

Characteristics of erythrocytes and risk factors for cardiovascular diseases

Vlastnosti erytrocytov a rizikové faktory pre kardiovaskulárne ochorenia

Jasenovec T¹, Radošinská J^{1,2}, Vrbjar N²

¹Fyziologický ústav, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Slovenská republika

Jasenovec T, Radosinska J, Vrbjar N. **Characteristic of erythrocytes and risk factors in cardiovascular diseases.** Cardiology Lett. 2017;26(6):348–352

Abstract. Deformability refers to an ability of red blood cells (RBCs) to change their shape in order to pass through capillaries in circulation. Deterioration in RBC deformability contributes to alterations in microcirculatory blood flow and delivery of oxygen to tissues. Decreased deformability of RBC has been found to be the marker of adverse outcomes in cardiovascular diseases (CVD). One of factors responsible for maintenance of RBC deformability is the Na,K-ATPase known as crucial enzyme in maintenance of intracellular ionic homeostasis. Changes in concentration of ions affect cellular volume and consequently RBC deformability. This review summarizes the knowledge concerning the RBC deformability in connection with selected risk factors of CVD, including hypertension, hypercholesterolemia, and diabetes mellitus, based on papers from human studies. We attempted to provide an update on important issues regarding the role of Na,K-ATPase in RBC deformability.

The parameters of RBCs are modified not only in CVD, but already in risk factors of CVD before clinical manifestation of disease. Data presented in this review allow us to suggest that in patients suffering from hypertension as well as diabetes mellitus the Na,K-ATPase appears to be responsible for the changes leading to alterations in RBC deformability. The triggering factor for changes of RBC deformability during hypercholesterolemia seems to be the increased content of cholesterol in erythrocyte membranes that modified its mechanical properties. Ref. 42, online full text (Free, PDF) www.sks.sk

Key words: erythrocyte deformability – Na,K-ATPase – hypertension – diabetes mellitus – hypercholesterolemia

Jasenovec T, Radošinská J, Vrbjar N. **Vlastnosti erytrocytov a rizikové faktory pre kardiovaskulárne ochorenia.** Cardiology Lett. 2017;26(6):348–352

Abstrakt. Deformabilita predstavuje schopnosť erytrocytov meniť tvar, čo je nevyhnutnou podmienkou pre ich prechod cez kapiláry cievneho systému. Zníženie deformability erytrocytov má za následok zhoršenie kvality mikrocirkulácie a tým aj dodávky kyslíka do tkanív. Bolo dokázané, že znížená deformabilita erytrocytov je markerom nepriaznivej prognózy pri kardiovaskulárnych ochoreniach (KVO). Jeden z významných faktorov, ktorý ovplyvňuje deformabilitu erytrocytov, je sodíko-vo-draslíková pumpa (Na,K-ATPáza), ktorá predstavuje kľúčový enzým pre zachovanie iónovej homeostázy buniek. Zmeny v koncentrácii iónov ovplyvňujú objem a tým aj deformabilitu erytrocytov. Tento článok sumarizuje poznatky o deformabilite erytrocytov vzhľadom na vybrané rizikové faktory kardiovaskulárnych ochorení (KVO), ako sú hypertenzia, hypercholesterolémia a diabetes mellitus na základe štúdií uskutočnených na ľuďoch. Našou snahou bolo tiež aktualizovať poznatky o úlohe erytrocytovej Na,K-ATPázy v týchto podmienkach.

Z ¹Fyziologického ústavu, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave a ²Ústavu pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 5. decembra 2017; prijaté dňa 6. decembra 2017

Adresa pre korešpondenciu: Doc. MUDr. Jana Radošinská, PhD., Fyziologický ústav LF, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: jana.radosinska@fmed.uniba.sk

Primárna práca bola v plnom rozsahu publikovaná v: Radosinska J, Vrbjar N. The role of red blood cell deformability and Na,K-ATPase function in selected risk factors of cardiovascular diseases in humans: focus on hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia. *Physiol Res.* 2016;65:S43–54.

