

Piśmiennictwo

- [1] J. D. Andrade, V. Hlady, L. Feng, K. Tingcy, "Interfacial Phenomena" J. Dekker N. York 1994.
 [2] W. Norde, Adv. Colloid Interface Sci. 25 (1986) 267.
 [3] R. F. Valentini, T. G. Vargo, J. A. Gardelle, P. Aebisher "Electrically charged polymeric substrates enhance nerve fibre outgrowth in vitro" Biomaterials 13 (1992) 183.
 [4] J. W. Park "The Biocompatibility" Plenum Press N. York 1986
 [5] B. Adam Biomaterials 18 (1997) 107.

References

- [6] E. Czarnowska, T. Wierzchoń, A. Maranda, "Improvement of titanium alloy for biomedical applications by nitriding and carbonitriding processes under glow discharge conditions" J. of Mat. Sci.: Materials in Medicine 11 (2000) 73.
 [7] S. Mitura "Nanocrystalline diamond for medicine" Proc. SPIE Solid State Crystals in Optoelectronics a Semiconductor Technology 3179 (1997) 79.
 [8] J. Marciniak "Biomateriały" Wyd. P. Śl. Gliwice 2002.

POMIARY PŁYNNOŚCI I MIKROLEPKOŚCI ELEMENTÓW MORFOTYCZNYCH KRWI U OSÓB ZE SZTUCZNĄ ZASTAWKĄ SERCA

MARTA SZYLLER-TRACZ, IZABELLA ŻAKOWSKA, KRZYSZTOF JÓŹWIK

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, INSTYTUT MASZYN PRZEPŁYWOWYCH
 ZESPÓŁ APARATURY MEDYCZNEJ
 UL. WÓLCZAŃSKA 219/223, 93-005 ŁÓDŹ, POLSKA

Streszczenie

Warstwa Nanokrystalicznego Diamentu (NCD) została wykorzystana w przypadku protez/urządzeń mających kontakt z komórkami krwi (np.: sztuczne zastawki serca). Warstwy węglowe wykazują dobre właściwości biogodności oraz hemozgodności.

W prezentowanych badaniach użyta została technika spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) do pomiarów płynności i lepkości wnętrza elementów morfotycznych, w szczególności erytrocytów. Parametry (opisujące płynność lipidów błonowych) zostały określone na podstawie widm EPR. Zmiany w płynności lipidów błonowych i lepkości wnętrza krwinek czerwonych zostały zbadane przy pomocy spektroskopii EPR przy użyciu znaczników spinowych: trzech kwasów tłuszczowych (kwasów 5-, 12-, 16-doksylostearynowych) oraz Tempaminy.

Celem niniejszej pracy było przedstawienie metod pomiaru parametrów krwinek czerwonych oraz opracowanie statystyczne uzyskanych wyników. Prezentowane metody mogą zostać użyte do zbadania oddziaływań warstwy NCD z komórkami krwi.

Przepływ przez sztuczną zastawkę serca jest związany z występowaniem większych wartości naprężeń ścinających działających na powierzchnię komórek oraz w konsekwencji zmian w strukturze lipidów i białek plazmatycznych. Zmiany w płynności lipidów błonowych krwinek czerwonych (RBC) mogą obniżyć ich deformację oraz zwiększać ich agregację, a w konsekwencji mogą prowadzić do zmian właściwości reologicznych krwi ludzkiej.

Słowa kluczowe: sztuczna zastawka serca (AHV), krwinki czerwone (RBC), erytrocyty, płynność lipidów błonowych.

MEASUREMENTS OF FLUIDITY AND MICROVISCOSITY OF MORPHOTIC ELEMENTS OF PATIENTS WITH AN ARTIFICIAL HEART VALVE

MARTA SZYLLER-TRACZ, IZABELLA ŻAKOWSKA, KRZYSZTOF JÓŹWIK

TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, INSTITUTE OF TURBOMACHINERY
 DIVISION OF MEDICAL APPARATUS
 219/223 WÓLCZAŃSKA ST. 93-005 ŁÓDŹ, POLAND

Abstract

Nanocrystalline Diamond Coatings (NCD) have been developed for blood cell contacting-implants/devices (e.g. artificial heart valves). Carbon surfaces have good biocompatibility and haemocompatibility.

