

ERİTROSİT AGREGASYONUNUN ELEKTRİKSEL YÖNTEMLE ÖLÇÜLMESİ

Mehmet Üyüklü

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı
34093 Fatih, İstanbul, muyuklu@bezmialem.edu.tr

Özetçe

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. 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 metreyle bağlanmıştır. Bu amaçla çeşitli özelliklere sahip eritrosit süspansiyonlarının cam kapillerden akımı sağlandı, akım sırasında ve akım durdurulduktan sonra, süspansiyonların agregasyon sürecini yansıttığı bilinen özellikleri izlenmiştir. Cam kapiller borulardaki eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin ölçülmesi, bu kapillerde eritrosit agregasyon kinetiğinin belirlenmesine yardımcı olabilir.

1. Giriş

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 [1-2], 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 [3-5]. Ancak eritrositlerin fiziksel özellikleri bu sistem içinde belirleyici rol oynamaktadır.

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 [6]. Akım hızının yüksek olduğu koşullarda eritrosit deformabilitesi kan viskozitesini belirleyen temel faktörler arasındadır [7]. Akımın yavaşlaması halinde, hücrelere etki eden kuvvetler küçülür ve kümelenme eğilimi ön plana çıkar. Eritrosit agregatlarının oluşması, bu koşullarda viskoziteyi yükseltir [8].

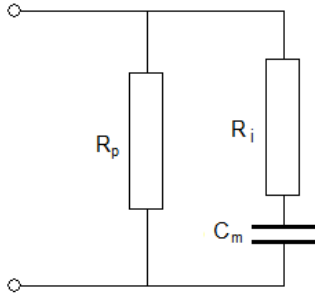
Eritrositler plazma içinde, durgun halde iken, bikonkav disklerin birbirine paralel yüzeyler oluşturması şeklinde kümelenirler. Bu kümelenme aynı hücrelerin basit tuz çözeltileri içinde (PBS) süspansiyon haline getirilmeleri halinde ortaya çıkmaz. Eritrosit agregasyonu, bu hücrelerin özel bir dizilim 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 [9]. Fibrinojen yanında diğer akut faz reaktanları, plazma globulin fraksiyonlarındaki değişimler, osmolarite ve pH değişiklikleri, hematokrit değerindeki artış eritrosit agregasyonunu etkiler [9-10]. 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 [11].

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 [12-13], eritrosit agregasyonunun mikroskopik indeksleri [14], eritrosit sedimentasyon hızı, düşük kayma viskozitesi [15] ve ultrason geri saçılımıdır.

Fotometrik ölçümler eritrosit süspansiyonlarında agregasyonunun araştırılması için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [16-18]. 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 silindireler, koniplak, paralel yüzeyler, dikdörtgen akım kanalı gibi) kullanırlar [16,17,19,20]. Bu ölçüm sistemlerine ait

geometriler genellikle birkaç yüz mikrometre genişliğinde bir akım alanına sahip yapılardan oluşmaktadır.

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.1).



Şekil 1. Kan bioempedansının eşdeğer devre modeli. R_p : Plazma direnci; R_i : Eritrosit iç direnci; C_m : Eritrosit membran kapasitansı.

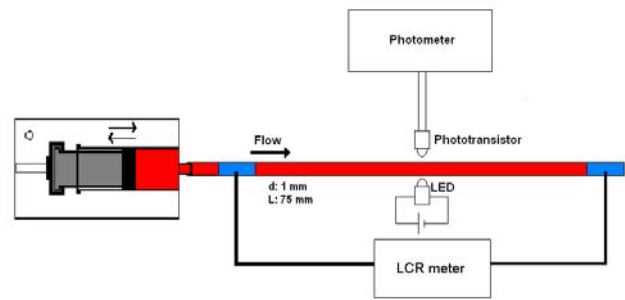
Agregasyon sırasında eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özellikleri değişir [21-26]. Yapılan birçok çalışmada eritrosit süspansiyonlarının elektriksel özelliklerinin kaydedilmesinin, fotometrik ölçümlere benzer şekilde agregasyon sırasında işleyen süreç hakkında bilgi verebileceği gösterilmiştir [22,23,25,27]. Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre direnç ve kapasitans ölçümünün süspansiyondaki fibrinojen konsantrasyonuyla arttığı gösterilmiştir [28]. 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. 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). Hematokrit ve eritrositlerin şekilleri, kan örneklerinin elektriksel parametrelerinin ölçümüne etki eden önemli faktörler arasındadır [29-32].

