

Vitamin C supplementation promotes whole blood rheology in healthy humans

Podávanie vitamínu C zlepšuje reológiu plnej krvi u zdravých ľudí

Radošinská J^{1,2}, Jasenovec T¹, Púžserová A³, Krajčír J¹, Laceková J¹, Kučerová K¹, Kalnovičová T⁴, Tóthová L⁵, Kovačicová I², Vrbjar N²

¹Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika

Radosinska J, Jasenovec T, Puzserova A, Krajcir J, Lacekova J, Kucerova K, Kalnovicova T, Tothova L, Kovacicova I, Vrbjar N. **Vitamin C supplementation promotes whole blood rheology in healthy humans.** Cardiology Lett. 2020;29(4):248–255

Abstract. Objectives: Rheological properties of blood significantly affect blood flow in large vessels. Changes in macrocirculation contribute to atherogenesis and consequently cardio-vascular diseases. However, blood flow disorders also impair the quality of microcirculation, e.g. in patients with recurrent episodes of cardiac ischemia. Since a negative correlation between plasma vitamin C levels and blood viscosity was found, we focused on the effect of vitamin C on hemorheology in more detail. Considering the important role of erythrocytes in blood rheology, we decided to simultaneously monitor changes in erythrocyte parameters. Methods: Hemorheological parameters were determined by rotational and oscillatory measurements. Regarding erythrocytes, we measured their deformability, nitric oxide production and sodium-potassium pump activity. Results: We observed a beneficial effect of increased vitamin C intake on several hemorheological parameters as well as improvement of erythrocyte deformability, increased nitric oxide production and activity of sodium-potassium pump. No change in oxidative stress and antioxidant protection parameters in plasma was observed.

Conclusion: Vitamin C administration led to an improvement in several hemorheological parameters in healthy young volunteers. Since improvement in hemorheology may contribute to better quality of macro- and microcirculation, our results suggest a possible benefit of vitamin C administration in patients with impaired hemodynamics. Fig. 4, Ref. 43, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Key words: vitamin C – hemorheology – erythrocytes – erythrocyte deformability – nitric oxide – Na,K-ATPase

Radošinská J, Jasenovec T, Púžserová A, Krajčír J, Laceková J, Kučerová K, Kalnovičová T, Tóthová L, Kovačicová I, Vrbjar N. **Podávanie vitamínu C zlepšuje reológiu plnej krvi u zdravých ľudí.** Cardiology Lett. 2020;29(4):248–255

Abstrakt. Ciele: Reologické vlastnosti krvi výrazne vplyvajú na prúdenie krvi vo veľkých cievach. Zmeny v makrocirkulácii prispievajú k rozvoju aterosklerózy a následne kardio-vaskulárných ochorení. Poruchy prúdenia krvi však zhoršujú aj kvalitu mikrocirkulácie, napríklad u pacientov s rekurentnými epizódami ischemie srdca. Bolo pozorované, že hladina vitamínu C v plazme negatívne koreluje s viskozitou krvi, preto sme sa zamerali na podrobnejšiu charakterizáciu účinku vitamínu C na hemoreológiu. Vzhľadom na významnú úlohu

Primárna práca bola v plnom rozsahu publikovaná v: Radosinska J, Jasenovec T, Puzserova A, Krajcir J, Lacekova J, Kucerova K, Kalnovicova T, Tothova L, Kovacicova I, Vrbjar N. Promotion of whole blood rheology after vitamin C supplementation: focus on redblood cells. Can J Physiol Pharmacol. 2019;97:837–843.

Z ¹Fyziologického ústavu, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, ²Centra experimentálnej medicíny, Ústav pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Bratislava, ³Centra experimentálnej medicíny, Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava,

⁴I. neurologickej kliniky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave a Univerzitná nemocnica Bratislava a ⁵Ústavu molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 25. novembra 2019; prijaté dňa 19. decembra 2019

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

erytrocytov v hemoreológii sme sa v práci rozhodli súčasne sledovať zmeny v parametroch erytrocytov po podávaní vitamínu C u zdravých dobrovoľníkov.

Metódy: Hemoreologické parametre sme stanovili rotačnými a oscilačnými meraniami. Pri erytrocytoch sme sa zamerali na ich deformabilitu, produkciu oxidu dusnatého a aktivitu sodíkovo-draslíkovej pumpy.

Výsledky: Zaznamenali sme priaznivý vplyv zvýšeného príjmu vitamínu C na viaceré hemoreologické parametre. Súčasne sme pozorovali zlepšenie deformability erytrocytov, zvýšenú produkciu oxidu dusnatého erytrocytmí a zvýšenie aktivity sodíkovo-draslíkovej pumpy v membránach erytrocytov. Parametre oxidačného stresu a antioxidačnej ochrany v plazme neboli zmenené.

Záver: Podávanie vitamínu C zdravým mladým dobrovoľníkom viedlo ku zlepšeniu viacerých hemoreologických ukazovateľov. Keďže zlepšenie hemoreológie sa môže podieľať na zvýšení kvality makro- aj mikrocirkulácie, naše výsledky naznačujú možný potenciál podávania vitamínu C u pacientov so zhoršenou hemodynamikou, ako je to napríklad pri kardio-vaskulárných ochoreniach. Obr. 4, Lit. 43, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Kľúčové slová: vitamín C – hemoreológia – erytrocyty – deformabilita erytrocytov – oxid dusnatý – Na,K-ATPáza

Kardiovaskulárne ochorenia stále patria k hlavným príčinám úmrtí. Ateroskleróza je jedným z dôležitých mechanizmov, ktoré prispievajú k ich patogenéze. Podľa Maleka et al. (1) môžu iba zmeny v reológii krvi vysvetľovať špecifické umiestnenie aterosklerotických plakov v jednotlivých cievach. Hemoreologické zmeny dokonca predchádzajú patologickým zmenám v stene ciev (2). Poruchy v reológii krvi môžu teda závažným spôsobom prispievať k patogenéze aterosklerózy, a tým aj k vývinu kardiovaskulárných ochorení. Porušené prietokové vlastnosti krvi sa môžu prejavovať aj vo forme mikrovaskulárných ochorení. Zistilo sa, že pacienti s opakovanou myokardiálnou ischémiou a akútnym infarktom myokardu majú oproti zdravým ľuďom výrazne horšie hemoreologické parametre (3). Zlepšenie hemoreológie ako takej, by teda mohlo zohrávať významnú úlohu v rámci prevencie kardio-vaskulárných ochorení.