In this study the technique of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy was used for measurements of fluidity and internal viscosity of morphotic elements, especially erythrocytes. Parameters (describing the membrane lipid fluidity) were determined using EPR spectra. Changes in the membrane lipid fluidity and internal viscosity of red blood cells were examined by means of EPR spectroscopy using spin labelled: three fatty acids (5-, 12-, 16-doxylstearic acids) and Tempamine.

The aim of this study was to present the method of measurements of red blood cells and the statistical post-processing of the obtained results. These methods could be used to examine interactions between a NCD layer and blood cells.

The blood flow through an artificial heart valve is connected with high values of the shear stress as acting on cell surfaces and, in consequence, by changes in the structure of membrane of lipids and proteins. Changes in plasma membranes of red blood cells (RBC) can decrease their deformation and increase their aggregation and, in consequence can lead to alterations in the rheological properties of human blood.

Key words: artificial heart valve (AHV), red blood cells (RBC), erythrocytes, membrane lipid fluidity.

Wprowadzenie

W ostatnich latach na całym świecie, w centrum zainteresowań znajdują się nowe biomateriały [1, 2]. Węgiel w postaci warstwy diamentowej (nanokrystalicznego diamentu -NCD) posiada atrakcyjne właściwości w zastosowaniach biomedycznych [3]. Powierzchnie implantów medycznych, wykonane z tych biomateriałów, mogą być bardziej biogodne wobec organizmu człowieka. Zastosowania nowych warstw do implantów (sztucznych zastawek serca) ma wpływ na długo terminowe biologiczne oddziaływania z tkankami je otaczającymi. Badania implantów potwierdziły, iż biogodność implantu może zostać poprawiona poprzez pokrycie go warstwą NCD (Nanokrystaliczny Proszek Diamentowy posiada właściwości antyutleniające wobec osocza krwi) [4].

Głównym celem niniejszej pracy było przedstawienie metod pomiaru parametrów krwinek czerwonych oraz opracowanie statystyczne uzyskanych wyników. Prezentowane metody mogą zostać użyte do badania oddziaływań warstwy NCD z komórkami krwi.

Sztuczna zastawka serca (AHV) kontroluje regulację przepływu krwi w sercu. Przepływ krwi przez sztuczną zastawkę serca jest związany jest z występowaniem większych wartości naprężeń ścinających działających na powierzchni komórek, kawitacją [5, 6, 7, 8] oraz procesami zapalnymi [9, 10]. Znajomość rozkładu prędkości oraz pola ciśnienia otaczającego sztuczną zastawkę serca umożliwia przewidywanie odkształceń komórek krwi [11].

Ciągłe oddziaływania pomiędzy sztuczną zastawką serca (AHV) a elementami morfotycznymi krwi ludzkiej mogą prowadzić do zmian w błonie plazmatycznej erytrocytów. W konsekwencji procesy te mogą doprowadzić do zmian w strukturze lipidów oraz białek plazmatycznych. Zmiany w płynności lipidów błonowych krwinek czerwonych (RBC) mogą wpływać na ich deformację oraz agregację, a w konsekwencji prowadzić do zmian właściwości reologicznych krwi.

W prezentowanych badaniach, technika spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) została użyta do pomiarów płynności lipidów błonowych oraz lepkości wnętrza erytrocytów ludzkich, kładąc szczególną uwagę na molekularny aspekt badań. Metoda ta jest oparta na zmianach kształtu linii widm EPR znaczników spinowych inkorporowanych do błony. Widma EPR charakteryzują strukturę błony plazmatycznej próbki biologicznej.

Płynność błony plazmatycznej odzwierciedla uporządkowanie i dynamikę łańcuchów fosfolipidów. Do określenia wpływu sztucznej zastawki serca na erytrocyty zostały użyte trzy doksylostearynowe znaczniki spinowe: (kwasy 5-, 12-, 16-doksylostearynowy), różniące się położeniem grupy nitroksydowej wewnątrz warstwy oraz Tempamina. Badania pozwoliły uzyskać informacje na temat płynności lipidów błonowych w różnych regionach membrany [12, 13, 14]. Lepkość wnętrza została określona przy pomocy Tempaminy przy użyciu spektroskopii EPR. Podatność osmotyczna została określona spektrofotometrycznie przy użyciu spektrofotometru UV/Vis (Ultospec 2000 firmy Amersham Pharmacia Biotech).

