

Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval

PORTIER K.¹, KIRSCHVINK N.², FELLMANN N.³, COUDERT J.³, LEKEUX P.⁴

¹ Anesthésiologie, Département Hippique, École nationale vétérinaire de Lyon, Avenue Bourgelat, 1 à F-69280 Marcy l'Etoile, France

² Laboratoire de Physiologie animale, Département de Médecine vétérinaire, Faculté des Sciences, Université de Namur, Rue de Bruxelles, 61 à 5000 Namur, Belgique

³ Laboratoire de Physiologie et Biologie du Sport, Faculté de Médecine, Université d'Auvergne, BP 38, Place Henri Dunant, 28 à 63001 Clermont Ferrand cedex, France

⁴ Service de Physiologie, Département des Sciences fonctionnelles, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, Bât B42 à 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Dr. Karine Portier, Email : k.portier@vet-lyon.fr

RESUME : Le globule rouge, de par sa fonction de transport de l'oxygène, est soumis à des milieux où le stress oxydant est important. Le maintien de la structure et de la dynamique de sa membrane est essentiel à la réalisation de sa fonction. En effet, l'oxygène doit pouvoir diffuser à travers la membrane et la cellule doit être capable de se déformer pour progresser dans les capillaires. La structure et, en conséquence, la fluidité de la membrane influencent ces propriétés. Le globule rouge présente des défenses antioxydantes importantes, mais dans certaines situations la production de radicaux libres est accrue et dépasse ces défenses aboutissant à des lésions irréversibles de la membrane cellulaire et donc de la fonction. L'érythrocyte équin semble plus sensible au stress oxydant que celui des autres espèces et les modifications hémo-rhéologiques qui en résultent peuvent avoir des conséquences au niveau tissulaire et organique.

INTRODUCTION

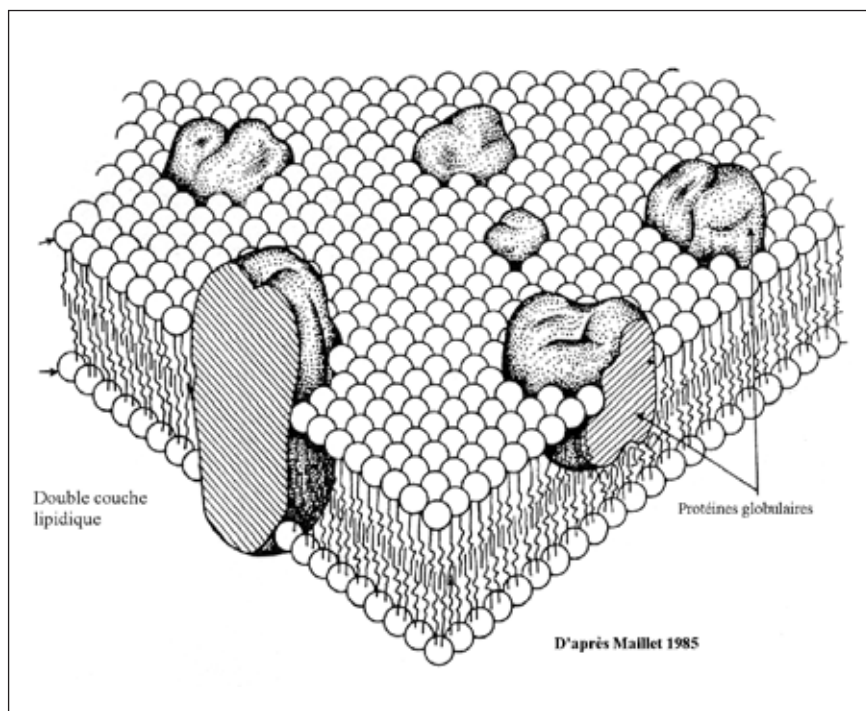
L'intégrité de la membrane est indispensable au bon fonctionnement de la cellule. Ceci est particulièrement vrai pour le globule rouge dont la fonction est de transporter un élément indispensable à la vie, l'oxygène. Des poumons jusqu'aux tissus utilisateurs, la membrane devra se défendre contre les oxydations, permettre à l'oxygène de diffuser, à la cellule de se déformer pour progresser dans les capillaires.