Ukázalo sa, že funkčnosť erytrocytov je ovplyvnená nielen pri KVO, ale už pri rizikových faktoroch KVO pred klinickými príznakmi ochorenia. Z dostupnej literatúry taktiež vyplýva, že v podmienkach hypertenzie, ako aj pri diabetes mellitus je znížená aktivita Na,K-ATPázy príčinou zmien, ktoré spôsobujú poruchy v deformabilite erytrocytov. Pri hypercholesterolémii sa javí byť rozhodujúcim faktorom zvýšený podiel cholesterolu v membráne erytrocytu, ktorý mení jej mechanické vlastnosti. Lit. 42, online full text (Free, PDF) www.sks.sk
Kľúčové slová: deformabilita erytrocytov – Na,K-ATPáza – hypertenzia – diabetes mellitus – hypercholesterolémia

Zrelé ľudské erytrocyty majú bikonkávny tvar, ktorý je nevyhnutnou podmienkou pre ich fyziologické funkcie. Prvou výhodou tohto tvaru je zväčšenie difúznej plochy potrebnej na výmenu dýchacích plynov. Druhou je schopnosť erytrocytov meniť svoj tvar, ktorá sa nazýva deformabilita erytrocytov. Predstavuje jeden z najdôležitejších faktorov ich prežívania v cirkulácii, keďže štandardný erytrocyt s priemerom 7,2 µm musí byť schopný prejsť cez kapiláry s priemerom len 3 – 4 µm. Deformabilita erytrocytov je tak kľúčová pre efektívnu mikrocirkuláciu a dostatočnú dodávku kyslíka tkanivám (1). Deformabilita erytrocytov sa považuje za hlavný faktor ich prežívania, udržiavania toku krvi aj pri vysokej hodnote hematokritu a umožňuje zníženie krvnej viskozity pri vyšších šmykových rýchlostiach (2).

Klinické štúdie (napríklad Framinghamská štúdia) poukazujú na hemoreologické parametre ako na nezávislé rizikové faktory kardiovaskulárnych ochorení (KVO). Iba zmeny v reológii krvi vedia vysvetliť, prečo ateroskleróza postihuje iba niektoré cievy. Podľa Vaya et al. (3) sú však zmeny v reológii prítomné ešte pred nástupom zmien v cievnej stene. Tieto zmeny majú ešte väčší význam v koronárnej cirkulácii, ktorá predstavuje jedno z miest s najužšími kapilármi v organizme a taktiež tu dochádza ku kontinuálnym zmenám prietoku krvi, perfúzneho tlaku a šmykového napätia počas srdcového cyklu (4). U pacientov s KVO boli pozorované zmeny v morfológii erytrocytov (5). Zníženie deformability erytrocytov spôsobené rôznymi faktormi spôsobuje zvýšenie viskozity krvi a narúša správnu perfúziu tkaniva, z čoho vyplývajú aj nepriaznivé príznaky KVO (4, 6, 7).

Deformabilita erytrocytov je všeobecne podmienená tromi hlavnými faktormi: fluiditou membrány erytrocytov, intracelulárnou viskozitou a pomerom povrch/objem bunky (7). Fluidita membrány erytrocytov a pomer povrch/objem erytrocytov priamo závisia od aktivity Na,K-ATPázy. Tento enzým zodpovedá za transport Na⁺ von z bunky a K⁺ do bunky, čím následne zabezpečuje objemovú a vodnú homeostázu buniek. Dôležitosť Na,K-ATPázy v erytrocytoch bola preukázaná u pacientov so stabilnou angínou pectoris, kde jej aktivita nepriamo úmerne koreluje so závažnosťou ochorenia (8). Vzhľadom na uvedené skutočnosti cieľom článku je objasniť vzťah medzi deformabilitou erytrocytov, aktivitou Na,K-ATPázy v erytrocytoch a rôznymi rizikovými faktormi KVO so zameraním na hypertenziu, diabetes mellitus (DM) a hypercholesterolémiu, na základe štúdií uskutočnených na ľuďoch.

