

## Zwiększanie się odkształcalności krwinek czerwonych u królików pod wpływem hipercholesterolemii wywołanej dietą

Diet-induced hypercholesterolaemia causes increase of red blood cell deformability in rabbits

Bogdan Chmiel<sup>1</sup>, Rozalia Grabowska-Bochenek<sup>2</sup>, Danuta Piskorska<sup>2</sup>, Lech Cierpka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej Śląskiej Akademii Medycznej, Katowice (Department of General and Transplantation Surgery Silesian Medical Academy Katowice, Poland)

<sup>2</sup>Zakład Biochemii Doświadczalnej i Klinicznej Śląskiej Akademii Medycznej, Katowice (Department of Clinical and Experimental Biochemistry, Silesian Medical Academy Katowice, Poland)

### Streszczenie

**Wstęp:** Między miażdżycą, hiperlipidemią, zaburzeniami w mikrokrążeniu i spadkiem odkształcalności erytrocytów istnieje niewątpliwy związek. Jednakże obniżenie stężenia cholesterolu w surowicy nie zawsze prowadzi do poprawy odkształcalności erytrocytów. Celem pracy była ocena odkształcalności erytrocytów w kontrolowanych warunkach eksperymentalnej hipercholesterolemii.

**Materiał i metody:** Króliki karmiono normalną dietą (n = 5 — grupa kontrolna) lub dietą wzbogaconą o kurze jaja (n = 5 — osobniki z hipercholesterolemią). Po sześciu tygodniach mierzono odkształcalność erytrocytów metodą dyfraktometrii laserowej aparatem Rheodyn SSD, parametry morfologiczne krwi i parametry biochemiczne.

**Wyniki:** W porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi u królików z hipercholesterolemią stwierdzono znamienny wzrost odkształcalności erytrocytów w naprężeniach ścinających od 60 do 600 Pa, spadek średniego stężenia hemoglobiny w krwince (MCHC), wzrost średniej objętości krwinki (MCV), wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach oraz wzrost stężenia witamin A i E w surowicy.

**Wnioski:** 1. Odkształcalność erytrocytów u królików z hipercholesterolemią zwiększa się. 2. Czynniki odpowiedzialnymi za zwiększenie się odkształcalności w hipercholesterolemii doświadczalnej mogą być zmiany w objętości erytrocytów, lepkości cytoplazmy krwinki czerwonej oraz przesunięcia w równowadze oksydacyjno-antyoksydacyjnej.

**Słowa kluczowe:** odkształcalność erytrocytów, hipercholesterolemia

### Abstract

**Introduction:** The associations between atherosclerosis, hyperlipidaemia, microcirculatory disturbances and decreased red blood cell (RBC) deformability are well established. However, a reduction of hypercholesterolaemia may not always lead to improvement of red blood cell deformability, hence the aim of this study was to measure RBC deformability in well-controlled experimental conditions.

**Material and methods:** Rabbits were fed normal diet n = 5 (control), or hen's egg enriched diet n = 5 (hypercholesterolaemia). After six weeks RBC deformability was measured by shear stress diffractometer Rheodyn SSD.

**Results:** There were significant increases in RBC deformability in hypercholesterolaemic v. control rabbits at higher shear stresses between 6.0 and 60.0 Pa, decreases in mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), increases in mean corpuscular volume of erythrocyte (MCV), increases in superoxide dismutase activity, and increases in Vitamin A and E levels in the serum.

**Conclusions:** 1. Deformability of RBC of hypercholesterolaemic rabbits has been increased. 2. Possible factors responsible for the increase in deformability of erythrocytes during experimental hypercholesterolaemia can be changes in mean corpuscular volume, erythrocyte's cytoplasm viscosity and oxidative-antioxidative balance.

