discussion

3.1 Light Transmittance Spectrum of Oxygenated Blood during Flow and at Stasis

Figure 1 presents typical results of LT through an oxygenated blood sample during flow, 1 s after flow stoppage, and at 60 s after flow stoppage when RBC aggregates have developed; data were obtained at wavelengths between 500 to 900 nm. LT was highest at wavelengths close to the upper end of the spectrum

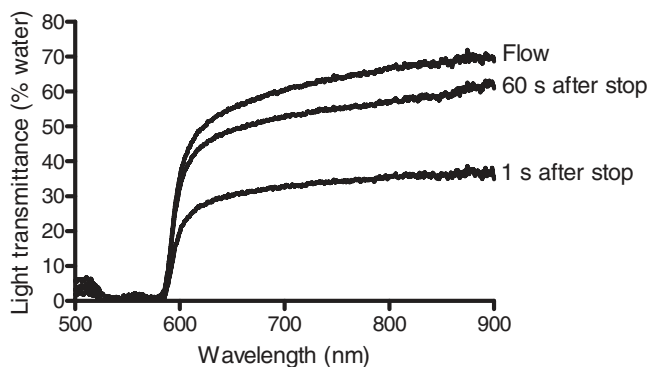


Fig. 1 Light transmittance at wavelengths between 500 to 900 nm through a 250- μ m thick oxygenated blood film during flow, 1 and 60 s after the flow stoppage (i.e., with RBC aggregates developed). Transmitted light intensity was normalized to that for deionized water in the same flow channel.

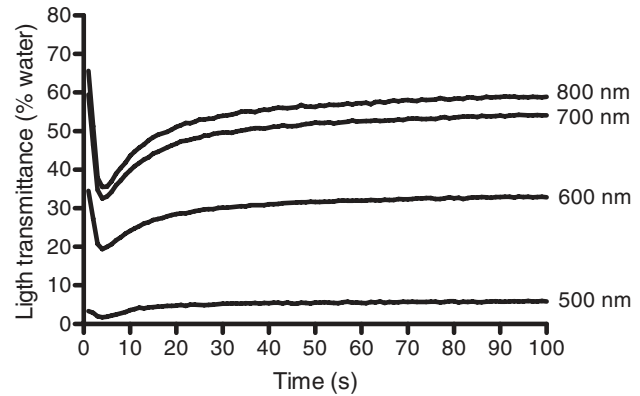


Fig. 2 A typical example of light transmittance time course through an oxygenated blood sample at selected wavelengths during the 100 s period starting immediately after stopping high shear flow (i.e., $\sim 500 \text{ s}^{-1}$). The values are normalized to the transmittance of deionized water.

(i.e., 900 nm), gradually decreased with decreasing wavelength, and exhibited a sharp decrease at wavelengths below 600 nm. LT spectra were characterized by a similar pattern during all phases of the measurement (i.e., during flow, 1 and 60 s after flow stoppage), although LT levels, especially in the range between 600 and 900 nm, were markedly different from each other. LT at all wavelengths in this range were highest during flow and lowest immediately after flow stoppage, then increased at 60 s and approached levels observed during flow.

Time courses of LT (i.e., syllectograms) at four wavelengths (i.e., 500, 600, 700, and 800 nm) for the same experiment described for Fig. 1 are presented in Fig. 2. Stoppage of flow was followed by a sharp decrease in LT levels, which reached a minimum within seconds. This minimum was followed by increased LT with an initial rapid phase and a following slower phase. The time courses of transmittance at these four wavelengths all followed a similar pattern although the normalized transmitted light intensity depended on the wavelength: ~ 50 to 60% for 700 and 800 nm, $\sim 30\%$ for 600 nm, and $\sim 3\%$ for 500 nm.

LT through suspensions is determined by the optical properties of the suspending phase, particle concentration, particle geometry, and the optical properties of particles.^{17,25} This general case can be directly applied to RBC suspensions, with hematocrit (i.e., particle concentration) being an important determinant of LT.²⁶ Light absorbance by RBC importantly contributes to the behavior of light passing through a suspension of these cells, with higher absorbance resulting in reduced LT;²⁷ RBC hemoglobin content is also an important determinant of absorbance and, hence, the level of LT.

The absorption spectrum of hemoglobin is clearly a critical factor determining LT through RBC suspensions. Hemoglobin is an effective light absorbant, especially at wavelengths below 600 nm.^{17,27,28} Thus, absorbance of hemoglobin has a well-known dependence on the wavelength of light and this dependency perfectly explains the relationship between the level of transmittance and wavelength observed in this study: about 10 times higher absorbance at wavelengths below 600 nm,²⁷ which is consistent with the differences in the LT shown in Fig. 2.

The time course of LT following the sudden stop of flow of RBC suspensions (i.e., during RBC aggregation) mainly reflects

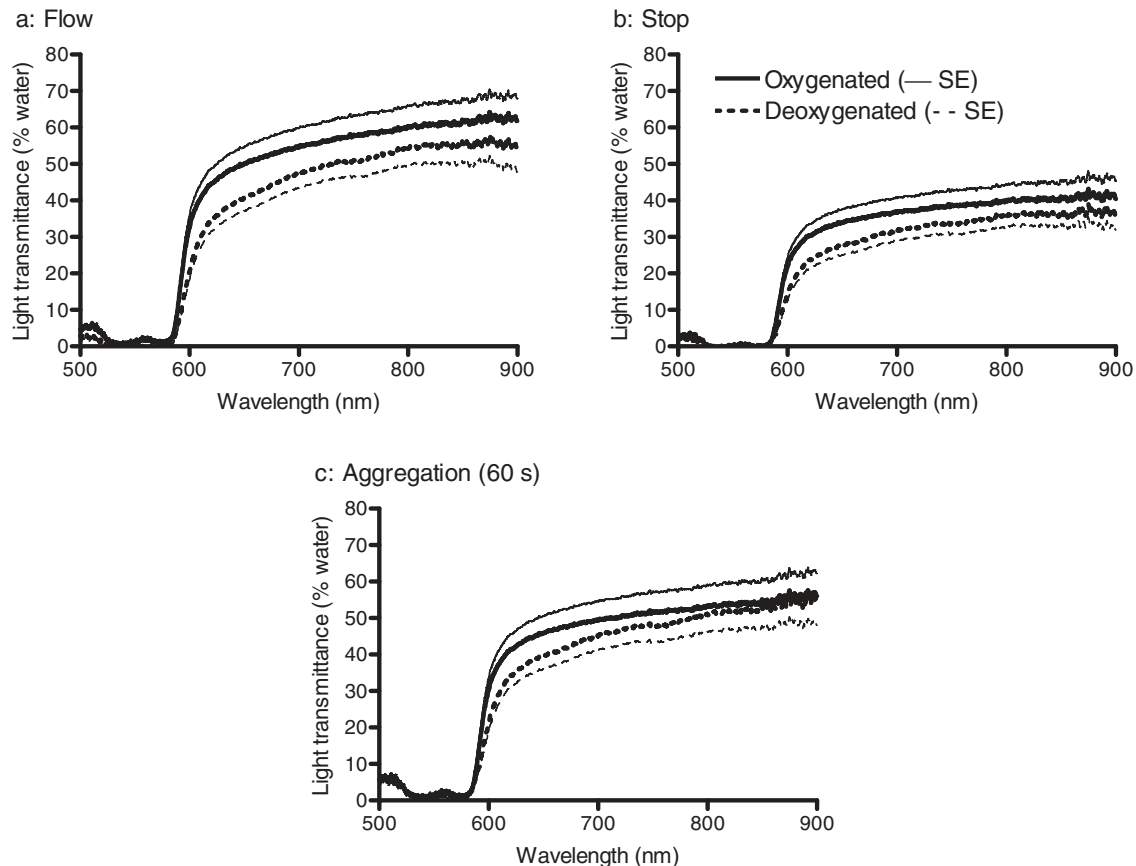


Fig. 3 Light transmittance spectrum of oxygenated and hypoxic blood samples. (a) During flow. (b) Immediately after flow stoppage. (c) Following the development of RBC aggregates at 60 s after flow stoppage. Curves in the three panels represent the mean light transmittance spectrum of 10 experiments with different blood samples (thick solid line for oxygenated and thick broken line for deoxygenated samples) and SE (thin solid line for oxygenated and thin broken line for deoxygenated samples). Light transmittance was normalized to light transmitted through deionized water at wavelengths between 500 to 900 nm.

the change in the number of effective particles: aggregation of RBC results in larger particles and, thus, the number of scatters decrease as does the effective total optical path through the chamber, thus giving rise to increased LT during the course of aggregation.¹ Additionally, LT might also be affected by other processes altering the particle concentration in the area under observation, such as sedimentation of RBC. However, the course of RBC sedimentation in suspensions used in this study is very slow than the course of the aggregation process, and starts to be effective after the first 100 s following an abrupt stoppage of flow in a similar flow system.²⁰ Therefore the sedimentation effect has been accepted to not significantly interfere with the recorded LT in the current study. Obviously, the magnitude of changes in LT due to alterations of the number of effective particles is also strongly affected by the light absorbance of these particles.

3.2 Influence of Oxygenation Level on Light Transmittance Patterns

An important factor affecting the LT characteristics of RBC suspensions is the degree of hemoglobin oxygen saturation. Hemoglobin has isobestic points for oxygenated and deoxygenated forms (e.g., 582 and 808 nm), with the largest difference in light absorbance between these forms at about 650 nm.^{28,29}

LT spectra were recorded during flow, immediately after flow stoppage, and 60 s after flow stoppage using oxygenated and hypoxic aliquots of the blood samples (Fig. 3). Oxygen partial pressures were 110 ± 10 mmHg and 44 ± 4.5 mmHg for the oxygenated and hypoxic RBC suspensions, respectively. LT at all wavelengths over 500 nm was lower in hypoxic suspensions during flow and immediately after flow stoppage and, hence, prior to the development of RBC aggregation [Fig. 3(a)]. Following the development of RBC aggregates, the difference of LT through oxygenated and hypoxic suspensions became smaller with increasing wavelength and the two curves approached each other at 900 nm [Fig. 3(b)].

The time courses of LT of oxygenated and hypoxic blood samples at wavelengths of 500, 600, 700, and 800 nm are presented in Fig. 4(a), while Fig. 4(b) presents the data for 500 nm using an expanded scale to provide better visibility. Inspection of these curves confirms the dependence of LT characteristics of oxygenated and hypoxic blood on wavelength, with this difference being greatest at 600 nm and becoming smaller as the wavelength approached 500 and 800 nm. While the change of LT with time during RBC aggregation exhibited similar patterns at all wavelengths, there are visually detectable differences in the rate of change between oxygenated and hypoxic samples at all wavelengths (Fig. 4). These differences were also reflected

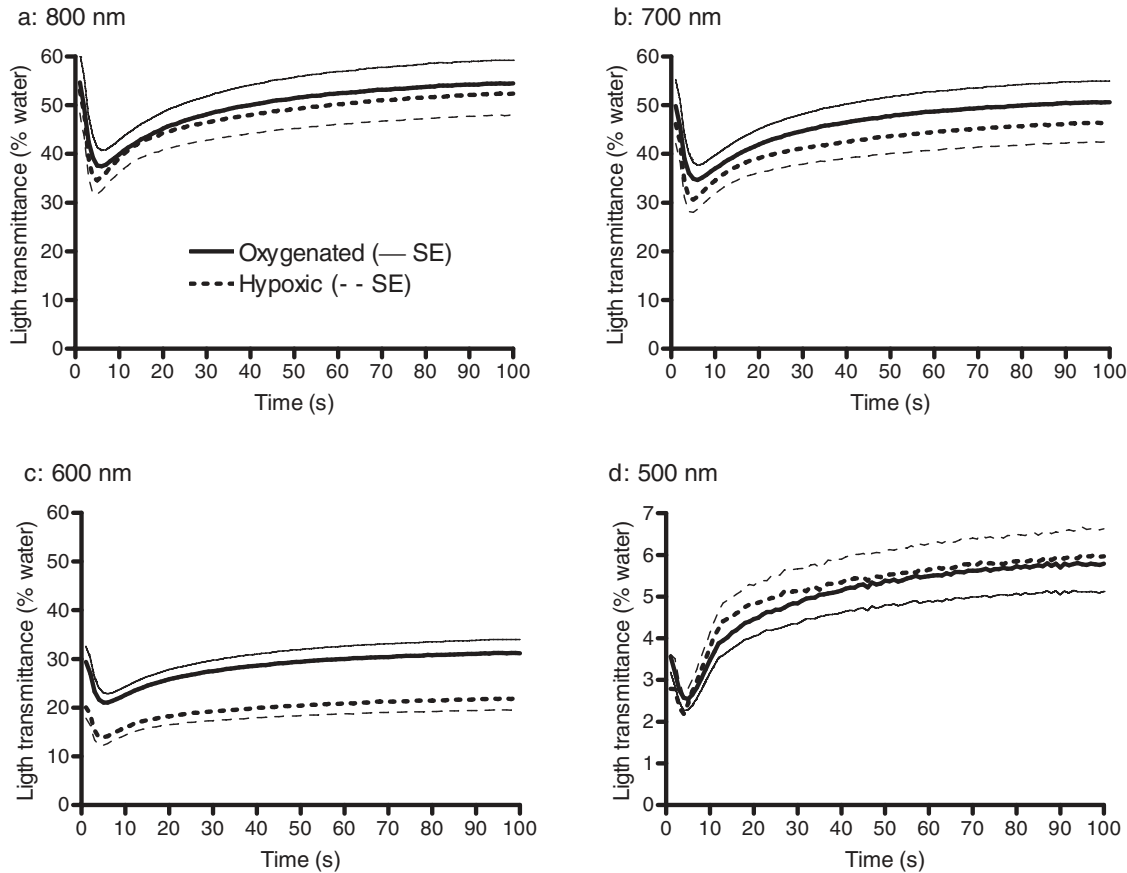


Fig. 4 (a)–(d) Show light transmittance time course at 500-, 600-, 700-, and 800-nm wavelengths during the 100 s period starting immediately after stopping high shear flow for oxygenated and hypoxic blood. Curves in the four panels represent the mean of 10 experiments with different blood samples (thick solid line for oxygenated and thick broken line for deoxygenated samples) and SE (thin solid line for oxygenated and thin broken line for deoxygenated samples). Note that the data for 500 nm are presented with an expanded transmittance scale (d).

in the time constants (T_{fast}) calculated by fitting these curves to a double-exponential equation (see Sec. 3.3 and Table 1 below).

3.3 Red Blood Cell Aggregation Parameters

Aggregation parameters calculated using LT time courses (i.e., syllectograms) at wavelengths of 500, 600, 700, and 800 nm for oxygenated and hypoxic whole blood samples are presented in Table 1. For both oxygenated and hypoxic samples, statistically significant differences between the parameters calculated using the data at various wavelengths were detected only for those that are sensitive to light intensity [i.e., AMP and area under curve (AUC)]. In contrast, parameters that are independent of transmitted light intensity (i.e., AI, $T_{1/2}$, and T_{fast}) did not differ regardless of the wavelength (Table 1). Therefore, time course related parameters AI, $T_{1/2}$, and T_{fast} calculated using syllectograms recorded at different wavelengths should be comparable with each other, while the magnitude-related parameters AMP and AUC are not. This sensitivity to light intensity should be considered when comparing RBC aggregation results measured with devices using light sources of different wavelengths. However, it should also be noted that even time-course related parameters may be influenced by other factors such as the geometry of the chamber used for RBC aggregation measurements.^{12,13,15}

Table 1 also presents comparisons between oxygenated and hypoxic samples for the parameters calculated using syllectograms at different wavelengths. Parameters calculated using data obtained at 500 nm did not differ between oxygenated and hypoxic samples, obviously due to higher variation of the data but not to smaller mean differences (see Fig. 5). Parameters that are sensitive to the level of LT (i.e., AMP and AUC) were significantly lower in hypoxic samples at 600 nm but not at 800 nm. At wavelengths away from the isobestic points between 600 and 800 nm, deoxyhemoglobin has a higher absorbance, yielding a ~ 10 -fold difference compared to oxyhemoglobin at ~ 650 nm,²⁷ with this difference reflected by parameters sensitive to transmitted light intensity (Table 1). Differences between oxygenated and hypoxic samples decreased with wavelength and were negligible for measurements at 800 nm (i.e., close to the isobestic point),^{28,29} indicating that using a light source of ~ 800 nm wavelength may eliminate the influence of oxygenation on these parameters.

Interestingly, parameters reflecting the time course of RBC aggregation (i.e., $T_{1/2}$ and T_{fast}) as determined between 600 and 800 nm were affected by the level of oxygenation (Table 1). A detailed analysis of the effect of oxygen partial pressure and, thus, hemoglobin oxygen saturation previously reported, indicates a significant dependence of aggregation time course and related parameters on the oxygenation status of the samples.¹⁸

Table 1 RBC aggregation parameters in oxygenated and hypoxic WB, calculated using light transmittance time courses at 500, 600, 700, and 800 nm (see Sec. 2.3 for a description of parameters.) (Data are mean $\pm$ standard error. Difference from 500 nm; *: $p < 0.01$, **: $p < 0.001$. Difference from 600 nm; †: $p < 0.05$. Statistical significance was tested by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post test. §: Difference from oxygenated; $p < 0.05$.)

		500 nm	600 nm	700 nm	800 nm
Oxygenated	AMP (au)	3.56 $\pm$ 0.64	11.59 $\pm$ 1.58*	18.17 $\pm$ 2.38**†	19.37 $\pm$ 2.56**†
	AUC (au)	244.12 $\pm$ 44.56	823.83 $\pm$ 109.68*	1287.71 $\pm$ 168.55**†	1378.26 $\pm$ 180.84**†
	AI (%)	76.52 $\pm$ 1.34	77.51 $\pm$ 1.22	77.27 $\pm$ 3.70	77.21 $\pm$ 1.17
	$T_{1/2}$ (s)	10.44 $\pm$ 0.93	12.89 $\pm$ 1.15	13.33 $\pm$ 1.20	13.33 $\pm$ 1.19
	T_{fast} (s)	8.42 $\pm$ 1.01	11.04 $\pm$ 1.62	14.27 $\pm$ 2.20	14.22 $\pm$ 2.14
	T_{slow} (s)	91.04 $\pm$ 30.81	72.70 $\pm$ 12.89	109.22 $\pm$ 19.98	99.60 $\pm$ 45.58
Hypoxic	AMP (au)	4.81 $\pm$ 0.87	9.22 $\pm$ 1.18*§	16.82 $\pm$ 1.88**†§	19.07 $\pm$ 2.06**†
	AUC (au)	357.60 $\pm$ 76.92	659.87 $\pm$ 78.57*§	1218.32 $\pm$ 140.14**†	1354.60 $\pm$ 155.94**†
	AI (%)	80.50 $\pm$ 1.83	78.31 $\pm$ 1.38	78.21 $\pm$ 1.23	77.86 $\pm$ 1.38
	$T_{1/2}$ (s)	8.11 $\pm$ 1.11	10.88 $\pm$ 1.46	11.33 $\pm$ 1.27§	10.66 $\pm$ 1.28§
	T_{fast} (s)	4.87 $\pm$ 1.62	6.50 $\pm$ 0.94§	6.54 $\pm$ 0.76§	6.40 $\pm$ 0.74§
	T_{slow} (s)	108.74 $\pm$ 49.06	50.49 $\pm$ 5.90	49.06 $\pm$ 4.86§	48.22 $\pm$ 5.02

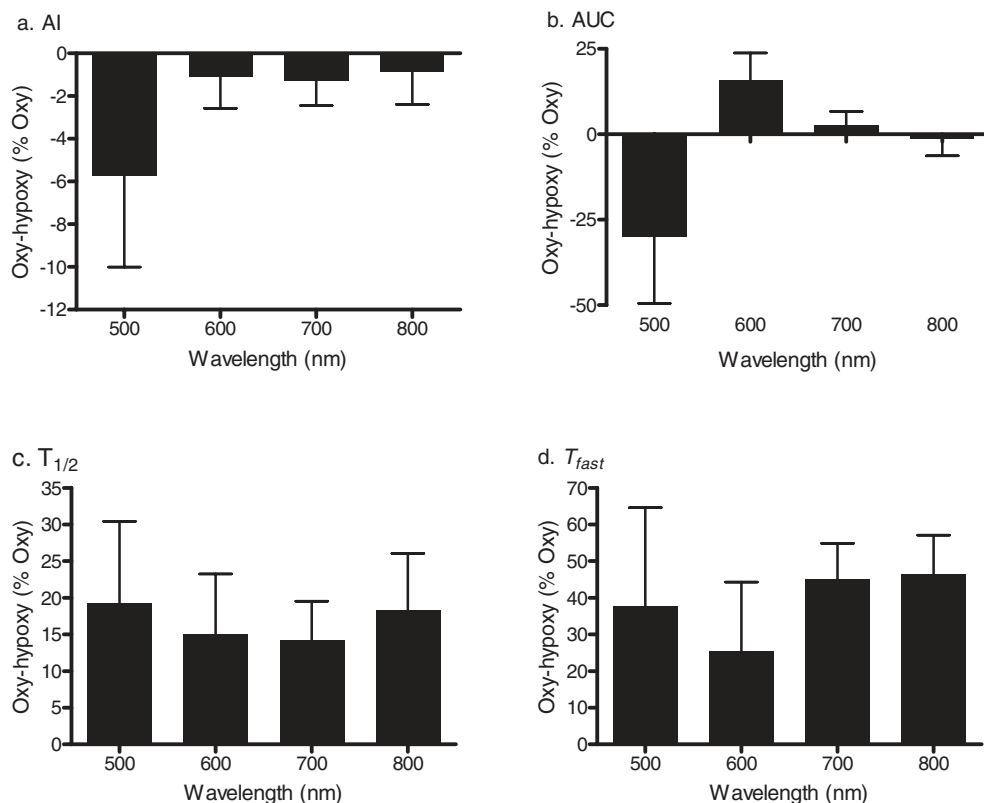


Fig. 5 Difference of calculated aggregation parameters for oxygenated and hypoxic samples expressed as a percentage of oxygenated values: (a) aggregation index (AI); (b) area under curve (AUC); (c) aggregation half time ($T_{1/2}$); (d) aggregation time constant (T_{fast}). Data are mean $\pm$ standard error; $n = 10$.