Hypertenzia

Viacero štúdií poukázalo na zníženú deformabilitu erytrocytov u pacientov s esenciálnou hypertenziou. Deformabilita erytrocytov bola znížená aj u pacientov podstupujúcich anti-hypertenzívnu liečbu a toto zníženie bolo nepriamo úmerné ich strednému artériovému tlaku (9). Skúmaním regulačných mechanizmov membránových funkcií sa u esenciálnych hypertonikov dokázal vzťah medzi endogénnym inhibítorom Na,K-ATPázy (digitalis-like factor, DLF) a fluiditou erytrocytovej membrány. U hypertenzných pacientov bola v porovnaní s normotenznými pacientmi vyššia hladina DLF, ktorá súvisela s poklesom fluidity erytrocytovej membrány (10).

Tvar erytrocytov a z toho vyplývajúca adaptabilita membrány ľudského erytrocytu je podmienená aj jeho cytoskeletom. U pacientov s hypertenziou mali erytrocyty zvýšenú frakciu membránového tubulínu, čo malo za následok inhibíciu aktivity Na,K-ATPázy (11). U hypertenzných pacientov bola tiež zvýšená frakcia detyrozínovaného tubulínu, ktorého následná translokácia do plazmatickej membrány zvýšila inhibičný účinok tubulínu na aktivitu Na,K-ATPázy, z čoho vyplývala aj znížená deformabilita erytrocytov (12).

Keďže oxidatívny stres má významnú úlohu v patofyziológii esenciálnej hypertenzie a Na,K-ATPáza je ovplyvnená okolitým lipidovým mikroprostredím, peroxidácia lipidov môže spôsobiť zmeny v interakcii Na,K-ATPázy s komponentmi membrány. Redukcia aktivity Na,K-ATPázy a zvýšenie hladín reaktívnych zlúčenín kyseliny tiobarbiturovej môžu byť základným patofyziologickým aspektom spojeným s prehypertenziou (13). Pacienti trpiaci esenciálnou hypertenziou po podávaní vitamínov C a E vykazovali zníženie oxidatívneho stresu a zvýšenú fluiditu membrány spolu s vyššou aktivitou erytrocytovej Na,K-ATPázy (14).

Diabetes mellitus

Už dlho je známe, že diabetes mellitus (DM) je sprevádzaný narušenou mikrocirkuláciou, ktorá vedie k relatívnej tkanivovej hypoxii (15, 16). DM spôsobuje početné abnormality erytrocytov, ako napríklad ich zvýšenú agregáciu (17), zvýšenú membránovú viskozitu (18) a zníženú deformabilitu (19, 20). Inkubácia erytrocytov v prostredí s vysokou hladinou glukózy spôsobila výrazný pokles aktivity Na,K-ATPázy oproti

kontrolnej vzorke, zvýšenú peroxidáciu lipidov a glykozyláciu membránových proteínov (21).

Dlho sa verilo, že C-peptid, ktorý spája inzulínové reťazce A a B v prekurzorovej molekule inzulínu, je len vedľajší produkt jeho syntézy. Avšak pri porovnaní aktivity erytrocytovej Na,K-ATPázy pacientov s DM 1. typu, s pacientmi s DM 2. typu a kontrolnou vzorkou sa zistilo, že priemerná aktivita enzýmu bola u diabetikov 1. typu nižšia v porovnaní s kontrolnou skupinou a diabetikmi 2. typu. Pacienti s DM 2. typu, ktorí podstupovali inzulínovú terapiu, mali aktivitu Na,K-ATPázy taktiež zníženú (22). Úlohu C-peptidu v regulácii erytrocytovej Na,K-ATPázy potvrdila štúdia uskutočnená na diabetikoch 1. typu, u ktorých sa zvýšila jej aktivita po suplementácii C-peptidom o približne 100 %. Po podávaní C-peptidu diabetikom 1. typu sa pozorovalo aj výrazné zlepšenie deformability erytrocytov. Inhibícia Na,K-ATPázy jej špecifickým inhibítorom ouabainom zablokovala vplyv C-peptidu na deformabilitu erytrocytov (23).