Les membranes sont constituées de trois espèces chimiques majeures : les phospholipides, le cholestérol et les protéines. Les phospholipides forment une double couche d'environ 4,5 nm

d'épaisseur enveloppant la cellule. Leurs têtes polaires hydrophiles de structure variée liée à un squelette glycérol par une liaison phosphoester sont tournées vers l'extérieur de la membrane et leurs chaînes hydrocarbonées hydrophobes, comprenant 2 esters d'acide gras (les chaînes latérales) fixés aux 2 autres fonctions du glycérol, vers l'intérieur. Ils constituent avec les sphingolipides et les stérols l'une des 3 principales classes de lipides présents dans les biomembranes. Les acides gras composant les phospholipides naturels présentent de nombreuses positions possibles d'insaturation et des longueurs de chaînes variables. Ce modèle en « mosaïque fluide » de Singer et Nicholson (figure 1) de la

structure de la membrane plasmique est toujours valide mais reste un modèle macroscopique. En effet, de récentes études ont montré que les mouvements des protéines et des lipides sont loin d'être totalement libres. Il semble maintenant évident que des complexes protéiques, construits de manière hiérarchique, limitent la diffusion des protéines dans la membrane et que l'existence de domaines membranaires appelés « rafts ou microdomaines » contredisent le modèle de Singer et Nicholson (Helms et Zurzolo, 2004). Ces microdomaines jouent un rôle important dans la signalétique de la membrane (Vereb *et al.*, 2003 ; Marguet *et al.*, 2006). De plus, il semble que les amino-phospholipi-

Figure 1 : Structure membranaire sur le modèle macroscopique en « mosaïque fluide » de Singer et Nicholson.



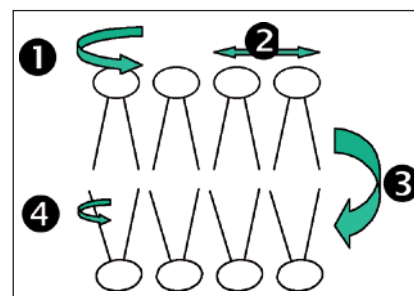
des, phosphatidylserine et phosphatidylethanolamine, soient distribués de façon asymétrique dans la bicouche membranaire des cellules eucaryotes. Cette asymétrie résulte d'un transport actif de ces phospholipides de la couche externe vers la couche interne par une enzyme, translocase appelée « flipase ». Le maintien de cette asymétrie peut être désactivé par un autre système enzymatique « scramblase » par exemple lors de la mort programmée de la cellule, l'apoptose (McIntyre, 2003).

Les membranes plasmiques demeurent des structures fluides (les molécules ont si peu d'adhérence entre elles qu'elles glissent les unes sur les autres) et la maintenance de la fluidité est un pré requis pour la fonction, la viabilité, la croissance et la reproduction des cellules. La fluidité membranaire est la réciproque (l'inverse) de la microviscosité membranaire qui est à son tour inversement proportionnelle aux taux de diffusions latérales et de rotations des composants membranaires. En absence de contraintes, la plupart des lipides et des protéines non liés et non impliqués dans les microdomaines diffusent librement dans le plan de la membrane avec des coefficients de diffusion élevés (Hollan, 1996)

(figure 2). Mais si le modèle de diffusion était considéré comme une combinaison des mouvements dans et en dehors du plan (Shinitzky, 1984), le concept de la fluidité de ce modèle original est interprété maintenant comme la possibilité donnée à l'architecture membranaire de restructurer les agrégats protéiques au niveau moléculaire et supramoléculaire en fonction des besoins de la cellule et en réponse aux stimulations de l'environnement (Vereb *et al.*, 2003). De plus la membrane ne présente pas une fluidité « homogène » car l'analyse biochimique suggère que les « rafts » sont riches en cholestérol et sphingolipides sur l'hémimembrane externe et en cholestérol et phospholipides composés d'acides gras saturés sur la face interne. Ces microdomaines présentent une viscosité accrue et sont entourés de domaines plus fluides (Vereb *et al.*, 2003).