Table 2 Aggregation parameters (SA and $T_{1/2}$) measured using a LORCA erythrocyte aggregometer for WB and for RBC suspended in 1/3 diluted plasma and in 0.5% dextran 500 solution. Measurements were conducted using oxygenated samples. (Data are presented as mean $\pm$ standard error; $n = 10$. Difference from whole blood; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.)

	Whole blood	RBC in 1/3 diluted plasma	RBC in 0.5% dextran 500
SA (au)	179.30 $\pm$ 17.45	48.58 $\pm$ 8.49**	232.80 $\pm$ 9.90*
$T_{1/2}$ (s)	5.75 $\pm$ 0.56	14.30 $\pm$ 2.81*	4.87 $\pm$ 0.50*

The results of the current study also confirm the dependence of time-course related parameters on oxygenation, with significantly smaller $T_{1/2}$ values for hypoxic samples regardless of wavelengths above 500 nm used for recording syllectograms (Table 1). This pattern is also obvious in Fig. 5, where the difference between oxygenated and hypoxic samples are shown as a percentage of the oxygenated value. The difference decreased with increasing wavelength for the AUC parameter [Fig. 5(b)] but not for time-course dependent parameters [Figs. 5(c) and 5(d)].

Alterations in the time-course related aggregation parameters require further attention. Priezzhev et al. reported differential alterations in T_{fast} and T_{slow} in samples from patients with various diseases, with this observation having diagnostic value.³⁰ Mechanisms responsible for the influence of oxygenation on RBC aggregation kinetics are not clear and require further investigation. Nevertheless, our observations indicate that RBC aggregation measurements should include standardization of oxygenation level in the samples (e.g., equilibration of the samples with ambient air to achieve $\sim 100\%$ hemoglobin oxygen saturation) even if the syllectogram recordings are done using a light source with a wavelength near an isosbestic point (i.e., ~ 800 nm).^{28,29} Hemoglobin oxygen saturation may significantly differ between samples used for assessing RBC aggregation unless a specific procedure is used for standardization of oxygenation; lack of standardization is expected to contribute to enhanced variance of measured data within a group, thereby influencing the statistical power of a parameter. Note that the dependence of aggregation parameters on oxygenation status has been reported for

instruments using light sources in the 600- to 700-nm range, but not for instruments using light sources in the infrared range.¹⁸

3.4 Power in Detection of Alterations in Red Blood Cell Aggregation

The power of RBC aggregation parameters calculated using syllectograms recorded at different wavelengths was compared by analyzing data obtained using samples with normal, decreased (i.e., 1/3 diluted plasma), and enhanced (i.e., 0.5% dextran 500) aggregation. Aggregation parameters for these samples, as measured by a widely used commercial erythrocyte aggregometer (i.e., LORCA), indicated the expected differences (Table 2). The SA parameter, which corresponds to AUC, was significantly decreased for RBC suspended in 1/3 diluted plasma and was increased for RBC suspended in the 0.5% dextran 500 solution. Significant alterations were also found in $T_{1/2}$ for the same RBC suspensions being increased for the 1/3 diluted plasma and decreased for the 0.5% dextran 500 solution.

Parameters calculated using the data obtained using the rectangular flow channel for 800 nm wavelength revealed similar differences; parameters sensitive to the extent of aggregation (AMP and AUC) and the time course (AI and $T_{1/2}$) were significantly modified by 1/3 plasma dilution and, with the exception of AMP, were significantly modified for RBC suspended in 0.5% dextran 500 (Table 3). This pattern was similar for other wavelengths.

The standardized difference for a given parameter is determined by both the mean difference between two groups (i.e., normal and modified aggregation) and the common standard deviation reflecting the variation in both groups, and indicates the statistical power to detect a given experimental alteration using that parameter.³¹ Standardized differences between whole blood (WB) and RBC suspended in 1/3 diluted plasma were similar for AI and AUC parameters at wavelengths of 600 to 800 nm, but lower for 500 nm for both hypoxic and oxygenated samples [Figs. 6(a) and 6(b)]. The $T_{1/2}$ parameter had lower standardized differences compared to the other two parameters [Fig. 6(a)].

The power of the aggregation parameters to detect a given alteration of RBC aggregation was also more dependent on the wavelength for the 0.5% dextran 500 suspensions with enhanced aggregation [Fig. 6(c)]. However, standardized differences for $T_{1/2}$ and AUC between whole blood and RBC in 0.5% dextran

Table 3 Aggregation parameters calculated using syllectograms at 800 nm for WB, RBC in 1/3 diluted plasma or in the 0.5% dextran 500 solution. Measurements were conducted using oxygenated samples. (Data are presented as mean $\pm$ standard error; $n = 10$. Difference from whole blood; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.)

	Whole blood	RBC in 1/3 diluted plasma	RBC in 0.5% dextran 500
AMP (au)	19.37 $\pm$ 2.56	10.98 $\pm$ 1.81***	22.31 $\pm$ 2.00
AUC (au)	1378.26 $\pm$ 180.84	702.02 $\pm$ 134.40***	1681.29 $\pm$ 139.82*
AI (%)	77.21 $\pm$ 1.17	68.38 $\pm$ 3.15**	80.83 $\pm$ 0.41*
$T_{1/2}$ (s)	13.33 $\pm$ 1.19	18.11 $\pm$ 2.25*	8.66 $\pm$ 0.52**

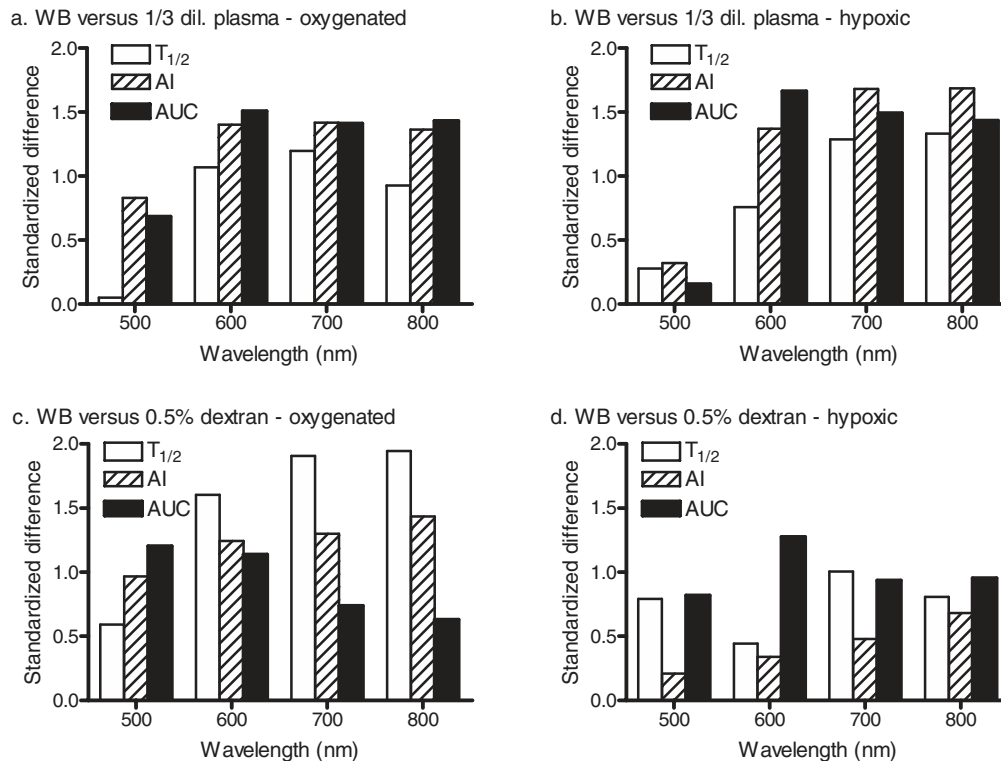


Fig. 6 Standardized differences from whole blood (WB) for RBC suspended in [(a) and (b)] 1/3 diluted plasma or in [(c) and (d)] 0.5% dextran 500 for oxygenated [(a) and (c)] and hypoxic [panels (b) and (d)] samples. The data are for the three parameters ($t_{1/2}$, AI, and AUC) calculated using data at 500-, 600-, 700-, and 800-nm wavelengths. See Sec. 3.4 for discussion.

500 differed in their dependence on wavelength for oxygenated samples [Fig. 6(c)]: standardized differences decreased with increasing wavelength for AUC while increasing with wavelength for $T_{1/2}$ [Fig. 6(c)]. This pattern was not obvious with the hypoxic samples [Fig. 6(d)], although a slight decrease in standardized difference with increasing wavelength was detected. The decreased power of AUC at higher wavelengths is related to increased within-group variance paralleling the higher level of LT. Standardized differences for time-course dependent parameters under hypoxic conditions were significantly smaller than corresponding values for oxygenated samples, apparently related to the reduction of the time constants for hypoxic samples (Table 1).

4 Conclusion

Based on the data presented above, use of a light source having a wavelength of ~ 800 nm is recommended when recording syllectograms for assessment of RBC aggregation. Further, even if a light source near this wavelength is being used, it is recommended that the oxygenation status should be standardized for blood samples and RBC suspensions since kinetic parameters are influenced by the level of oxygenation.

Acknowledgments

This study supported by NIH Research Grant Nos. HL15722, HL 70595, and HL 090511, and by the Akdeniz University Research Projects Unit.

References

- O. K. Baskurt, B. Neu, and H. J. Meiselman, *Red Blood Cell Aggregation*, pp. 1–328, Chemical Rubber, Boca Raton (2011).
- B. Neu and H. J. Meiselman, “Red blood cell aggregation,” in *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, O. K. Baskurt, M. R. Hardeman, M. W. Rampling, and H. J. Meiselman, Eds., pp. 114–136, IOS Press, Amsterdam, (2007).
- M. W. Rampling, H. J. Meiselman, B. Neu, and O. K. Baskurt, “Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation,” *Biorheology* **41**, 91–112 (2004).
- M. W. Rampling, “Red cell aggregation and yield stress,” in *Clinical Blood Rheology*, G. D. O. Lowe, Ed., pp. 45–64, Chemical Rubber, Boca Raton (1988).
- R. Ben Ami, G. Barshtein, D. Zeltser, Y. Goldberg, I. Shapira, A. Roth, G. Keren, H. Miller, V. Prochorov, A. Eldor, S. Berliner, and S. Yedgar, “Parameters of red blood cell aggregation as correlates of the inflammatory state,” *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H1982–H1988 (2001).
- S. Berliner, O. Rogowski, S. Aharonov, T. Mardi, T. Tolshinsky, M. Rozenblat, D. Justo, V. Deutsch, J. Serov, I. Shapira, and D. Zeltzer, “Erythrocyte adhesiveness/aggregation; A novel biomarker for the detection of low-grade internal inflammation in individuals with atherothrombotic risk factors and proven vascular disease,” *Am. Heart J.* **149**, 260–267 (2005).
- N. Maharshak, I. Shapira, R. Rotstein, J. Serov, S. Aharonov, T. Mardi, A. Twig, A. Rubinstein, M. Kofler, S. Berliner, and D. Zeltzer, “The erythrocyte adhesiveness/aggregation test for the detection of an acute phase response and for the assessment of its intensity,” *Clin. Lab. Haematol.* **24**, 205–210 (2002).
- J. Stuart, “Rheological methods for monitoring the acute-phase response,” *Rev. Port. Hemorrh.* **5**, 57–62 (1991).
- O. K. Baskurt, M. Uyuklu, P. Ulker, M. Cengiz, N. Nemeth, T. Alexy, S. Shin, M. R. Hardeman, and H. J. Meiselman, “Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation,” *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **43**, 283–298 (2009).

10. W. G. Zijlstra, "Syllectometry, a new method for studying rouleaux formation of red blood cells," *Acta Phys. Pharmacol. Neerl* **7**, 153–154 (1958).
11. M. R. Hardeman, P. T. Goedhart, and S. Shin, "Methods in hemorheology," in *Handbook Hemorheology and Hemodynamics*, O. K. Baskurt, M. R. Hardeman, M. W. Rampling, and H. J. Meiselman, Eds., pp. 242–266, IOS Press, Amsterdam, (2007).
12. J. G. G. Dobbe, G. J. Streekstra, J. Strackee, M. C. M. Rutten, J. M. A. Stijnen, and C. A. Grimbergen, "Syllectometry: the effect of aggregometer geometry in the assessment of red blood cell shape recovery and aggregation," *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **50**, 97–106 (2003).
13. A. Gaspar-Rosas and G. B. Thurston, "Erythrocyte aggregate rheology by transmitted and reflected light," *Biorheology* **25**, 471–487 (1988).
14. J. H. Nam, Y. Yang, S. Chung, and S. Shin, "Comparison of light transmission and backscattering methods in the measurement of RBC aggregation," *J. Biomed. Opt.* **15**, 027003 (2010).
15. S. Shin, Y. Yang, and J. S. Suh, "Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip-based stirring system by light transmission," *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **41**, 197–207 (2009).
16. O. K. Baskurt, M. Uyuklu, M. R. Hardeman, and H. J. Meiselman, "Photometric measurements of red blood cell aggregation: light transmission versus light reflectance," *J. Biomed. Opt.* **14**, 54044/1–54044/6 (2009).
17. A. Roggan, M. Friebe, K. Dirsche, A. Hahn, and G. Muller, "Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400–2500 nm," *J. Biomed. Opt.* **4**, 36–46 (1999).
18. M. Uyuklu, H. J. Meiselman, and O. K. Baskurt, "Effect of hemoglobin oxygenation level on red blood cell deformability and aggregation parameters," *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **41**, 179–188 (2009).
19. O. K. Baskurt, M. Boynard, G. R. Cokelet, P. Connes, B. M. Cooke, S. Forconi, F. Liao, M. R. Hardeman, F. Jung, H. J. Meiselman, G. B. Nash, N. Nemeth, B. Neu, B. Sandhagen, S. Shin, G. B. Thurston, and J. L. Wautier, "New guidelines for hemorheological laboratory techniques," *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **42**, 75–97 (2009).
20. O. K. Baskurt, M. Uyuklu, and H. J. Meiselman, "Time course of electrical impedance during red blood cell aggregation in a glass tube: comparison with light transmittance," *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **57**, 969–978 (2010).
21. O. K. Baskurt, H. J. Meiselman, and E. Kayar, "Measurement of red blood cell aggregation in a 'plate-plate' shearing system by analysis of light transmission," *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **19**, 307–314 (1998).
22. M. R. Hardeman, J. G. G. Dobbe, and C. Ince, "The laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer," *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **25**, 1–11 (2001).
23. J. Cohen, *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd ed., Earlbaum, Hillsdale, NJ (1988).
24. J. Stuart, P. C. W. Stone, G. Freyburger, M. R. Boisseau, and D. G. Altman, "Instrument precision and biological variability determine the number of patients required for rheological studies," *Clin. Hemorheol.* **9**, 181–197 (1989).
25. L. D. Shvartsman and I. Fine, "Optical transmission of blood: Effect of erythrocyte aggregation," *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **50**, 1026–1033 (2003).
26. M. Friebe, J. Helfmann, G. Muller, and M. Meinke, "Influence of shear rate on the optical properties of human blood in the spectral range 250 to 1100 nm," *J. Biomed. Opt.* **12**, 054005 (2007).
27. M. Friebe, J. Helfmann, U. Netz, and M. Meinke, "Influence of oxygen saturation on the optical scattering properties of human red blood cells in the spectral range 250 to 2000 nm," *J. Biomed. Opt.* **14**, 034001 (2009).
28. G. S. Dubova, A. Ya. Khairullina, and S. F. Shumilina, "The recovery of the absorption spectra of oxy- and deoxyhemoglobin from the coefficients of diffuse transmission and reflection of whole blood," *J. Appl. Spectrosc.* **36**, 66–71 (1982).
29. O. Hazeki and M. Tamura, "Quantitative analysis of hemoglobin oxygenation state of rat brain in situ by near-infrared spectrophotometry," *J. Appl. Physiol.* **64**, 796–802 (1988).
30. A. V. Priezzhev, O. M. Ryaboshapka, N. N. Firsov, and I. V. Sirko, "Aggregation and disaggregation of erythrocytes in whole blood: study by backscattering technique," *J. Biomed. Opt.* **4**, 76–84 (1999).
31. J. Stuart, P. C. W. Stone, G. Freyburger, M. R. Boisseau, and D. G. Altman, "Instrument precision and biological variability determine the number of patients required for rheological studies," *Clin. Hemorheol.* **9**, 181–197 (1989).

Time Course of Electrical Impedance During Red Blood Cell Aggregation in a Glass Tube: Comparison With Light Transmittance

Oguz K. Baskurt*, Mehmet Uyuklu, and Herbert J. Meiselman

Abstract—Red blood cells (RBC) in normal human blood undergo reversible aggregation at low flow or stasis. The extent and kinetics of this phenomenon have been studied using various optical and electrical methods, yet results using such methods are not always in concordance. This study employed a horizontal glass tube in which blood flow could be established, then abruptly stopped. Normal blood and RBC suspensions with enhanced or decreased aggregation were studied. Light transmittance (LT) and electrical impedance at 100 kHz were recorded during high-shear flow and for 120 s after flow was abruptly stopped during which RBC aggregation occurs. Capacitance values were also obtained based on the imaginary part of impedance data and recorded. Various aggregation parameters were calculated, using the time course of LT, impedance, and capacitance, then compared with each other and with results from laboratory aggregometers. RBC aggregation parameters were calculated, using the time course of impedance data often failed to correlate with known changes of aggregation, even reporting aggregation for cells in nonaggregating media (i.e., RBC in buffered saline). Alternatively, RBC aggregation parameters based upon the time course of capacitance data are in general agreement with those derived from LT data and with RBC aggregation indexes, measured using commercial instruments.

Index Terms—Capacitance, impedance measurement, light transmittance (LT), red blood cell (RBC) aggregation.

I. INTRODUCTION

THE ELECTRICAL properties of red blood cell (RBC) suspensions have been the subject of numerous investigations, most of which were aimed at developing rapid diagnostic methods [1]–[4]. The studies using electrical impedance and dielectric spectroscopy methods indicated that both the resistive and capacitive properties of blood are determined by the electrical characteristics of plasma (i.e., the suspending phase of blood) and of RBC [5], [6]. Detailed theoretical analyses of the electrical properties of RBC suspensions exist in the literature [7]–[10].

Plasma and the fluid within RBC (i.e., concentrated hemoglobin solution) have different conductivities [5], and these

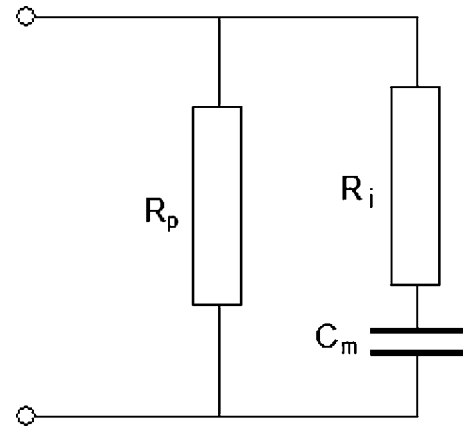


Fig. 1. Three element model of blood impedance. R_p , R_i , and C_m .

two fluid compartments are separated from each other by the RBC membrane, which has a very low electrical conductivity but introduces capacitance into the system [5]. These factors can be lumped into a three-element model of blood impedance [11] that includes plasma resistance (R_p), internal resistance of the RBC (R_i), and RBC membrane capacitance (C_m) (see Fig. 1). The volume fraction of RBC in blood (hematocrit) and the shape of RBC have been identified as important determinants of their relative contribution to the equivalent impedance, and hence, the measured electrical parameters of blood samples [5], [9], [12]. The resistivity of blood (ρ_b) can be estimated, using plasma resistivity and hematocrit by various approaches [13], [14], including the well-known Maxwell–Fricke equation

$$\rho_b = \rho_p \frac{1 + kH}{1 - H} \quad (1)$$

where ρ_p is plasma resistivity, H is hematocrit, and k is a factor depending on the geometry and orientation of RBC.