Ďalším možným mechanizmom zodpovedným za zmeny aktivity Na,K-ATPázy pri DM je samotná zvýšená koncentrácia glukózy v krvi, ktorá spúšťa tubulínom indukované účinky vedúce k inhibícii Na,K-ATPázy (24). Zistilo sa tiež, že vysoké koncentrácie glukózy podporujú acetyláciu tubulínu a jeho následnú translokáciu do membrány, čím znižujú deformabilitu erytrocytov (25).

Hypercholesterolémia

Nadbytok cholesterolu spôsobuje zmeny základných vlastností plazmatickej membrány erytrocytov, vrátane jej fluidity a stupňa peroxidácie membránových lipidov (26, 27). Zvýšenie cholesterolu v membráne spôsobuje progresívny pokles deformability erytrocytov (28). Štúdie zamerané na vplyv vysokej hladiny LDL cholesterolu preukázali výrazne nižšiu deformabilitu erytrocytov v skupine pacientov s hypercholesterolémiou (29). U diabetikov 2. typu sa tiež zistila významná negatívna vzájomná súvislosť medzi hladinou LDL cholesterolu a aktivitou erytrocytovej Na,K-ATPázy (30). Deformabilita erytrocytov bola oproti kontrolnej skupine u normocholesterolemických diabetikov znížená a u hypercholesterolemických diabetikov veľmi znížená (31). Tieto výsledky naznačujú, že zvýšená hladina plazmatického cholesterolu môže znížiť deformabilitu erytrocytov iným spôsobom ako hyperglykémia pri DM 2. typu.

U dospelých pacientov s familiárnou hypercholesterolémiou 2. typu bol okrem zmeny štruktúry a fluidity erytrocytových membrán, zhoršenej funkcie a štruktúry plazmatických membránových proteínov popísaný aj pokles koncentrácie tiolových skupín membránových proteínov s následným poklesom aktivity Na,K-ATPázy (32). Pokles voľných tiolových skupín koreluje so zvýšenou agregáciou membránových proteínov, pretože významná frakcia oxidovaných skupín môže tvoriť disulfidové mostíky (33).

V skupine hypercholesterolemických pacientov so zníženou aktivitou Na,K-ATPázy a membránovou fluiditou červených krviniek sa po podávaní polyfenolového extraktu z *Aronia melanocarpa* objavil výrazný pokles koncentrácie cholesterolu v erytrocytoch, pokles peroxidácie lipidov a zvýšenie fluidity erytrocytovej membrány. Tieto hodnoty však nedosiahli hodnoty kontrolnej skupiny a aktivita Na,K-ATPázy ostala nezmenená (34). Môžeme teda predpokladať, že vysoký podiel cholesterolu a stupeň oxidácie lipidov má u hypercholesterolemických pacientov kľúčovú úlohu v regulácii deformability erytrocytov, čo sa potvrdzuje aj v štúdií vykonanej na pacientoch s ischemickou chorobou srdca, u ktorých bola v porovnaní so zdravými ľuďmi zvýšená hladina peroxidácie lipidov a celkového cholesterolu. Prítomný bol tiež pokles aktivity katalázy a superoxid dizmutázy v erytrocytoch. Tieto poruchy v antioxidačnom systéme boli sprevádzané štruktúrnymi zmenami membrány erytrocytov (35).

Ďalšie kardiovaskulárne rizikové faktory

Reologické faktory krvi sú ovplyvnené aj samotným starnutím. Vekom podmienený pokles deformability erytrocytov je pravdepodobne spôsobený kumulatívnym efektom rozličných intracelulárnych a extracelulárnych faktorov, ako sú: vekom podmienený oxidačný stres (36), zmenený obsah kyseliny siarovej (37), či aktivita Na,K-ATPázy v bunkovej membráne (38).