Eritrosit agregasyonunun ışık yansımaları veya ışık geçirgenliği özellikleriyle incelenmesi halinde zaman seyri çift-eksponansiyel bir eğriyle modellenilebildiği bilinmektedir. Bu çalışmada elde edilen elektriksel parametrelerin zaman seyri kullanılarak da benzer bir eksponansiyel değişimi temsil eden eğrilerin ölçülebilmesi ve eritrosit agregasyonu ölçebileceğimiz bir ölçüm sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metod

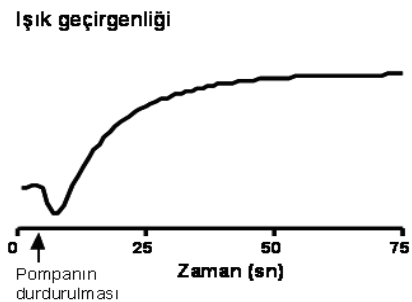
2.1.Çalışmanın Genel Tanımı

Öncelikle, eritrosit agregasyonu 1000 μm 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 (Şekil 2.1.), eritrosit agregatlarının tümüyle parçalanmasına yetecek hızda (42 ml/dakika) pompalanmış, pompanın ani olarak durdurulmasını takiben ışık geçirgenliği izlenmiştir (Şekil 2.).



Şekil 2. Fotometrik ölçüm sistemi [33]

Kaydedilen ışık geçirgenliği-zaman eğrileri eritrosit agregasyon sürecini yansıtan tipik eğrilerle büyük bir benzerlik göstermektedir [16,18-20,34]. Çalışmanın bu bölümünde, 1000 mikrometre iç çapa sahip kapiller borularda eritrosit süspansiyonlarının ışık geçirgenliğinin kolaylıkla kaydedilebileceği, bu yolla eritrosit agregasyonunun zaman seyri izlenebileceği onaylanmıştır.



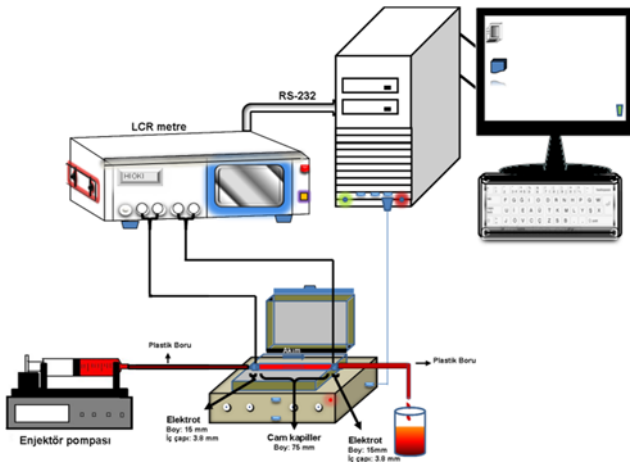
Şekil 3. Fotometrik ölçüm sistemi ile ölçülen ışık geçirgenliğinde agregasyon sırasında meydana gelen değişimler [33].

Arkasından 1000 μm çapa sahip kapiller borulardaki eritrosit agregasyonu sırasında, süspansiyonun hem fotometrik hem de elektriksel özellikleri eş zamanlı olarak kaydedilmiştir. 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.