Materiały i metodyka

Preparatyka erytrocytów

Erytrocyty wyizolowano z próbek krwi uzyskanych od pacjentów ze sztuczną zastawką serca oraz od osób zdrowych. Przy doborze grupy osób chorych brano pod uwagę również badania laboratoryjne. Świeżo pobraną, heparynizowaną krew, odwirowywano i separowano erytrocyty.

Introduction

New biomaterials have been of great interest for researches during past decades all over the world [1, 2]. Carbon in the form of a diamond coating (nanocrystalline diamond -NCD) has attractive properties for biomedical applications [3]. Surfaces of medical implants, which are made of these biomaterials, could be biocompatible for human body. Applications of the new coatings for implants (artificial heart valves) have an influent on the long-term biological interactions of implants with the surrounding tissues. Implant investigations has proved that implant main biomaterial biocompatibility can be improved by coating it with a NCD layer (Nanocrystalline Diamond Powder has antioxidant properties in the blood plasma) [4].

Methods of measurements of erythrocyte parameters and the statistical post-processing of obtained results have been presented and it has been the main aim of this study. These methods could be used to examine the interactions between the NCD layer and blood cells.

Artificial heart valve (AHV) controls blood flow in the heart. The blood flow through the artificial heart valve is connected with high values of the shear stresses acting on cell surfaces, cavitations [5, 6, 7, 8] and inflammatory processes [9, 10]. The knowledge of the velocity distribution and the pressure field in the artificial heart valve surroundings enables one to predict a deformation of blood cells [11].

Permanent interactions between an artificial heart valve and morphotic elements of human blood can lead to changes in the plasma membrane of erythrocytes. These processes in consequence can result in changes in the structure of membrane lipids and proteins. The changes in the membrane lipid fluidity of red blood cells (RBC) can effect their deformation and aggregation, and in consequence, lead to alterations in the rheological properties of blood.

In the presented study, the technique of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy was used for measurements of membrane lipid fluidity and viscosity of human erythrocyte, especially focused on molecular aspects of the research. The method is based on changes in the shape of EPR line-spectra of the spin probes incorporated to a membrane. These EPR spectra characterize the structure of membranes of biological samples.

Fluidity of the plasma membrane corresponds to the order and dynamics of phospholipid chains. Three doxylstearate spin labelled (5-, 12- and 16-doxylstearic acids), which differ in the location of nitroxide free radical inside the layer and Tempamine were used for determination the influence of an artificial heart valve on erythrocytes. This allowed one to obtain informations about the fluidity of different regions of the membrane [12, 13, 14]. A viscosity of the cell interior was measured using Tempamine, using also EPR spectroscopy. The osmotic fragility was determined spectrophotometrically by means of UV/Visible spectrophotometer (Ultospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech).

Materials and methods

Red blood cell preparation

Blood samples obtained from patients with artificial heart valves and healthy donors were used to isolate red blood cells. A group with AHV was also subject to standard laboratory investigations. Fresh, heparinized blood of patients and controls was sampled, centrifuged and RBC were separated. Red blood cells were washed thrice using cooled isotonic salt buffered solution (pH equal to 7.4).

Krwinki czerwone przemywano trzykrotnie oziębionym zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) (pH równym 7,4).

Ocena płynności lipidów błonowych

Płynność lipidów błonowych (w całych komórkach) została określona przy użyciu trzech znakowanych kwasów tłuszczowych (kwasy: 5-, 12-, 16-doksylostearynowe). Do zawiesiny erytrocytów dodawano znacznik spinowy rozpuszczony w etanolu i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Na podstawie widm znakowanych kwasów tłuszczowych inkorporowanych do lipidów błonowych krwinek czerwonych obliczano parametr (h_{+1}/h_0) (gdzie: h_{+1} oraz h_0 są odpowiednio wysokościami amplitud niskopolowej oraz środkowej linii widma) [14].