**Key words:** erythrocytes deformability, hypercholesterolaemia

## Wstęp

Miażdżyca tętnic wiąże się nierozdzielnie z zaburzeniami w mikrokrążeniu krwi i w metabolizmie lipidów [1–4]. Zaburzenia w mikrokrążeniu mogą być następstwem zmian we właściwościach reologicznych krwi [5]. Jedną z sytuacji klinicznych często związanych z zaburzeniami hemoreologicznymi są hiperlipidemie. Najczęściej obserwuje się wzrost lepkości krwi i spadek odkształcalności erytrocytów [6–8]. Ustalono również związek między rodzinną hipercholesterolemią a zmniejszoną odkształcalnością erytrocytów u dorosłych [9]. Jednakże dzieci z hipercholesterolemią bez cech miażdżycy nie wykazują zmian w odkształcalności erytrocytów [10]. Leczenie hiperlipidemii prowastatyną przywraca prawidłową odkształcalność zarówno u chorych z hipercholesterolemią [2], jak u pacjentów z cukrzycą [3]. Oprócz poprawy odkształcalności erytrocytów terapia ukierunkowana na zmniejszenie stężenia cholesterolu w surowicy obniża stosunek stężenia cholesterolu do stężenia fosfolipidów w błonie komórkowej erytrocytów [11]. Ostra choroba wieńcowa zazwyczaj wiąże się z zaburzeniami lipidowymi, a dane na temat odkształcalności erytrocytów są niejednoznaczne. Niektórzy autorzy nie zanotowali zmian w twardości erytrocytów [12], a inni stwierdzili spadek odkształcalności [13]. Terapia prowastatyną u chorych po zawale serca lub z niestabilną chorobą wieńcową może spowodować zmniejszenie się odkształcalności erytrocytów [14]. Zmiany w odkształcalności erytrocytów, w trakcie terapii zmniejszającej stężenie cholesterolu w surowicy, mogą zależeć od stężenia kompleksu lipoproteinowego LP(a). Gdy stężenie LP(a) jest niskie, odkształcalność w trakcie terapii zmniejsza się, kiedy stężenie LP(a) jest wysokie — odkształcalność erytrocytów rośnie [15].

Celem pracy było wykonanie pomiarów odkształcalności erytrocytów w warunkach kontrolowanej, doświadczalnej hipercholesterolemii.

## Materiał i metody

Króliki o wadze 2400–3500 g karmiono normalną, dostępną w handlu dietą, ( $n = 5$  — grupa kontrolna) lub dietą wzbogaconą w jaja kurze ( $n = 5$  — osobniki z hipercholesterolemią), podobnie jak to uczynili Finking i wsp. [16]. Po sześciu tygodniach stosowania diety pobierano krew do badania. W tym czasie zwierzęta nie wykazywały cech miażdżycy w naczyniach. Jako antykoagulantu użyto cytrynianu fosforanowego z dekstrozą i adeniną (CPD-A, *Sigma*) w stężeniu 1:9 obj./obj.

Odkształcalność erytrocytów mierzono za pomocą dyfraktometru laserowego Rheodyn SSD, Myrenne GmbH, Niemcy, podobnie jak Schmid-Schönbein i wsp. [17]. W skrócie; 30  $\mu$ l krwi z antykoagulantem dodawano do 2 ml roztworu dekstranu o lepkości równej 24 mPas, osmolarności 290 mOsm, pH wynoszącym 7,4, mieszano i wprowadzano do aparatu, gdzie erytrocyty poddawano naprężeniom ścinającym, powodującym odkształcenie się komórek, którego miarą jest stopień dyfrakcji promienia laserowego przechodzącego przez zawiesinę. Parametrem

## Introduction

Atherosclerosis is strongly associated with microcirculatory and lipid metabolism disturbances [1–4]. Disorders in microcirculation can be caused by rheological alterations within the blood [5]. Hyperlipidaemias are frequently associated with haemorheological alterations. Increase in blood viscosity, and decrease in red blood cells (RBC) deformability have been reported [6–8]. The relationship between familial hypercholesterolaemia and decrease of deformability of RBC in the adults is well established [9]. Hypercholesterolaemic children without atherosclerotic lesion do not reveal any abnormality in erythrocyte deformability [10]. Treatment by provastatin leads to increase in RBC deformability in hypercholesterolaemic [2] as well as in diabetic [3] patients. Moreover, besides restoration of erythrocyte deformability cholesterol depletion therapy decreases the cholesterol/phospholipid ratio of the red blood cell membrane [11]. Acute coronary disease is a clinical situation usually associated with lipid disturbances where conflicting data about deformability of erythrocytes exist. Some authors reported no changes [12] and others reported a decrease in deformability [13]. However, an increase in erythrocyte rigidity after normalisation of cholesterol levels by diet and provastatin has been reported in patients with a history of myocardial infarction or unstable angina pectoris [14]. The changes in the deformability of RBC after lowering cholesterol therapy can depend on the lipoprotein complex LP(a) level. When LP(a) is low, deformability during treatment decreases, when LP(a) is high — deformability of RBC can increase [15].