Mais l'intégrale de l'ensemble de ces mouvements exprimée dans l'échelle de temps dans laquelle ils se produisent représente la fluidité membranaire globale. Or, le maintien de la fluidité lipidique globale à un niveau précis, reflet de la dynamique moléculaire, est essentiel au bon fonctionnement physiologique de la membrane.

Figure 2 : Mouvements des phospholipides au sein de la bicouche membranaire.



La diffusion en **translation** ② peut être décrite par des mouvements latéraux (dans le plan) ou verticaux (en dehors du plan) à une vitesse de l'ordre de 10^{-8} s.

La diffusion par **rotation** ① peut être décrite par des mouvements de rotations uniaxiales (dans le plan) à une vitesse de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-14} s ou de type « **flip flop** » ④ (en dehors du plan) plus rares (1 par mois ou par semaine).

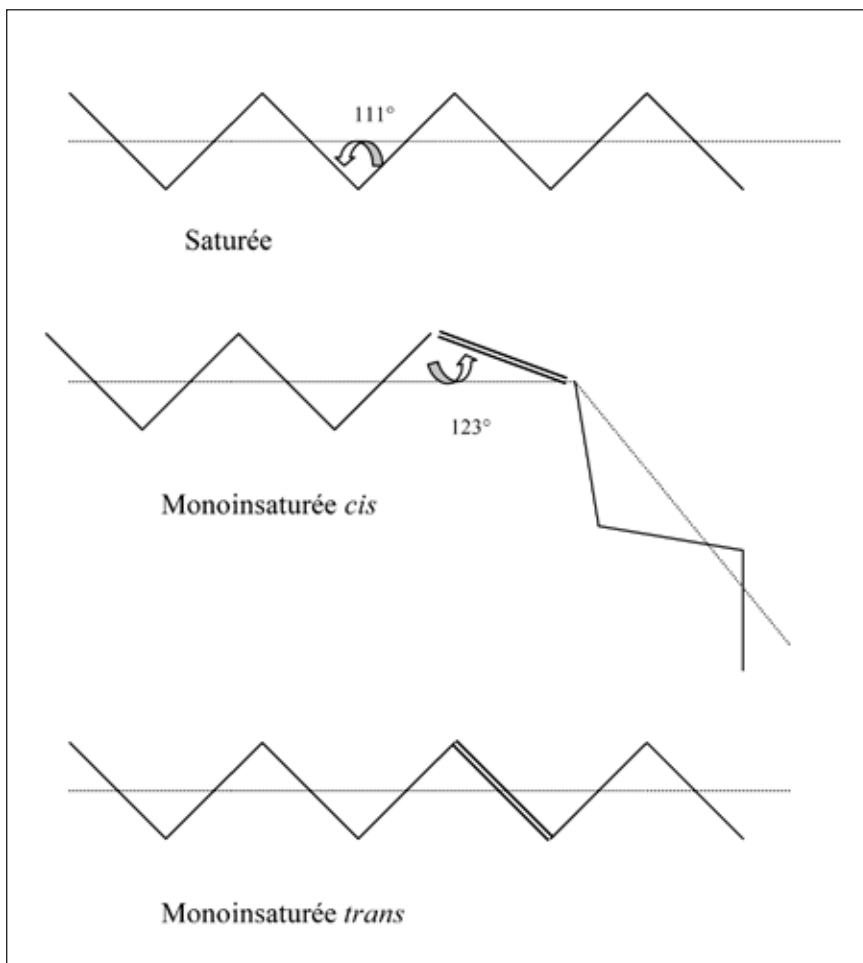
Les **flexions d'acides gras** ③ présentent des mouvements (d'une vitesse de l'ordre de 10^{-8} s), au niveau des queues des phospholipides, dont l'amplitude est d'autant plus importante que l'on se rapproche du centre de la bicouche membranaire.