Viskozita krvi predstavuje odpor kladený krvi pri jej prúde. Ide o dynamickú veličinu, ktorej aktuálna hodnota sa neustále mení vzhľadom na fázu srdcového cyklu, ale aj v závislosti od jednotlivých častí cievneho systému, ktorými krv práve preteká. Hemoreologické parametre opisujú prietokové vlastnosti krvi, ako aj mechanické vlastnosti krvných elementov, predovšetkým erytrocytov. Viskozita plnej krvi závisí najmä od týchto troch faktorov: viskozita plazmy, hematokrit a deformabilita erytrocytov (4). Vzhľadom na to, že erytrocyty predstavujú najpočetnejšie krvné elementy, ich deformabilita je jedným z hlavných determinantov viskozity krvi v širokom rozmedzí šmykových rýchlostí (5).

Deformabilita erytrocytov predstavuje schopnosť erytrocytov opakovane meniť svoj tvar bez toho, aby došlo k ich poškodeniu. Táto vlastnosť je rozhodujúca pre ich funkciu, pretože erytrocyty prechádzajú kapilármi s menším priemerom ako je ich samotný priemer. Deformabilitu erytrocytov ovplyvňujú viaceré mechanizmy, ako napríklad produkcia oxidu dusnatého (NO). Erytrocyty disponujú vlastnou endotelovou NO syntázou (eNOS) a spolu s endotelovými bunkami významne prispievajú k celkovému množstvu NO v krvi (6). Inhibícia produkcie NO vedie k zhoršeniu deformability erytrocytov a donory NO po takomto zásahu deformabilitu erytrocytov

normalizujú (7). Ďalším dôležitým faktorom, ktorý ovplyvňuje deformabilitu erytrocytov je funkčnosť sodíkovo-draslíkovej pumpy (Na,K-ATPázy) v erytrocytových membránach. Porucha funkčnosti tohto enzýmu vedie k zvýšeniu koncentrácie sodíka v erythrocyte, zvýšeniu vnútrobunkovej osmolarity a následne k zväčšeniu bunkového objemu, čo má za následok zhoršenie deformability erytrocytov (8 – 11).

Porušenie deformability erytrocytov môže viesť k zhoršeniu perfúzie tkanív a ich okysličeniu, čo môže spôsobiť až orgánové poškodenie. Deformabilita erytrocytov sa zhoršuje v prítomnosti rizikových faktorov kardiovaskulárných ochorení (8, 11). Znížená deformabilita sa prejavila aj v širokom spektre ochorení, ako napríklad systémový zápal, diabetes mellitus, reumatoidná artritída, Parkinsonova a Alzheimerova choroba (12), ale aj počas fyziologického starnutia (8, 11). Zvýšená oxidačná záťaž, prípadne narušenie antioxidačnej ochrany sú prítomné pri všetkých uvedených stavoch (12). Oxidačné poškodenie vyvoláva zmeny v membráne a cytoskelete erythrocytu a tým následne zhoršuje aj ich deformabilitu (12 – 14). Antioxidanty predstavujú látky, ktoré by zvýšenú oxidačnú záťaž mohli eliminovať, a tým by mohli pozitívne vplyvať na deformabilitu erythrocytov a následne aj na viskozitu celej krvi.

V našom výskume sme sa okrem stanovenia viskozity krvi zamerali aj na ďalšie parametre, ktoré opisujú reologické vlastnosti krvi. Z prietokových meraní krvi možno vypočítať medzu sklzu (konečná hodnota šmykového napätia pri nulovej šmykovej rýchlosti). Tento parameter hovorí o kritickej hodnote viskozity krvi, ktorá by mohla byť spúšťačom mikrovaskulárných ochorení (15). Niektorí autori však prietokové merania považujú za nedostatočné vzhľadom na presný popis reologických vlastností krvi (16). Preto sme zrealizovali aj oscilačné merania a získali parametre opisujúce elastické vlastnosti krvi – komplexnú viskozitu krvi, ako aj jej zložky, ktorými sú elastický a stratový modul (energia, ktorá je pri deformácii erythrocytov uložená a následne uvoľnená, respektíve spotrebovaná).

Keďže plazmatická hladina vitamínu C u ľudí negatívne koreluje s viskozitou krvi (17), skúmanie doplnkového príjmu vitamínu C na ďalšie hemoreologické parametre by mohlo

obohatiť poznatky v danej problematike. Preto sme sa v našom výskume zamerali na rôzne hemoreologické parametre, ako aj na parametre erytrocytov po podávaní vitamínu C u mladých zdravých dobrovoľníkov, pri súčasnom sledovaní parametrov antioxidačného stavu a oxidačného stresu.

Materiály a metódy

Dizajn štúdie

Štúdie sa zúčastnilo 20 mladých zdravých ľudí (10 mužov, 10 žien, medián veku 22, min. 20, max. 33). Na začiatku pokusu im bola ráno nalačno odobratá venózna krv. Dobrovoľníci následne počas troch týždňov užívali vitamín C (kyselina L-askorbová, NATURAL, Spišská Nová Ves, Slovensko) v dávke 1 000 mg denne. Na konci experimentu im bola opäť odobratá krv, ktorá bola odoslaná na ďalšie analýzy.