The aim of the study, therefore, is to measure RBC deformability in well-controlled experimental hypercholesterolaemia.

## Material and methods

Rabbits weighing between 2400 and 3500 g were fed normal, commercially available diet,  $n = 5$  (control), or hen's egg enriched diet,  $n = 5$  (hypercholesterolaemia) according to Finking *et al.* [16]. After six weeks, blood was taken for examination. At this time there were no atherosclerotic lesions in the vessels. Citrate phosphate dextrose with adenine (CPD-A, *Sigma*) was used as an anticoagulant (1:9 vol/vol).

Deformability of RBC was measured by shear stress diffractometer Rheodyn SSD, Myrenne GmbH, Germany according to Schmid-Schönbein *et al.* [17]. Briefly, 30  $\mu$ l of anticoagulated blood was added to 2 ml of dextran solution (viscosity 24 mPas, osmolality 290 mOsm, Ph 7.4), well mixed and introduced to the device, where RBC suspension was sheared. As a measure of deformability, the index of elongation of RBC was used according to the equation:

$$EI = (L-W)/(L+W) * 100$$

where L and W are intensity of light in two perpendicular axes of the diffraction pattern of the laser beam.

odkształcalności erytrocytów jest indeks elongacji (EI, *index of elongation*), który otrzymuje się z równania:

$$EI = (L-W)/(L+W) * 100$$

gdzie L i W to intensywności światła, mierzonego w dwóch prostopadłych osiach, powstałego wskutek dyfrakcji promienia laserowego. Indeks elongacji mierzy się w naprężeniach ścinających 0,3–60 Pa.

Parametry hematologiczne badano za pomocą automatycznego analizatora Cell Dyn 1700 (Abbot). Stężenie cholesterolu, triglicerydów oraz fibrynogenu oznaczono za pomocą standardowych metod laboratoryjnych. Stężenie witaminy A i E mierzono za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Aktywność dysmutazy nadadtlenkowej w erytrocytach oznaczano za pomocą zestawu firmy RANSOD (Randox Laboratories Ltd. Wielka Brytania).

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu rang Wilcozona oraz testu korelacji rang Spearmana.

## Wyniki

W porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi u królików karmionych dietą wzbogaconą w jaja kurze stwierdzono wzrost stężenia cholesterolu całkowitego, bez wzrostu stężeń triglicerydów i albumin w surowicy (tab. I). Indeks elongacji erytrocytów u królików z doświadczalną hipercholesterolemią po sześciu tygodniach stosowania diety był znacznie wyższy niż u zwierząt karmionych kontrolnie w naprężeniach ścinających 6,0–60 Pa (tab. II).

U zwierząt z hipercholesterolemią stwierdzono wzrost hematokrytu oraz średniej objętości krwinki czerwonej, natomiast spadek — średniego stężenia hemoglobiny w krwince (tab. III). Stężenia witamin A i E w surowicy oraz aktywność dysmutazy nadadtlenkowej w erytrocytach u królików z doświadczalną hipercholesterolemią były większe niż u zwierząt kontrolnych (tab. IV). Między indeksem elongacji a średnim stężeniem hemoglobiny w krwince czerwonej (MCHC, *mean corpuscular haemoglobin concentration*) stwierdzono znamiennej, ujemną korelację w naprężeniach ścinających 12,0–60 Pa (tab. V). Natomiast dodatnią korelację uzyskano między indeksem elongacji erytrocytów w naprężeniach ścinających od 0,3 do 6,0 Pa a stężeniem witaminy E (tab. VI).

Elongation index was measured at shear stresses from 0.3 to 60 Pa. Haematological parameters were measured by automatised analyser Cell Dyn 1700 (Abbot). Cholesterol, triglycerides, fibrinogen levels were measured by standard clinical methods. Vitamin E and vitamin A were measured by means of high purity liquid chromatography. Superoxide dismutase in erythrocyte was measured by RANSOD Kit (Randox Laboratories Ltd UK).