Lepkość wnętrza krwinek czerwonych

Lepkość środowiska wewnątrz erytrocytu obliczano według metody Morse'a [15] przy użyciu Tempaminy (4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidino-1-oksyl) jako znacznika spinowego. W celu wyeliminowania znacznika na zewnątrz krwinek czerwonych pomiarów dokonywano w 5 mol/m³ PBS z 80 mol/m³ roztworem żelazicyjanku potasowego. Lepkość wnętrza komórki została określona poprzez równanie ruchu znacznika spinowego w komórce do jego ruchu w wodzie:

$$\eta = \frac{\tau_{C(RBC)}}{\tau_{C(H_2O)}} \eta_{H_2O} \quad (1)$$

gdzie:

h - współczynnik lepkości dynamicznej (współczynnik tarcia wewnętrznej),

$\tau_{C(RBC)}$ - rotacyjny czas korelacji wewnątrz erytrocytu,

$\tau_{C(H_2O)}$ - rotacyjny czas korelacji w wodzie,

η_{H_2O} - współczynnik lepkości dynamicznej wody w temperaturze 293K.

Wartość rotacyjnego czasu korelacji (τ_c), odzwierciedlającego ruch znacznika spinowego, została obliczona na podstawie równania:

$$\tau_c = k w_0 \left[\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right] \quad (2)$$

gdzie:

τ_c - rotacyjny czas korelacji,

$k = 6,5 \cdot 10^{-10}$ - stała,

w_0 - szerokość środkowej linii widma EPR,

h_0 - wysokość środkowej linii widma EPR,

h_{-1} - wysokość wysokopolowej linii widma EPR.

Podatność osmotyczna krwinek czerwonych

Pomiary podatności osmotycznej zostały wykonane dodając zawiesinę erytrocytów do roztworów zawierających różne stężenia NaCl. Absorbancja supernatantu w odniesieniu do wody została określona spektrofotometrycznie przy długości fali 540 nm. Stopień hemolizy erytrocytów został obliczony przy pomocy zależności:

$$H\% = \frac{A_X - A_0}{A_W - A_0} * 100\% \quad (3)$$

gdzie:

H% - frakcja krwinek zhemolizowanych (procent hemolizy).

A_x - absorbancja supernatantu poszczególnych próbek,

A_0 - absorbancja supernatantu dla stężenia 155 mol/m³ NaCl,

A_w - absorbancja supernatantu po całkowitej hemolizie w wodzie.

Evaluation of the membrane lipid fluidity

Membrane lipid fluidity (from whole cells) was determined using three labelled fatty acids (5-, 12- and 16-doxylstearic acids). A spin label dissolved in ethanol and incubated for 30 minutes at room temperature conditions was introduced to erythrocyte suspension. On the basis of spectra of signed fatty acids incorporated into lipids of erythrocyte membranes the parameter (h_{+1}/h_0) (where h_{+1} and h_0 are the heights of amplitudes of low field and middle field lines of spectrum, respectively) was calculated [14].

Viscosity of red blood cell interior

Intracellular viscosity of erythrocytes was determined according to Morse method [15] using Tempamine (4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) as a spin label. Owing to have the spin label eliminated outside the red blood cell measurements were conducted in 80 mol/m³ potassium ferricyanide as a broadening agent in 5 mol/m³ phosphate buffer. The viscosity of the cell interior was determined by means of a comparison of the motion of spin label inside a cell and the motion of spin label in water:

$$\eta = \frac{\tau_{C(RBC)}}{\tau_{C(H_2O)}} \eta_{H_2O} \quad (1)$$

where:

h - coefficient of dynamic viscosity (the coefficient of internal friction),

$\tau_{C(RBC)}$ - correlation rotating time parameter of Tempamine in erythrocyte,

$\tau_{C(H_2O)}$ - correlation rotating time parameter of Tempamine in water,

η_{H_2O} - coefficient of dynamic viscosity of water at the temperature 293K.

Values of correlation rotating time parameter (τ_c), which reflect a motion of spin-label, were calculated according to the following equation:

$$\tau_c = k w_0 \left[\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right] \quad (2)$$

where:

τ_c - correlation rotating time parameter,

$k = 6,5 \cdot 10^{-10}$ - constant,

w_0 - width of the midfield EPR line spectrum,

h_0 - height of the midfield EPR line spectrum,

h_{-1} - height of the high-field EPR line spectrum.

Osmotic fragility of red blood cells

Osmotic fragility measurements were done adding a red blood cell suspension to solutions containing various concentrations of NaCl. The absorbance of supernatant with respect to water was determined using spectrophotometry at the wavelength equal to 540 nm. The ratio of haemolysis was calculated on the basis of the following relation:

$$H\% = \frac{A_X - A_0}{A_W - A_0} * 100\% \quad (3)$$

where:

H% - haemolysis expressed in percents,

A_x - absorbance of supernatant of particular sample,

A_0 - absorbance of supernatant for 155 mol/m³ concentration of NaCl,

A_w - absorbance of supernatant after complete haemolysis in water.