I - LES FACTEURS INFLUENÇANT LA FLUIDITÉ MEMBRANAIRE

La **composition chimique** des lipides membranaires peut changer soit par translocation, soit en échange avec le milieu extérieur, soit par synthèse *in situ* ou à l'extérieur. En général, ces changements prennent quelques minutes à quelques heures, donc des modifications de la fluidité lipidique plus rapides ne doivent pas être rapportées à des modifications de la composition chimique des membranes. Les modificateurs de la composition chimique des lipides membranaires sont :

- le cholestérol qui est le principal rigidifiant des membranes en condition physiologique. Il augmente la microviscosité et le degré d'ordre. Il s'associe de préférence à certains phospholipides tels que la sphingomyéline ;
- le degré d'insaturation (figure 3) des acides gras qui constituent les phospholipides membranaires. L'introduction d'une double liaison dans la chaîne d'un acide gras abaisse son point de fusion et induit une augmentation de volume qui s'exprime par la réduction de la viscosité et donc par une augmentation de la fluidité, ceci d'autant plus si le phospholipide était entièrement saturé au départ. Les acides gras

Figure 3 : Représentation schématique d'une chaîne d'acide gras.



mono-insaturés sont moins vulnérables aux attaques radicalaires que les poly-insaturés du fait de leur unique double liaison qui est plus difficile d'accès pour les radicaux libres ;

- la nature des phospholipides membranaires : la lécithine et la sphingomyéline constituent plus de 50 % du contenu lipidique des membranes et des fluides, mais leurs propriétés physiques diffèrent. La sphingomyéline contribue à la rigidification, tandis que la lécithine participe à la fluidification. Le ratio lécithine/sphingomyéline est un facteur majeur qui contribue à la modification de la fluidité membranaire dans certaines pathologies et vieillissement des tissus. La phosphatidyléthanolamine : sa méthylation augmente la fluidité membranaire. Les autres lipides membranaires : ils présentent un haut niveau d'insaturation et peuvent être considérés comme des fluidifiants au même titre que la lécithine. Or si l'on peut faire varier la nature des acides gras membra-

naires par un apport alimentaire particulier, il est plus difficile de faire varier la nature des phospholipides.

- les protéines : elles occupent un volume comparable à celui de 50 à 100 phospholipides, elles ont donc un effet de rigidification similaire à celui du cholestérol (rigidification et augmentation de l'ordre).

Les **facteurs physiques** ont des effets très rapides (quasi-instantanés sur la membrane) : des changements importants de température corporelle (baisse de 10°C) peuvent diminuer la fluidité. Les couches lipidiques de la membrane sont plus compressibles que les protéines, c'est pourquoi la pression exerce aussi un rôle sur la fluidité. La formation d'un potentiel électrique à travers la bicouche membranaire peut être à l'origine d'une petite diminution de la fluidité (Shinitzky, 1984).

Certains **facteurs physiologiques** tels que le cycle cellulaire, la différenciation et la maturation cellulaire, la

densité cellulaire, le vieillissement affectent la fluidité membranaire.

Les radicaux libres (RL) sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir, dans l'environnement où ils sont produits, avec toute une série de substrats biologiques dont les lipides membranaires (Pincemail *et al.*, 1996). Les RL peuvent modifier les propriétés chimiques et physiques des membranes cellulaires des érythrocytes en modifiant la composition, la protection et la distribution de leurs lipides. Ceci aboutit à une altération structurale de la membrane cellulaire ce qui se manifeste par une réduction de sa fluidité qui peut modifier l'activité des protéines membranaires (Cazzola *et al.*, 2003).

II - CONSÉQUENCES DES VARIATIONS DE LA FLUIDITÉ MEMBRANAIRE SUR LA FONCTION DU GLOBULE ROUGE

Les facteurs principaux qui peuvent agir sur la fluidité membranaire sont donc la composition lipidique du sérum (déterminée par la fonction hépatique et la diète) et le métabolisme lipidique intracellulaire. Les lipides membranaires servent à fournir un environnement fluide défini pour une fonction optimale qui est réalisée par les protéines membranaires (Shinitzky, 1984). Cette fonction peut être celle de récepteurs hormonaux (tels que les récepteurs à insuline), qui, selon la viscosité lipidique, sont exposés ou masqués. Les recherches sur la fluidité membranaire semblent être basées sur des méthodes utiles et sensibles qui permettent une bonne approche des mécanismes par lesquels, les produits, les composés et le contact avec des corps étrangers affectent les fonctions cellulaires.