Ďalším z rizikových faktorov KVO je obezita. Zvýšenie krvnej viskozity bolo u obezných pacientov prítomné aj napriek neporušenej glukózovej tolerancii a neprítomnosti diabetu, hypertenzie, či hyperlipidémie (39). Vplyv Na,K-ATPázy na deformabilitu erytrocytov nie je však u obezných ľudí úplne objasnený. Meranie deformability erytrocytov ek-tacytometrickými technikami nepreukázalo významný rozdiel medzi obeznými pacientmi bez ďalších rizikových faktorov KVO a kontrolnou skupinou (40).

V štúdií zameranej na chronických fajčiarov sa zistila v skupine dobrovoľníkov mužského pohlavia, ktorí fajčili 7 až 10 rokov aspoň 12 ± 2 cigarety denne, zvýšená peroxidácia lipidov erytrocytovej membrány a jej zvýšená rigidita spolu s poklesom aktivity Na,K-ATPázy a tiolových skupín (41). Okrem zhoršených pľúcnych funkcií bola u fajčiarov prítomná znížená deformabilita erytrocytov a dodávka kyslíka do tkanív. Naopak, zvýšená bola viskozita krvi a plazmy, hladina fibrinogénu a hematokrit (42).

Záver

Údaje prezentované v tomto článku naznačujú, že vzťah medzi deformabilitou erytrocytov a aktivitou Na,K-ATPázy sa odlišuje vzhľadom na podstatu kardiovaskulárnych rizikových faktorov. U pacientov s hypertenziou, ako aj diabetes mel-

litus bola Na,K-ATPáza z veľkej časti príčinou, ktorá viedla k zmenám v deformabilite erytrocytov.

Pri hypercholesterolémii sa zdá byť spúšťajúcim faktorom zníženej deformability erytrocytov zvýšený podiel cholesterolu v membráne erytrocytu, z čoho vyplýva zníženie fluidity membrány. Pokles membránového cholesterolu má zlepšuje hemoreologické parametre, vrátane deformability erytrocytov aj napriek nezmenenej aktivite Na,K-ATPázy.

Vzhľadom na liečbu KVO je výzvou stanoviť možné účinky rôznych terapeutických zásahov do aktivity erytrocytovej Na,K-ATPázy a tým aj do deformability erytrocytov. Intervencie, ktoré vedú k zlepšeniu mikrocirkulácie, by mali byť v praxi uprednostňované. V rámci prevencie KVO by každé opatrenie, ktoré vedie k úprave aktivity Na,K-ATPázy a tým aj deformability erytrocytov, malo byť súčasne považované aj za prevenciu KVO.

Konflikt záujmov

Autori deklarujú, že neexistuje žiadny konflikt záujmov vo vzťahu k tejto práci.