Štúdiu schválila etická komisia Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice v Bratislave. Všetci účastníci podpísali informovaný súhlas.

Reologické merania

Hemoreologické parametre sme stanovili pri 37 °C pomocou reometra MCR102 (Anton Paar GmbH, Ostfildern, Nemecko). Všetky merania sa uskutočnili do piatich hodín od odobratia krvi. Pomocou meraní jednotlivých šmykových rýchlostí sme popísali závislosť celkovej viskozity krvi od šmykového napätia a vytvorili sme prietokové krivky. Pomocou programu RheoPlus Rheometer sme údaje popísali Cassonovým matematickým modelom. Tento model charakterizuje medzi sklzu a ne-Newtonovské správanie kvapaliny, preto je veľmi vhodný na popis reologických vlastností krvi (18).

Pomocou oscilačných meraní sme popísali nasledujúce parametre viskoelastických vlastností krvi: komplexná viskozita, elastický modul a stratový modul. Elastický modul nám predstavuje deformačnú energiu, ktorá je počas pôsobenia šmykového napätia uskladnená vo vzorke a následne sa uvoľní. Stratový modul zase označuje deformačnú energiu, ktorá sa počas pôsobenia šmykového napätia spotrebuje.

Analýza krvi

Analýzu krvi sme vykonali pomocou hematologického analyzátoru Sysmex F-820 (Sysmex Corp, Tokyo, Japonsko) a stanovili nasledujúce parametre: počet erytrocytov, distribučná šírka erytrocytov (RDW-SD), hematokrit a priemerný objem erytrocytu (MVC).

Deformabilita erytrocytov

Deformabilitu erytrocytov sme stanovili filtračnou metódou (19). Vzorky krvi sa ihneď po odobratí centrifugovali pri 1 150 g počas piatich minút pri 4 °C. Plazmu, leukocyty, trombocyty a vrchných 20 % erytrocytov sme odsali. Zvyšné erytrocyty sme trikrát premyli vo fyziologickom roztoku.

Premyté erytrocyty sme následne rozriedili pomocou roztoku Cellpack (roztok pre krvný analyzátor Sysmex, 1 : 1 000, V : V) a pomocou centrifugácie pri 175 g filtrovali päť minút cez membránové filtre s 5 µm pórmí (Ultrafree-MC SV Centrifugal Filter; Merck Millipore Ltd., Tullagreen Carrigtwohill, Írsko). Deformabilitu erytrocytov sme vypočítali ako podiel počtu erytrocytov po filtrácii k ich počtu pred filtráciou.

Produkcia NO v erytrocytoch

Na meranie prítomnosti NO v krvinkách sme použili fluorescenčnú sondu DAF-2 DA. Metódu sme modifikovali podľa Cortese-Krott et al. (20). Plnú krv sme nariedili v pomere 1 : 9 v modifikovanom fyziologickom roztoku (v mmol/l: NaCl 118,99; KCl 4,69; NaHCO₃ 25; MgSO₄ · 7 H₂O 1,17; KH₂PO₄ 1,18; CaCl₂ · 2 H₂O 2,5; Na₂EDTA 0,03; glukóza 5,5; pH 7,4) a inkubovali s DAF-2 DA (25 µmol/l, Chemodex, St Gallen, Švajčiarsko) 10 minút v tme pri izbovej teplote. Na inhibíciu NO syntázy sme použili L-NAME (3 mmol/l; Sigma-Aldrich, Hamburg, Nemecko). Na detekciu prípadnej autofluorescencie krvi sme použili vzorku krvi bez prídania DAF-2DA. Krv sme analyzovali pomocou fluorescenčného mikroskopu (Nikon Eclipse Ti, Tokyo, Japonsko). Pri meraní sme použili filtre pre fluoresceín-izotiokyanát (lex. 465–495 nm, lem. 515–555 nm). Florescenčný signál sme kvantifikovali pomocou programu ImageJ.

Kinetické merania Na,K-ATPázy v erytrocytových membránach

Erytrocytové membrány sme izolovali ako v predchádzajúcej štúdi (21). Membrány sme rozriedili v roztoku TRIS (50 mmol/l). Časť membrán sme použili na stanovenie koncentrácie proteínov Lowryho metódou (22). Kinetiku Na,K-ATPázy pre kofaktor Na⁺ sme stanovili pri stúpajúcej koncentrácii NaCl (2 – 100 mmol/l). Objem inkubačného média bol 0,5 ml (v mmol/l, MgCl₂ 4, KCl 10, NaCl 2–100, TRIS 50; pH 7,4). Po 20 minútach preinkubácie vzoriek (40 µg membránových proteínov) v médiu sme reakciu iniciovali pridaním ATP (8 mmol/l) a následne sme ju zastavili po 20 minútach pridaním 0,3 ml 12 % ľadovej kyseliny trichlóroctovej. Anorganický fosfor (P_i), ktorý sa uvoľnil počas hydrolýzy ATP, sme stanovili metódou podľa Taussky a Shorr (23). Aktivitu Na,K-ATPázy sme vypočítali ako rozdiel medzi hydrolýzou ATP vzorky v prítomnosti všetkých iónových kofaktorov (Na⁺, K⁺, Mg²⁺) a vzorky, v ktorej neboli prítomné Na⁺ a K⁺ ióny. Pomocou priamej nelineárnej regresie sme stanovili kinetické parametre V_{max} (maximálna rýchlosť reakcie) a K_{Na} (koncentrácia Na⁺ potrebná k polovičnej aktivácii Na,K-ATPázy). Roztoky, ktoré sme použili pri meraniach, boli od firmy Sigma-Aldrich (Mníchov, Nemecko).