Les modifications de la fluidité membranaire peuvent affecter la déformabilité des globules rouges qui est un des facteurs déterminant de la viscosité sanguine (Chien, 1987) et par conséquent de l'efficacité du transport des érythrocytes (Bogar *et al.*, 2005). La perfusion et l'oxygénation des tissus peuvent donc être affectées.

L'oxygène qui catalyse l'oxydation des protéines et des lipides membranaires semble ainsi accélérer l'hémolyse (Webster et Toothill, 1987 ; Bialas *et*

al., 2001 ; Szweda-Lewandowska *et al.*, 2003). Mais l'exposition directe *in vitro* de globules rouges de chevaux à différentes concentrations d'oxygène pendant une et deux heures a montré une augmentation de la peroxydation des lipides membranaires sans induire cependant de modification de la fluidité ni de la structure de la membrane (Portier *et al.*, 2007). Dans cette étude, une corrélation a également été mise en évidence entre la pression partielle en oxygène et la fluidité membranaire. Par ailleurs, l'oxygénation des tissus est dépendante de leur temps d'exposition aux globules rouges circulants. Or, la diffusion de l'oxygène à travers la membrane du globule rouge est influencée par les propriétés de sa structure. Le cholestérol induit un épaissement de la couche lipidique et son augmentation est corrélée à une diminution de la fluidité membranaire. Il constitue donc une barrière à la diffusion de l'oxygène. De fortes concentrations en cholestérol ont été corrélées à une diminution du transport de l'oxygène dans le sang (Buchwald *et al.*, 2000).

III – EFFETS DE L'EXERCICE ET DES CONDITIONS DE L'OXYGÉNATION SUR LA FLUIDITÉ MEMBRANAIRE

Effet de l'exercice

Un lien entre stress oxydant, structure membranaire et rôle physiologique du globule rouge a été postulé par Cazzola et collaborateurs (2003) : la libération d'espèces oxygénées réactives, à l'origine des lésions des membranes érythrocytaires, pourrait aboutir à une diminution de l'oxygénation tissulaire. Il semble donc que les peroxydations des lipides membranaires diminuent la fluidité membranaire, compromettant sa fonction barrière et la déformabilité du globule rouge, ce qui à son tour, perturbe la diffusion de l'oxygène aux tissus (Shiga et Maeda, 1980 ; Stoltz, 1983 ; Poss *et al.*, 1990 ; Pawlak *et al.*, 1998). L'exercice d'endurance chez le cheval semble, par exemple, être à l'origine d'une diminution de la déformabilité des globules rouges (Ostenbrug *et al.*, 1997).

Une augmentation de la consommation d'oxygène et de l'activité mitochondriale pendant l'exercice chez l'homme et le cheval peut également induire un stress oxydant et altérer la fluidité membranaire (Cazzola *et al.*, 2003 ; de Moffarts *et al.*, 2006 ;

Portier *et al.*, 2006). Or la grande sensibilité des érythrocytes équins aux lésions oxydantes, et les modifications hemorhéologiques qui en résultent, peuvent avoir des conséquences importantes sur la perfusion tissulaire et la compétence cardiaque chez le cheval (Baskurt *et al.*, 1997 ; Chung et Ho, 1999 ; O'Connor *et al.*, 2004).

Effet de l'hypoxémie et de l'hyperoxémie

Les effets toxiques de l'oxygène sont décrits essentiellement dans des conditions drastiques d'oxygénation : oxygénation hyperbare ou longue durée. Cependant, chez l'enfant, lors de réanimation, une corrélation a été établie entre l'hyperoxémie (respiration d'oxygène pur) et la concentration intraérythrocytaire en glutathion oxydé (GSSG) en conséquence de l'oxydation du glutathion réduit (GSH, substrat d'une enzyme antioxydante). L'hypoxémie a donc induit un stress oxydant avec des conséquences possibles pour les membranes lipidiques (Vento *et al.*, 2002).

En revanche, l'hypoxémie ou l'hyperoxie provoquée chez le cheval anesthésié pendant deux heures respectivement sous air ou oxygène pur, ne semble pas induire de modification de la structure ni de la fluidité de la membrane érythrocytaire (Portier *et al.*, données non publiées). Cependant une augmentation de la fragilité osmotique des globules rouges a été notée en fin de procédure sous oxygène pur tandis que la résistance osmotique des globules rouges des chevaux placés en hypoxémie augmente et est observée au moins 24 heures après le réveil.