EPR measurements

EPR measurements were carried out at room temperature using Bruker ESP 300E (X-band) spectrometer.

Pomiary EPR

Pomiary EPR zostały przeprowadzone w temperaturze pokojowej na spektrometrze firmy Bruker ESP 300E (pracującym w paśmie X).

Statystyczne opracowanie wyników

Istotność statystyczna w uzyskanych wynikach została określona przy pomocy niesparowanego t-testu.

Wartość doświadczalną obliczano na podstawie wzoru:

$$t_d = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} \quad (4)$$

gdzie:

t_d - wartość obliczona na podstawie danych doświadczalnych

s_1^2, s_2^2 - wariancja próby 1 lub 2,

n_1, n_2 - liczność próby 1 lub 2.

Wyniki i dyskusja

Badania krwinek czerwonych przeprowadzono przy użyciu spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Użyto trzech znakowanych kwasów tłuszczowych: kwas 5-, 12-, 16-doksylostearynowy (5-, 12- oraz 16-DS), które zostały ułożone na różnych głębokościach w warstwie lipidów błonowych erytrocytów.

U pacjentów ze sztuczną zastawką serca wartość płynności lipidów błonowych była znacząco wyższa dla doksylostearynowych pochodnych: 5-DS oraz 12-DS. Aby porównać płynność lipidów błonowych krwinek czerwonych od pacjentów z AHV z grupą ludzi zdrowych został obliczony parametr (h_{+1}/h_0) (gdzie h_{+1} oraz h_0 są odpowiednio wysokościami niskopolowej oraz środkowej linii widma) [16]. Parametr ten jest na wstęp ilościowym określeniem pomiarów elastyczności łańcucha acylowego i odpowiada mikrolepkości środowiska. Obserwowano wzrost parametru h_{+1}/h_0 w krwinkach czerwonych pochodzących od pacjentów z AHV. Wzrost tego parametru odzwierciedla wzrost płynności lipidów błonowych w różnych regionach warstwy lipidowej.

Na RYSUNKU 1 pokazano istotne statystycznie zmiany w płynności lipidów błonowych u osób ze sztuczną zastawką serca dla kwasu 5-doksylostearynowego w porównaniu z grupą kontrolną (RYS. 1).

Zaobserwowano statystycznie istotny wzrost badanego parametru w hydrofobowym regionie błony erytrocytów pochodzących od osób z AHV w porównaniu z grupą kontrolną (RYS. 2).

Obserwowano znaczący statystycznie spadek płynności lipidów błonowych dla 16-DS (RYS. 3) [14].

Jakkolwiek, statystycznie istotny wzrost płynności lipidów błonowych był obserwowany tylko dla kwasów 5- i 12-doksylostearynowego. Wyniki te mogą wskazywać na utlenianie lipidów i/lub utlenianie białek w błonie erytrocytarnej. Podobne rezultaty zostały obserwowane (wzrost w płynności lipidów błonowych) po interakcji t-butyloperoksydantenu z erytrocytami [17, 18].

Lepkość wnętrza była znacząco wyższa w erytrocytach pochodzących od osób z AHV ($p < 0,05$) (RYS. 4).

Wzrost lepkości wnętrza erytrocytów pochodzących od ludzi z AHV wskazuje na zmiany w składowych białek cytozolowych. Badania pokazują wzrost podatności osmotycznej RBC u osób chorych (RYS. 5).

Wydaje się, że większa płynność lipidów błonowych erytrocytów może prowadzić do ułatwionej odkształcalności tych komórek w krążeniu podczas ich przepływu przez naczyńca u pacjentów z AHV.

Statistical analysis

The statistical significance of obtained results was determined using unpaired t-test. The experimental value was calculated on the basis of equation:

$$t_d = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} \quad (4)$$

where:

t_d - value calculated on the basis of the experimental data set,

s_1^2, s_2^2 - variances of the probe 1 and 2, respectively,

n_1, n_2 - the number of elements in the group 1 and 2, respectively.

Results and discussion

Red blood cells were investigated by means of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. RBC lipid membrane fluidity was determined. Three labelled fatty acids: 5-, 12-, 16-doksylostearic acid (5-, 12- and 16-DS), which were located at different depths in the lipid layer of the erythrocytes, were used.