Eritrosit süspansiyonlarının akımın durdurulmasından sonraki ışık geçirgenliği kayıtları syllectogram benzeri bir süreç gösterir ve eritrosit agregasyonu zaman seyrini yansıtır. Sonuç olarak, ön çalışmalar sonucunda, kapiller borulardaki eritrosit agregasyonu sırasında izlenen seri kapasitans değerlerinin agregasyonun zaman seyrini yansıttığı saptanmıştır [33,35]. Bu kanaate eş zamanlı olarak yapılan ışık geçirgenliği kayıtları ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda varılmıştır. Elektriksel empedans değerleri ise bu özelliğe bulunmamıştır.

Daha sonra ölçüm sistemini Şekil 3.'te gösterildiği gibi bir kapalı bir sistem içine yerleştirdik. Ölçüm sistemimizde elektriksel ölçümlerin yapılabilmesi için, iki tane paslanmaz çelikten yapılmış olan elektrotlar (Dış çapı:7 mm; İç çapı:3.8 mm; Boyu:15 mm) cam kapillerin baş ve son kısımlarına yerleştirilmiştir. Bu elektrotlar, elektriksel empedans (Z) ve seri kapasitans (C) ölçümleri için LCR metreye bağlanmıştır.



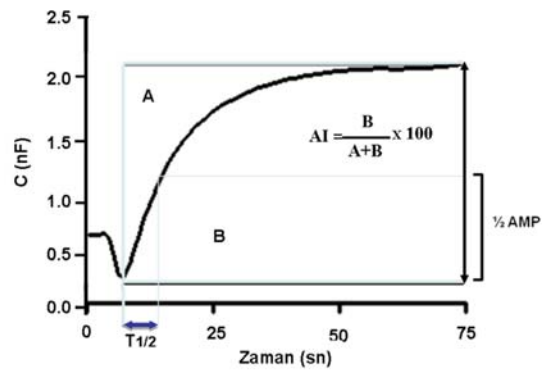
Şekil 4. Ölçüm sistemi

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.

Bu parametreler: 1) Agregasyon İndeksi, eğrinin altında kalan alanın, eğrinin üstündeki alanların toplamına bölümü; 2) Agregasyon yarı zamanı ($t_{1/2}$), 120 sn'lik periyot sırasındaki ışık yansımasındaki toplam değişikliğin (amplitüd) %50'si kadarı için geçen süre.

2.2. Değerlendirme ve İstatistiksel Hesaplamalar

Şekil 5.'te 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 5.). Zaman sabiti $t_{1/2}$ ise kapasitansdaki toplam değişikliğin yarısı kadarı ($1/2$ amplitüd) için geçen süredir.



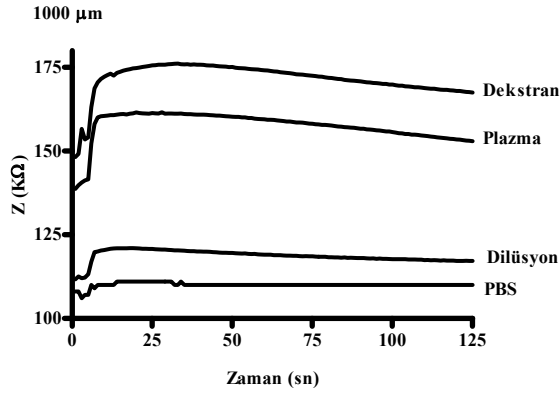
Şekil 5. Eritrosit agregasyon parametrelerinin hesaplanma prosedürünün şematik olarak gösterilmesi. A; eğrinin üstünde kalan alanı, B; eğrinin altında kalan alanı temsil etmektedir [33]

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.