Statistical analysis was performed using Wilcoxon rank sum test or Spearman's rank correlation test as appropriate.

## Results

Hen's egg enriched diet caused an increase in total cholesterol level, but no changes in triglycerides and albumin level in the plasma (Table I). An increase in the elongation index of RBC was detected at higher shear stresses after six weeks of cholesterol-enriched diet (Table II).

**Tabela II. Średnie arytmetyczne, odchylenia standardowe ( $\pm$ ), statystyka „z” testu Wilcozona i znamienność statystyczna (p) indeksu elongacji erytrocytów w poszczególnych naprężeniach ścinających**

**Table II. Mean,  $\pm$  standard deviation, „z” Wilcoxon's statistics and statistical significance (p) of elongation indexes of RBC at various shear stresses**

Naprężenie ścinające Shear stress [Pa]	Grupa kontrolna Control group	Grupa karmiona dietą wzbogaconą w jaja kurze Hen's eggs enriched diet group	z	p
0,3	8,87 $\pm$ 3,19	12,50 $\pm$ 3,08	1,57	0,12
0,6	13,71 $\pm$ 2,79	17,43 $\pm$ 3,48	1,77	0,08
1,2	19,90 $\pm$ 2,66	23,61 $\pm$ 3,98	1,77	0,08
3	30,73 $\pm$ 2,26	34,76 $\pm$ 2,26	1,57	0,12
6	40,59 $\pm$ 2,42	45,20 $\pm$ 3,36	1,98	<b>0,04</b>
12	49,91 $\pm$ 2,83	55,14 $\pm$ 3,10	2,19	<b>0,03</b>
30	55,75 $\pm$ 2,91	61,80 $\pm$ 4,17	2,19	<b>0,03</b>
60	55,50 $\pm$ 2,90	61,65 $\pm$ 4,11	2,19	<b>0,03</b>

**Tabela I. Średnie i odchylenia standardowe ( $\pm$ ), statystyka „z” testu Wilcozona i znamienność statystyczna (p) parametrów biochemicznych ocenianych w surowicy**

**Table I. Mean,  $\pm$  standard deviation, „z” Wilcoxon's statistics and statistical significance (p) of biochemical parameters.**

	Grupa kontrolna Control group	Grupa karmiona dietą wzbogaconą w jaja kurze Hen's eggs enriched diet group	z	p
Cholesterol / Cholesterol [mmol/l]	0,63 [0,6–0,65]	1,93 [1,23–2,4]	–2,61	<b>0,009</b>
Triglicerydy / Triglycerides [mmol/l]	0,55 [0,5–0,65]	0,65 [0,48–1,25]	–0,20	0,84
Albuminy / Albumin [g/dl]	3,77 $\pm$ 0,41	3,898 $\pm$ 0,135	–0,10	1,0
Fibrinogen / Fibrinogen [g/l]	2,88 $\pm$ 0,58	3,76 $\pm$ 0,46	–1,96	0,06

Stężenie cholesterolu i triglicerydów wyrażono jako medianę i [rozstęp międzykwartyłowy]  
For cholesterol and triglycerides median and interquartile [ ] range were used

**Tabela III. Średnia i odchylenia standardowe ( $\pm$ ), statystyka „z” testu Wilcoxon’a oraz znamienność statystyczna (p) parametrów morfologicznych krwi badanych zwierząt**

**Table III. Mean,  $\pm$  standard deviation, “z” Wilcoxon’s statistics and statistical significance (p) of haematological parameters after feeding of cholesterol rich diet compared to controls**

	Grupa kontrolna <i>Control group</i>	Grupa karmiona dietą wzbogaconą w kurze jaja <i>Hen’s eggs enriched diet group</i>	z	p
HT (%)	38,00 $\pm$ 1,28	42,5 $\pm$ 2,2	-2,40	<b>0,016</b>
HB [mg%]	11,58 $\pm$ 0,78	12,3 $\pm$ 0,64	-1,36	0,175
RBC [T/l]	3,99 $\pm$ 0,23	3,93 $\pm$ 0,38	0,00	1,000
MCHC [g/dl]	30,44 $\pm$ 1,073	28,99 $\pm$ 2,18	2,40	<b>0,016</b>
MCV [fm <sup>3</sup> ]	95,66 $\pm$ 7,26	108,48 $\pm$ 7,61	-2,19	<b>0,028</b>
MCH [pg]	29,15 $\pm$ 2,73	31,44 $\pm$ 2,19	-1,36	0,175
Leukocyty [G/l] <i>Leucocytes</i>	6,71 $\pm$ 1,68	5,78 $\pm$ 1,7	1,14	0,250