Literatúra

- Schmid-Schönbein H. Microrheology of erythrocytes, blood viscosity, and the distribution of blood flow in the microcirculation. *Int Rev Physiol*. 1976;9:1-62.
- Mokken FC, Kedaria M, Henny CP, Hardeman MR, Gelb AW. The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorrheological parameter. *Ann Hematol*. 1992 Mar;64(3):113-122.
- Vayá A, Martínez M, Dalmau J, Labios M, Aznar J. Hemorheological profile in patients with cardiovascular risk factors. *Haemostasis*. 1996;26(Suppl 4):166-170.
- Toth A, Papp J, Rabai M, Kenyeres P, Marton Z, Kesmarky G, Juricskay I, Meiselman HJ, Toth K. The role of hemorrheological factors in cardiovascular medicine. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2014;56(3):197-204.
- Revin VV, Ushakova AA, Gromova NV, Balykova LA, Revina ES, Stolyarova VV, Stolbova TA, Solomadin IN, Tychkov AY, Revina NV, Imarova OG. Study of Erythrocyte Indices, Erythrocyte Morphometric Indicators, and Oxygen-Binding Properties of Hemoglobin Hematoporphyrin Patients with Cardiovascular Diseases. *Adv Hematol*. 2017;2017:8964587.
- Fornal M, Korbut RA, Królczyk J, Grodzicki T. Evolution of rheological properties of erythrocytes and left ventricular geometry in cardiovascular disease risk patients. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2010;45(2-4):155-159.
- Tomaiuolo G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics*. 2014;8(5):051501.
- Namazi G, Jamshidi Rad S, Attar AM, Sarrafzadegan N, Sadeghi M, Naderi G, Pourfarzam M. Increased membrane lipid peroxidation and decreased Na⁺/K⁺-ATPase activity in erythrocytes of patients with stable coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2015;26(3):239-244.
- Odashiro K, Saito K, Arita T, Maruyama T, Fujino T, Akashi K. Impaired deformability of circulating erythrocytes obtained from nondiabetic hypertensive patients: investigation by a nickel mesh filtration technique. *Clin Hypertens*. 2015;21:17.
- Tsuda K, Shima H, Takeda J, Kimura K, Nishio I, Masuyama Y. The role of endogenous Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase inhibitory factor in the regulation of membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. *J Hypertens*. 1992;10(7):657-661.
- Amaiden MR, Santander VS, Monesterolo NE, Campetelli AN, Rivelli JF, Previtali G, Arce CA, Casale CH. Tubulin pools in human erythrocytes: altered distribution in hypertensive patients affects Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(10):1755-1768.
- Amaiden MR, Santander VS, Monesterolo NE, Nigra AD, Rivelli JF, Campetelli AN, Pie J, Casale CH. Effects of detyrosinated tubulin on Na⁺, K⁺-ATPase activity and erythrocyte function in hypertensive subjects. *FEBS Lett*. 2015;589(3):364-373.
- Malfatti CR, Burgos LT, Rieger A, Rüdger CL, Túrmina JA, Pereira RA, Pavlak JL, Silva LA, Osiecki R. Decreased erythrocyte Na⁺, K⁺-ATPase activity and increased plasma TBARS in prehypertensive patients. *Scientific World Journal*. 2012;2012:348246.
- Rodrigo R, Miranda-Merchak A, Valenzuela Grau R, Bachler JP, Vergara L. Modulation of (Na,K)-ATPase activity by membrane fatty acid composition: therapeutic implications in human hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2014;36(1):17-26.
- Ditzel J, Standl E. The problem of tissue oxygenation in diabetes mellitus. *Acta Med Scand Suppl*. 1975;578:59-68.
- Ditzel J, Jaeger P, Standl E. An adverse effect of insulin on the oxygen-release capacity of red blood cells in nonacidotic diabetics. *Metabolism*. 1978;27(8):927-934.
- Schmid-Schönbein H, Volger E. Red-cell aggregation and red-cell deformability in diabetes. *Diabetes*. 1976;25(2 SUPPL):897-902.
- Baba Y, Kai M, Kamada T, Setoyama S, Otsuji S. Higher levels of erythrocyte membrane microviscosity in diabetes. *Diabetes*. 1979;28(12):1138-1140.
- McMillan DE. Deterioration of the microcirculation in diabetes. *Diabetes*. 1975;24(10):944-957.
- Vague P, Juhan I. Red cell deformability, platelet aggregation, and insulin action. *Diabetes*. 1983;32 Suppl 2:88-91.
- Jain SK, Lim G. Lipoic acid decreases lipid peroxidation and protein glycosylation and increases (Na⁺ + K⁺)- and Ca⁺⁺-ATPase activities in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(11):1122-1128.
- De La Tour DD, Raccach D, Jannot MF, Coste T, Rougerie C, Vague P. Erythrocyte Na/K ATPase activity and diabetes: relationship with C-peptide level. *Diabetologia*. 1998;41(9):1080-1084.
- Forst T, Kunt T. Effects of C-peptide on microvascular blood flow and blood hemorheology. *Exp Diabetes Res*. 2004;5(1):51-64.
- Rivelli JF, Amaiden MR, Monesterolo NE, Previtali G, Santander VS, Fernandez A, Arce CA, Casale CH. High glucose levels induce inhibition of Na,K-ATPase via stimulation of aldose reductase, formation of microtubules and formation of an acetylated tubulin/Na,K-ATPase complex. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(8):1203-1213.