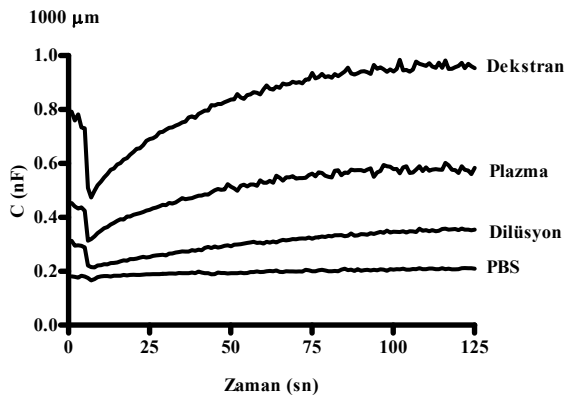
3. Sonuçlar

Şekil 6'daki kayıtlarda enjektör pompasının durdurulmasından sonra empedans değerlerinde ani bir artış 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.

Kapasitans ölçümünde ise PBS ile dilüe edilmiş plazma örneklerinde akımın durdurulmasından sonra meydana gelen değişiklikler, dilüe edilmemiş plazmayla hazırlanan örneklerle karşılaştırıldığında daha küçük bir çukur noktasının olduğu gözlenmektedir. PBS içinde hazırlanmış süspansiyonun kapasitans ölçümünde hesaplanabilir bir değişiklik gözlenmemektedir (Şekil 7.).



Şekil 6. 1000 µm çapa sahip cam kapillerde Tam Kan, 1/2 Dilüsyon ve Dekstran gruplarında kullanılan eritrosit süspansiyonlarına ait Empedans (Z; kΩ) kayıtları. Empedans ölçümleri 100 KHz frekansta yapılmıştır.



Şekil 7. 1000 µm çapa sahip cam kapillerde Tam Kan, 1/2 Dilüsyon ve Dekstran gruplarında kullanılan eritrosit süspansiyonlarına ait seri Kapasitans (C) kayıtları. Kapasitans ölçümleri 100 kHz frekansta yapılmıştır.

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. Özel bir yazılım üretme programı olan LabView 8.6 (National Instruments, Austin, Texas, USA) ile yazılan program kullanılarak kaydedilen kapasitans eğrilerinden eritrosit agregasyon parametreleri analiz edilmiş ve Tablo 1.'de verilmiştir.

Tablo 1. Tam Kan, 1/2 Dilüsyon ve Dekstran, gruplarında kullanılan eritrosit süspansiyonlarına ait hesaplanan agregasyon parametreleri. (Sonuçlar ± standart hata olarak verilmiştir, n=10. *:p<0.05; **:p<0.001 tam kan grubundan fark.

	AI	T _{1/2} (s)
Tam kan (Plazma)	70.3 ± 2.3	2.8 ± 0.08
1/2 dilüsyon	32.6 ± 2.4***	9.0 ± 0.9***
1% Dextran 500	82.1 ± 1.5*	0.4 ± 0.02*

4. Tartışma

Kendi laboratuvarlarımızda yaptığımız çalışmalarda 1000 µm çapa sahip kapiller borulardaki eritrosit süspansiyonun agregasyon ölçümü hem fotometrik hem de süspansiyonun elektriksel özelliklerinin ölçülmesiyle karşılaştırılmıştır. Süspansiyonun ışık geçirgenliği ve kapasitans ölçümlerinin agregasyon formasyonunu tam anlamıyla yansıttığı bulunmuştur. Elektriksel empedans değerleri ise bu özellikte bulunmamıştır [35].