The electrical properties of RBC suspensions depend on whether they are flowing or at stasis [8], [9], and Hoetink *et al.* [9] have theoretically analyzed the flow dependence of blood's electrical conductance in a cylindrical tube in detail. Their theoretical work is based on the Maxwell–Fricke theory (1), and therefore, strongly depends on factors related to RBC geometry and orientation. These factors are determined by the applied shear forces during flow and by cellular mechanical properties (i.e., RBC deformability) [15]. Since the theoretical results of Hoetink *et al.* agreed well with experimental data, they thus concluded that the flow dependence of conductance can be explained by RBC orientation and deformation [9]. However,

Manuscript received July 23, 2009; revised October 5, 2009. First published November 20, 2009; current version published March 24, 2010. This work was supported in part by the National Institutes of Health Research under Grants HL15722, HL 70595, and HL 090511 and in part by the Akdeniz University Research Projects Unit. Asterisk indicates corresponding author.

*O. K. Baskurt is with the Department of Physiology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya 07070, Turkey (e-mail: baskurt@akdeniz.edu.tr).

M. Uyuklu is with the Department of Physiology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya 07070, Turkey (e-mail: uyuklu@akdeniz.edu.tr).

H. J. Meiselman is with the Department of Physiology and Biophysics, Keck School of Medicine, Los Angeles, CA 90033 USA (e-mail: meiselma@usc.edu).

Color versions of one or more of the figures in this paper are available online at <http://ieeexplore.ieee.org>.

Digital Object Identifier 10.1109/TBME.2009.2036598

these theoretical models ignore cellular aggregation, another important aspect of RBC rheological behavior, which significantly affects the effective particle geometry during shear flow or at stasis [16].

RBC form multicellular aggregates at stasis or when subjected to low shear forces [17]. This reversible aggregation is characterized by a special structure, with RBC–RBC contact forming parallel surfaces like a stack of coins, a process that is frequently termed rouleaux formation. Certain plasma proteins (e.g., fibrinogen) are necessary for RBC aggregation, and therefore, rouleaux formation does not take place in suspensions without these proteins (e.g., isotonic saline). RBC aggregation can also be induced by polymers (e.g., dextrans) of appropriate molecular weight [16], [17]. The degree of RBC aggregation is also determined by the shear forces affecting these cells; therefore RBC aggregates dominate under low shear forces or at stasis. RBC aggregation is an important determinant of the flow properties of blood, especially under low flow conditions [17], has a significant potential to adversely affect *in vivo* blood flow and tissue perfusion [16], [18], and is enhanced during certain pathophysiological processes (e.g., inflammatory processes). RBC aggregation is accepted as a clinically important parameter [19].

Various approaches have been utilized to assess RBC aggregation, ranging from simply observing the erythrocyte sedimentation rate (ESR) over an hour period [20] to more detailed analysis by monitoring light reflectance (LR) or transmittance (LT) from or through RBC suspensions [21]–[26]. Previous studies have simultaneously monitored LT and microscopically observed RBC aggregation and report a strong correlation during the time course of aggregation [27], thus making LT methods accepted by workers in the field [20]. The time course of LR following a sudden stop of blood flow is known as a syllectogram and reflects the time course of aggregation [26]. LT-time data are also termed syllectograms. Both LR and LT syllectograms can be mathematically analyzed to determine various indexes and/or time constants to quantitate RBC aggregation [21], [23], [28], and there are commercially available instruments based on monitoring LT or LR [29].

It has been recognized that RBC aggregation affects the electrical properties of native blood and RBC suspensions [5], [6], [30]–[34]. While some observations reflect changes due to aggregation prior to the start of a measurement (i.e., RBC aggregation occurring before collecting data) [5], [6], [31], others have investigated the potential of electrical impedance derived parameters to quantitate the process of RBC aggregation [30], [32]–[34]. The time course of electrical impedance or conductance has been reported to be similar to LT or LR; therefore suggesting that electrical changes provide the same information regarding aggregation kinetics [30], [34]. However, previous studies have not directly examined this suggestion via a direct comparison of the time course of electrical properties with LT or LR data that are widely accepted to reflect the time course of aggregation [21]–[23], [26]. In addition, previous observations have revealed an unexpected finding: electrical impedance has a syllectogram-like time course for nonaggregating RBC suspensions that is similar to that ob-

served for aggregating RBC suspensions (e.g., RBC in plasma) [35].

This study was designed to compare the time course of electrical impedance and derived capacitance with that for LT during RBC aggregation in a horizontal glass tube. RBC suspended in nonaggregating and aggregating media were investigated; comparisons between measured modalities were based on calculated aggregation indexes that are accepted to reflect RBC aggregation [20], [36] and are used by commercial instruments [23].

II. MATERIALS AND METHODS

A. Blood Samples and RBC Suspensions

Venous blood samples were obtained from healthy human male volunteers, aged from 25 to 52 years, and anticoagulated with sodium heparin (15 IU/ml). The blood was centrifuged at 1400 g for 5 min, and the plasma carefully aspirated and saved. For some experiments, plasma was diluted with phosphate buffered saline (PBS; pH = 7.4, osmolality 290 ± 5 mOsm/kg) at a ratio of 1/2 and 1/3, corresponding to 50% and 66% of original plasma components. RBC from each donor were resuspended either in unmodified or diluted plasma at a hematocrit of 0.4 l/l. RBC were also resuspended in PBS containing 1% bovine serum albumin at 0.4 l/l; albumin does not cause aggregation and maintains the normal resting RBC shape. For some experiments, dextran 500 (MW = 500 kDa, D-5251, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) was dissolved in undiluted plasma at a concentration of 1% and RBC from each donor were resuspended in the plasma + dextran media at 0.4 l/l hematocrit. Compared to cells in undiluted plasma, RBC suspended in diluted plasma exhibit reduced aggregation due to lower concentrations of plasma proteins (e.g., fibrinogen), which induce aggregation [37], while RBC in plasma containing 1% dextran 500 (a strong RBC aggregator) are characterized by enhanced aggregation [38]. Note that while most experiments were done at a hematocrit of 0.40 l/l, some experiments employed 0.30 and 0.50 l/l hematocrits, with all hematocrits determined, using the microcapillary method (i.e., 12000 g for 5 min); hematocrits were adjusted by adding or removing the appropriate suspending medium. All experiments were completed within 4 h after blood sampling [36].

B. Characterization of RBC Aggregation

RBC aggregation indexes for the final RBC suspensions were determined, using two commercially available instruments: 1) a cone-plate photometric aggregometer (Myrenne Aggregometer, Myrenne GmbH, Roetgen, Germany) [24] employing LT was used to measure a dimensionless aggregation index (M) obtained at stasis after abrupt stoppage of shear; and 2) a Couette aggregometer using a system based on laser light-backscattering (LORCA, RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands) [23]. All aggregation measurements were conducted at 37 °C.

C. Experimental System

The experimental system used for the LT and electrical measurements is shown schematically in Fig. 2. The electrical

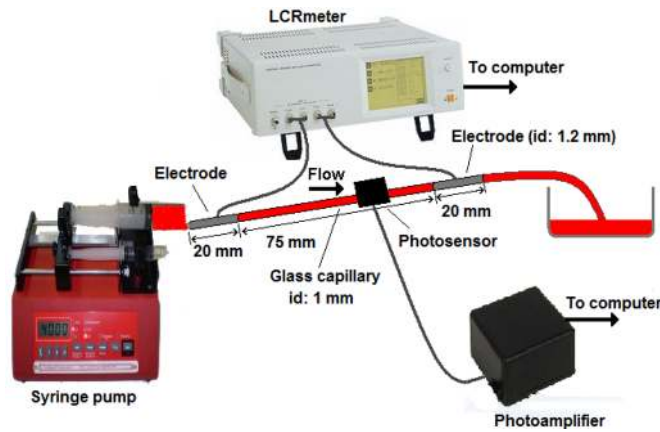


Fig. 2. Schematic representation of the measurement system. The glass tube was horizontal with the axis of the LED-photometer horizontal and perpendicular to the axis of the tube.

and LT properties of RBC suspensions were simultaneously recorded in a horizontal glass tube (1 mm ID and 75 mm length) during and after the stoppage of flow induced by a syringe pump (Model NE1000, New Era Pump Systems, Inc., Wantagh, NY). Two stainless-steel tubes (OD: 1.65 mm, ID: 1.19 mm, and length: 20 mm) were attached to each end of the tube to serve as electrodes for electrical measurements and were also used as hydraulic connections to the flow system. These electrodes were connected to a LCR (inductance, capacitance, and resistance) meter (Hioki, 3532-50LCR HiTester, Nagano, Japan) for measurement of electrical impedance and derived parameters. A two-electrode approach was used for the measurements [31] with the instrument controlled by a digital computer via an RS-232 connection. The instrument was run in a series equivalent circuit mode. The LCR meter applies a test signal across the electrodes at a selected frequency and a constant voltage (V), measures the resulting current (I), and phase angle (θ) between V and I . Impedance (Z) is calculated as V/I , while reactance (X) is calculated as $|Z| \cdot \sin\theta$. Series capacitance (C) is then calculated as $1/\omega X$, where ω is the angular velocity corresponding to the test frequency [39]. The signal voltage was held constant at 1 V, resulting in currents in the order of 10^{-5} amp through the tube filled with the RBC suspensions. The results of 16 measurements were averaged by the instrument and reported as a single data point.

The frequency of the test signal was selected based on preliminary studies. Fig. 3 presents the impedance spectrum of RBC suspended in plasma and PBS during flow and at 120 s following flow stoppage (i.e., after full development of RBC aggregates). These results indicated that the difference between flowing and stagnant (i.e., aggregated) RBC suspensions in plasma was not frequency dependent for low frequencies, including the beginning of the β -dispersion range (i.e., ~ 100 kHz) [40]. C values under similar testing conditions were found to be strongly dependent on frequency, decreasing by about 10^3 as the frequency changed from the lowest (42 Hz) to about 100 kHz (data not shown).

It should be noted that the difference between Z values during flow and stasis of RBC suspension in PBS was negligible except

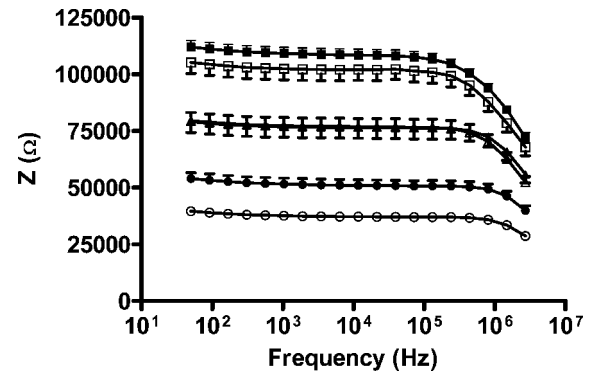


Fig. 3. Z of the glass tube filled with RBC suspended in undiluted plasma during flow ($\square$) and after 120 s after flow stoppage ($\blacksquare$) as measured at frequencies between 42 Hz and 2.7 MHz. Z values of the glass tube filled with RBC suspended in PBS measured during flow ($\triangle$) and at stasis ($\blacktriangle$) are also shown. The hematocrit was 0.4 l/l for all suspensions. Also shown are impedance data for cell-free PBS ($\circ$) and undiluted plasma ($\bullet$) at stasis. Data as mean $\pm$ standard deviation, $n = 8$.

at highest range of measurement frequencies (see Fig. 3). RBC aggregation requires the presence of certain plasma proteins (e.g., fibrinogen) or high-molecular weight polymers (e.g., dextrans), and hence, RBC suspensions in PBS exhibit no detectable aggregation. As the RBC suspensions in PBS and plasma were otherwise the same, the difference of Z between flowing and stagnant RBC suspensions in plasma reflects the influence of fully developed aggregation at 120 s.

The two levels of Z values for RBC suspensions in plasma mentioned earlier (during flow or at stasis; Fig. 3) reflect two specific conditions: no RBC aggregation (i.e., during flow) or complete aggregation (i.e., at stasis, 120 s after flow stoppage). However, previous experiments indicated that electrical values during the aggregation process (i.e., during the 120 s period after flow stoppage) may exceed the values corresponding to flow and to complete aggregation, owing to the initial phase after flow stoppage [35]. The amplitude of Z and C changes during the transition from flow to the stasis (i.e., full development of aggregation process) was maximum at 100 kHz. C values were most stable at this frequency, but exhibited large temporal fluctuations if measured at lower frequencies, possibly reflecting shear rate dependent electrode effects, which may be influenced by shear forces during flow and the transition phase to stasis. Therefore, based on these preliminary experiments, 100 kHz was selected as the frequency of the test signal. This frequency yields the largest β -dispersion effect primarily reflecting the capacitive effects of cell membranes [40] and has been previously recommended for measuring the electrical parameters of blood [32]. The stray capacitance and inductance of the system were tested according to Pribush *et al.* [32] and were found to be negligible.

To monitor LT through the glass tube a phototransistor and an infrared LED (850 nm) were placed opposite to each other at the middle of the glass tube with their axis horizontal and perpendicular to the axis of the tube (see Fig. 2). The signal from the phototransistor was transferred to an amplifier, then

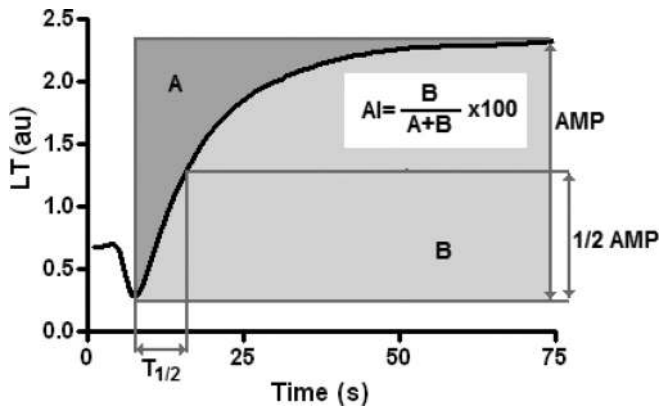


Fig. 4. Calculation procedure for aggregation parameters, using LT-time data. “A” and “B” are the areas of the surfaces above and below the curve, respectively. AI is equal to $B/(A + B)$ and SA is equal to B.

digitized and stored on a computer simultaneously with electrical parameters.

D. Experimental Protocol

For recordings during flow, the syringe pump was run at a volumetric flow rate of 42 ml/min, resulting in a nominal average shear rate of about 500 s^{-1} , this shear rate has been shown to exceed that needed for complete dispersion of all RBC aggregates [20], [41]. After assuring stable conditions the pump was turned off, thereby abruptly stopping flow. Z, C, and LT were recorded simultaneously at 1 Hz sampling frequency for 5 s during flow and for 120 s following the sudden stoppage of flow. The flow system, including the glass tube, electrodes and LT detector unit were placed in a temperature-controlled box and maintained at 37°C .

E. Calculations and Statistics

LT, Z, and C data recorded during the aggregation process after abruptly stopping flow were used to calculate aggregation parameters; surface area (SA), aggregation index (AI), and aggregation half-time ($T_{1/2}$), which are equivalent to those reported by commercially available LT or LR RBC aggregometers [23], [28], [42]. The first 75 s period following stoppage of flow was analyzed, using software written in LabView 8.6 (National Instruments, Austin, TX), as the alterations in the last 45 s of the recorded data had no significant effect on the calculated parameters, using Z and C time courses, while sedimentation of RBC may start to affect the time course of LT during this late phase. Fig. 4 indicates how the SA, AI, and $T_{1/2}$ parameters are obtained when using LT data. The calculation starts with the determination of a minimum, which corresponds to the completion of RBC shape recovery after the sudden stoppage of flow [23]. This is followed by a characteristic increase of LT reflecting the time course of aggregation. The SA parameter is the area below the curve (B in Fig. 4), while AI corresponds to the ratio of the area under the curve B to the sum of areas below and above the curve (A + B). $T_{1/2}$ is the time required to reach one-half of the total change in LT during 75 s. Since the directions of Z and C changes due to RBC shape recovery and aggregation

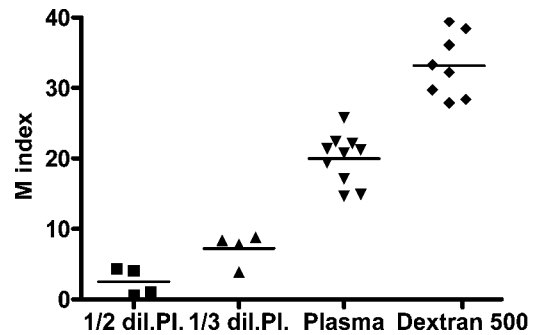


Fig. 5. M for RBC suspended in 1/3 and 1/2 diluted plasma, undiluted plasma and plasma containing 1% dextran 500 kDa dextran (D500). The horizontal line for each group represents mean value.

were opposite to those for LT (see Fig. 6), the positive peak was taken as the start of calculations for electrical recordings. The calculations were otherwise similar to those for LT except that SA corresponds to the area above the curve, and AI was calculated as the ratio of the area above the curve to the sum of areas under and above the curve. Note that the Myrenne aggregometer yields an “M” parameter, using the same approach as the SA parameter described earlier [24].

Data are presented as mean $\pm$ standard error (SE). Pearson correlation coefficients and linear regression models were employed to evaluate relationships between parameters calculated using different modalities (i.e., LT, C, or Z) reflecting the same aggregation processes, as well as those between these parameters and aggregation indexes measured using the RBC aggregometers.

III. RESULTS

A. Aggregation Characteristics of RBC Suspensions

The four types of RBC suspensions used herein exhibited different aggregation characteristics as indicated by the Myrenne aggregometer “M” index (see Fig. 5). Mean values of M were 2.5 ± 1.0 , 7.2 ± 1.1 , 19.9 ± 1.1 , and 33.2 ± 1.6 for 1/2 diluted, 1/3 diluted, undiluted, and dextran-containing plasma suspensions, respectively. In addition to the M index measured by Myrenne aggregometer, parameters provided by the laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) laser backscattering aggregometer, which employs a mathematical approach consistent with that used in this study (see Fig. 4), also revealed significant differences between the RBC suspensions (see Table I). Note the marked increases of SA and AI, and the progressive decrease of $T_{1/2}$ with increased RBC aggregation (i.e., 1/2 diluted plasma to 1/3 diluted plasma to plasma to plasma +1% dextran 500 kDa). In particular, the kinetics of aggregation as indexed by $T_{1/2}$ are greatly affected, a ten-fold change of $T_{1/2}$ versus a 3- to 4-fold change for SA and AI for the range of aggregation shown in Table I.

B. Electrical Characteristic of RBC-plasma Suspensions

The Z and C of RBC suspensions in undiluted plasma measured during flow sufficient for complete dispersion of RBC

TABLE I
AGGREGATION PARAMETERS REFLECTING EXTENT AND DYNAMICS OF
RBC AGGREGATION MEASURED USING LORCA AGGREGOMETER.
(PLEASE SEE SECTION II-E FOR DEFINITION OF PARAMETERS)

	SA	AI	$T_{1/2}$
1/2 diluted plasma (n=4)	16.8 ± 4.5	20.2 ± 1.6	17.8 ± 1.8
1/3 diluted plasma (n=4)	34.4 ± 6.4	34.6 ± 4.4	8.4 ± 1.9
Plasma (n=10)	51.3 ± 4.7	63.9 ± 2.3	2.2 ± 0.2
Plasma + 1% D500 (n=8)	58.51 ± 5.3	69.4 ± 0.3	1.7 ± 0.1

Data are mean $\pm$ SE.

TABLE II
Z AND C AT 100 kHz ACROSS GLASS TUBE DURING FLOW OF RBC
SUSPENDED IN UNDILUTED PLASMA AT HEMATOCRITS
OF 0.3, 0.4, OR 0.5 l/l

	Z	C
0.3 l/l	$95.78 \pm 4.19 \text{ k}\Omega$	$0.39 \pm 0.01 \text{ nF}$
0.4 l/l	$105.86 \pm 2.24 \text{ k}\Omega$	$1.99 \pm 0.03 \text{ nF}$
0.5 l/l	$121.63 \pm 4.48 \text{ k}\Omega$	$6.06 \pm 0.14 \text{ nF}$

Values are mean $\pm$ SE of five separate experiments.