HT — hematokryt, HB — stężenie hemoglobiny, RBC — liczba krwinek czerwonych, MCHC — średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej, MCV — średnia objętość krwinki czerwonej, MCH — średnia zawartość hemoglobiny w krwince czerwonej

**Tabela IV. Średnia, odchylenie standardowe ( $\pm$ ), statystyka „z” testu Wilcoxon’a oraz znamienność statystyczna (p) parametrów antyoksydacyjnych**

**Table IV. Mean  $\pm$ , standard deviation, “z” Wilcoxon’s statistics and statistical significance (p) of antioxidant parameters**

	Grupa kontrolna <i>Control group</i>	Grupa karmiona dietą wzbogaconą w kurze jaja <i>Hen’s eggs enriched diet group</i>	z	p
Witamina E [ $\mu$ mol/l] <i>Vitamin E</i>	2,87 $\pm$ 0,83	5,36 $\pm$ 1,79	-2,19	<b>0,028</b>
Witamina A [ $\mu$ mol/l] <i>Vitamin A</i>	0,40 $\pm$ 0,10	0,588 $\pm$ 0,45	-2,61	<b>0,009</b>
SOD [ $\mu$ l]	227,1 $\pm$ 28,1	287,9 $\pm$ 33,5	-2,40	<b>0,016</b>

SOD — dysmutaza ponadtlenkowa

## Dyskusja

Karmienie królików przez sześć tygodni dietą prowadzącą do hipercholesterolemii w doświadczeniu autorów spowodowało wzrost odkształcalności erytrocytów. Hayashi i wsp. [1] stwierdzili spadek odkształcalności w tym modelu hipercholesterolemii, ale doświadczenie prowadzili przez dłuższy czas — trwało ono 16 tygodni. Świadczy to o tym, że zaburzenia hemoreologiczne w trakcie stosowania diety hipercholesterolowej u królików są bardziej złożone i zależne od czasu trwania stosowania diety. Wyniki badań autorów są zgodne z innymi przeprowadzonymi u ludzi. Ejima opisuje dodatnią korelację między stężeniem cholesterolu całkowitego w surowicy a odkształcalnością erytrocytów u zdrowych ludzi, a także ujemną korelację odkształcalności ze stężeniem triglicerydów w surowicy [18].

**Tabela V. Korelacja porządku rang Spearmana pomiędzy indeksem elongacji erytrocytów a średnim stężeniem hemoglobiny w krwince czerwonej (MCHC). Znamienna, ujemna korelacja między tymi parametrami w naprężeniach ścinających 12,0–60 Pa**

**Table V. Spearman’s rank correlation coefficient between elongation indexes and mean corpuscular haemoglobin concentration. Significant negative correlation between these parameters at shear stresses from 12.0 to 60 Pa**

Naprężenie ścinające [Pa] <i>Shear stresses [Pa]</i>	Współczynnik R Spearmana <i>Spearman’s R coefficient</i>	t (N-2) <i>t (N-2)</i>	Wartość p <i>P level</i>
0,3	-0,36	-1,083	0,3104
0,6	-0,35	-1,041	0,3282
1,2	-0,35	-1,041	0,3282
3,0	-0,33	-1,000	0,3466
6,0	-0,62	-2,260	0,0537
12,0	-0,77	-3,410	0,0092
30,0	-0,89	-5,548	0,0005
60,0	-0,90	-5,946	0,0003

**Tabela VI. Korelacja porządku rang Spearmana między indeksem elongacji erytrocytów w różnych naprężeniach ścinających a stężeniem witaminy E w surowicy: znamienna korelacja między indeksem elongacji erytrocytów a stężeniem witaminy E w surowicy w naprężeniach ścinających 0,3–6,0 Pa**

**Table VI. Spearman’s rank correlation coefficient between elongation indexes and vitamin E levels. Significant correlation between elongation indexes and vitamin E levels at shear stresses from 0.3 to 6.0 Pa**