Biochemická analýza oxidačného stavu

Markery oxidačného poškodenia proteínov sme stanovili spektrofotometricky analýzou AOPP podľa metódy Witko-Sarsat (24). Markery lipidovej peroxidácie (TBARS) sme

stanovili spektrofotometricky podľa Behuliak et al. (25). Vzorku sme preniesli do mikroplatničky a merali pri λ 515 nm a λ 535 nm. Na stanovenie markerov karbonylového stresu (AGEs) sme vzorky rozriedili vo fosfátovom tlmivom roztoku ($\text{pH} = 7,2$) a fluorometricky odmerali pri λ 370 nm a λ 430 nm (26). Na stanovenie antioxidačného stavu sme odmerali tieto parametre: TAC a FRAP. Na stanovenie TAC sme vzorky plazmy zmiešali s acetátovým tlmivým roztokom ($0,4 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 5,8$). Ako blank sme použili začiatočnú absorbanciu vzorky (pri vlnovej dĺžke 660 nm). Po pridaní roztoku ABTS (kyselina 2,2'-azino-bis-3-etylbenzotiazolín-6-sulfónová s acetátovým tlmivým roztokom) a peroxidu vodíka sme znovu zmerali absorbanciu. Kalibračnú krivku sme vytvorili pomocou Trolox (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchróm-2-karboxylová). FRAP sme merali spektrofotometricky metódou podľa Benzie a Strain (27).

Koncentráciu bielkovín sme odmerali pomocou kitu s kyselinou bicinichonínovou (Sigma-Aldrich, Mníchov, Nemecko) podľa návodu výrobcu. Všetky uvedené spektrofotometrické a spektrofluorometrické merania sa uskutočnili na multidekčnom analyzátore mikroplatničiek Tecan Safire II (Grödig, Rakúsko) a činidlá použité na tieto merania boli od firmy Sigma-Aldrich (Mníchov, Nemecko).

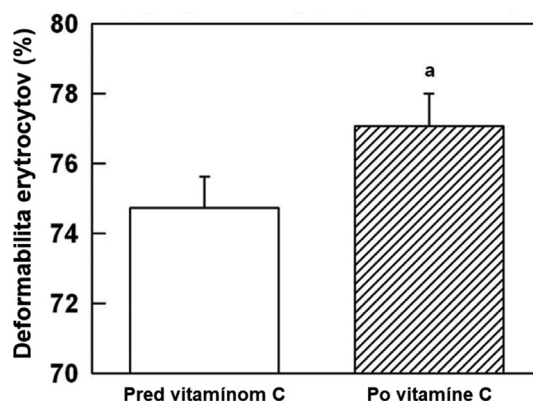
Štatistické analýzy

Údaje uvádzame ako priemer $\pm$ štandardná chyba priemeru (SEM). Normalitu údajov sme overili D'Agostino-Pearsonovým testom. Štatistickú významnosť rozdielov pred a po príjme vitamínu C sme analyzovali párovým t-testom alebo Wilcoxonovým testom. Rozdiely sme považovali za štatisticky významné pri $p < 0,05$. Na analýzu údajov sme použili softvér GraphPad Prism 7.02.

Výsledky

Reologické merania

Prietokové krivky sme analyzovali rozdelením šmykových rýchlostí do troch kategórií: nízka ($0,1 - 1 \text{ s}^{-1}$), stredná ($1 - 10 \text{ s}^{-1}$) a vysoká ($10 - 216 \text{ s}^{-1}$) šmyková rýchlosť. Po suplementácii vitamínom C sme pozorovali nižšiu viskozitu v stredných (v mPa.s; $10,7 \pm 0,9$ pred verus $9,9 \pm 1,0$ po, $p < 0,0001$) a vysokých šmykových rýchlostiach (v mPa.s; $5,6 \pm 0,4$ pred verus $5,2 \pm 0,3$ po, $p = 0,0007$). Pomocou Cassonovho modelu sme po podávaní vitamínu C pozorovali nižšiu medzu sklzu (v Pa; $0,16 \pm 0,01$ pred verus $0,13 \pm 0,01$ po, $p = 0,04$), ale rozdiel v Cassonovej viskozite pred a po intervencii nedosiahol štatisticky významnú úroveň (v Pa.s; $0,43 \pm 0,07$ pred verus $0,26 \pm 0,03$ po, $p = 0,068$). Oscilačnými meraniami sme po suplementácii vitamínom C detegovali nižšiu komplexnú viskozitu (v Pa.s; medián 5322 , min. 229 , max. 166160 pred verus medián 3235 , min. 156 ,



Obrázok 1 Deformabilita erytrocytov pred a po podávaní vitamínu C (1 000 mg denne počas troch týždňov). Údaje sú uvedené ako priemerné hodnoty $\pm$ SEM. "a" označuje $p < 0,05$ (deformabilita erytrocytov pred podávaním vitamínu C verus deformabilita erytrocytov po podávaní vitamínu C)

Figure 1 Erythrocyte deformability before and after administration of vitamin C (1000 mg/day for 3 weeks). Data are presented as mean $\pm$ SEM. "a" represents $p < 0,05$ (erythrocyte deformability before vitamin C administration versus erythrocyte deformability after vitamin C administration).

max. 84680 po, $p < 0,0001$), pokles elastického modulu (v Pa; 24295 ± 2214 pred verus 14303 ± 939 po, $p < 0,0001$), ako aj stratového modulu (v Pa; 3560 ± 1603 pred verus 2225 ± 335 po, $p < 0,0001$).