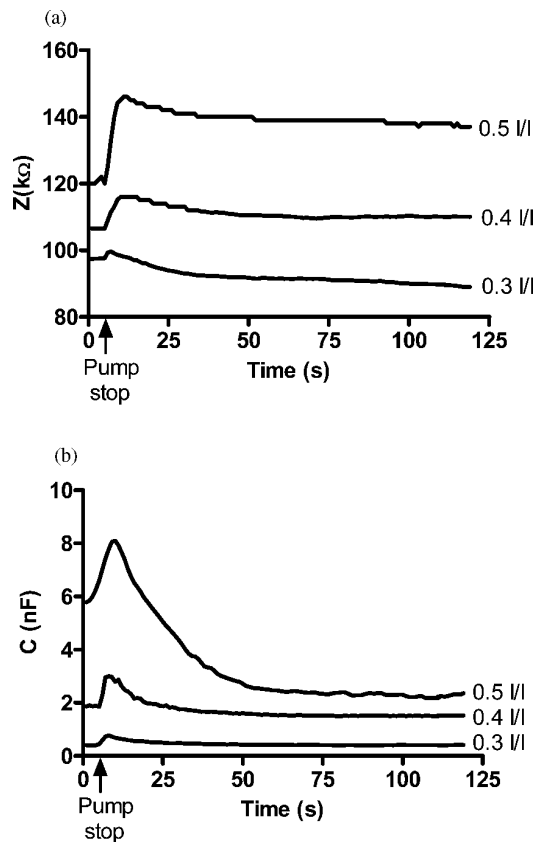


Fig. 6. Time courses of Z and C of RBC suspended in undiluted plasma at hematocrits of 0.3, 0.4, and 0.5 l/l following flow stoppage in the glass tube. Test signal frequency was 100 kHz.

aggregates were found to increase with increasing hematocrit (see Table II), as predicted by the Maxwell–Fricke equation. The changes of Z and C between flow and after 120 s of stasis were also affected by hematocrit, but exhibited differences (see Fig. 6). If the values during flow and at the last part of the time course (i.e., 100–120 s after flow stoppage) are compared, Z was

higher in fully aggregated RBC suspensions compared to the disaggregated state for suspensions with 0.4 and 0.5 l/l hematocrit. The difference was more prominent ($\sim 15\%$) for the suspensions with 0.5 l/l hematocrit, compared to the suspension with 0.4 l/l hematocrit ($\sim 4\%$). In contrast, the Z was lower in fully aggregated RBC suspensions with 0.3 l/l hematocrit compared to the disaggregated state. It should be noted that the level of Z and C values in aggregated RBC suspensions is determined by both the increase due to shape recovery that defines the starting point for aggregation-related changes and by the magnitude of the decrease following this peak due to aggregation. Obviously, both effects are sensitive to the number of particles in the suspension (i.e., hematocrit), as also predicted by Maxwell–Fricke equation, since hematocrit is the determinant of the influence of “ k ” factor that reflects the geometry and orientation of RBC (according to 1). This hematocrit dependence is especially prominent for 0.3 l/l hematocrit suspensions in which there are very small initial increases due to shape recovery, thus resulting in Z and C levels at the start of aggregation that are close to the high-flow disaggregated state (see Fig. 6). C measurements indicated a different pattern of hematocrit dependence. For suspensions with 0.4 and 0.5 l/l hematocrit, the values for aggregated samples were lower than those measured during flow, with again the difference for 0.5 l/l hematocrit suspensions being significantly greater than for 0.4 l/l. As mentioned earlier, C values of aggregated and disaggregated samples were almost identical for 0.3 l/l suspensions.

C. Time Course of LT, Z, and C During RBC Aggregation

Fig. 7 presents typical examples of LT, Z, and C versus time relations for RBC suspended at 0.4 l/l hematocrit in PBS, in 1/2 and 1/3 diluted plasma, and in undiluted plasma. The LT-time curve for RBC in undiluted plasma [see Fig. 7(a)] exhibited a well-known pattern [21], [22], [25], which reflects the process of RBC aggregation and is qualitatively similar to LT or LR signals obtained via the aggregometers described in Section II-B). There is a sharp decrease in LT following stoppage of flow, which reaches a minimum in a few seconds, followed by increased LT with a characteristic time course [21], [24], [42]. LT-time data for RBC suspended in 1/2 and 1/3 diluted plasma exhibited similar patterns, although the time course was significantly slower in 1/3 diluted plasma and even slower in 1/2 diluted plasma. LT results for RBC suspended in PBS did not exhibit a time course comparable with these recordings and only exhibited progressive decreases with time [see Fig. 7(a)].

Both Z and C values tended to increase immediately after stoppage of flow, reached a peak, and then, decreased gradually [see Figs. 7(b) and (c)]. Interestingly, the time course for Z following the peak value was similar for all RBC suspensions (i.e., plasma, diluted plasma, and PBS), and thus, unlike that observed for LT, the time course of Z after the peak was slower compared to LT, even for RBC in undiluted plasma. The time course of C after the sudden stop exhibited a different pattern than Z: 1) compared to nondiluted plasma, there were smaller peak values and slower decreases of C after the peak for RBC

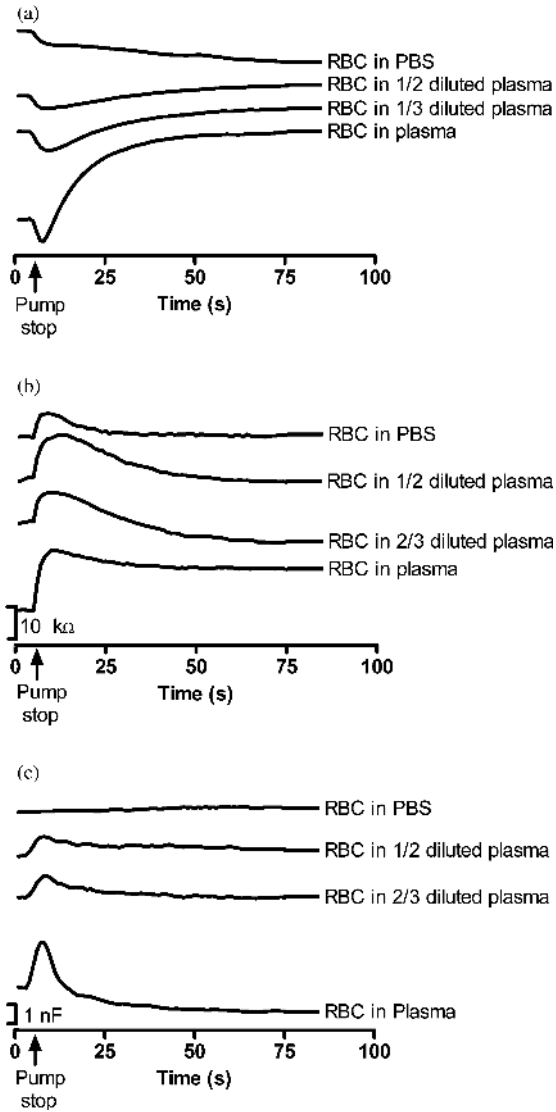


Fig. 7. Time courses of LT, Z, and C across the glass tube after a sudden stop of flow for RBC suspended in PBS, 1/2 and 1/3 diluted plasma and undiluted plasma. Impedance and capacitance were measured at 100 kHz. (a) Light transmittance. (b) Impedance (Z). (c) Capacitance (C).

in diluted plasma [see Fig. 7(c)]; and 2) there was no detectable change of C for the nonaggregating RBC suspension in PBS.

D. RBC Aggregation Indexes Calculated Using LT, Z, and C Time Courses

Table III presents aggregation parameters calculated as described in Section II-E, using the time courses of LT, Z, and C after sudden stoppage of flow. It should be noted that the parameter SA is dependent on the numerical value of the recorded modality (LT, Z, or C), and therefore, the calculated values of SA for different modalities are not comparable. However, it is obvious that SA and AI were calculated, using LT and C data exhibited a similar trend for the diluted plasmas and plasma with 1% dextran 500, with a rank order of plasma + D500 > undiluted plasma > 1/3 diluted plasma > 1/2 diluted plasma. This trend was not seen when using Z data (see Table III).

TABLE III
AGGREGATION PARAMETERS REFLECTING EXTENT AND DYNAMICS OF RBC AGGREGATION CALCULATED USING LT, Z, AND C TIME COURSES AFTER SUDDEN STOP OF FLOW FOR RBC IN UNDILUTED PLASMA, DILUTED PLASMAS, AND PLASMA CONTAINING 1% 500 kDa DEXTRAN (D500)

LT	SA	AI	$T_{1/2}$ (s)
1/2 diluted plasma	12.8 ± 3.5	63.2 ± 3.3	21.5 ± 2.2
1/3 diluted plasma	31.5 ± 3.7	74.1 ± 2.8	16.5 ± 0.6
Plasma	100.6 ± 12.7	78.4 ± 1.5	11.7 ± 1.1
Plasma + 1% D500	153.0 ± 9.9	80.1 ± 1.5	10.8 ± 0.8
Z	SA	AI	$T_{1/2}$
1/2 diluted plasma	253.0 ± 23.3	59.6 ± 1.5	24.0 ± 1.8
1/3 diluted plasma	398.7 ± 18.1	68.7 ± 2.3	16.0 ± 1.9
Plasma	204.3 ± 28.6	73.8 ± 2.5	10.1 ± 0.8
Plasma + 1% D500	207.6 ± 34.2	69.8 ± 5.3	12.2 ± 1.7
C	SA	AI	$T_{1/2}$
1/2 diluted plasma	27.1 ± 1.5	60.6 ± 5.1	21.5 ± 1.0
1/3 diluted plasma	41.2 ± 16.6	67.3 ± 2.8	12.7 ± 2.2
Plasma	81.1 ± 10.6	79.0 ± 1.7	8.8 ± 1.3
Plasma + 1% D500	131.0 ± 17.6	84.4 ± 1.8	10.9 ± 1.2

Z and C were monitored at 100 kHz frequency. Data are mean $\pm$ SE.

$T_{1/2}$ values based upon LT, Z, and C data were consistent with slower aggregation for diluted plasma. SA and AI parameters provided by the LORCA aggregometer were in agreement with this sequence. $T_{1/2}$ results via LORCA also indicated slower aggregation for diluted plasma (see Table I).

E. Associations Between Aggregation Indexes

Fig. 8 presents cross-plots of the SA parameter versus the Myrenne aggregometer "M" index for the pooled data obtained, using four types of RBC suspensions (in 1/3 and 1/2 diluted plasma, undiluted plasma, and dextran 500 containing plasma). There were highly significant ($p < 0.001$) correlations for SA values calculated, using LT and C data [see Fig. 8(a) and (c)], but not for SA values calculated, using Z data [see Fig. 8(b)]. There was also a significant positive correlation between the SA values calculated, using LT and C data ($r = 0.68$, $p < 0.0001$), while the correlation between SA values calculated, using LT and Z data, was much weaker and negative ($r = -0.40$, $p < 0.05$) (see Table IV). Other correlation coefficients, including those for AI and $T_{1/2}$, are also presented in Table IV. The relations between AI calculated using C or LT data and the M index were also highly significant, whereas AI calculated using Z data did not correlate with either the M index or AI based on LT data. Interestingly, $T_{1/2}$ calculated, using Z data significantly correlated with both M and $T_{1/2}$ calculated, using LT data, and thus, showed associations similar to that for $T_{1/2}$ based on C data. The correlation coefficients of $T_{1/2}$ based on C and Z versus the M index were negative with r larger when using C data (see Table IV).

IV. DISCUSSION

Blood is a suspension of cellular elements in plasma, a solution of electrolytes, proteins, and other biomolecules. Although

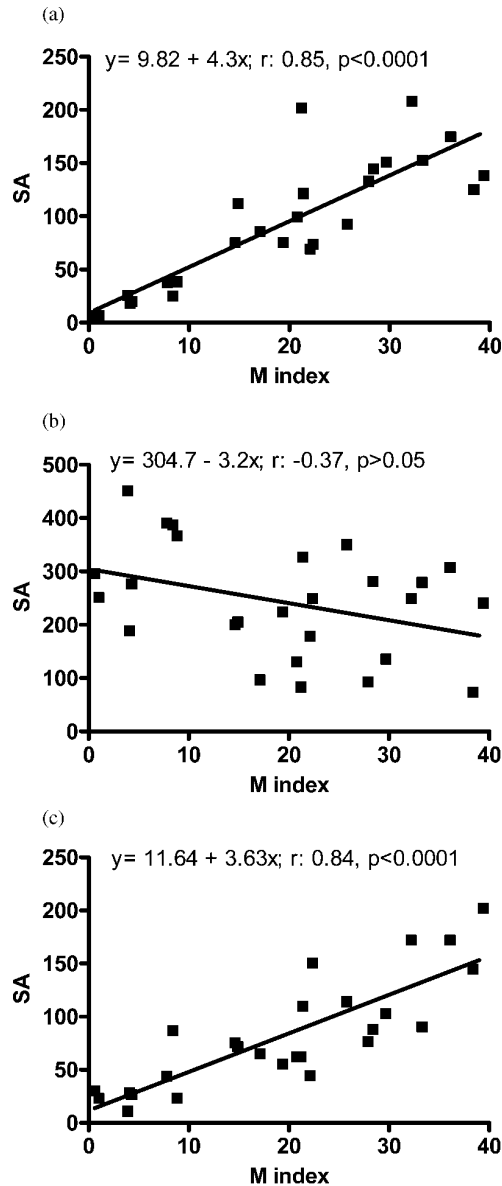


Fig. 8. Linear regression analysis of the relations between the M index and the SA parameter was calculated, using LT, Z, and C time courses. Data are pooled results for undiluted and diluted plasma and plasma containing 1% 500 kDa dextran (D500). (a) Light transmittance. (b) Impedance (Z). (c) Capacitance (C).

TABLE IV
PEARSON CORRELATION COEFFICIENTS FOR RELATIONS BETWEEN SA, AI, AND $T_{1/2}$ VALUES CALCULATED USING IMPEDANCE AND CAPACITANCE DATA AND M INDEX. ALSO SHOWN ARE COEFFICIENTS FOR RELATIONS BETWEEN SA, AI AND $T_{1/2}$ VIA LT DATA AND M INDEX

		Impedance	Capacitance
SA	M index	-0.37	0.84***
	SA by LT	-0.40*	0.68***
AI	M index	0.29	0.81***
	AI by LT	0.23	0.69***
$T_{1/2}$	M index	-0.67**	-0.81***
	$T_{1/2}$ by LT	0.68***	0.69***

Statistical significance of correlation coefficients.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$.

its structure seems relatively simple compared to other biological tissues, its physical properties, including flow behavior [43] and electrical properties [5], [6], [8], [9], are complex. RBC constitute over 99% by volume of the cellular elements and are primarily responsible for these complexities. The electrical properties of blood (i.e., Z and C) are functions of hematocrit and the “effective” geometry of RBC [5], [9], [12], [44], with this geometric term determined by the biological properties of a single cell (e.g., geometry and deformability), by external factors (e.g., shear forces) and by intercellular interactions (e.g., aggregate formation resulting in increased particle size and altered particle geometry). This study confirmed the dependence of Z and C on hematocrit and shape change/orientation due to flow as suggested by earlier theoretical and experimental studies [8], [9], [32], [45]. Alterations of both Z and C were observed during the transition from flow to stasis in which two important changes occur in “effective” geometry: 1) the initial phase of increased Z and C reflects the recovery of RBC morphology for cells initially deformed by shear forces during high-shear flow (corresponding to $\sim 500 \text{ s}^{-1}$ shear rate), with the shape changing from an elongated form to the normal biconcave-discoid shape [46]–[48]; and 2) the later phase of gradual decreases of Z and C reflects RBC aggregate formation, which follows a characteristic time course [17].

It should be noted that this study differs from previous reports owing to its focus on the analysis of the time course of electrical properties of RBC suspensions during the transition from flow to stasis, rather than focusing on measurement of electrical properties at stasis or at various constant flow rates. The transition phase is known to carry important information related to RBC aggregation behavior [20]. It also differs by using a cylindrical test chamber to measure Z and C in the direction of flow across a glass tube filled with a RBC suspension. One millimeter diameter glass tube was selected in order to avoid wall effects [49], and stainless steel tube electrodes were placed at the two ends of the 75 mm long glass tube. At frequencies below 500 kHz, the Z across the tube was $\sim 40 \text{ k}\Omega$ when filled with PBS, $\sim 50 \text{ k}\Omega$ when filled with plasma, and above $100 \text{ k}\Omega$ when filled with RBC suspension at 0.4 l/l hematocrit (see Fig. 3). Most previous studies have employed rectangular or cylindrical flow chambers and electrodes with various orientations (e.g., parallel), the measured Z for blood with such chambers was far below the values obtained in this study [32], [33]. The higher Z of the tube served to reduce the relative contribution of artifacts due to technical issues, such as electrode polarization, the two-electrode configuration used herein may also have contributed to the high Z characterizing the measurement system.

The test signal used in this study (i.e., 1 V) and the high Z of the tube resulted in currents on the order of $10 \mu\text{A}$, when the tube was filled with RBC suspensions, and thus, this current is below the range where current density may interfere with Z and C measurements [9]. Furthermore, the large surface area of the electrodes used in this study also reduced the current density at electrode–suspension interfaces, thus tending to minimize electrode effects. The cylindrical flow chamber geometry allowed measurement of electrical properties of RBC suspensions, using a two-electrode configuration rather than a four-electrode

arrangement. While it has been shown that a four-electrode system is superior to a two-electrode system at frequencies below 20 kHz, both arrangements are equally effective for the frequency range used in this study [31].

Since the C of the RBC suspensions were derived from the Z measured at 100 kHz, using an LCR meter as previously used by other investigators [5], [32], the resulting C values did not exactly reflect RBC membrane capacitance (i.e., C_m in the three-element model of blood bioimpedance, Fig. 1), but are expected to be strongly influenced by this membrane property. Zhao *et al.* have reported a method to calculate C_m based on impedance measurements at three signal frequencies within the β -dispersion range [10]. However, this approach was not applicable for our dynamic measurements during the transition from flow to stasis, since simultaneous measurements at different frequencies were not possible with the present system. Further, preliminary studies using different frequencies for separate measurements of the time course of Z with the same sample indicated slight differences in aggregation response or measurement conditions (e.g., electrode characteristics), calculation of C_m using such multifrequency data was thus also not possible.

The difference of Z and C values measured during flow (i.e., fully disaggregated state) and at stasis (i.e., after the full development of RBC aggregation) was strongly hematocrit dependent (see Fig. 6). In addition, the pattern and magnitude of alterations during the transition period were also markedly affected by hematocrit (see Fig. 6). Both Z and C exhibited a sudden increment immediately after flow stoppage, reached a maximum within a few seconds, and then, began to decline. In addition to the obvious differences in the magnitude of the changes, the time course of these changes also appeared to be hematocrit dependent. This influence of hematocrit can, at least in part, be explained by the well-known influence of hematocrit on RBC aggregation kinetics [21], [23], [42], [50]. It thus seems logical to assume that the time course of C and Z during the transition from flow to stasis should reflect the time course of RBC aggregation. LT through RBC suspensions is well-known to reflect RBC aggregation [21], [22], [27], and includes an abrupt change due to RBC shape recovery followed by increased LT due to the decreased number of individual particles accompanying increased effective particle size (see Fig. 4). Although the changes of Z and C corresponding to shape recovery and aggregation are opposite in sign, their overall behavior are consistent with LT results (see Figs. 6 and 7).

An unexpected finding of this study was the time course of Z changes for nonaggregating suspensions of RBC in PBS [see Fig. 7(b)]. Z changes had the same pattern as those for aggregating suspensions, while such similarity between aggregating and nonaggregating suspensions was not observed for LT and C . Note that the lack of detectable aggregation in RBC–PBS suspensions was confirmed by the contrasting time courses of LT and C measured simultaneously with Z (see Fig. 7). The initial phase of increased Z of RBC suspensions in PBS following flow stoppage can be explained by the shape recovery-disorientation process. However, the time constant of this process is within several hundred milliseconds [46] and cannot be expected to have an influence after this initial phase of a few seconds. This

finding is in conflict with the reports of Pribush *et al.* [33] and Antonova *et al.* [30], and Antonova and Rhia [51], who suggest the aggregation process is reflected by the time course of electrical conductance after the cessation of flow. However, experimental conditions differed between these prior reports and this study: 1) the measurement chamber geometry in both prior studies was not a cylindrical glass tube. Pribush *et al.* measured Z , using two parallel electrodes separated by 2 mm, with the electrode axis perpendicular to the flow axis [33]. Antonova *et al.* used a Couette-type viscometer with platinum electrodes attached to the surfaces of the cup [51]; 2) Pribush *et al.* measured conductances at 200 kHz [33], while Antonova *et al.* used 2 kHz [30], [51]; and 3) no prior study reported results for suspensions of normal RBC in a nonaggregating suspending media. The Z change of nonaggregating RBC suspensions cannot be explained by current experimental evidence and available literature data, and it is not yet clear if this behavior is limited to the particular flow-measurement chamber geometry used in this study.

In addition to the unexpected Z findings for nonaggregating RBC suspensions, Z measurements also failed to correctly reflect altered aggregation induced by plasma dilution or 500 kDa dextran, whereas these alterations were detected by LT and C (see Fig. 7 and Table III). Visual inspection of LT and C curves for RBC suspensions with 1/3 or 1/2 diluted plasma indicate that both overall changes and the rate of change were significantly decreased by plasma dilution. Analysis of LT and C curves indicated, decreased SA and AI aggregation parameters and increased aggregation half time (see Table III). These alterations of RBC aggregation in diluted plasma or plasma + 1% dextran D500 were confirmed by measurements, using commercial instruments designed to quantitate RBC aggregation (see Fig. 5 and Table I). Linear regression analysis and Pearson correlation coefficients also support the merit of LT and C measurements, with significant positive correlations between SA computed from LT and C data and the M index of the Myrenne aggregometer [24]. SA was calculated using Z data did not correlate with the M index. These observations suggest that the time course of Z following stoppage of flow in the cylindrical glass tube is affected by flow-related phenomena that may include, but are not limited to, shear-induced changes in adsorption of macromolecules on electrodes, partial blockage of the interface by adhesion of the dispersed particles [33].