The lipid membrane fluidity was higher for AHV patients as indicated by doxyl derivatives 5-DS and 12-DS. For comparison of lipid membrane fluidity of healthy and AHV red blood cells the spectral parameter h_{+1}/h_0 (where h_{+1} and h_0 are the heights of low-field line and middle line of the spectra, respectively) was calculated [16]. This parameter is a semiquantitative in the measurements of acyl chain flexibility corresponding to microviscosity of the environment. The increase in the h_{+1}/h_0 parameter in red blood cells of AHV patients was observed. The increase of this parameter corresponds to the increase of lipid membrane fluidity at different regions of the lipid layer.

The statistically significant changes in RBC plasma membrane lipid fluidity of patients with artificial heart valve for 5-doksylostearic acid in comparison with controls are presented in FIG. 1.

One can observe a significant increase in examined parameter in hydrophobic regions of AHV RBC membranes in comparison with controls (FIG. 2).

A significant decrease in the lipid membrane fluidity for 16-DS is visible (FIG. 3) [14].

However, a significant increase in membrane lipid fluidity was observed only for 5- and 12-doksylostearic acid. These results can point out lipid peroxidation and/or protein oxidation in erythrocyte membranes. Similar results (increase in lipid membrane fluidity) were observed after interactions t-butyloperoxide and erythrocytes [17, 18].

The viscosity of erythrocyte interior was significantly higher for artificial heart valve (AHV) patients ($p < 0.05$) (FIG. 4).

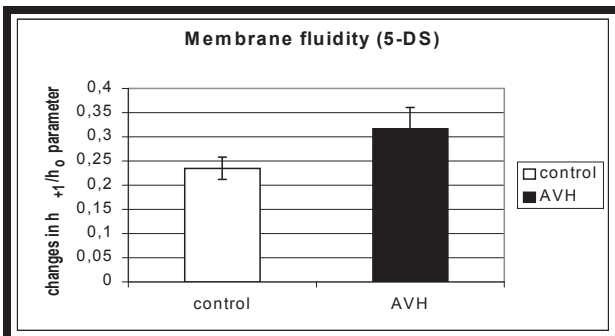
The increase in viscosity of RBC interior of AHV patients indicates changes in cytosol protein components.

Results show also a significant increase in osmotic fragility of red blood cells of AHV patients (FIG. 5).

It seems, that higher membrane fluidity of erythrocytes can lead to simplified deformation of these cells in microcirculation during their flow in AHV patient vessels.

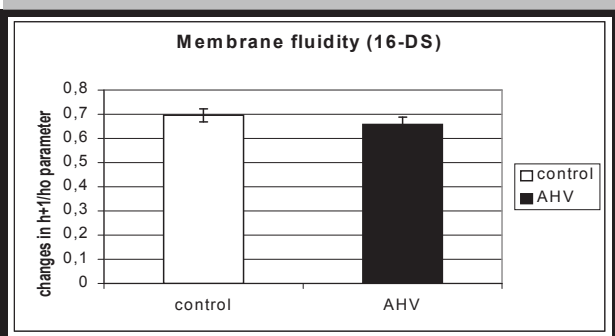
Above discussed results suggest, that mechanical heart valves affect red blood cell plasma membrane properties and can induce erythrocytes deformation and aggregation and, in consequence, alteration in their rheological properties.

Observed changes in examined parameters can be associated with artificial heart valve implantation and/or with an



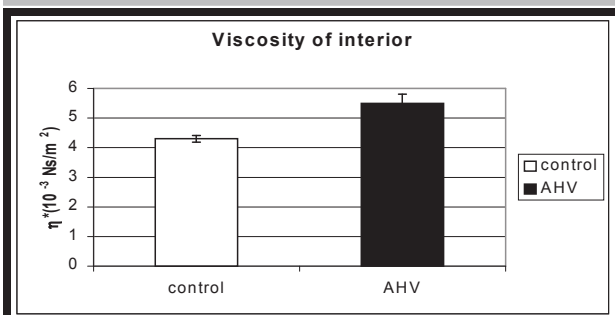
RYS. 1. Płynność lipidów błonowych (5-DS) w grupie kontrolnej oraz u pacjentów z AHV ($p < 0,001$).