25. Nigra AD, Monesterolo NE, Rivelli JF, Amaiden MR, Campetelli AN, Casale CH, Santander VS. Alterations of hemorheological parameters and tubulin content in erythrocytes from diabetic subjects. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;74:109-120.
26. Koter M, Broncel M, Chojnowska-Jezierska J, Klikczynska K, Franiak I. The effect of atorvastatin on erythrocyte membranes and serum lipids in patients with type-2 hypercholesterolemia. *Eur J Clin Pharmacol.* 2002;58(8):501-506.
27. Broncel M, Bała A, Koter-Michalak M, Duchnowicz P, Wojsznis W, Chojnowska-Jezierska J. Physicochemical modifications induced by statins therapy on human erythrocytes membranes. *Wiad Lek.* 2007;60(7-8):321-328.
28. Cooper RA, Arner EC, Wiley JS, Shattil SJ. Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. *J Clin Invest.* 1975;55(1):115-126.
29. 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(3):287-291.
30. Chakraborty A, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 ;93(1):56-62.
31. Babu N. Influence of hypercholesterolemia on deformability and shape parameters of erythrocytes in hyperglycemic subjects. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2009;41(3):169-177.
32. Koter M, Franiak I, Strychalska K, Broncel M, Chojnowska-Jezierska J. Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(2):205-215.
33. Soszyński M, Bartosz G. Decrease in accessible thiols as an index of oxidative damage to membrane proteins. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(3):463-439.
34. Duchnowicz P, Nowicka A, Koter-Michalak M, Broncel M. In vivo influence of extract from *Aronia melanocarpa* on the erythrocyte membranes in patients with hypercholesterolemia. *Med Sci Monit.* 2012;18(9):CR569-574.
35. Pytel E, Olszewska-Banaszczyk M, Koter-Michalak M, Broncel M. Increased oxidative stress and decreased membrane fluidity in erythrocytes of CAD patients. *Biochem Cell Biol.* 2013;91(5):315-318.
36. Goi G, Cazzola R, Tringali C, Massaccesi L, Volpe SR, Rondanelli M, Ferrari E, Herrera CJ, Cestaro B, Lombardo A, Venerando B. Erythrocyte membrane alterations during ageing affect beta-D-glucuronidase and neutral sialidase in elderly healthy subjects. *Exp Gerontol.* 2005;40(3):219-225.
37. Huang YX, Wu ZJ, Mehrishi J, Huang BT, Chen XY, Zheng XJ, Liu WJ, Luo M. Human red blood cell aging: correlative changes in surface charge and cell properties. *J Cell Mol Med.* 2011;15(12):2634-2642.
38. Maurya PK, Prakash S. Decreased activity of Ca(++)-ATPase and Na(+)/K(+)-ATPase during aging in humans. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;170(1):131-137.
39. Rillaerts E, van Gaal L, Xiang DZ, Vansant G, De Leeuw I. Blood viscosity in human obesity: relation to glucose tolerance and insulin status. *Int J Obes.* 1989;13(6):739-745.
40. Solá E, Vayá A, Santaolalia ML, Hernández-Mijares A, Réganon E, Vila V, Martínez-Sales V, Corella D. Erythrocyte deformability in obesity measured by ektacytometric techniques. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2007;37(3):219-227.
41. Padmavathi P, Reddy VD, Kavitha G, Paramahansa M, Varadacharyulu N. Chronic cigarette smoking alters erythrocyte membrane lipid composition and properties in male human volunteers. *Nitric Oxide.* 2010;23(3):181-186.
42. Ergun DD, Karis D, Alkan FA, Cakmak G, Yenigun M, Ercan M. Effects of cigarette smoking on hemorheologic parameters, plasma osmolality and lung function. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016;63(4):313-324.