Based upon the discussion aforementioned, our results strongly suggest that capacitance is the preferred electrical parameter to monitor aggregation properties of RBC suspensions. It should be noted that capacitance values obtained in this study are expected to reflect the membrane capacitance of RBC. While merely speculative, it is interesting to consider the observed decrement of C with RBC aggregation in light of the morphology of RBC aggregates: RBC–RBC form face-to-face structures with parallel membrane surfaces (i.e., rouleaux formation). As a result, the membrane capacitance of each cell is in series in aggregates, resulting in a lower equivalent capacitance as RBC aggregation progresses.

The correlations between LT- and C -based parameters versus the M index were comparable (see Table IV), thereby suggesting

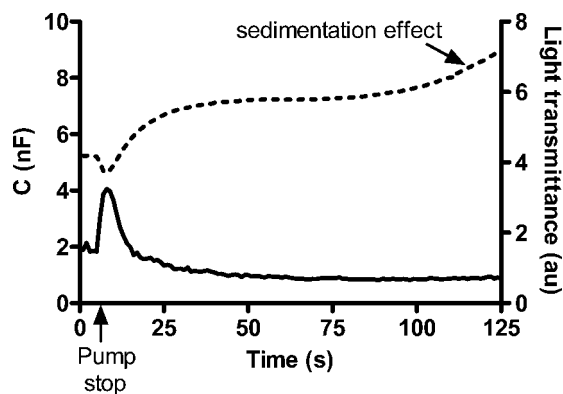


Fig. 9. Simultaneous recordings of LT (---) and series capacitance (—) following sudden stoppage of flow for a normal blood sample with 0.4 I/I hematocrit. The increment of LT during later part of the record (~90 s after the flow stop) reflects RBC sedimentation which does not affect capacitance.

equal usefulness of these two modalities for evaluating RBC aggregation. However, in our system (i.e., horizontal glass tube with LT monitored in a horizontal direction), the LT parameter was sensitive to RBC sedimentation, which started to be evident after ~75 s (see Fig. 9). In contrast, C recorded simultaneously was not affected by sedimentation, yet was similarly sensitive to the aggregation process (see Fig. 9), and thus, this insensitivity to sedimentation should be regarded as an advantage for the C measurements.

In overview, our results indicate that RBC aggregation parameters based upon C data obtained during the transition from flow to stasis are in general agreement with those derived from LT data and with RBC aggregation indexes measured, using commercial instruments. Parameters based on C data were more robust and had much stronger correlations with the generally accepted indexes. Aggregation parameters were calculated, using Z time course data often failed to correlate with known changes of aggregation, even incorrectly indicating aggregation for cells in nonaggregating media (i.e., RBC in PBS). Differences between our results using a horizontal tube and other studies using different chamber geometries, as well as the bases for the failure of Z time course reflecting RBC aggregation, clearly warrant further studies.

REFERENCES

- [1] C. Balan, C. Balut, L. Gheorghe, C. Gheorghe, E. Gheorghiu, and G. Ursu, "Experimental determination of blood permittivity and conductivity in simple shear flow," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 30, pp. 359–364, 2004.
- [2] M. Sosa, J. B. Bernal-Alvarado, M. Jimenez-Moreno, J. C. Hernandez, G. Gutierrez-Jarez, M. Vargas-Luna, R. Huerta, J. C. Villagomez-Castro, and P. Palomares, "Magnetic field influence on electrical properties of human blood measured by impedance spectroscopy," *Bioelectromagnetics*, vol. 26, pp. 564–570, 2005.
- [3] Y. Ulgen and M. Sezdi, "Physiological quality assessment of stored whole blood by means of electrical measurements," *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 45, pp. 653–660, 2007.
- [4] G. A. M. Pop, W. J. Hop, M. van der Jagt, J. Quak, D. Dekkers, Z. Chang, F. J. Gijzen, D. J. Dunncker, and C. J. Slager, "Blood electrical impedance closely matches whole blood viscosity as parameter of hemorheology and inflammation," *Appl. Rheol.*, vol. 13, pp. 305–312, 2003.
- [5] H. Beving, L. E. G. Eriksson, C. L. Davey, and D. B. Kell, "Dielectric properties of human blood and erythrocytes at radio frequencies (0.2–10 MHz); dependence on cell volume fraction and medium composition," *Eur. Biophys. J.*, vol. 23, pp. 207–215, 1994.
- [6] T. X. Zhao and B. Jacobson, "Quantitative correlations among fibrinogen concentration, sedimentation rate and electrical impedance of blood," *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 35, pp. 181–185, 1997.
- [7] H. Fricke, "The Maxwell–Wagner dispersion in a suspension of ellipsoids," *J. Phys. Chem.*, vol. 57, pp. 934–937, 1953.
- [8] R. L. Gaw, B. H. Cornish, and B. J. Thomas, "The electrical impedance of pulsatile blood flowing through rigid tubes: A theoretical investigation," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 55, no. 2, pp. 721–727, Feb. 2008.
- [9] A. E. Hoetink, Th. J. C. Faes, K. R. Visser, and R. M. Heethaar, "On the flow dependency of the electrical conductivity of blood," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 51, no. 7, pp. 1251–1261, Jul. 2004.
- [10] T. X. Zhao, B. Jacobson, and T. Ribbe, "Triple-frequency method for measuring blood impedance," *Physiol. Meas.*, vol. 14, no. 2, pp. 145–156, 1993.
- [11] H. Fricke and S. Morse, "The electrical resistance and capacity of blood for frequencies between 800 and 4.5 million cycles," *J. Gen. Physiol.*, vol. 9, pp. 153–167, 1925.
- [12] H. Fricke, "The electrical capacity of suspensions with special reference to blood," *J. Gen. Physiol.*, vol. 9, pp. 137–152, 1925.
- [13] H. Fricke, "A mathematical treatment of the electrical conductivity and capacity of disperse systems," *Phys. Rev.*, vol. 4, pp. 575–587, 1924.
- [14] L. A. Geddes and C. Sadler, "The specific resistance of blood at body temperature," *Med. Biol. Eng.*, vol. 11, pp. 336–339, 1973.
- [15] S. Chien, "Red cell deformability and its relevance to blood flow," *Ann. Rev. Physiol.*, vol. 49, pp. 177–192, 1987.
- [16] O. K. Baskurt and H. J. Meiselman, "Blood rheology and hemodynamics," *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 29, no. 5, pp. 435–450, Oct. 2003.
- [17] B. Neu and H. J. Meiselman, "Red blood cell aggregation," in *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, O. K. Baskurt, M. R. Hardeman, M. W. Rampling, and H. J. Meiselman, Eds. Amsterdam, The Netherlands: IOS Press, 2007, pp. 114–136.
- [18] O. K. Baskurt, "In vivo correlates of altered blood rheology," *Biorheology*, vol. 45, pp. 629–638, 2008.
- [19] O. K. Baskurt, "Mechanisms of blood rheology alterations," in *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, O. K. Baskurt, M. R. Hardeman, M. W. Rampling, and H. J. Meiselman, Eds. Amsterdam, The Netherlands: IOS Press, 2007, pp. 170–190.
- [20] M. R. Hardeman, P. T. Goedhart, and S. Shin, "Methods in hemorheology," in *Handbook Hemorheology and Hemodynamics*, O. K. Baskurt, M. R. Hardeman, M. W. Rampling, and H. J. Meiselman, Eds. Amsterdam, The Netherlands: IOS Press, 2007, pp. 242–266.
- [21] O. K. Baskurt, H. J. Meiselman, and E. Kayar, "Measurement of red blood cell aggregation in a "plate-plate" shearing system by analysis of light transmission," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 19, no. 4, pp. 307–314, Dec. 1998.
- [22] A. Gaspar-Rosas and G. B. Thurston, "Erythrocyte aggregate rheology by transmitted and reflected light," *Biorheology*, vol. 25, pp. 471–487, 1988.
- [23] M. R. Hardeman, J. G. G. Dobbe, and C. Ince, "The laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 25, no. 1, pp. 1–11, 2001.
- [24] H. Kiesewetter, H. Radtke, R. Schneider, K. Mussler, A. Scheffler, and H. Schmid-Schonbein, "The mini erythrocyte aggregometer: A new apparatus for the rapid quantification of the extent of erythrocyte aggregation," *Biomed. Tech. (Berlin)*, vol. 28, pp. 209–213, 1982.
- [25] S. Shin, Y. Yang, and J. S. Suh, "Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip-based stirring-system by analysis of light transmission and backscattering," *Biorheology*, vol. 45, no. 1–2, pp. 71–72, 2008.
- [26] W. G. Zijlstra, "Syllectometry, a new method for studying rouleaux formation of red blood cells," *Acta Phys. Pharm. Neerl.*, vol. 7, pp. 153–154, 1958.
- [27] H. Schmid-Schoenbein, J. von Gosen, L. Heinrich, H. J. Klose, and E. Volger, "A counter-rotating "rheoscope chamber" for the study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry," *Microvasc. Res.*, vol. 6, pp. 366–376, 1973.
- [28] R. M. Bauersachs, R. B. Wenby, and H. J. Meiselman, "Determination of specific red blood cell aggregation indices via an automated system," *Clin. Hemorheol.*, vol. 9, pp. 1–25, 1989.
- [29] O. K. Baskurt, M. Uyuklu, P. Ulker, M. Cengiz, N. Nemeth, T. Alexy, S. Shin, M. R. Hardeman, and H. J. Meiselman, "Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 43, pp. 283–298, 2009.
- [30] N. Antonova, P. Riha, and I. Ivanov, "Time dependent variation of human blood conductivity as a method for an estimation of RBC aggregation," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 39, pp. 69–78, 2008.

- [31] Z. Chang, G. A. M. Pop, and G. C. M. Meijer, "A comparison of two and four electrode techniques to characterize blood impedance for the frequency range of 100 Hz to 100 MHz," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 55, no. 3, pp. 1247–1249, Mar. 2008.
- [32] A. Pribush, H. J. Meiselman, D. Meyerstein, and N. Meyerstein, "Dielectric approach to the investigation of erythrocyte aggregation. Part I. Experimental basis of the method," *Biorheology*, vol. 36, no. 5–6, pp. 411–423, 1999.
- [33] A. Pribush, D. Meyerstein, and N. Meyerstein, "Conductometric study of shear-dependent processes in red cell suspensions. I. Effect of red blood cell aggregate morphology on blood conductance," *Biorheology*, vol. 41, no. 1, pp. 13–28, 2004.
- [34] A. Pribush, L. Hatzkelson, D. Meyerstein, and N. Meyerstein, "A novel technique for quantification of erythrocyte aggregation abnormalities in pathophysiological situations," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 36, pp. 121–132, 2007.
- [35] O. K. Baskurt, M. Uyuklu, and H. J. Meiselman, "Simultaneous monitoring of electrical conductance and light transmittance during red blood cell aggregation," *Biorheology*, vol. 46, pp. 239–249, 2009.
- [36] O. K. Baskurt, M. Boynard, G. R. Cokelet, P. Connes, B. M. Cooke, S. Forconi, F. Liao, M. R. Hardeman, F. Jung, H. J. Meiselman, G. B. Nash, N. Nemeth, B. Neu, B. Sandhagen, S. Shin, G. B. Thurston, and J. L. Wautier, "New guidelines for hemorheological laboratory techniques," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 42, pp. 75–97, 2009.
- [37] S. Chien, "Biophysical behaviour of red cells in suspensions," in *The Red Blood Cell*, 2nd ed., D. M. Surgenor, Ed. New York: Academic, 1975, pp. 1031–1133.
- [38] O. K. Baskurt, M. Bor-Kucukatay, O. Yalcin, H. J. Meiselman, and J. K. Armstrong, "Standard aggregating media to test the "aggregability" of rat red blood cells," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 22, no. 2, pp. 161–166, 2000.
- [39] *Instruction Manual 3532-50 LCR Hitester*, Hioki EE Corp., Nagano, Japan, 2006, pp. 1–180.
- [40] D. Holder, "Brief introduction to bioimpedance," in *Electrical Impedance Tomography*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005, pp. 411–422.
- [41] T. W. Secomb and A. R. Pries, "Basic principles of hemodynamics," in *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, O. K. Baskurt, M. R. Hardeman, M. W. Rampling, and H. J. Meiselman, Eds. Amsterdam, The Netherlands: IOS Press, 2007, pp. 289–306.
- [42] S. Shin, Y. Yang, and J. S. Suh, "Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip-based stirring system by light transmission," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 41, pp. 197–207, 2009.
- [43] G. R. Cokelet and H. J. Meiselman, "Macro and microrheological properties of blood," in *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, O. K. Baskurt, M. R. Hardeman, M. W. Rampling, and H. J. Meiselman, Eds. Amsterdam, The Netherlands: IOS Press, 2007, pp. 45–71.
- [44] H. Fricke, "Relation of the permittivity of biological cell suspensions to fractional cell volume," *Nature*, vol. 172, no. 4381, pp. 731–732, 1953.
- [45] A. Pribush, H. J. Meiselman, D. Meyerstein, and N. Meyerstein, "Dielectric approach to investigation of erythrocyte aggregation. II. Kinetics of erythrocyte aggregation-disaggregation in quiescent and flowing blood," *Biorheology*, vol. 37, no. 5–6, pp. 429–441, 2000.
- [46] O. K. Baskurt and H. J. Meiselman, "Determination of red blood cell shape recovery time constant in a Couette system by the analysis of light reflectance and ektacytometry," *Biorheology*, vol. 33, no. 6, pp. 489–503, Nov. 1996.
- [47] R. M. Hochmuth, "Deformability and viscoelasticity of human erythrocyte membrane," *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 41, pp. 63–66, 1981.
- [48] S. P. Suter, E. R. Mueller, and G. I. Zahalak, "Extensional recovery of an intact erythrocyte from a tank-treading motion," *J. Biomech. Eng.*, vol. 112, pp. 250–256, 1990.
- [49] H. A. Barnes, "A review of the slip (wall depletion) of polymer solutions, emulsions and particle suspensions in viscometers: Its cause, character and cure," *J. Non-Newtonian Fluid Mech.*, vol. 56, pp. 221–251, 1995.
- [50] L. H. Deng, J. C. Barbenel, and G. D. O. Lowe, "Influence of hematocrit on erythrocyte aggregation kinetics for suspensions of red blood cells in autologous plasma," *Biorheology*, vol. 31, pp. 193–205, 1994.
- [51] N. Antonova and P. Riha, "Studies of electrorheological properties of blood," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 35, pp. 19–29, 2006.



Oguz K. Baskurt was born in Istanbul, Turkey, in 1956. He received the M.D. and Ph.D. degrees in physiology from Hacettepe University, Ankara, Turkey.

He is currently engaged as a Professor with the Department of Physiology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya. He conducted extensive research mostly in the fields of red blood cell aggregation, comparative hemorheology, and *in vivo* hemorheology. He has authored or coauthored more than 150 papers, mostly in international and peer-reviewed journals. He is author of a book entitled *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. His current research interests include the rheological properties of blood and their physiological significance.

Dr. Baskurt was the President of the International Society for Clinical Hemorheology from 1999 to 2005. He is on the editorial boards of several international journals.



Mehmet Uyuklu was born in Kahramanmaraş, Turkey, in 1977. He received the M.S. degree in physiology from the Akdeniz University, Antalya, Turkey, in 2006, where he is working toward the Ph.D. degree in the Department of Physiology, Faculty of Medicine.

He is currently engaged as a Research Assistant with the Department of Physiology, Faculty of Medicine. His research interests include red blood cell aggregation, importance of red blood cell factors in aggregation, role of hemorheological factors in hemodynamics, hemorheological instrumentation, and comparative hemorheology.



Herbert J. Meiselman was born in Jamestown, NY, in 1940. He received the Sc.D. degree in chemical engineering from the Massachusetts Institute of Technology, Cambridge.

He is currently a Professor and a Vice-Chair with the Department of Physiology and Biophysics, Keck School of Medicine, Los Angeles, CA. His research interests include the physicochemical and rheological properties of blood and its cellular components: normal and pathologic blood, cell mechanics, the mechanism of red cell aggregation, and comparative studies of various mammalian species. He has authored or coauthored more than 250 peer-review papers and has edited three books including the *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*.

Dr. Meiselman is currently a President of the International Society of Clinical Hemorheology and engaged on the Editorial Board of *Biorheology* and *Clinical Hemorheology and Microcirculation*.

Photometric measurements of red blood cell aggregation: light transmission versus light reflectance

Oguz K. Baskurt

Mehmet Uyuklu

Akdeniz University
Department of Physiology
Faculty of Medicine
Antalya
Turkey

Max R. Hardeman

Academic Medical Center
Department of Physiology
Amsterdam
The Netherlands

Herbert J. Meiselman

University of Southern California
Keck School of Medicine
Department of Physiology and Biophysics
Los Angeles, California 90089

Abstract. Red blood cell (RBC) aggregation is the reversible and regular clumping in the presence of certain macromolecules. This is a clinically important phenomenon, being significantly enhanced in the presence of acute phase reactants (e.g., fibrinogen). Both light reflection (LR) and light transmission (LT) from or through thin layers of RBC suspensions during the process of aggregation are accepted to reflect the time course of aggregation. It has been recognized that the time courses of LR and LT might be different from each other. We aim to compare the RBC aggregation measurements based on simultaneous recordings of LR and LT. The results indicate that LR during RBC aggregation is characterized by a faster time course compared to simultaneously recorded LT. This difference in time course of LR and LT is reflected in the calculated parameters reflecting the overall extent and kinetics of RBC aggregation. Additionally, the power of parameters calculated using LR and LT time courses in detecting a given difference in aggregation are significantly different from each other. These differences should be taken into account in selecting the appropriate calculated parameters for analyzing LR or LT time courses for the assessment of RBC aggregation. © 2009 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers. [DOI: 10.1117/1.3251050]

Keywords: erythrocyte rouleaux formation; syllectometry; acute phase reactions.

Paper 09216R received Jun. 2, 2009; revised manuscript received Aug. 21, 2009; accepted for publication Aug. 28, 2009; published online Oct. 23, 2009.

1 Introduction

The reversible aggregation of red blood cells (RBCs) is a physiological phenomena influenced by both plasma and cellular properties.¹⁻³ This process is significantly affected in various pathophysiological processes (e.g., acute phase reactions),^{4,5} it influences *in vivo* blood flow,⁶⁻⁸ and thus has clinical significance. Most methods used to quantitate aggregation are based on monitoring the optical properties of RBC suspensions. The level of light transmission (LT) through or light reflectance (LR) from RBC suspensions during aggregation reflects the time course of this process. The time course of LT or LR recorded following the dispersion of existing aggregates in RBC suspensions can be analyzed and various indices reflecting both the kinetics and the overall intensity of aggregation can be calculated.⁹ Such measurements of RBC aggregation using LR data from RBC suspensions have been termed "syllectometry"¹⁰ and have been developed into a commercial instrument.¹¹ LT data have also been successfully used in various instruments developed to quantitate RBC aggregation,¹²⁻¹⁴ Both LT and LR methods utilize similar approaches to calculate parameters reflecting the time course and the intensity of aggregation.^{11,12,14}

In general, both LT and LR of RBC suspensions during aggregation are expected to be influenced by the same physi-

cal alterations of the suspension properties. The average particle size grows while the number of particle, including both individual cells and aggregates, become smaller during the course of aggregation, resulting in decreased LR and increased LT. Although these two properties of RBC suspensions (LR and LT) reflect the same process, it has been demonstrated^{15,16} that their time courses are not identical (i.e., they are not mirror images of each other). Therefore, it might be expected that at least the parameters reflecting the kinetics of aggregation may differ when measured using LR or LT data. However, it is not clear if differences of such parameters can influence the power of the methods or instruments to detect alterations in aggregation. This study was designed to compare (1) the parameters calculated using LR and LT data recorded during the aggregation process following an abrupt cessation of shear and (2) the power of these parameters to detect the experimental alterations in the aggregation behavior of RBC suspensions.

2 Materials and Methods

2.1 Preparation of RBC Suspensions

Venous blood samples (~25 ml) were obtained from 10 healthy male volunteers, aged between 25 to 52 yr, following the guidelines for hemorheological laboratory methods.¹⁷ A tourniquet was applied to locate the antecubital vein prior to venipuncture and kept in place during the blood sampling.

Address all correspondence to: Oguz K. Baskurt, Dr., Akdeniz University, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Antalya, Turkey. Tel: +90 242 249 6963; Fax: +90 242 227 4483; E-mail: baskurt@akdeniz.edu.tr

Blood samples were obtained using vacuum tubes (Vacutainer; Becton-Dickinson, New Jersey) containing dipotassium ethylenediamine-tetraacetic acid (K_2EDTA , 1.8 mg/ml) as the anticoagulant. All blood sampling was completed within 2 min after the application of the tourniquet.