Naprężenie ścinające [Pa] <i>Shear stresses [Pa]</i>	Współczynnik R Spearmana <i>Spearman’s R coefficient</i>	t (N-2) <i>t (N-2)</i>	Wartość p <i>P level</i>
0,3	0,66	2,49	0,04
0,6	0,78	3,55	0,008
1,2	0,78	3,55	0,008
3,0	0,76	3,28	0,01
6,0	0,68	2,66	0,03
12,0	0,60	2,12	0,07
30,0	0,37	1,13	0,29
60,0	0,32	0,96	0,36

Hypercholesterolaemia in rabbits was associated with an increase in hematocrit, mean corpuscular volume and decrease of mean corpuscular haemoglobin concentration (Table III). Vitamin A and E in the plasma and superoxide dismutase activity in erythrocytes increased (Table IV). There were significant, negative correlations between mean corpuscular haemoglobin concentration and elongation indexes at shear stresses from 12.0 to 60 Pa (Table V). However positive correlations were found between vitamin E levels and

Istnieje kilka możliwych wyjaśnień wzrostu odkształcalności erytrocytów w tym modelu hipercholesterolemii. Jedną z przyczyn może być wzrost średniej objętości krwinki czerwonej (MCV, *mean corpuscular volume*) u zwierząt z hipercholesterolemią. Różnice w odkształcalności erytrocytów między gatunkami zwierząt jako funkcję różnic w objętości krwinek czerwonych opisał Baskurt [19]. Dodatnią korelację między średnią objętością krwinki czerwonej a odkształcalnością erytrocytów opisano również u ludzi, posługując się metodą dyfraktometrii laserowej [20].

Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia hemoglobiny prowadzi do wzrostu lepkości wewnątrzkomórkowej [21]. Wynikiem tego jest zmniejszona odkształcalność erytrocytów [22, 23]. Prezentowane wyniki potwierdzają tę zależność, ponieważ w opisanym doświadczeniu spadek stężenia hemoglobiny wewnątrz krwinki czerwonej w grupie zwierząt z hipercholesterolemią wiązał się ze wzrostem odkształcalności (tab. III).

Również nadmierne obciążenie tlenowe (stres oksydacyjny) przyczynia się do spadku odkształcalności erytrocytów [24]. Zwiększenie się odkształcalności erytrocytów u królików z hipercholesterolemią może wynikać ze zmian w równowadze oksydacyjno-antyoksydacyjnej, ponieważ, podobnie jak inni autorzy, autorzy niniejszego artykułu stwierdzili u królików z hipercholesterolemią wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej [25]. Jednocześnie króliki z hipercholesterolemią wykazywały wzrost stężenia w surowicy innych przeciwutleniaczy — witamin A i E (tab. IV). Jednakże tylko stężenie witaminy E korelowało dodatnio z odkształcalnością krwinek czerwonych (tab. VI). Z innych doniesień wiadomo, że zwiększona podaż witaminy A w posocznicy [26], a witaminy E — w okresie bezpośrednio po oparzeniu [27], prowadzi do wzrostu odkształcalności erytrocytów. Prawdopodobnie podaż witamin A i E w diecie wzbogaconej kurzymi jajami częściowo odpowiada za wzrost odkształcalności erytrocytów u zwierząt z hipercholesterolemią.

## Wnioski

1. Odkształcalność erytrocytów u królików z hipercholesterolemią zwiększa się.
2. Czynniki odpowiedzialnymi za zwiększenie się odkształcalności w hipercholesterolemii doświadczalnej mogą być zmiany w objętości erytrocytów, lepkości cytoplazmy krwinki czerwonej oraz przesunięcia w równowadze oksydacyjno-antyoksydacyjnej.

## Piśmiennictwo (References)

1. Rosenson R.S., Shott S., Lu L., Tangney C.C. Hypertriglyceridemia and Other Factors Associated with Plasma Viscosity. *Am. J. Med.* 2001; 110: 488–492.
2. Paniagua O.A., Bryant M.B., Panza J.A. Role of Endothelial Nitric Oxide in Shear Stress Induced Vasodilation of Human Microvasculature: Diminished Activity in Hypertensive and Hypercholesterolemic Patients. *Circulation* 2001; 103: 1752–1758.
3. Pfafferoth C., Moessmer G., Ehrly A.M., Bauersachs R.M. Involvement of erythrocyte aggregation and erythrocyte resistance

elongation indexes at shear stresses from 0.3 to 6.0 Pa (Table VI).