Analýza krvi

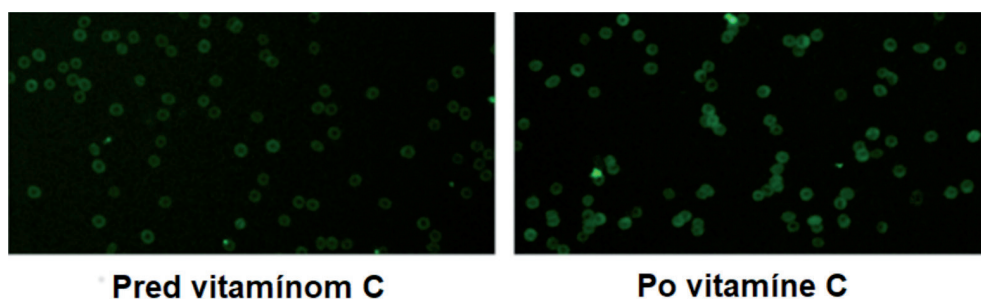
Po podaní vitamínu C sme nepozorovali zmeny nasledujúcich krvných parametrov: počet erytrocytov (v počte. $10^{12}/\text{l}$; $4,69 \pm 0,14$ pred verus $4,68 \pm 0,11$ po, $p = 0,35$), RDW-SD (v fl; $40,45 \pm 0,55$ pred verus $40,18 \pm 0,67$ po, $p = 0,64$), hematokrit ($0,40 \pm 0,01$ pred verus $0,39 \pm 0,01$ po, $p = 0,17$) a MCV (v fl; $84,98 \pm 0,90$ pred verus $83,49 \pm 0,85$ po, $p = 0,24$).

Deformabilita erytrocytov a produkcia NO v erytrocytoch

Deformabilita erytrocytov sa po príjme vitamínu C zvýšila zo $74,73 \% \pm 0,90$ na $77,08 \% \pm 0,92$ ($p = 0,018$) (**obrázok 1**). Reprezentatívne snímky NO závislej fluorescence v erytrocytoch sú na **obrázku 2**. Kvantitatívnou analýzou sme preukázali v erytrocytoch po podávaní vitamínu C zvýšenú produkciu NO (v jednotkách integrovanej denzity): 2544 ± 92 pred, na 2746 ± 65 po ($p = 0,006$). Pridanie inhibítora NO syntázy (L-NAME) úplne eliminovalo fluorescenčný signál DAF-2 DA. Autofluorescenciu erytrocytov sme nepozorovali.

Kinetické merania Na, K-ATPázy v erytrocytových membránach

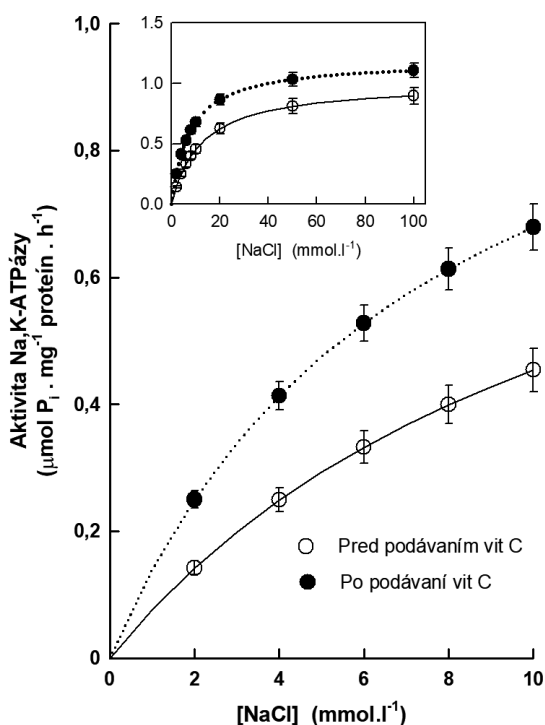
Pred podávaním vitamínu C sme počas aktivácie Na,K-ATPázy v erytrocytových membránach stanovili $V_{\text{max}} = 1,01$



Obrázok 2 Reprezentatívne obrázky produkcie oxidu dusnatého (NO) v erythrocytoch vizualizované fluorescenčnou sondou DAF-2 DA pred a po prijíme vitamínu C (1 000 mg denne počas troch týždňov)

Figure 2 Representative figures of nitric oxide (NO) production in red blood cells visualized by cell-permeable fluorescent NO probe DAF-2 DA before and after vitamin C intake (1000 mg/day for 3 weeks).

$\pm 0,08 \mu\text{mol}$ anorganického fosfátu (P_i). $\text{mg}^{-1}\text{proteinu} \cdot \text{h}^{-1}$. Hodnota K_{Na} (koncentrácia Na^+ potrebná na polovicu maximálnej aktivácie enzýmu) predstavovala vo vzorkách $12,15 \pm 0,92 \text{ mmol/l}$ NaCl. Podávanie vitamínu C vyvolalo stimuláciu aktivity Na,K-ATPázy v celom rozsahu



Obrázok 3 Aktivácia Na,K-ATPázy v membránach erythrocytov pri nízkych koncentráciách kofaktora Na^+ pred a po podávaní vitamínu C (1 000 mg denne počas troch týždňov). Vložený obrázok: Aktivácia enzýmu v organizme v celom skúmanom rozsahu koncentrácií NaCl

Figure 3 Activation of Na,K-ATPase in erythrocyte membranes by low concentrations of cofactor Na^+ before and after vitamin C intake (1000 mg/day for 3 weeks). Insert: Activation of the enzyme in the whole investigated concentration range of NaCl.