A 5-ml aliquot of each sample was saved for control measurements and the remaining 20 ml of each sample was centrifuged at $1400 \times g$ for 6 min, the buffy coat removed, and the plasma aspirated and saved. RBCs were washed twice with isotonic phosphate-buffered saline (PBS, pH=7.4), then resuspended as described in the following.

Native plasma was diluted with PBS at ratios of 1/3 and 1/2 to yield altered plasma containing 66 and 50% of the components in undiluted plasma. Washed RBCs from each donor were resuspended in the diluted plasmas at 0.4 l/l hematocrit. Diluting plasma with PBS results in reduced RBC aggregation due to lower concentrations of proaggregating plasma proteins.¹⁸ Additionally, washed RBCs from each donor were suspended in PBS containing 1% dextran 500 (500 kDa, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) at 0.4 l/l hematocrit, resulting in increased RBC aggregation compared to suspensions in undiluted native plasma.¹⁹

The hematocrit of all samples was adjusted to 0.4 l/l by adding or removing calculated amounts of suspending medium after determining hematocrit by the microcapillary method.¹⁷ Since the degree of hemoglobin oxygenation has been demonstrated to influence RBC aggregation parameters, especially those calculated²⁰ based on the time course of LR, all samples were carefully oxygenated prior to measurement by rolling 3 ml of suspension in a horizontal 15-ml polypropylene tube for 5 min at 37°C. All measurements of LT and LR were performed at 37°C.

2.2 Recordings of LT and LR during RBC Aggregation

LT and LR were recorded simultaneously during RBC aggregation using the laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA; RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands) which was modified to record LT in addition to the usual LR. The system has been previously described elsewhere.¹¹ In brief, it consists of a Couette shearing system consisting of a glass cup and a precisely fitting bob with a 0.3-mm gap between the cylinders; the RBC suspension is contained in the gap. The outer cylinder is rotated by a stepper motor controlled by a digital computer. The beam from a laser diode (670 nm, 4 mW) mounted in the bob is directed onto the sheared sample, and the reflected light is recorded by two photodiodes in the bob. The LR signal from these two photodiodes was obtained from the LORCA and fed to an analog-to-digital converter (USB-6009; National Instruments, Texas) via a signal conditioning circuit to adjust signal amplitude and offset. Additionally, a phototransistor (BP101, Siemens, Germany) was positioned immediately adjacent to the outside of the cup in the pathway of the laser light to monitor the transmitted light through the blood sample, and connected to a second channel of the analog-to-digital converter. LR and LT signals were digitized at a sampling rate of 10 Hz and recorded on a separate digital computer using LabView 8.2 (National Instruments, Texas).

LT and LR were recorded during the usual aggregation protocol of the LORCA. Briefly, the sample is first sheared at

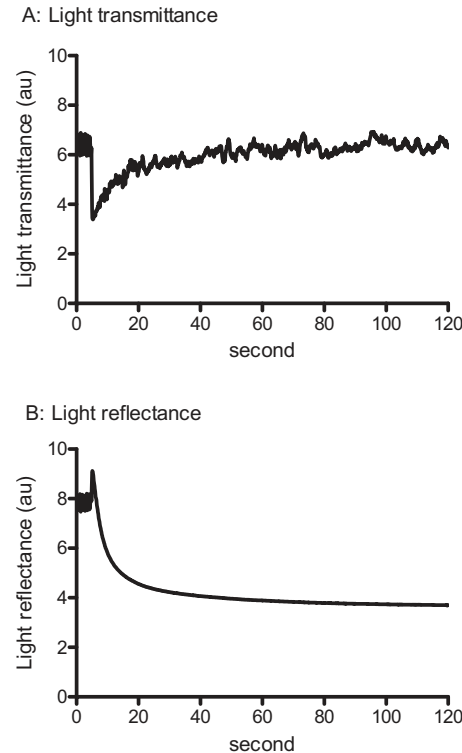


Fig. 1 Time course of (a) LT through and (b) LR from blood between the bob and cup of the LORCA during RBC aggregation.

a shear rate of 500 s^{-1} to disperse preexisting RBC aggregates, following which the shear is abruptly stopped. LT and LR data are recorded for 120 s using software developed using LabView 8.2, and the resulting LR or LT versus time profiles analyzed to determine several indices reflecting both the magnitude and time course of aggregation. The following parameters were calculated: (1) amplitude (AMP), the total change in intensity of transmitted or reflected light during the 120-s period; (2) aggregation half time ($T_{1/2}$), the time required to reach a LT or LR level corresponding to 50% of AMP; (3) surface area (SA), the area below (for LT) or above (for LR) the time course curve during the first 10 s; and (4) aggregation index (AI), the ratio of the area below (for LT) or above (for LR) the time course curve to the sum of the areas above and below the curve during the first 10 s. Additionally, time constants for the fast (T_{fast}) and slow (T_{slow}) components of RBC aggregation were calculated by fitting LR or LT versus time data to a double-exponential equation:

$$I_t = a + b \exp(-t/T_{\text{fast}}) + c \exp(-t/T_{\text{slow}}). \quad (1)$$

In this equation T_{fast} reflects the time course of 2-D rouleaux formation, while T_{slow} represents the formation of 3-D structures resulting from secondary aggregation. Accordingly, the terms b and c correspond to the changes of reflected or transmitted light intensity due to these processes, whereas the a term is the light intensity at the end of the measurement period.⁹

Table 1 Aggregation parameters calculated using LT and LR data for whole blood, RBC suspensions in 1/3 and 1/2 diluted plasma, and 1% dextran 500.

	LT			
	Whole Blood	RBCs in 1/3 Diluted Plasma	RBCs in 1/2 Diluted Plasma	1% dextran 500
AMP (au)	4.09±0.32	1.69±0.28**	0.74±0.13**	3.75±0.27
SA (au)	179.30±17.45	48.58±8.49**	19.96±2.95**	182.80±9.90
AI	43.11±1.95	31.70±6.42	33.26±8.19	45.97±1.73
$T_{1/2}$ (s)	5.75±0.56	14.30±2.81*	20.22±4.63**	4.87±0.50
T_{fast} (s)	3.32±0.35	7.35±2.12	10.25±5.32	3.07±0.47
T_{slow} (s)	48.38±7.39	102.4±37.9	68.25±22.01	61.61±19.29
	LR			
	Whole Blood	RBCs in 1/3 Diluted Plasma	RBCs in 1/2 Diluted Plasma	1% dextran 500
AMP (au)	4.58±0.26	5.38±0.20*	4.77±0.24	8.55±0.45**
SA (au)	305.41±17.75 ^{†††}	207.40±21.13	136.33±21.59**	621.60±57.47**
AI	66.29±2.31 ^{†††}	38.29±3.96**	27.54±3.71**	76.81±0.47*
$T_{1/2}$ (s)	2.27±0.22 ^{†††}	7.89±1.09*	13.66±2.50**	1.16±0.03
T_{fast} (s)	2.35±0.21 [†]	5.89±0.73	12.46±3.17*	1.26±0.03*
T_{slow} (s)	19.47±1.92 ^{††}	38.62±4.6*	38.34±7.27**	26.04±5.87

All hematocrits adjusted to 0.4 l/l. Data are mean±SE; $n=10$ for each type of suspension. Difference from whole blood: *, $p<0.05$; **, $p<0.01$. Difference of LR results from LT results are shown only for the whole blood samples: †, $p<0.05$; ††, $p<0.01$; †††, $p<0.001$.

2.3 Calculations and Statistics

The results of the measurements on RBC suspensions with normal and modified aggregation are expressed as mean±standard error (SE). Statistical comparisons were done using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by appropriate posttests. Additionally, standardized differences from control values were calculated by dividing the mean difference between control and modified RBC suspensions by the “pooled standard deviation” of the control plus modified data. That is,

$$\text{St.Diff.} = \frac{M_c - M_m}{SD_p}, \quad (2)$$

where M_c and M_m are the means of the selected parameter for control and modified samples prepared using RBC from 10 donors. SD_p was calculated as the square root of the average of the squared standard deviations (SD_c and SD_m) of the data from the control and modified samples being compared:²¹

$$SD_p = \left(\frac{SD_c^2 + SD_m^2}{2} \right)^{1/2}. \quad (3)$$

The standardized difference has been accepted as a measure of the power of a specific measurement condition to detect a difference between two groups.²²

3 Results

Typical time courses of LT and LR signals for normal blood at 0.4 l/l hematocrit are presented in Fig. 1. LT exhibits a very sudden decrement following the abrupt cessation of shear, reaching a minimum in about 0.1 s. This minimum level of LT is followed by an increase that is initially rapid during the first several seconds and then occurs at a slower rate. Although this time course was clearly visible, there were rapid, random fluctuations of LT with amplitudes sometimes about one-third of the initial decline [Fig. 1(a)]. The LR time course [Fig. 1(b)] is characterized by an initial peak after the shearing is stopped and then an initial fast decrement of LR. The change in LR then slows over several seconds and continues to change slowly throughout the recording up to 120 s. There were no random fluctuations in LR similar to those seen for LT.

A comparison of LT and LR curves for whole blood during aggregation indicates a faster time course for LR and the time constants $T_{1/2}$, T_{fast} , and T_{slow} , with all three constants being significantly smaller than those calculated using LT data (Table 1). Additionally, the SA and AI parameters were higher if calculated using LR data while AMP values calculated by LR and LT for whole blood were not significantly different (Table 1).

Parameters calculated using LT and LR curves of RBC suspensions in diluted plasma and in 1% dextran 500 are also shown in Table 1. AMP and SA values calculated using LT were very significantly reduced by plasma dilution and $T_{1/2}$ was significantly increased, whereas AI, T_{fast} , and T_{slow} were not sensitive to dilution. In contrast, the time course parameters calculated using LR were more sensitive to plasma dilutions while AMP and SA were not; there was even an increase of AMP above whole blood for the 1/3 diluted plasma.

RBC suspended in 1% dextran 500 were characterized by very significantly higher AMP and SA when calculated using LR ($p < 0.01$) data, while time course parameters were less affected (Table 1). Interestingly, none of the parameters calculated using LT were sensitive to the enhanced RBC aggregation in these dextran 500 suspensions.

Standardized differences from normal blood values for RBC suspensions with modified aggregation were calculated using the data presented in Table 1. The calculated values indicate an interesting contrast between results using LT or LR [Figs 2(a)–2(c)]: (1) parameters reflecting the overall extent of aggregation (i.e., SA) and thus those less affected by the kinetics of aggregation had a higher power to detect altered aggregation if calculated using LT curves; and (2) kinetic parameters reflecting the time course of aggregation generally had higher power if calculated using LR curves. Note that the low standardized differences for RBC in 1% dextran 500 [Fig. 2(c)] confirm the insensitivity of LT-based parameters for alterations in these highly aggregating suspensions (Table 1).

Since the differences between the calculated values of AMP using LT or LR data were most obvious for this parameter [Fig. 2(b)], the AMP term was further evaluated to determine its dependence on the duration of time after the start of aggregation process (Table 2). AMP values calculated using LT data for whole blood exhibited a significant dependence on the duration (e.g., at 10 s it was 62% of the value reached at 120 s), while this dependence was less pronounced for LR data (e.g., at 10 s, 86% of the value at 120 s). This dependence of AMP on the duration after stopping shear became more pronounced for RBC suspended in diluted plasma: (1) for 1/3 diluted plasma, AMP calculated at 10 s was 43% of the 120 s value for LT and 56% for LR and (2) for 1/2 diluted plasma, AMP calculated at 10 s using LT data was 38% of the 120 s value and 42% for LR. Thus, both LT and LR curves had slower time courses for RBCs suspended in diluted plasma. Standardized differences for AMP calculated using LT or LR at various time points after the start of aggregation offer additional insight into the two measurement methods: in 1/2 diluted plasma suspensions, standardized differences for AMP using LR decreased with increasing time period after the start of aggregation whereas AMP using LT data was insensitive to the elapsed time (Fig. 3).

4 Discussion

Our results indicate that the time course of LT and LR recorded simultaneously during RBC aggregation are significantly different: (1) LR changes faster during aggregation and (2) LT data are characterized by random fluctuations of the signal superimposed on the characteristic time course, reflecting the aggregation process. These fluctuations are similar to

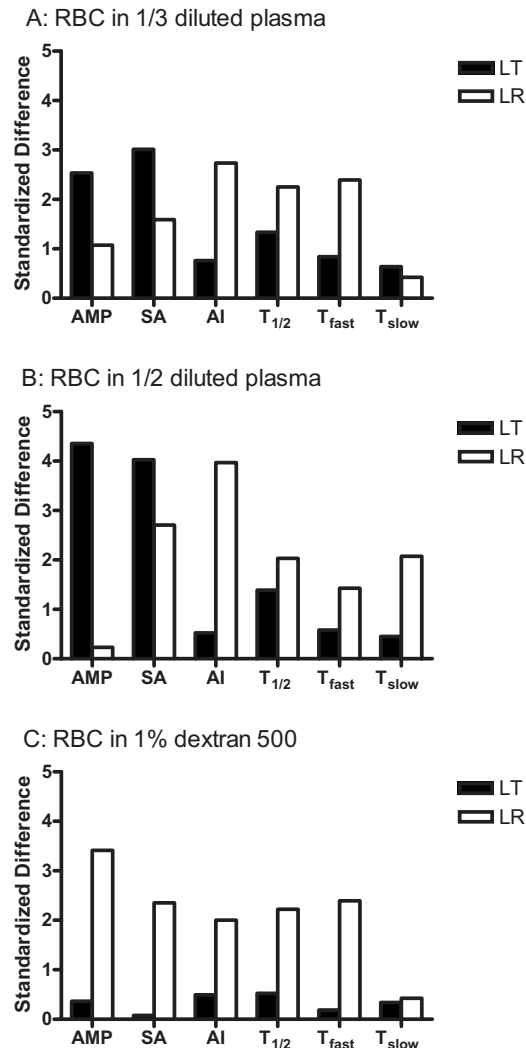


Fig. 2 Standardized differences from whole blood of RBC aggregation parameters for RBC suspended in (a) 1/3 and (b) 1/2 diluted plasma and in (c) 1% dextran 500. The parameters were calculated using LT or LR data in Table 1.

those reported by Singh and Kumavarel who suggest that they represent the instantaneous changes in aggregate size and number of cells per aggregate.²³

The difference in the time course of LT and LR signals was also reflected by the calculated parameters that are widely utilized by instruments developed to quantitate RBC aggregation^{11–14} (Table 1). These findings confirm the previous report by Gaspar-Rosas and Thurston,¹⁵ who also reported faster time courses for reflected light during RBC aggregation when using a chamber consisting of two parallel glass plates. Their calculations of time constants yielded values consistent with those obtained via LT and LR in this study. It is notable that the time constants calculated via LT data reported by Gaspar-Rosas and Thurston were strongly influenced by the thickness of the blood layer, with data reported for 0.125- and 0.508-mm layers. However, since the thickness of the blood layer between the bob and cup in the LORCA is 0.3 mm, their time constants are not directly comparable with our values.¹⁵

Table 2 AMP parameters calculated at various time points after the sudden stop of shearing for whole blood and RBCs suspended in 1/3 and 1/2 diluted plasma.

LT					
AMP	10 s	20 s	40 s	60 s	120 s
Whole blood	2.52 ± 0.22	2.98 ± 0.24	3.46 ± 0.27	3.75 ± 0.29	4.09 ± 0.32
RBC in 1/3 diluted plasma	0.72 ± 0.10	0.96 ± 0.12	1.24 ± 0.17	1.42 ± 0.22	1.69 ± 0.28
RBC in 1/2 diluted plasma	0.28 ± 0.04	0.38 ± 0.05	0.50 ± 0.07	0.59 ± 0.09	0.74 ± 0.13
LR					
AMP	10 s	20 s	40 s	60 s	120 s
Whole blood	3.94 ± 0.22	4.23 ± 0.23	4.45 ± 0.25	4.55 ± 0.25	4.58 ± 0.26
RBC in 1/3 diluted plasma	3.02 ± 0.23	3.92 ± 0.19	4.65 ± 0.17	5.00 ± 0.17	5.38 ± 0.20
RBC in 1/2 diluted plasma	2.00 ± 0.20	2.88 ± 0.23	3.70 ± 0.22	4.12 ± 0.22	4.77 ± 0.24

Data are mean $\pm$ SE; $n=10$ for each sample.

The difference between the LT and the LR time relations during RBC aggregation can be explained based on the relative contribution of RBCs located at various depths of the blood film under investigation. It can be assumed that RBCs close to the surface facing the incident light are mostly responsible for the reflected light, while transmitted light intensity is affected by the entire thickness of the RBC suspension.¹⁵ RBC aggregation kinetics might well be influenced by geometrical constraints due to the presence of solid surfaces (e.g., parallel plates or cylindrical bob used in this study), thereby affecting the time course of aggregation. Supporting this explanation, Gaspar-Rosas and Thurston report that the values of aggregation time constants calculated using LR data are less affected by blood layer thickness than those using LT data.¹⁵

The different time courses and time constants for LT and LR also influenced the sensitivity of the calculated parameters to modified RBC aggregation. There is an interesting contrast

between the results based on LT or LR data (Figs. 2 and 3): (1) the AMP parameter reflecting the overall extent of aggregation was very sensitive to changes due to plasma dilution, but only if this parameter was calculated using LT data. AMP values calculated using LR data showed no change for 1/2 dilution and an unexpected increase of AMP even though the concentration of pro-aggregating proteins was reduced; (2) parameters reflecting the time course of aggregation ($T_{1/2}$, T_{fast} , and T_{slow}) were more sensitive to alterations in RBC aggregation due to plasma dilutions if they were calculated using LR data; and (3) all parameters reflecting both the extent and time course of aggregation were sensitive to the enhanced aggregation in 1% dextran 500 solution.²⁴ only if they were calculated using LR data. In particular, AMP and SA parameters using LR data were doubled in the dextran suspensions compared to whole blood, while there were no significant changes of these parameters using LT data. Such striking differences also suggest different dynamics of aggregate formation at the locations within the suspension that are sensed by LT and LR monitoring. Gaspar-Rosas and Thurston also reported contrasting features for LT and LR such as different dependences of aggregation time constants on blood layer thickness: aggregation time constants based on LT decreased with increasing blood layer thickness, while they were slightly increased if based on LR data.¹⁵

A major aim of this study was to compare the power of various parameters to detect given alterations in RBC aggregation when calculated using LT or LR data. Standardized differences (see Sec. 2.3) between RBC suspensions with normal and experimentally altered aggregation (i.e., plasma dilution or 1% dextran 500) were used as an indicator of the power for a parameter.²² A contrast similar to that already discussed was also obvious when considering standardized difference data (Fig. 2), with the results for 1/2 plasma dilution being typical. First, the AMP parameter, which reflects

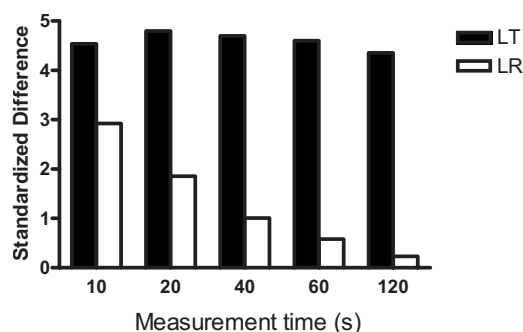


Fig. 3 Standardized differences of AMP for RBC suspended in 1/2 diluted plasma compared to whole blood; values were calculated using LT and LR data at various time points after the start of aggregation (Table 2).

the extent of RBC aggregation over the 120-s recording period, was the most powerful parameter (i.e., parameter with highest standardized difference) to reduced aggregation due to plasma dilution when using LT data, while the same parameter based on LR had the least power and was almost equal to zero [Fig. 2(b)]. Second, the SA parameter based on LT data had a high standardized difference while the same parameter calculated based on LR data has only a modest power. Note that the SA parameter is affected by both the magnitude of the signal change due to aggregation and its time course, and therefore reflects a mixture of both properties. Third, AI, $T_{1/2}$, T_{fast} , and T_{slow} exhibited higher power if they were calculated using LR data. Finally, standardized differences for RBC suspended in PBS containing 1% dextran 500 confirmed the insensitivity of parameters calculated using LT data.

The sensitivity of the AMP parameter calculated using LR data was significantly affected by the length of the period selected for analysis, with the power for RBC suspended in diluted plasma being highest if the analyzed period following the abrupt cessation of shear was shorter. This dependence on analysis period can be interpreted as being related to the fast time course of LR. It can be assumed that LR from the layers of a RBC suspension changes between a maximum corresponding to the totally disaggregated status and a minimum level corresponding to extensive aggregation. Since LR has a faster time course, the signal could approach the minimum level for both normal and reduced RBC aggregation suspensions if the analysis period is sufficiently long, thereby preventing detection of the given alteration. Alternatively, if calculations were limited to shorter time periods, differences in aggregation tendency would more likely to be detected, and thus reducing the analysis time to shorter periods is strongly recommended for measurements based on LR. Note that due to the slower time course of the LT signal, the duration of analysis period did not affect the AMP parameter to the same extent.