## Discussion

Feeding of rabbits during 6 weeks by hypercholesterolaemic diet caused an increase in RBC deformability in our experiments. Hayashi and others [1] reported a decrease in red cell deformability in this model of hypercholesterolaemia, but after a longer period of time — 16 weeks. This means that haemorheological disturbances during feeding of rabbits by cholesterol-enriched diet are probably more complex and time-dependent. Our observations are in agreement with other investigators. Ejima reported a positive correlation between deformability of erythrocytes and cholesterol levels in healthy subjects, and a negative correlation between deformability and serum triglyceride levels [18].

In our experiment serum triglyceride levels in hypercholesterolaemic animals were unchanged. There are several further explanations for the increase in deformability of the erythrocytes in hypercholesterolaemic animals in this model. Increase in MCV is associated with increase in deformability. Differences in deformability of RBC between various animal species as a function of cell size have been described by Baskurt [19]. A concomitant increase in MCV and deformability of erythrocytes detected by ektacytometry has been reported in humans [20].

An increase in intracellular haemoglobin concentration led to an increase in intracellular viscosity [21]. As a result a decrease in deformability has been observed [22, 23]. Our results confirm this association, because in the presented experiment a decrease in mean corpuscular haemoglobin concentration was associated with increase in deformability in hypercholesterolaemic rabbits (Table III). Excessive oxidative stress induced a decrease in red blood cell deformability [24]. An increase in deformability of erythrocytes in hypercholesterolaemic rabbits may indicate changes in oxidation-antioxidation balance, since our experiment confirms an increase in activity of SOD in the plasma of hypercholesterolaemic rabbits [25] and reveals a significant increase of other antioxidants in plasma Vitamin A and E (Table IV). Supplementation of vitamin A in sepsis [26] and E in post-burn period can increase the deformability of erythrocytes [27]. Probably supplementation of vitamin E in hen's egg enriched diet is at least partially involved in the increase in red blood cell deformability in hypercholesterolaemic animals.

## Conclusions

1. Deformability of RBC of hypercholesterolaemic rabbits has been increased.
2. Possible factors responsible for the increase in deformability of erythrocytes during experimental hypercholesterolaemia can be changes in mean corpuscular volume, plasma viscosity and oxidative-antioxidative balance.