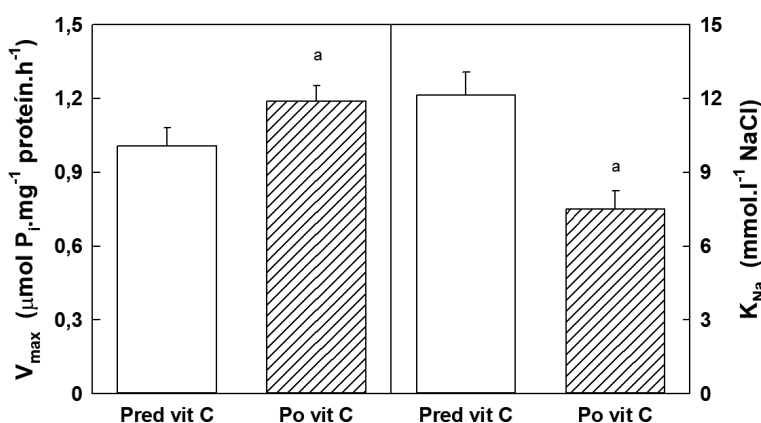
koncentrácií NaCl. Najvyšší účinok predstavujúci +75 % sa pozoroval v prítomnosti 2 mmol/l NaCl. So zvyšujúcou sa koncentráciou sodíka účinok postupne klesal (50 % zvýšenie pri 10 mmol/l NaCl). Pri najvyššej skúmanej koncentrácii NaCl bola aktivita Na,K-ATPázy vyššia o 23 % (obrázok 3). Sumárne sme po podávaní vitamínu C pozorovali zníženie hodnoty K_{Na} o 38 %, kým hodnota V_{max} sa zvýšila o 20 % (obrázok 4).

Biochemická analýza oxidačného stavu

Podávanie vitamínu C nemalo v našom súbore štatisticky významný vplyv na parametre oxidačného stresu a antioxidačného stavu v plazme: AOPP (v $\mu\text{mol/g}$ proteínu; $0,64 \pm 0,10$ pred verus $0,53 \pm 0,10$ po, $p = 0,39$), TAC (v $\mu\text{mol/l}$; 650 ± 19 pred verus 646 ± 23 po, $p = 0,83$), FRAP (v $\mu\text{mol/l}$; 315 ± 29 pred verus 298 ± 21 po, $p = 0,25$), TBARS (v $\mu\text{mol/l}$; $7,11 \pm 0,29$ pred verus $6,77 \pm 0,39$ po, $p = 0,48$) a AGE (v relatívnych jednotkách fluorescencie/g proteínu; $64,14 \pm 8,46$ pred verus $50,47 \pm 4,67$ po, $p = 0,099$).

Diskusia

Cirkulujúca krv je vystavená neustálym hemodynamickým zmenám. Hoci žiadne reometrické merania nedokážu úplne napodobiť podmienky *in vivo*, výsledky týchto meraní nám poskytujú cenné informácie o zmenách mechanického správania sa krvi (28). V našej štúdii sme po podávaní vitamínu C pozorovali nižšiu viskozitu plnej krvi v rozsahu stredných až vysokých šmykových rýchlostí. Keďže vplyv deformability erythrocytov na viskozitu krvi bol opísaný predovšetkým pri vyšších šmykových rýchlostiach (5, 29), predpokladáme, že k týmto zmenám mohlo prinajmenšom čiastočne prispieť zlepšenie deformability erythrocytov. Medza sklzu sa považuje za klinicky významnú v oblasti nízkych šmykových rýchlostí a pri iniciácii toku krvi (30). Zníženie medze sklzu po podávaní vitamínu C môže zodpovedať nižšiemu tlaku potreb-



Obrázok 4 Kinetické parametre Na,K-ATPázy V_{max} a K_{Na} v membránach erytrocytov počas aktivácie NaCl pred a po podávaní vitamínu C (1 000 mg denne počas troch týždňov). V_{max} predstavuje maximálnu rýchlosť enzýmovej reakcie, zodpovedá počtu aktívnych molekúl Na,K-ATPázy v membránach erytrocytov. K_{Na} predstavuje koncentráciu Na^+ potrebnú na polovicu maximálnej aktivácie enzýmu, informuje o afinite enzýmu k sodíkovým iónom (pokles K_{Na} zodpovedá lepšej väzbe sodíkových iónov na Na,K-ATPázu). Údaje sú uvedené ako priemer $\pm$ SEM. "a" označuje $p < 0,05$ v zodpovedajúcom parametri pred podávaním vitamínu C verzus po podávaní vitamínu C.

Figure 4 Kinetic parameters of Na,K-ATPase V_{max} and K_{Na} in erythrocyte membranes during activation with NaCl before and after vitamin C intake (1000 mg/day for 3 weeks). V_{max} represents maximum velocity of enzyme reaction reflecting the count of active molecules of Na,K-ATPase in erythrocyte membranes. K_{Na} represents concentration of Na^+ necessary for half-maximal activation of the enzyme reflecting affinity of enzyme to sodium ions (the decrease in K_{Na} corresponds to better binding of sodium ions by Na,K-ATPase). Statistical significance: "a" represents $p < 0.05$ in corresponding parameter before vitamin C intake vs. after vitamin C intake. The data are presented as means $\pm$ SEM.

nému na obnovenie prietoku krvi, čo prispieva k zlepšeniu periférnej cirkulácie (31).

Ako už bolo uvedené, zlepšenie hemoreológie po podávaní vitamínu C môže byť dôsledkom zmien v parametroch erytrocytov. Výsledky našej štúdie sú v súlade s názorom, že vitamín C by mohol aj prostredníctvom zvýšenia deformability erytrocytov zlepšovať prognózu u septických pacientov (32, 33). V našej štúdii sme popísali dva mechanizmy, ktoré by mohli byť zodpovedné za vyššiu deformabilitu erytrocytov. Tieto zmeny možno vysvetliť zvýšenou produkciou NO v erytrocytoch. Podobné pozitívne účinky na deformabilitu erytrocytov, ktoré boli sprostredkované zvýšením aktivity eNOS v erytrocytoch, sa pozorovali po fyzickej aktivite (34). Syntéza NO vyžaduje viacero kofaktorov. Hladina jedného z nich – tetrahydrobiopterínu sa v aorte po podaní vitamínu C zvyšovala spolu so zvýšenou aktivitou eNOS (35). Sám vitamín C sa považuje za jeden z kofaktorov pre eNOS, pretože sa môže zúčastňovať hydroxylačných reakcií pri tvorbe NO (35). Podanie L-NAME v našich experimentoch úplne inhibovalo intracelulárnu fluorescenciu erytrocytov, preto môžeme tvrdiť, že kvantifikáciou produkcie NO v erytrocytoch môžeme poukázať na aktivitu eNOS v erytrocytoch.