In overview, our results indicate that RBC aggregation parameters calculated using LR and LT versus time data may not be directly comparable when using the same mathematical approaches for the two modalities. Furthermore, the power of the parameters calculated using LR and LT data for detecting alterations of RBC aggregation also differ from each other. These characteristics of the parameters therefore should be considered when selecting appropriate indices to quantitate RBC aggregation. In general, when using measurements based on LR, either parameters sensitive to the time course of RBC aggregation should be used or the analysis period should be short. Alternatively, when using measurements based on LT, parameters sensitive to the overall extent of RBC aggregation (e.g., AMP, SA) are appropriate.

Acknowledgments

This study supported by National Institutes of Health (NIH) Research Grants HL15722, HL 70595, and HL 090511, by the Akdeniz University Research Projects Unit.

References

1. H. J. Meiselman, "Red blood cell aggregation: 45 years being curious," *Biorheology* **46**, 1–19 (2009).

2. B. Neu and H. J. Meiselman, "Red blood cell aggregation," in *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, pp. 114–136, IOS Press, Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington, DC (2007).
3. M. W. Rampling, H. J. Meiselman, B. Neu, and O. K. Baskurt, "Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation," *Biorheology* **41**, 91–112 (2004).
4. O. K. Baskurt, "Mechanisms of blood rheology alterations," in *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, pp. 170–190, IOS Press, Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington, DC (2007).
5. M. W. Rampling, "Haemorheology and the inflammatory process," *Clin. Hemorheol Microcirc* **19**, 129–132 (1998).
6. O. K. Baskurt, "In vivo correlates of altered blood rheology," *Biorheology* **45**, 629–638 (2008).
7. O. Yalcin, M. Uyuklu, J. K. Armstrong, H. J. Meiselman, and O. K. Baskurt, "Graded alterations of RBC aggregation influence in vivo blood flow resistance," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H2644–H2650 (2004).
8. O. Yalcin, H. J. Meiselman, J. K. Armstrong, and O. K. Baskurt, "Effect of enhanced red blood cell aggregation on blood flow resistance in an isolated-perfused guinea pig heart preparation," *Biorheology* **42**, 511–520 (2005).
9. M. R. Hardeman, P. T. Goedhart, and S. Shin, "Methods in hemorheology," in *Handbook Hemorheology and Hemodynamics*, pp. 242–266, IOS Press, Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC (2007).
10. W. G. Zijlstra, "Syllectometry, a new method for studying rouleaux formation of red blood cells," *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl* **7**, 153–154 (1958).
11. M. R. Hardeman, J. G. G. Dobbe, and C. Ince, "The laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer," *Clin. Hemorheol Microcirc* **25**, 1–11 (2001).
12. O. K. Baskurt, H. J. Meiselman, and E. Kayar, "Measurement of red blood cell aggregation in a 'plate-plate' shearing system by analysis of light transmission," *Clin. Hemorheol Microcirc* **19**, 307–314 (1998).
13. H. Kiesewetter, H. Radtke, R. Schneider, K. Mussler, A. Scheffler, and H. Schmid-Schonbein, "The mini erythrocyte aggregometer: a new apparatus for the rapid quantification of the extent of erythrocyte aggregation," *Biomed. Tech.* **28**, 209–213 (1982).
14. S. Shin, Y. Yang, and J. S. Suh, "Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip-based stirring system by light transmission," *Clin. Hemorheol Microcirc* **41**, 197–207 (2009).
15. A. Gaspar-Rosas and G. B. Thurston, "Erythrocyte aggregate rheology by transmitted and reflected light," *Biorheology* **25**, 471–487 (1988).
16. S. Shin, Y. Yang, and J. S. Suh, "Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip-based stirring-system by analysis of light transmission and backscattering," *Biorheology* **45**, 71–72 (2008).
17. O. K. Baskurt, M. Boynard, G. R. Cokelet, P. Connes, B. M. Cooke, S. Forconi, F. Liao, M. R. Hardeman, F. Jung, H. J. Meiselman, G. B. Nash, N. Nemeth, B. Neu, B. Sandhagen, S. Shin, G. B. Thurston, and J. L. Wautier, "New guidelines for hemorheological laboratory techniques," *Clin. Hemorheol Microcirc* **42**, 75–97 (2009).
18. S. Chien, "Biophysical behaviour of red cells in suspensions," in *The Red Blood Cell*, D. M. Surgenor, Ed., pp. 1031–1133, Academic Press, New York (1975).
19. O. K. Baskurt, M. Bor-Kucukatay, O. Yalcin, and H. J. Meiselman, "Aggregation behavior and electrophoretic mobility of red blood cells in various mammalian species," *Biorheology* **37**, 417–428 (2000).
20. M. Uyuklu, H. J. Meiselman, and O. K. Baskurt, "Effect of hemoglobin oxygenation level on red blood cell deformability and aggregation parameters," *Clin. Hemorheol Microcirc* **41**, 179–188 (2009).
21. J. Cohen, *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, NJ (1988).
22. J. Stuart, P. C. W. Stone, G. Freyburger, M. R. Boisseau, and D. G. Altman, "Instrument precision and biological variability determine the number of patients required for rheological studies," *Electron. J. Biotechnol.* **9**, 181–197 (1989).
23. M. Singh and M. Kumaravel, "Sequential analysis of erythrocyte aggregation in health and diseases," *Clin. Hemorheol Microcirc* **17**, 319–324 (1997).
24. O. K. Baskurt, M. Bor-Kucukatay, O. Yalcin, H. J. Meiselman, and J. K. Armstrong, "Standard aggregating media to test the 'aggregability' of rat red blood cells," *Clin. Hemorheol Microcirc* **22**, 161–166 (2000).

Simultaneous monitoring of electrical conductance and light transmittance during red blood cell aggregation *

O.K. Baskurt ^{a,**}, M. Uyuklu ^a and H.J. Meiselman ^b

^a *Department of Physiology, Akdeniz University, Antalya, Turkey*

^b *Department of Physiology and Biophysics, Keck School of Medicine, Los Angeles, CA, USA*

Received 1 December 2008

Accepted in revised form 12 May 2009

Abstract. The electrical properties of red blood cell (RBC) suspensions are influenced by flow conditions, and prior studies indicate that electrical properties may reflect the kinetics of RBC aggregation. Changes of conductance and capacitance were monitored and had a time course resembling a “syllectogram” (i.e., temporal change of light reflectance from an RBC suspension after sudden cessation of flow). In the present study, both AC electrical conductance (EC) across and light transmission (LT) through a 1 mm ID glass tube were recorded simultaneously after a sudden stoppage of flow for RBC at various hematocrits in plasma or in isotonic saline (PBS). Preliminary results indicate that EC and LT signals for RBC in plasma have similar time courses, both increasing after an initial decrement of a few seconds duration. Aggregation indexes and aggregation half times calculated using LT and EC showed a similar dependence on hematocrits between 30–50%. Interestingly, RBC in PBS also exhibited a syllectogram time course for conductance, whereas LT continued to decrease after an initial decline reflecting RBC shape recovery. These results suggest that electrical conductance in aggregating and non-aggregating suspensions may be sensitive to phenomena other than RBC aggregation.

Keywords: Red blood cell aggregation, electrical conductance, light transmission, syllectogram

1. Introduction

Red blood cell (RBC) aggregation is the reversible association of cells into linear face-to-face structures termed rouleaux; given sufficient space, these structures can form random three-dimensional arrays [17,25]. RBC aggregation is determined by both plasmatic and cellular factors, with the effects of cellular factors used to define RBC aggregability [16,25]. Aggregation can be altered during pathophysiological processes due to modifications of both plasma composition (e.g., in acute phase reactions) and cellular factors (e.g., increased oxidant stress) [9,11,17,24,25]. RBC aggregation affects the flow properties of blood, especially at low shear rates, and therefore has the potential to influence blood flow in the circulatory system [7].

* This article is based on a paper given by Dr. O.K. Baskurt in Symposium 20 at the 13th International Congress of Biorheology and the 6th International Conference of Clinical Hemorheology at the Pennsylvania State University, State College, PA, USA, July 9–14, 2008.

** Address for correspondence: Dr. Oguz K. Baskurt Department of Physiology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, Turkey. Tel.: +90 242 310 1560; Fax: +90 242 310 1561; E-mail: baskurt@akdeniz.edu.tr.

Due to its potential pathophysiological significance, quantification of RBC aggregation is necessary in order to understand its importance, and a variety of approaches have been used to monitor and quantify this phenomenon. As it is a dynamic process that is strongly affected by local shear forces, both the effects of shear and the time course of aggregation need to be considered. Low-shear viscometry can be used to estimate the degree of aggregation in RBC suspensions [5,23,27]. However, photometric measurements have been the most widely used methods to investigate aggregation in red cell suspensions [8,14,28], and there are several commercially available instruments based on measurement of light transmittance or light reflectance through or from red cell suspensions during the aggregation process.

It has been reported that the electrical properties of red cell suspensions also change during aggregation [2,3,20–22]. Several groups have suggested that monitoring the electrical properties of red cell suspensions during aggregation can provide information about the time course of this process [2,3,19,21] in a manner similar to that provided by photometric methods. It has been demonstrated that a syllectogram-like curve [29] can be obtained if electrical conductance through aggregating blood is recorded [19,22]; such curves reflect the time course of RBC aggregation and can be used to calculate various related parameters, with these parameters correlated with blood properties known to influence RBC aggregation [19]. However, these prior studies did not compare the time course of electrical conductance of RBC suspensions with the time course of light transmittance/reflectance. The present study was thus designed to compare the time course of electrical conductance and of light transmittance through a glass tube during RBC aggregation, and hence to test the hypothesis that both parameters accurately describe the time course of red blood cell aggregation.

2. Materials and methods

2.1. Blood samples and preparation of RBC suspensions

Venous blood samples were obtained from healthy, human male volunteers, aged between 25–52 years and anticoagulated with sodium heparin (15 IU/ml). Blood samples were divided into two aliquots; (1) the hematocrit in one aliquot was adjusted to values between 30–50% by adding or removing calculated amounts of autologous plasma after measuring hematocrit by the microcapillary method. Blood was centrifuged at 1400g for 5 min if plasma removal was necessary; (2) the second aliquot was centrifuged at 1400g for 10 min, the plasma was removed, the RBC washed two times with phosphate buffered saline (PBS; pH: 7.4) and then re-suspended in the same medium at 30–50% hematocrit. RBC from each donor suspended in autologous plasma or isotonic PBS were available at several levels of hematocrit; all experiments were completed within four hours after blood sampling.

2.2. Measurement system

The measurement system is shown schematically in Fig. 1. Electrical conductance (EC) and light transmission (LT) of RBC suspensions were recorded for a glass tube (1 mm inside diameter, 75 mm length) during and after the stoppage of flow induced by a syringe pump (Model NE1000, New Era Pump Systems, Wantagh, NY, USA). Two stainless steel 16 gauge needles were fitted on both ends of the capillary and served as electrodes for electrical measurements; these electrodes were connected to a 10 kHz AC conductometer circuit that was interfaced to a digital computer through an A/D converter. Electrical conductance (EC) was calculated as the inverse of impedance values obtained by the conductometer. A phototransistor and an infrared light emitting diode (850 nm) were arranged at the center

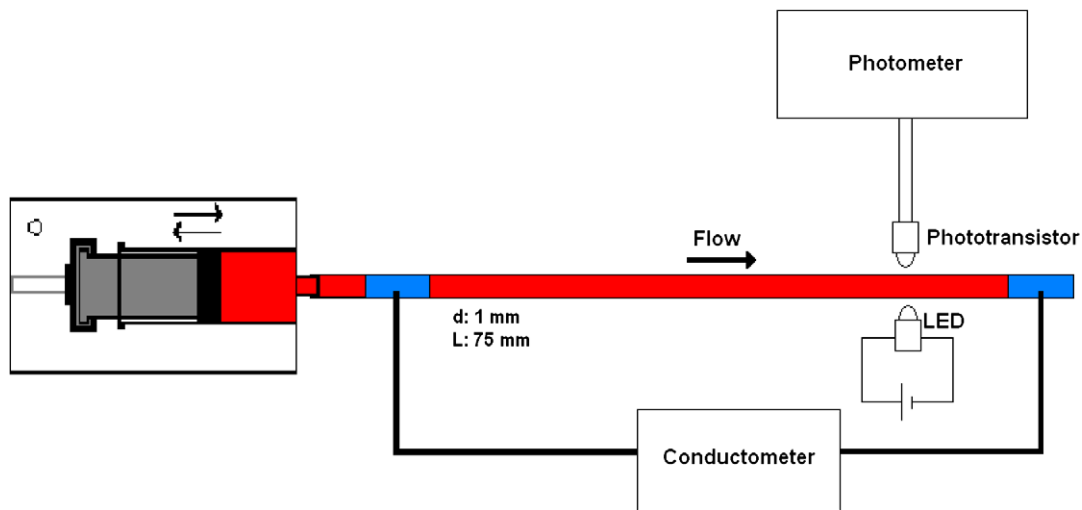


Fig. 1. Measurement system.

line on opposite sides of the glass tube, and light transmission (LT) data were recorded simultaneously using the same A/D converter and digital computer. The flow system (i.e. glass tube, electrodes and LT detector unit) were placed in a temperature-controlled box and maintained at 37°C.

The experimental protocol involved operating the pump at a volumetric flow rate of 42 ml/min for recordings during flow. This flow rate corresponded to a wall shear stress of about 28 Pa assuming a 40% hematocrit for the flowing blood [12], and thus a shear stress that clearly exceeds the threshold for total disaggregation in the glass tube [26]. The measurement and recording of electrical properties and light transmittance were conducted simultaneously during the 60 s period immediately following flow stoppage. Selecting a 60 s period for data recording was based upon the period in which aggregation occurred in the RBC–plasma suspensions. Longer recording periods were avoided in order to eliminate RBC sedimentation artifacts that were noted for some RBC–plasma suspensions. Note that absolute values relevant to the kinetics of aggregation (e.g., half-time) may be specific to this 60 s period: recording for only a few seconds after stoppage could indicate a faster process. LT and EC data obtained at and after the peak (i.e., maximum initial change of signal, see Fig. 2) that follows the sudden stop were analyzed to obtain three parameters [8,10,14]: (1) amplitude or AMP, the difference between the peak level of EC or LT signal and the level at the end of the 60 s period; (2) aggregation half time ($T_{1/2}$), time taken for LT or EC to reach one-half of AMP; (3) aggregation index (AI), the area under the LT- or EC-time curve from peak to 60 s. Figure 2 presents a schematic illustration of these parameters.

2.3. Measurement of red blood cell aggregation

RBC aggregation in the samples used in the experiments described above was also assessed separately using a custom-built photometric aggregometer, interfaced to a digital computer, that allowed monitoring light transmittance through the blood sample during aggregation [8]. This instrument was employed to provide independent quantitative aggregation data, and has been shown to yield results which agree with commercial devices (e.g., LORCA, Myrenne Aggregometer). The shearing portion of the system consists of two parallel glass plates with a gap of 0.3 mm between them; a stepper motor, controlled by the computer, rotates one of these plates. The blood sample under investigation is placed between the

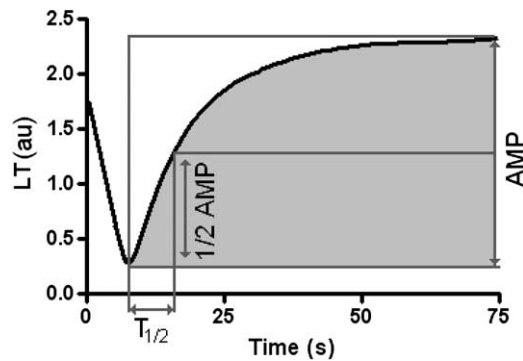


Fig. 2. Schematic representation of calculated aggregation parameters for LT, EC and plate-plate experimental data. $T_{1/2}$ is time required for the signal to decrease by 50% of AMP; the aggregation index (AI) for LT and EC data and the index for the plate-plate aggregometer correspond to the area under the curve (i.e., shaded area in figure).

glass plates, and is first sheared at 500 s^{-1} for 10 s to disperse RBC aggregates. After a sudden stop of the motor, the infrared light (850 nm) transmission through the blood sample at one fixed radial position is monitored for 10 s and recorded by the computer. The computer then calculates the area under the light transmission curve and reports a dimensionless aggregation index which increases with the extent of RBC aggregation, as shown in Fig. 2. Measurements were done in triplicate for each sample and the mean of the three measurements used as the result.

3. Results

With the glass tube filled with RBC in plasma, both EC and LT exhibited a similar time course after a sudden stop of flow. Figure 3 shows a typical example for a blood sample with a hematocrit of 0.40 l/l. Although the two curves look similar, the time course of EC was faster and was characterized by a shorter time constant compared to the LT time course. Both curves have an initial down-stroke phase (i.e., decreased EC or LT) which is completed in a few seconds and followed by increases of each parameter. This second phase of both curves could be fitted to a single-exponential equation of the form of $x(t) = a \cdot e^{-t/\tau} + b$: for the data in Fig. 3, τ for the EC curve was 16.27 s while it was 25.39 s for the LT curve. EC and LT approached the values measured prior to flow stoppage and slightly exceeded these values during the 60 s period (Fig. 3).

The time required to reach the minimum levels of the EC and LT curves (i.e., “peak”-time) and the amplitude of the down-stroke were both influenced by the hematocrit of the samples. Compared to the value obtained at 30% hematocrit, the peak-time of the EC curve was about 80% greater at 40% and approximately 4-fold greater at 50% hematocrit (Fig. 4(A)). Peak times for the LT curve exhibited similar behavior: compared to 30% hematocrit, the time was about 70% greater at 40% and 3.2-fold greater at 50% (Fig. 4(A)). The down-stroke amplitude for both EC and LT were also affected by hematocrit, but the dependence was less prominent compared to the peak-time (Fig. 4(B)).

The time course behavior of EC and of LT for the 60 second period immediately following the maximum extent of the down stroke are presented in Fig. 5 for blood samples with hematocrits of 30–50%. The AMP parameter was strongly influenced by hematocrit, being highest for the sample with lowest hematocrit (Fig. 6(A)). AI and $T_{1/2}$ also demonstrated a strong dependence on hematocrit (Fig. 6(B and C)).

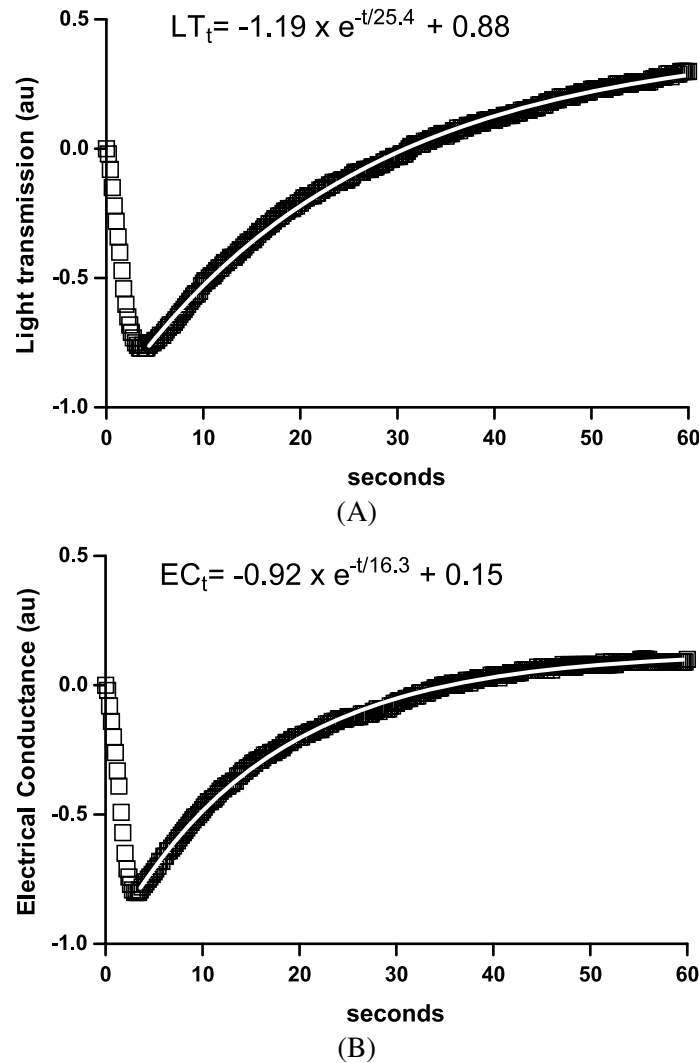


Fig. 3. Light transmittance (A) and electrical conductance at 10 kHz (B) through 40% hematocrit blood during the 60 second period after sudden stoppage of flow. Both electrical conductance and light transmittance were recorded in arbitrary units (au) and normalized by subtracting the value during flow; the initial value at zero time for each curve is thus zero. The white line in each figure represents values fitted to the rising phase of the curve by the single-exponential equation shown.