KAYNAKLAR

- [1] S. Chien, Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu Rev Physiol* 49 (1987) 177-192.
- [2] M.M Wintrobe, G.R. Lee, D.R. Boggs, T.C. Bithell, and R.J. Foerster, The mature erythrocyte: eds GA Jamieson, TJ Greenwalt: Philadelphia:JB Lipponcott, (1981) 123-144.
- [3] N. Mohandas, Molecular basis for red cell membrane viscoelastic properties. *Biochem Soc Trans* 20 (1982) 776-782.
- [4] N. Mohandas and J.A. Chasis, Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 30 (1993) 171-192.
- [5] N. Mohandas and E. Evans, Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23 (1994) 787-818.
- [6] C.C. Sweeley and G. Dawson, Lipids of erythrocyte in red cell membrane: eds GA Jamieson, TJ Greenwalt; Philadelphia; JB Lipponcott, (1969) 213-267.
- [7] P. Ways and D.J. Hanahan, Characterization and quantification of red cell lipids in normal man. *J Lipid Res* 5 (1964) 318-328.
- [8] R.J. Gordon and M.B. Ravin, Rheology and anesthesiology. *Anesth Analg* 57 (1978) 252-261.
- [9] H.J. Meiselman, Red blood cell role in RBC aggregation: 1963-1993 and beyond. *Clin Hemorheol Microcirc* 13 (1993) 575-592.
- [10] T. Shiga, N. Maeda, and K. Kon, Erythrocyte rheology. *Crit Rev Oncol Hematol* 10 (1990) 9-48.
- [11] 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.
- [12] R.M. Bauersachs, R.B. Wenby, and H.J. Meiselman, Determination of specific red blood cell aggregation indices via an automated system. *Clin Hemorheol Microcirc* 9 (1989) 1-25.
- [13] M.R. Hardeman, P.T. Goedhart, J.G.G. Dobbe, and K.P. Lettinga, Laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA).I. A new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters. *Clin Hemorheol Microcirc* 14 (1994) 605-618.
- [14] .Barshtein, D. Wajnblum, and S. Yedgar, Kinetics of linear rouleaux formation studied by visual monitoring of red cell dynamic organization. *Biophys J* 78 (2000) 2470-2474.

- [15] O.K. Baskurt and H.J. Meiselman, Cellular determinants of low-shear blood viscosity. *Biorheology* 34 (1997) 235-247.
- [16] 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.
- [17] M.R. Hardeman, P.T. Goedhart, and S. Shin, "Methods in hemorheology": In: *Handbook Hemorheology and Hemodynamics*, Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW and Meiselman HJ, Eds. IOS Press, Amsterdam, (2007) 242-266.
- [18] 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 (2009)197-207.
- [19] M.R. Hardeman, J.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.
- [20] 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 (2008) 71-72.
- [21] C. Alonso, A.R. Pries, and P.Gahtgens, Time-dependent rheological behavior of blood at low shear in narrow vertical tubes. *Am J Physiol* 265 (1993) H553-561.
- [22] 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.
- [23] 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* 30 (2004) 359-364.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] M.W. Rampling, Haemorheology and the inflammatory process. *Clin Hemorheol Microcirc* 19 (1998) 129-132.
- [27] 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.
- [28] T.X. Zhao and B. Jacobson, Quantitative correlations among fibrinogen concentration, sedimentation rate and electrical impedance of blood. *Med Biol Eng Comput* 35 (1997) 181-185.
- [29] H. Beving, L.E. 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* 23 (1994) 207-215.
- [30] H. Fricke, The Electric Capacity of Suspensions with Special Reference to Blood. *J Gen Physiol* 9 (1925) 137-152.
- [31] H. Fricke and S.Morse, The Electric Resistance and Capacity of Blood for Frequencies between 800 and 4(1/2) Million Cycles. *J Gen Physiol* 9 (1925) 153-167.
- [32] A.E. Hoetink, T.J. Faes, K.R. Visser, and R.M. Heethaar, On the flow dependency of the electrical conductivity of blood. *IEEE Trans Biomed Eng* 51 (2004) 1251-1261.
- [33] O.K. Baskurt, M. Uyklu, and H.J. Meiselman Simultaneous monitoring of electrical conductance and light transmittance during red blood cell aggregation. *Biorheology*, 46 (2009) 239-249.
- [34] 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* 27 (1982) 209-213.
- [35] O.K. Baskurt, M. Uyklu, 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 (2010) 969-978.