- to flow in acute coronary syndromes. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 1999; 21: 35–43.
4. Hiatt W.R. Medical Treatment of Peripheral Arterial Disease and Claudication. *NEJM* 2001; 344: 108–1621.
  5. Chmiel B., Kokocińska D., Leidgens M., Kuśmierski S. Wpływ zmniejszonej odkształcalności erytrocytów na mikrokążenie w wątrobie szczura. *Chir. Pol.* 2001, 3 (1): 17–21.
  6. Hayashi J., Ishida N., Sato H., Hata Y., Saito T. Effect of bera- prost, a stable prostacyclin analogue, on red blood cell deformability impairment in the presence of hypercholesterolemia in rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1996; 27: 527–531.
  7. Kohno M., Murakawa K., Yasunari K., Yokokawa K., Horio T., Kano H., Minami M., Yoshikawa J. Improvement of erythrocyte deformability by cholesterol-lowering therapy with pravastatin in hypercholesterolemic patients. *Metabolism*, 1997; 46: 287–291.
  8. Miossec P., Zkhiri F., Paries J., David-Dufilho M., Devynck M.A., Valensi P.E. Effect of pravastatin on erythrocyte rheological and biochemical properties in poorly controlled Type 2 diabetic patients. *Diabetes Medecine* 1999; 16: 424–430.
  9. Vaya A., Martinez M., Solves P., Barbera J.L., Aznar J. Red blood cell deformability determined by the rheodyn SSD in familial hypercholesterolemia. *Clin. Hemorheol.* 1996; 16: 515–522.
  10. Vaya A., Martinez M., Guillen M., Dalmau J., Aznar J. Erythrocyte deformability in young familial hypercholesterolemics. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 1998; 19: 43–48.
  11. Martinez M., Vaya A., Marti R., Gil L., Lluch I., Carmena R., Aznar J. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on red blood cell membrane lipids and haemorheological parameters, in patients affected by familial hypercholesterolemia. *Haemostasis* 1996; 26: 171–176.
  12. Pfafferoth C., Moessmer G., Ehrly A.M., Bauersachs R.M. Involvement of erythrocyte aggregation and erythrocyte resistance to flow in acute coronary syndromes. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 1999; 21: 35–43.
  13. Saldanha C., Sargento L., Monteiro J., Perdigao C., Ribeiro C. Impairment of the erythrocyte membrane fluidity in survivors of acute myocardial infarction. A prospective study. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 1999; 20: 111–116.
  14. Fawcett J.P., Menkes D.B. Does Cholesterol Depletion Have Adverse Effects on Blood Rheology? *Angiology* 1994; 45: 199–206.
  15. Koenig W., Hehr R., Ditschuneit H.H., Kuhn K., Ernst E., Rosenthal J., Hombach V. Lovastatin alters blood rheology in primary hyperlipoproteinemia: dependence on lipoprotein(a)? *J. Clin. Pharmacol.* 1992; 32: 539–545.
  16. Finking G., Hanke H. Nikolaj Nikolajewitsch Antschkow (1885–1964) established the cholesterol-fed rabbit as model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis* 1977; 135: 1–7.
  17. Schmid-Schönbein H., Ruef P., Linderkamp O. The shear stress diffractometer rheodyn SSD for determination of erythrocyte deformability. I. Principles of operation and reproducibility. *Clin. Hemorheol.* 1996; 16: 745–748.
  18. Ejima J., Ijichi T., Ohnishi Y., Maruyama T., Kaji Y., Kanaya S., Fujino T., Uyesaka N., Ohmura T. Relationship of high-density lipoprotein cholesterol and red blood cell filterability: cross-sectional study of healthy subjects. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2000; 22: 1–7.
  19. Baskurt O.K. Deformability of red blood cells from different species studied by resistive pulse shape analysis technique. *Biorheology* 1996; 33: 169–179.
  20. Smith J.A., Martin D.T., Telford R.D., Ballas S.K. Greater erythrocyte deformability in world-class endurance athletes. *Am. J. Physiol.* 1999; 276 (H2): 188–193.
  21. Cokelet G.R., Meiselman H.J. Rheological comparison of hemoglobin solutions and erythrocyte suspensions. *Science* 1968; 162: 275–277.
  22. Bosch F.H., Werre J.M., Schipper L., Roerdinkholder-Stoelwinder B., Huls T., Willekens F.L.A., Wichers G., Halie M.R. Determination of red blood cell deformability in relation to cell age. *Eur. J. Haematol.* 1994; 52: 35–41.
  23. Mohandas N., Chasis J.A. Red Blood Cell deformability, Membrane Material Properties and Shape: Regulation by Transmembrane, Skeletal and Cytosolic Proteins and Lipids. *Semin. Hematol.* 1993; 30: 171–192.
  24. Baskurt O.K., Temiz A., Meiselman H.J. Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 24: 102–110.
  25. Kim S.C., Kim I.K., Seo K.K., Baek K.J., Lee M.Y. Involvement of superoxide radical in the impaired endothelium-dependent relaxation of cavernous smooth muscle in hypercholesterolemic rabbits. *Urol. Res.* 1997; 25: 341–346.
  26. Powell R.J., Machiedo G.W., Rush B.F., Dikdan G. Oxygen free radicals: Effect on red cell deformability in sepsis. *Crit. Care Med.* 1991; 19: 732.
  27. Bekyarova G., Yankova T., Kozarev I. Combined application of alpha-tocopherol and FC-43 perfluorocarbon emulsion suppresses early postburn lipid peroxidation and improves deformability of erythrocytes. *Acta Chir. Plast.* 1998; 40: 17–21.

**Adres do korespondencji (Address for correspondence):**

dr med. Bogdan Chmiel  
Klinika Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej Śląskiej AM  
ul. Francuska 20/26  
40-027 Katowice  
faks: (032) 255-50-52  
e-mail: chmiel@slam.katowice.pl

Praca wpłynęła do redakcji 05.09.2002 r.