IV - MODULATION DES VARIATIONS DE LA FLUIDITÉ MEMBRANAIRE DES GLOBULES ROUGES

Les érythrocytes sont particulièrement vulnérables car ces cellules anucléées ne possèdent pas la capacité de réparer leur membrane ni de se régénérer (Webster et Toothill, 1987).

Cependant, en comparaison des autres cellules, l'érythrocyte présente de grandes activités des enzymes antioxydantes les plus importantes. De plus, la plupart de la capacité antioxydante non enzymatique du sang y est localisée. Les globules rouges se comportent comme des pièges à radicaux libres

circulants et protègent ainsi les autres tissus et organes (Siems *et al.*, 2000). Mais en comparaison avec le globule rouge humain, celui du cheval est plus sensible au stress oxydant (déséquilibre entre les défenses de l'organisme et la production de radicaux libres) si on observe la formation de méthémoglobine et les modifications de l'agrégation (Baskurt *et al.*, 1997). Sain, il présente également une flexibilité plus importante que celle du globule rouge humain (Amin et Sirs, 1985). Par ailleurs, il a été montré que le stress oxydant réduit la déformabilité (c'est-à-dire augmente la rigidité des globules rouges) chez l'homme et le cheval, avec un effet plus important chez le cheval (Bellary *et al.*, 1995 ; Baskurt *et al.*, 1997).

Par l'alimentation

De nombreuses études ont montré que les acides gras de type omega 3 ont des effets bénéfiques sur de nombreuses pathologies chez l'homme, peut-être par leur action sur la composition lipidique de la membrane (Cazzola *et al.*, 2003).

Chez le cheval, de nombreuses études expérimentales et de terrain ont montré que l'exercice induit un stress oxydant, ce qui justifie l'utilisation d'antioxydants chez le cheval de compétition (Mills *et al.*, 1996 ; Deaton *et al.*, 2002 ; Hargreaves *et al.*, 2002 ; Marlin *et al.*, 2002 ; de Moffarts *et al.*, 2004 ; 2005).

De plus, il a été montré qu'une alimentation enrichie en antioxydants et acides gras de type omega 3 peut induire des modifications de la composition membranaire et moduler les variations de la fluidité membranaire induites par l'exercice (de Moffarts *et al.*, 2006 ; Portier *et al.*, 2006). La complémentation en huile de poisson (riche en acides gras de la série oméga 3) serait à l'origine d'une augmentation de la déformabilité des globules rouges et serait associée à une diminution de la fréquence cardiaque pendant l'exercice (O'Connor *et al.*, 2004).

En revanche, contrairement à d'autres espèces (Simopoulos, 1991), l'enrichissement ne semble pas induire directement de modification de la dynamique membranaire (de Moffarts *et al.*, 2006 ; Portier *et al.*, 2006).

Par l'entraînement

Chez l'homme, l'entraînement améliore le statut antioxydant et augmente la fluidité de la membrane (Cazzola, 2003). Le stress oxydant induit par l'exercice chez le cheval de compétition dépend du type d'exercice, de son intensité et peut être modulé par l'entraînement (de Moffarts *et al.*, 2004 ; 2005). Cependant, l'effet direct de l'entraînement sur la dynamique des membranes n'a pas encore été étudié chez le cheval.

CONCLUSION

L'exercice ou d'autres conditions à l'origine d'une augmentation de la production de radicaux libres, si elle dépasse les défenses antiradicalaires de l'organisme, peuvent être à l'origine de lésions cellulaires, en particulier des globules rouges. Si le stress

oxydant est important, ces troubles cellulaires peuvent se répercuter au niveau tissulaire (hypoxie) et présenter des conséquences pathologiques pour le cheval. Certaines sont identifiées, d'autres comme, par exemple, les effets de l'hyperoxygénation ou de l'ischémie *per* anesthésique sur la récupération post-anesthésique/chirurgicale restent à étudier.