FIG. 1. Fluidity of plasma membrane (5-DS) of control and artificial heart valve (AHV) patients ($p < 0.001$).



RYS. 3. Płynność lipidów błonowych (16-DS) w grupie kontrolnej oraz u pacjentów z AHV ($p < 0,05$).

FIG. 3. Fluidity of plasma membrane (16-DS) of control and artificial heart valve (AHV) patients ($p < 0.05$).

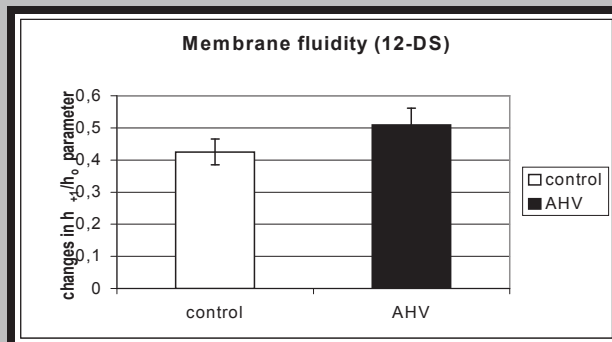


RYS. 4. Lepkość wnętrza (h) wewnątrz erytrocytów pochodzących od pacjentów ze sztuczną zastawką serca w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,002$).

FIG. 4. Viscosity (h) of erythrocyte interior of artificial heart valve patients in comparison with these of control group ($p < 0.002$).

Powyzsze wyniki sugerują, iż mechaniczna zastawka serca wpływa na właściwości błony plazmatycznej erytrocytów oraz może powodować ich deformację oraz agregację, a w konsekwencji zmiany w właściwości reologicznych tych komórek.

Obserwowane zmiany w badanych parametrach mogą



RYS. 2. Parametr h_{+1}/h_0 w erytrocytach dla 12-DS w grupie kontrolnej oraz u pacjentów z AHV ($p < 0,002$).

FIG. 2. The h_{+1}/h_0 ratio of red blood cells for 12-DS of control and artificial heart valve (AHV) patients ($p < 0.002$).

interaction of pharmacotherapy. The influence of a treatment on erythrocytes in will be investigated in future researches.

Conclusions

1. The statistically significant increase in RBC plasma membrane lipid fluidity of patients with artificial heart valve for 5-DS ($p < 0,001$) and 12-DS ($p < 0,002$) was revealed.
2. For 16-DS in hydrophobic region of lipid layer, a significant decrease in membrane lipid fluidity of RBC of AHV patients was observed ($p < 0.05$).
3. The viscosity of erythrocyte interior was higher for artificial heart valve (AHV) patients ($p < 0.05$).
4. The erythrocytes of AHV patients have higher osmotic fragility in comparison with control group ($p < 0.05$).

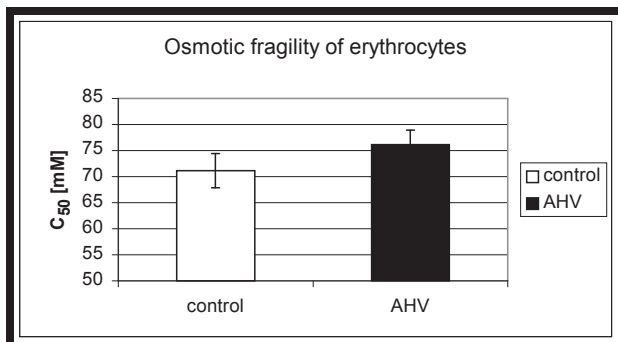
Acknowledgements

This work was supported by grant No. 7 T11E 013 21 (State Committee for Scientific Research, Poland).