Ďalším systémom, ktorý ovplyvňuje deformabilitu erytrocytov, sú zmeny v aktivite Na,K-ATPázy v erytrocytových membránach. Tento enzým sa spolu s niektorými ďalšími iónovými transportnými systémami (Ca-ATPáza, Na,H-výmenník) považuje za membránovo-viazaný biomarker oxidačného stavu krvi (37). U hypertenzných pacientov podávanie vitamínu C a E viedlo k zníženiu parametrov

oxidačného stresu, zvýšeniu fluidity erytrocytovej membrány a zvýšenej aktivity Na, K-ATPázy (38). Jeden z cieľov našej štúdie bol teda zameraný na mechanizmus protektívneho vplyvu podávania vitamínu C na Na,K-ATPázu. Stimulácia Na,K-ATPázy je pravdepodobne výsledkom kvantitatívnych, ale aj kvalitatívnych zmien tohto enzýmu v erytrocytoch. Po podávaní vitamínu C sa zvýšil počet aktívnych molekúl Na,K-ATPázy, na čo poukazuje zvýšená hodnota V_{max} . Súčasne sa však modifikovala aj štruktúra enzýmu, najmä v blízkosti väzbového miesta pre sodíkové kationy. Táto modifikácia môže viesť k lepšej väzbe sodíkových iónov na enzým, o čom svedčí znížená hodnota K_{Na} . Mechanizmom zodpovedným za takýto účinok je pravdepodobne priama interakcia vitamínu C s enzýmom, ako to dokumentujú štúdie *in vitro* (39), alebo aj nepriamo prostredníctvom aktivácie eNOS v erytrocytoch. Vzťah medzi syntézou NO a funkciou Na,K-ATPázy bol už opísaný v srdci a obličkách. V experimentálnom modeli L-NAME indukovanej hypertenzie bolo u potkanov zníženie syntézy NO sprevádzané zníženou schopnosťou Na,K-ATPázy v srdci viazať sodík. Po obnovení syntézy NO sa táto schopnosť normalizovala (40). Podobný vplyv sa pozoroval aj v obličkách, avšak obnova schopnosti obličkového enzýmu viazať sodík bola v porovnaní so srdcovým nižšia (41). Úloha NO pri aktivácii Na,K-ATPázy sa pozorovala aj v tkanive hladkého svalstva (42).

Všetky uvedené parametre opísané v našej štúdii sme merali pri monitorovaní vybraných parametrov antioxidačného stavu a oxidačného stresu v plazme. Tieto analýzy boli nevyhnutné, keďže vitamín C sme podávali v pomerne vysokej dávke (1 000 mg/denne), ktorá by mohla mať aj prooxidač-

ný účinok a spôsobiť poškodenie erytrocytov stimuláciou peroxidácie lipidov (43). Napriek tomu sme v aktuálnej, ako aj v už publikovanej štúdii (19) nepozorovali žiadny vzťah medzi zmenami charakteristík erytrocytov a parametrami antioxidačného stavu v plazme.

Záver

Naše výsledky ukazujú, že podávanie vitamínu C viedlo u zdravých mladých dobrovoľníkov k viacerým pozitívnym zmenám hemoreologických parametrov. Vzhľadom na zlepšenú schopnosť erytrocytov prechádzať úzkymi kapilármi mikrocirkulácie, vyššiu produkciu NO a zlepšenie vnútrobunkovej homeostázy sodíka, môžeme konštatovať, že hemoreologické zmeny po podávaní vitamínu C sú prinajmenšom čiastočne dôsledkom zlepšenia charakteristík erytrocytov. Bolo by zaujímavé skúmať vplyv vitamínu C na hemoreológiu u pacientov, ktorí trpia poruchami mikrocirkulácie a zhoršenou perfúziou orgánov, ako je to v prípade kardiovaskulárnych ochorení.

Podakovanie: Tento výskum bol podporený z grantov: VEGA 2/0166/17, VEGA 1/0234/18, APVV-15-0085 a ITMS 26240120020-CEKOMAT II.