SUMMARY

The erythrocyte, as an oxygen carrier, is submitted to areas where oxidative stress is important. The maintenance of the structure and fluidity of its membrane is essential to its function. Indeed, oxygen must diffuse through the membrane and the

deformability of the cell is essential to its progression through capillaries. The structure and, as a consequence, the fluidity of the membrane influence these properties. The red blood cell presents antioxydant capacities, but in some cases, free radical production is increased and exceeds antiradical defences leading to irreversible defects of the membrane, and, as a consequence, of its function.

Horse erythrocyte seems to be more sensitive to oxidative stress than other species and resulting hemorheological changes could have tissular and organic consequences

BIBLIOGRAPHIE

- AMIN T.M., SIRS J.A. The blood rheology of man and various animal species. *Q. J. Exp. Physiol.*, 1985, **70**, 37-49.
- BASKURT O.K., FARLEY R.A., MEISELMAN H.J. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat : a comparative study. *Am. J. Physiol.*, 1997, **273**, H2604-H2612.
- BELLARY S.S., ANDERSON K.W., ARDEN W.A., BUTTERFIELD D.A. Effect of lipopolysaccharide on the physical conformation of the erythrocyte cytoskeletal proteins. *Life Sci.*, 1995, **56**, 91-98.
- BIALAS W.A., DRYJANSKA A., GOMULKIEWICZ J. Effect of O(2)/O(3) atmosphere on the rate of osmotic hemolysis of bovine erythrocytes in the presence of some antioxidants. *Toxicol. In Vitro*, 2001, **15**, 163-168.
- BOGAR L., JURICKSKAY I., KESMARKY G., KENYERES P., TOTTH K. Erythrocyte transport efficacy of human blood: a rheological point of view. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2005, **35**, 687-690.
- BUCHWALD H., O'DEA T.J., MENCHACA H.J., MICHALEK V.N., ROHDE T.D. Effect of plasma cholesterol on red blood cell oxygen transport. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2000, **27**, 951-955.
- CAZZOLA R., RUSSO-VOLPE S., CERVATO G., CESTARO B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2003, **33**, 924-930.
- CHIEN S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Ann. Rev. Physiol.*, 1987, **49**, 177-192.
- CHUNG T.W., HO C.P. Changes in viscosity of low shear rates and viscoelastic properties of oxidative erythrocyte suspensions. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 1999, **21**, 99-103.
- DE MOFFARTS B., KIRSCHVINK N., ART T., PINCEMAIL J., MICHAUX C., CAYEUX K., DEFRAIGNE J.O., LEKEUX P. Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy Standardbred horses. *Equine Comp. Exerc. Physiol.*, 2004, **1**, 211-220.
- DE MOFFARTS B., KIRSCHVINK N., ART T., PINCEMAIL J., LEKEUX P. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *Vet. J.*, 2005, **169**, 65-74.
- DE MOFFARTS B., PORTIER K., KIRSCHVINK N., COUDERT J., FELLMANN N., VAN ERK E., LETELLIER C., MOTTA C., PINCEMAIL J., ART T., LEKEUX P. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. *Vet. J.*, 2007, **174**, 113-121.
- DEATON C.M., MARLIN D.J., ROBERTS C.A., SMITH N., HARRIS P.A., KELLY F.J., SCHROTER R.C. Antioxidant supplementation and pulmonary function at rest and exercise. *Equine Vet. J.*, 2002, **Suppl. 34**, 58-65.
- HARGREAVES B.J., KRONFELD D.S., WALDRON J.N., LOPES M.A., GAY L.S., SAKER K.E., COOPER W.L., SKLAN D.J., HARRIS P.A. Antioxidant status and muscle cell leakage during endurance exercise. *Equine Vet. J.*, 2002, **Suppl. 34**, 116-121.
- HELMS JB, ZURZOLO C. Lipids as targeting signals: lipid rafts