Piśmiennictwo

References

- [1] Singh A, Ehteshami G, Massia S, He J, Storer RG, Raupp G., Glial cell and fibroblast cytotoxicity study on plasma-deposited diamond-like carbon coatings. *Biomaterials*. 24(28), Dec., (2003), 5083-9.
- [2] Kumari TV, Anil Kumar PR, Muraleedharan CV, Bhuvaneshwar GS, Sampeur Y, Derangere F, Suryanarayanan R., In vitro cytocompatibility studies of Diamond Like Carbon coatings on titanium., *Biomedical Materials and Engineering*, 12(4), (2002), 329-38.
- [3] Mitura S., Mitura A., Niedzielski P. and Couvrat P., Nanocrystalline Diamond Coatings, *Chaos, Solitons & Fractals* 10(12), (1999), 2165-2176.
- [4] Bąkowiicz K., Mitura S., Biocompatibility of NCD., *Journal of Wide Bandgap Materials*. 9(4), April (2002), 261-272.
- [5] Andersen T. S., Johansen P., Paulsen P. K., Nygaard H., Hasenkam J.M., Indication of cavitation in mechanical heart valve patients., *The Journal of Heart Valve Disease*, 12(6), Nov. (2003), 790-796.
- [6] Biancucci BA, Deutsch S, Geselowitz DB, Tarbell JM. In vitro studies of gas bubble formation by mechanical heart valves. *The Journal of Heart Valve Disease*., 8(2), Mar., (1999), 186-96.
- [7] Garrison LA, Lamson TC, Deutsch S, Geselowitz DB, Gaudmond RP, Tarbell JM. An in-vitro investigation of prosthetic heart valve cavitation in blood. *The Journal of Heart Valve Disease*., 3



RYS. 5. Podatność osmotyczna RBC w kontroli oraz u pacjentów ze sztuczną zastawką serca (AHV) ($p < 0,05$).

FIG. 5. Osmotic fragility of RBC of control and artificial heart valve (AHV) patients ($p < 0,05$).

być związane z implantacją sztucznej zastawki serca lub/i interakcją stosowanych leków. Wpływ stosowanych leków na erytrocyt zostanie określony w późniejszych badaniach.

Wnioski

1. Wykazano istotny statystycznie wzrost płynności lipidów błonowych w erytrocytach pochodzących od pacjentów ze sztuczną zastawką serca dla znaczników 5-DS ($p < 0,001$) oraz 12-DS ($p < 0,002$).
2. Dla kwasu 16-DS., w hydrofobowym rejonie warstwy lipidowej, obserwowano istotny statystycznie spadek płynności lipidów błonowych erytrocytów pochodzących od osób chorych ($p < 0,05$).
3. Wykazano wzrost lepkości wnętrza krwinek czerwonych wyizolowanych od osób z AHV ($p < 0,05$).
4. Erytrocyty pochodzące od osób z AHV były bardziej podatne na hemolizę w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$).

Podziękowania

Badania są realizowane w ramach grantu nr: 7 T11E 013 21 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Suppl 1, Apr., (1994), S8-22.

[8] Józwiak K., Bakteryjne zapalenie wsierdzia a zastawki serca., Nowa Klinika, 7(10), (2000), 1052-1056.

[9] Tong E., An overview of artificial heart valve replacement in infants and children., Journal of Cardiovascular Nursing, 6(3), Apr. (1992), 30-43.

[10] Dobrowolska A., Józwiak K., Required properties of artificial heart valves., Mechanics and Mechanical Engineering. International Journal., 4(1), (2000), 39-44.

[11] Józwiak K., Nawrat Z., Eksperymentalne badania przepływu przez dyskową zastawkę serca z warstwą NCD., Ciepłotyprzebiegowe. No 117, (2000), 317-323.

[12] Górnicki A., Gutsze A., In vitro effects of ozone on human erythrocyte membranes: An EPR study., 47(4), (2000), 963-971.

[13] Gwoździński K., A spin label study of the action of cupric and mercuric ions on human red blood cells., Toxicology, 65, (1991), 315-323.

[14] Żakowska I., Józwiak K., Pieniżek A., Gwoździński K., Zmiany parametrów krwinek czerwonych u osób ze sztuczną zastawką serca., Materiały V Sympozjum Modelowanie i Pomiary w Medycynie, MPM'2003, Maj (2003).

[15] Mors P.D., Determining intracellular viscosity from the rotational motions of spin labels., Methods in Enzymology 127, (1986), 239-249.

[16] Gwoździński K., Żakowska I., Olejniczak J., Pawlicki L., Red blood cell membrane alteration in ischaemia heart disease., (2000), 38-241.

[17] Brzeszczyńska J., Gwoździński K., Erythrocyte membrane damage induced by t-butyl hydroperoxide., Current Topics in Biophysics 22 (Supplement B), (1998), 238-241.

[18] Zawodnik I.B., Lapshina EA, Bartosz G, Soszyński M, Bryszewska M., Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity., Free Radicals in Medicine 15, 30(4), (2001), 363-9.