Konflikt záujmov

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

Literatúra

- Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamics hear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA*. 1999;282:2035-2042.
- Vayá A, Martínez M, Dalmau J, et al. Hemorheological profile in patients with cardiovascular risk factors. *Haemostasis*. 1996;26:166-1170.
- Toth A, Papp J, Rabai M, et al. The role of hemorheological factors in cardiovascular medicine. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2014;56:197-204. doi: 10.3233/CH-131685.
- Kensley KR. The mechanistic relationships between hemorheological characteristics and cardiovascular disease. *Curr Med Res Opin*. 2003;19:587-596.
- Shin S, Ku Y, Park MS, et al. Deformability of red blood cells: A determinant of blood viscosity. *J Mech Sci Technol* 2005;19:216. doi:10.1007/BF02916121
- Cortese-Krott MM, Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? *Redox Bio*. 2014;2:251-258. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.027
- Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, et al. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H1577-1584.
- Jasenovec T, Radosinska J, Vrbjar N. Vlastnosti erytrocytov a rizikové faktory pre kardiovaskulárne ochorenia. *Cardiology Lett*. 2017;26:348-352.
- Juhan-Vague I, Roul C, Rahmani-Jourdheil D, et al. Rapid modifications of biophysical and biochemical parameters of red blood cell membrane from insulin dependent diabetics after insulin administration. *Klin Wochenschr* 1986;64:1046-1049.
- Amaden MR, Santander VS, Monesterolo NE, et al. Effects of de-tyrosinated tubulin on Na⁺,K⁺-ATPase activity and erythrocyte function in hypertensive subjects. *FEBS Lett* 2015;589:364-373. doi: 10.1016/j.febslet.2014.12.022
- 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.
- Pretorius E, Olumuyiwa-Akeredolu OO, Mbotwe S, et al. Erythrocytes and their role as health indicator: Using structure in a patient-orientated precision medicine approach. *Blood Rev* 2016;30:263-274. doi: 10.1016/j.blre.2016.01.001
- Arese P, Turrini F, Schwarzer E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2005;16:133-146.
- Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol* 2014;5:84. doi: 10.3389/fphys.2014.00084
- Cho YI, Cho DJ. Hemorheology and microvascular disorders. *Korean Circ J*. 2011;41:287-295. doi: 10.4070/kcj.2011.41.6.287.
- Campo-Deaño L, Dullens RP, Aarts DG, et al. Viscoelasticity of blood and viscoelastic blood analogues for use in polydimethylsiloxane in vitro models of the circulatory system. *Biomicrofluidics* 2013;7:34102. doi: 10.1063/1.4804649
- Woodward M, Rumley A, Tunstall-Pedoe H, et al. Associations of blood rheology and interleukin-6 with cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. *Br J Haematol*. 1999;104:246-257.
- Lee BK, Xue S, Nam J, et al. Determination of the blood viscosity and yield stress with a pressure-scanning capillary hemorheometer using constitutive models. *Korea-Aust Rheol J* 2011;23:1-6.
- Radosinska J, Horvathova M, Frimmel K, et al. Acute dark chocolate ingestion is beneficial for hemodynamics via enhancement of erythrocyte deformability in healthy humans. *Nutr Res* 2017;39:69-75. doi: 10.1016/j.nutres.2017.03.002
- Cortese-Krott MM, Rodriguez-Mateos A, Sansone R, et al. Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Blood* 2012;120:4229-4237. doi: 10.1182/blood-2012-07-442277
- Radosinska J, Mezesova L, Okruhlicova L, et al. Effect of yeast biomass with high content of carotenoids on erythrocyte deformability, NO production and Na,K-ATPase activity in healthy and LPS treated rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2016;64:125-134.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folinphenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- Tausky HH, Shorr E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* 1953;202:675-685.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304-1313.

25. Behuliak M, Pálffy R, Gardlík R, et al. Variability of thiobarbituric acid reacting substances in saliva. *Dis Markers* 2009;26:49-53. doi: 10.3233/DMA-2009-0606
26. Münch G, Keis R, Wessels A, et al. Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:669-677.
27. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239:70-76.
28. Alves MM, Rocha C, Gonçalves MP. Study of the rheological behaviour of human blood using a controlled stress rheometer. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013;53:369-386. doi: 10.3233/CH-121645
29. Chien S. Determinants of blood viscosity and redcell deformability. *Scand J Clin Lab Invest* 1981;41:7-12.
30. Picart C, Piau JM, Galliard H, et al. Human blood shear yield stress and its hematocrit dependence. *J Rheol* 1998;42:1-12.
31. Replogle RL, Meiselman HJ, Merrill EW. Clinical implications of blood rheology studies. *Circulation* 1967;36:148-160.
32. Marik PE, Khangoora V, Rivera R, et al. Hydrocortisone, vitamin C, and thiamine for the treatment of severe sepsis and septic shock: A retrospective before-after study. *Chest*. 2017;151:1229-1238. doi: 10.1016/j.chest.2016.11.036.
33. Donadello K, Piagnerelli M, Reggiori G, et al. Reduced redblood cell deformability over time is associated with a poor outcome in septic patients. *Microvasc Res*. 2015;101:8-14. doi: 10.1016/j.mvr.2015.05.001.
34. Suhr F, Brenig J, Müller R, et al. Moderate exercise promotes human RBC-NOS activity, NO production and deformability through Akt kinase pathway. *PLoSOne* 2012;7:e45982.
35. d'Uscio LV, Milstien S, Richardson D, et al. Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 2003;92:88-95.
36. May JM. How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radic Biol Med* 2000;28:1421-1429.
37. Kumar P, Chaudhary N, Sharma, et al. Detection of oxidative stress biomarkers in myricetin treated redblood cells. *RSC Adv* 2016;6,100028-34. doi: 10.1039/c6ra15213a
38. Rodrigo R, Miranda-Merchak A, Valenzuela Grau R, et al. Modulation of (Na,K)-ATPase activity by membrane fatty acid composition: therapeutic implications in human hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2014;36:17-26.
39. Kumar N, Kant R, Maurya PK, et al. Concentration dependent effect of (-)-Epicatechin on Na(+) /K(+) -ATPase and Ca(2+) -ATPase inhibition induced by free radicals in hypertensive patients: comparison with L-ascorbic acid. *Phytother Res* 2012;26:1644-1647. doi: 10.1002/ptr.4624.
40. Vrbjar N, Bernátová I, Pechánová O. Changes of sodium and ATP affinities of the cardiac (Na,K)-ATPase during and after nitric oxide deficient hypertension. *Mol Cell Biochem* 1999;202:141-147.
41. Vrbjar N, Javorková V, Pechánová O. Changes of sodium and ATP affinities of the renal Na,K-ATPase during and after nitric oxide-deficient hypertension. *Physiol Res* 2002;51:475-481.
42. Forst T, Kunt T. Effects of C-peptide on microvascular blood flow and blood hemorheology. *Exp Diabetes Res* 2004;5:51-64.
43. Spengler MI, Rasia M, Palma S, et al. Effects of ascorbate fatty ester derivatives on erythrocyte membrane lipoperoxidation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011;47:163-168. doi: 10.3233/CH-2010-1266.