- and intracellular trafficking. *Traffic*, 2004, **5**, 247-254.
- HOLLAN S. Membrane fluidity of blood cells. *Haematologia (Budap.)*, 1996, **27**, 109-127.
- MARGUET D., LENNE, P.F., RIGNEAULT H., HE H.T. Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *EMBO J.* 2006, **25**, 3446-3457.
- MARLIN D.J., FENN K., SMITH N., DEATON C.D., ROBERTS C.A., HARRIS P.A., DUNSTER C., KELLY F.J. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *J. Nutr.*, 2002, **132 : Suppl 2**, 1622S-1627S.
- McINTYRE J.A. Antiphospholipids antibodies in implantation failure. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2003, **49**, 221-229.
- MILLS P.C., SMITH N.C., CASAS I., HARRIS P., HARRIS R.C., MARLIN D.J. Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 1996, **74**, 60-66.
- O'CONNOR C.I., LAWRENCE L.M., LAWRENCE A.C., JANICKI K.M., WARREN L.K., HAYES S. The effect of dietary fish oil supplementation on exercising horses. *J. Anim. Sci.*, 2004, **82**, 2978-2984.
- OOSTENBRUGG.S., MENSINKR.P., HARDEMAN M.R., DE VRIES T., BROUNS F., HORNSTRA G. Exercise performance, red blood cell deformability, and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. *J. Appl. Physiol.*, 1997, **83**, 746-752.
- PAWLAK W., KEDZIORA J., ZOLYNSKI K., KEDZIORKORNATOWSKA K., BLASZCZYK J., WITKOWSKI P., ZIELENIEWSKI J. Effect of long term bed rest in men on enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation in erythrocytes. *J. Gravit. Physiol.*, 1998, **5**, P163-P164.
- PINCEMAIL J., DEFRAIGNE J.O., LIMET R. Oxidative stress in clinical situations- fact or fiction ? *Eur. J. Anaesthesiol.*, 1996, **13**, 219-234.
- PORTIER K., DE MOFFARTS B., FELLMANN N., KIRSCHVINK N., MOTTA C., LETELLIER C., RUELLAND A., VAN ERCK E., LEKEUX P., COUDERT J. The effects of dietary n-3 and antioxidant supplementation on erythrocyte membrane fatty acid composition and fluidity in exercising horses. *Equine Vet. J.*, 2006, **36**, 279-284.
- PORTIER K., GUICHARDANT M., DEBOUZY J.C., CROUZIER D., GERAUD I., KIRSCHVINK N., LEKEUX P., FELLMANN N. COUDERT J. In vitro effects of oxygen on physico-chemical properties of horse erythrocyte membrane. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2007, **23**, 240-246.
- POSSM.J., LONGMUIR I.S., MOSER E.T. Hyperchylomicronemia, oxygen affinity and proton passage across the red cell membrane. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1990, **277**, 173-179.
- SHIGA T., MAEDA N. Influence of membrane fluidity on erythrocyte functions. *Biorheology*, 1980, **17**, 485-499.
- SHINITZKY M. Physiology of membrane fluidity. CRC Press : Boca Raton, 1984, 1-39.
- SIEMS W.G., SOMMERBURG O., GRUNE T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin. Nephrol.*, 2000, **53**, S9-S17.
- SIMOPOULOS A.P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, **54**, 438-463.
- SINGER S.J., NICOLSON G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 1972, **175**, 720-731.
- STOLTZ J. Red blood cell microrheology (clinical and pharmacological applications). *Ric. Clin. Lab.*, 1983, **13**, 53-70.
- SZWEDA-LEWANDOWSKA Z., KROKOSZ A., GONCIARZ M., ZAJECKOWSKA W. PUCHALA M. Damage to human erythrocytes by radiation-generated HO* radicals: molecular changes in erythrocyte membranes. *Free Radic. Res.*, 2003, **37**, 1137-1143.
- VENTO M., ASENSI M., SASTRE J., LLORET A., GARCIA-SALA F., MINANA J.B., VINA J. Hyperoxemia caused by resuscitation with pure oxygen may alter intracellular redox status by increasing oxidized glutathione in asphyxiated newly born infants. *Semin. Perinatol.*, 2002, **26**, 406-410.
- VEREB G., SZOLLOSI J., MATKO J., NAGY P., FARKAS T., VIGH L. MATYUS L., WALDMANN, T.A., DAMJANOVICH S. Dynamic, yet structured : the cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 8053-8058.
- WEBSTER N.R., TOOTHILL C. Inorganic phosphate transport across the red blood cell membrane: the effect of exposure to hyperoxia. *Clin. Chim. Acta*, 1987, **167**, 259-265.