Figure 7 presents the EC and LT curves for washed RBC suspended in PBS at hematocrits of 30, 40 and 50% and recorded under conditions identical to those for the RBC–plasma suspensions. It should be noted that the EC curves for these PBS suspensions were similar to the curves for blood at corresponding hematocrit values (Figs 5(B) and 7(B)). Further, although AI values calculated using the EC curves were somewhat greater for the PBS versus the plasma suspensions, both were comparably affected by hematocrit: for 30, 40 and 50% hematocrit levels, AI was 1.38 ± 0.15 , 1.04 ± 0.39 and 0.75 ± 0.12 for PBS suspensions and 1.00 ± 0.19 , 0.62 ± 0.19 and 0.24 ± 0.12 for the blood samples. However, in marked contrast to the EC results, LT curves for PBS exhibited a completely different time course compared to the LT curves for blood (Figs 5(A) and 7(A)), with LT continuing to decrease after the peak-time (Fig. 7(A)). In addition, the effects of hematocrit on LT of PBS suspensions were significantly smaller

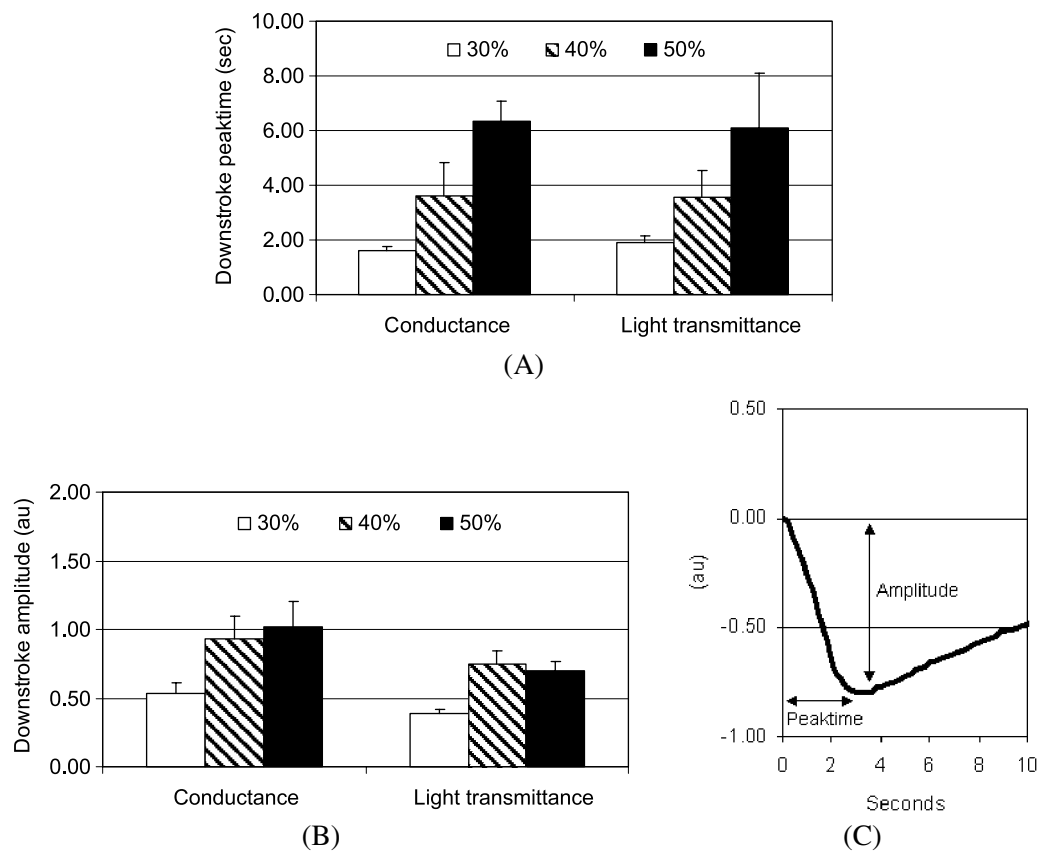


Fig. 4. Down-stroke amplitude (A) and peak-time (B) values of electrical conductance and light transmittance of blood samples with hematocrit values of 30, 40 and 50%. Figure 3(C) indicates how these values were obtained from recorded data. Data are mean $\pm$ standard error; $n = 4$. au: arbitrary units.

than those for blood samples; given the shapes of the LT curves, AI values were not calculated for PBS suspensions.

RBC aggregation indexes measured in the blood samples by “plate-on-plate” aggregometer based on light transmittance were also found to be significantly influenced by hematocrit. Aggregation indexes were 15.75 ± 1.16 , 12.47 ± 1.68 and 8.90 ± 1.69 in blood of 30, 40 and 50% hematocrit, respectively. In suspensions of RBC in PBS, there was no measurable aggregation with the instrument described above.

4. Discussion

RBC aggregation is known to be a dynamic process. If the shear forces are sufficiently high, RBC under flow are dispersed, move individually, and are deformed to orient themselves with flow stream-lines [6]. If the flow stops, RBC initially return to their normal, biconcave discoid shape with a shape recovery time constant of a few hundred milliseconds [4]. Subsequently, RBC undergo aggregation over a period of several minutes. Therefore, physical properties of RBC suspensions (e.g., electrical conductance, light transmittance) recorded during the period after a sudden stoppage of flow are expected to reflect the time course of these two phases (i.e., shape recovery and aggregate formation).

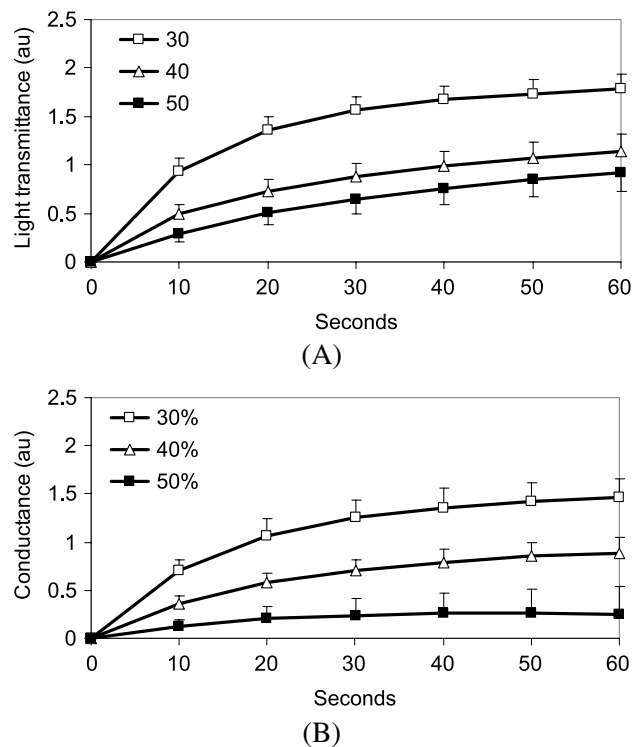


Fig. 5. Time course of light transmission (A) and electrical conductance (B) of RBC suspended in autologous plasma with hematocrits between 30–50% during 60 seconds following the peak of the downstroke. The curves are normalized by subtracting the EC or LT value at the peak of the downstroke. Data are mean $\pm$ standard error; $n = 4$. au: arbitrary units.

LT through RBC suspensions has a well-known, typical time course (i.e., syllectogram) and its utilization to quantitate RBC aggregation has been validated [8,10,13,14,18,29]. Furthermore, it has been demonstrated that the very early part of LT time course can be used to calculate the shape recovery time constant and this approach has also been validated by comparing recorded signals with optical images obtained by analyzing simultaneous video-recordings of elongation indexes [4]. In the present study, LT recordings after a sudden stop of flow exhibited the typical shape of a syllectogram: (a) decreased LT immediately after the stop of flow, reaching a minimum in ~ 2 –6 s; (b) subsequent increase of LT with a typical time-course which can be represented by an exponential equation. EC recordings also followed a very similar pattern, with only slight differences in the magnitude of the time course (Fig. 3). The increase of LT in an aggregating RBC suspension is due to the decreased number of effective particles interacting with and reflecting rays of light [15]. Increases of EC during the aggregation process can also be explained by alterations of the current pathways which are affected by the distribution of particles (i.e., RBC) that have significantly different conductivity compared to the suspending medium [22].

It is interesting to note that the hematocrit dependence of both LT and EC curves were similar (Fig. 5). In addition to the expected dependence of absolute values of LT and EC during flow and the course of aggregation (data not shown), the time course of these curves were strongly influenced by hematocrit (Fig. 5). Further, the parameters calculated to quantitate RBC aggregation (i.e., AMP, AI, $T_{1/2}$) [8,14] using both LT and EC data exhibited a hematocrit dependence that paralleled the aggregation indexes measured in aliquots of the same samples using the photometric aggregometer. This pattern of depen-

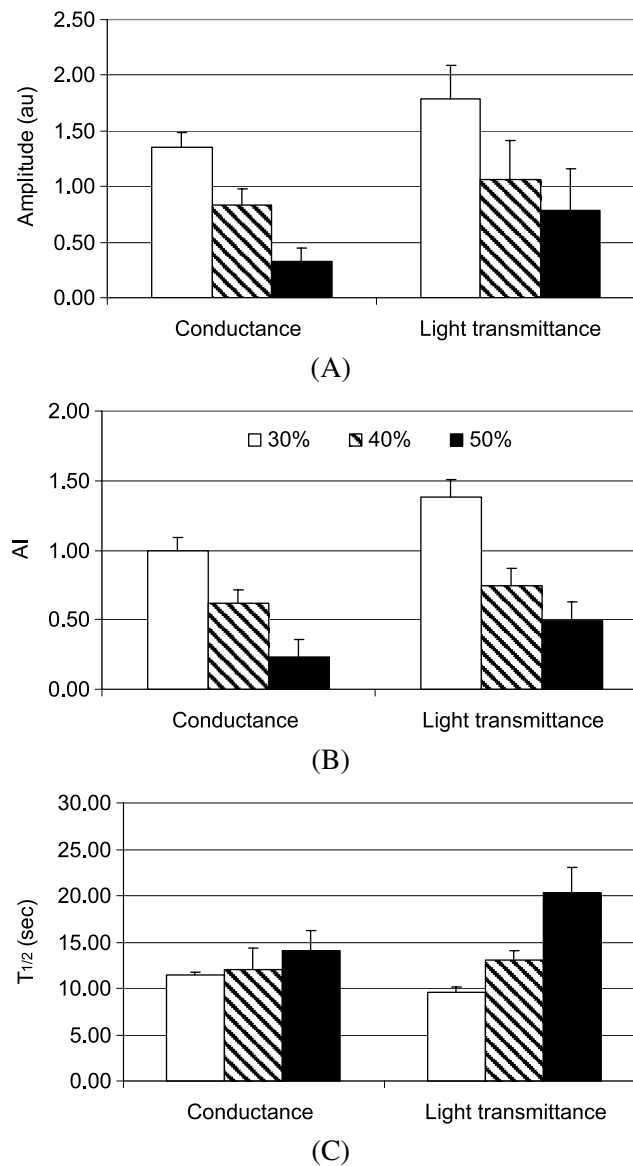


Fig. 6. (A) Amplitude (AMP), (B) “area under curve” aggregation index (AI), (C) halftime ($T_{1/2}$) of electrical conductance and light transmittance curves calculated for a 60 second period after the completion of downstroke. Data are mean $\pm$ standard error; $n = 4$. au: arbitrary units.

dence on hematocrit has been demonstrated and published previously [1,8] and supports the hypothesis that both LT and EC recordings following a sudden stop of flow reflect the time-course of RBC aggregation.

In the current study, LT and EC recordings were also made using RBC suspended in isotonic PBS, a suspending medium which did not contain proteins or macromolecules. RBC do not aggregate if they are suspended in such media, and this lack of aggregation was confirmed by “zero” aggregation indexes provided by the photometric aggregometer. Examination of LT curves (Fig. 7(A)) also confirms the absence of aggregation, with no increment following the peak time and a slight decrease of LT during

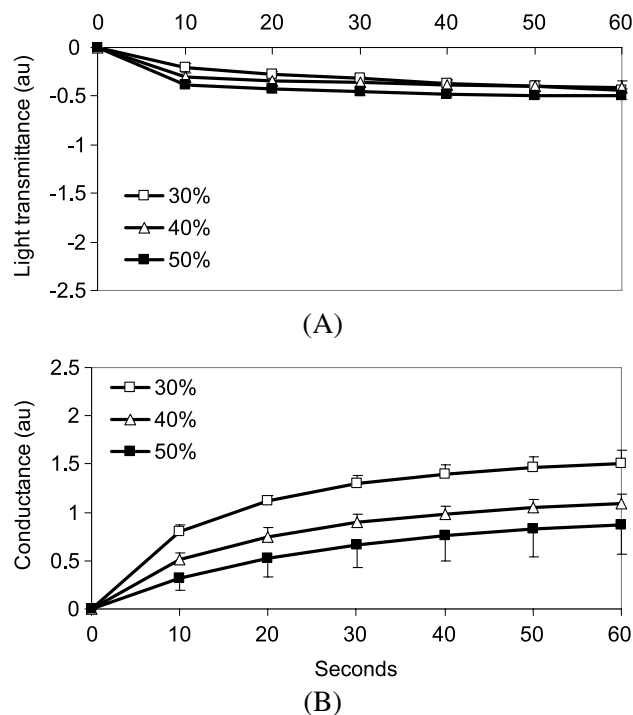


Fig. 7. Time course of light transmission (A) and electrical conductance (B) of RBC suspended in PBS with hematocrits adjusted to 30, 40 and 50% (30–50%), for a 60 second period after the completion of downstroke. Data are mean $\pm$ standard error; $n = 6$. au: arbitrary units.

the 60 s period. This is the expected behavior if there is no RBC aggregation since there will be no change in the number of effective particles; the very small decrease of LT most likely reflects a slight further dispersion of RBC.

Surprisingly, EC recordings using RBC suspended in PBS exhibited a time-course which is very similar to that for an aggregating RBC suspension (Figs 5 and 7). The PBS curve has the typical increment in EC following the minimum, which for RBC in plasma was attributed to the aggregation process and the related alterations in electrical current pathways. Obtaining a curve with such characteristics during the time period when no detectable RBC aggregation occurs suggests that other phenomena common in aggregating and non-aggregating RBC suspensions are responsible for EC following a sudden stop of flow. Shear-induced changes in adsorption of macromolecules on electrodes, partial blockage of the interface by adhesion of the dispersed particles, and an increase in the apparent diffusion coefficient by rotation of particles in the shear field are possible mechanisms suggested for time-dependent alterations in electrical conductance of RBC suspensions [22]. The physical properties of RBC suspensions are also expected to be influenced by RBC sedimentation, especially under no-flow conditions. However, in the current study, no significant effects of sedimentation in the glass tube could be detected during the 60 second recording time of LT and EC. Monitoring LT and/or EC of RBC suspensions for longer periods may provide insight into sedimentation-related alterations.

In conclusion, the preliminary results of this study indicate that the time course of EC changes for RBC suspensions may not solely be reflecting the aggregation process. They also indicate that further studies are necessary in order to understand the mechanisms affecting the electrical properties of RBC suspensions, and thus the need to validate the usage of electrical properties to assess RBC aggregation.

If the electrical properties of RBC suspensions can be proven to reflect aggregation properties, it is then interesting to contemplate implementing this technique in the field of hemorheological instrumentation and, possibly, for *in vivo* applications.

Acknowledgements

This study was supported by NIH Research Grants HL15722, HL 70595 and FIRCA IR03 TW01295, and by the Akdeniz University Research Projects Unit.

References

- [1] R. Agosti, A. Clivati, M. D'Etto, F. Ferrarini et al., Hematocrit dependence of erythrocyte aggregation, *Clin. Hemorheol.* **8** (1988), 913–924.
- [2] N. Antonova, P. Riha and I. Ivanov, Time dependent variation of human blood conductivity as a method for an estimation of RBC aggregation, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **39** (2008), 69–78.
- [3] C. Balan, C. Balut, L. Gheorghe, C. Gheorghe et al., Experimental determination of blood permittivity and conductivity in simple shear flow, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **30** (2004), 359–364.
- [4] O.K. Baskurt and H.J. Meiselman, Determination of red blood cell shape recovery time constant in a Couette system by the analysis of light reflectance and ektacytometry, *Biorheology* **33** (1996), 489–503.
- [5] O.K. Baskurt and H.J. Meiselman, Cellular determinants of low-shear blood viscosity, *Biorheology* **34** (1997), 235–247.
- [6] O.K. Baskurt and H.J. Meiselman, Blood rheology and hemodynamics, *Semin. Thromb. Hemost.* **29** (2003), 435–450.
- [7] O.K. Baskurt and H.J. Meiselman, *In vivo* hemorheology, in: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, O.K. Baskurt, M.R. Hardeman, M.W. Rampling and H.J. Meiselman, eds, IOS Press, Amsterdam, 2007, pp. 322–338.
- [8] O.K. Baskurt, H.J. Meiselman and E. Kayar, Measurement of red blood cell aggregation in a “plate–plate” shearing system by analysis of light transmission, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **19** (1998), 307–314.
- [9] O.K. Baskurt, A. Temiz and H.J. Meiselman, Red blood cell aggregation in experimental sepsis, *J. Lab. Clin. Med.* **130** (1997), 183–190.
- [10] R.M. Bauersachs, R.B. Wenby and H.J. Meiselman, Determination of specific red blood cell aggregation indices via an automated system, *Clin. Hemorheol.* **9** (1989), 1–25.
- [11] B. Chong-Martinez, T.A. Buchanan, R. Wenby and H.J. Meiselman, Decreased red blood cell aggregation subsequent to improved glycemic control in type 2 diabetes mellitus, *Diabet. Med.* **20** (2003), 301–306.
- [12] G.R. Cokelet and H.J. Meiselman, Macro- and micro-rheological properties of blood, in: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, O.K. Baskurt, M.R. Hardeman, M.W. Rampling and H.J. Meiselman, eds, IOS Press, Amsterdam, 2007, pp. 45–71.
- [13] M. Donner, M. Siadat and J.F. Stoltz, Erythrocyte aggregation: an approach by light scattering determination, *Biorheology* **25** (1988), 367–375.
- [14] M.R. Hardeman, J.G.G. Dobbe and C. Ince, The laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **25** (2001), 1–11.
- [15] M.R. Hardeman, P.T. Goedhart and S. Shin, Methods in hemorheology, in: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, O.K. Baskurt, M.R. Hardeman, M.W. Rampling and H.J. Meiselman, eds, IOS Press, Amsterdam, 2007, pp. 242–266.
- [16] H.J. Meiselman, Red blood cell aggregation: 45 years being curious, *Biorheology* **46** (2009), 1–19.
- [17] B. Neu and H.J. Meiselman, Red blood cell aggregation, in: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, O.K. Baskurt, M.R. Hardeman, M.W. Rampling and H.J. Meiselman, eds, IOS Press, Amsterdam, 2007, pp. 114–136.
- [18] D. Pieragalli, S. Forconi, M. Guerrini, A. Acciavatti et al., A syllectometric method to study erythrocyte aggregation, *Ric. Clin. Lab.* **15** (1985), 79–86.
- [19] A. Pribush, L. Hatzkelson, D. Meyerstein and N. Meyerstein, A novel technique for quantification of erythrocyte aggregation abnormalities in pathophysiological situations, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **36** (2007), 121–132.
- [20] A. Pribush, H.J. Meiselman, D. Meyerstein and N. Meyerstein, Dielectric approach to the investigation of erythrocyte aggregation: I. Experimental basis of the method, *Biorheology* **36** (1999), 411–423.
- [21] A. Pribush, H.J. Meiselman, D. Meyerstein and N. Meyerstein, Dielectric approach to investigation of erythrocyte aggregation. II. Kinetics of erythrocyte aggregation–disaggregation in quiescent and flowing blood, *Biorheology* **37** (2000), 429–441.
- [22] A. Pribush, D. Meyerstein and N. Meyerstein, Conductometric study of shear-dependent processes in red cell suspensions. I. Effect of red blood cell aggregate morphology on blood conductance, *Biorheology* **41** (2004), 13–28.

- [23] M.W. Rampling, Red cell aggregation and yield stress, in: *Clinical Blood Rheology*, G.D.O. Lowe, ed., CRC Press, FL, USA, 1988, pp. 45–64.
- [24] M.W. Rampling, Haemorheology and the inflammatory process, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **19** (1998), 129–132.
- [25] M.W. Rampling, H.J. Meiselman, B. Neu and O.K. Baskurt, Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation, *Biorheology* **41** (2004), 91–112.
- [26] S.M. Razavian, M. Delpino, A. Simon and J. Levenson, Increase in erythrocyte disaggregation shear-stress in hypertension, *Hypertension* **20** (1992), 247–252.
- [27] T. Shiga, N. Maeda and K. Kon, Erythrocyte rheology, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **10** (1990), 9–48.
- [28] H. Zhao, X. Wang and J.F. Stoltz, Comparison of three optical methods to study erythrocyte aggregation, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **21** (1999), 297–302.
- [29] W.G. Zijlstra, Sylllectometry, a new method for studying rouleaux formation of red blood cells, *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* **7** (1958), 153–154.