

- [1] Margaret Oot Hayes, BSN, Gail A. Harkness, DrPH, FAAN, Durham, New Hampshire: Practice Forum: Body piercing as a risk factor for viral hepatitis: An integrative research review. *American Journal of Infection Control*, 2001; 29(4): 271-4.
- [2] Ehrlich, Alison; Kucenic, Michael; Belsito, Donald V.: Role of body piercing in the induction of metal allergies. *American Journal of Contact Dermatitis*, 2001; 12(3): 151-155.
- [3] L.Budinger, M.Hertl: Immunological mechanism in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. *Allergy*, 2000; 55:108-115.
- [4] Haudrechy P., Fousseureau J., Mantout B., Baroux B.: Nickel release from 304 and 316 stainless steels in synthetic sweat. Comparison with nickel and nickel-plated metals. Consequences on allergic contact dermatitis, *Corrosion Science*, 1993; 35 (1-4): 329-336.

- [5] Mitura S., Mitura E., Mitura A.: Manufacturing of amorphous carbon layers by RF dense plasma, *Diamond Rel. Materials*, 1995; 4: 302-303.
- [6] Katarzyna Bąkiewicz and Stanisław Mitura: Biocompatibility of NCD, *Journal of Wide Bandgap Materials*, 2002;4,Vol.9
- [7] Tang L., Tsai C., Gerberich W.W., Kruckeberg L., Kania D.R.: Biocompatibility of chemical-vapor-deposited diamond, *Biomaterials*, 1995;16: 483-488.
- [8] Mitura S., Niedzielski P., Marciniak J., Stanishevsky A., Tochitsky E., Louda P., Couvrat P., Denis M., Lourdin P.: Influence of carbon coatings origin on the properties important for biomedical application, *Diamond Rel. Materials*, 1996; 5: 1185-1188.
- [9] Mazurek H.: Testy skórne w praktyce, Wydawnictwo Medipress, Choroby dróg oddechowych, 1997; 2: 15-20.
- [10] S. Fregert: *Manual of Contact Dermatitis*, 2nd edition, Munksgaard, Copenhagen 1981.

HAMOWANIE PROCESU HEMOLIZY W OBECNOŚCI PROSZKU DIAMENTOWEGO W WARUNKACH USZKODZENIA PRZEZ WOLNE RODNIKI

KATARZYNA MITURA*, GRZEGORZ BARTOSZ**, STANISŁAW MITURA*

*ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ
**KATEDRA BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ UNIwersYTETU ŁÓDZKIEGO

Streszczenie

Stres oksydacyjny jest zjawiskiem powodującym uszkodzenie błony komórkowej, w tym błony erytrocytu. Jest to łańcuchowa reakcja wolnorodnikowa, w wyniku której powstające wolne rodniki [1,2], uszkadzając strukturę tej błony, zmieniają jej właściwości półprzepuszczalne i powodują zmianę konformacji dwuwarstwy lipidowo-białkowej. Powstałe w wyniku procesu peroksydacji lipidów, toksyczne produkty - nadtlarki lipidów, wbudowując się w błonę komórkową, mogą być przyczyną uszkodzenia całej komórki, a przede wszystkim jej materiału genetycznego zawartego w jądrze komórkowym. Tak uszkodzona błona komórkowa erytrocytu, powoduje zaburzenie w funkcjonowaniu tej krwinki, które nazywa się zjawiskiem hemolizy. Klinicznie hemoliza to niedokrwistość hemolityczna, czyli zmniejszenie liczby krwinek czerwonych we krwi obwodowej, spowodowane rozpadem tej krwinki, z powodu uszkodzenia błony komórkowej, uwarunkowane czynnikami zewnątrz- lub wewnątrzkrwinkowymi. Istotą samego zjawiska jest odzwierciedleniem procesu chorobowego, jaki dotyka krwinkę czerwoną, a co za tym idzie, wymaga właściwego postępowania terapeutycznego. Leki, które hamują proces hemolizy, nie zawsze spełniają oczekiwania

THE INHIBITION OF HAEMOLYSIS IN PRESENCE DIAMOND POWDER PARTICLES IN CONDITIONS OF FREE RADICAL DAMAGE

KATARZYNA MITURA*, GRZEGORZ BARTOSZ**, STANISŁAW MITURA*

*BIOMEDICAL ENGINEERING DIVISION,
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDZ, POLAND

**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOPHYSICS, UNIVERSITY OF ŁÓDZ,
POLAND

Summary

Oxidative stress is the phenomenon which takes part in the damage of cell membrane, for ex.: the erythrocyte membrane. This mechanism is based on the free radical chain reactions [1,2]. The result of this process are the products: free radicals - the cause of the damage of cell membrane structure and change properties of cell membrane fluidity and conformations of phospholipid bilayer. Lipid peroxidation is the cause of the form the toxic products - superoxides lipids in cell membrane and the damage of nucleus which contains a genetic material (DNA) of this cell. Erythrocyte membrane can be destroyed in mechanism of oxidative stress and it is the base of developing the phenomenon of haemolysis. The clinical name of this process is "anemia haemolytica" - the decreasing of amount of erythrocytes in peripheral blood from the exogenous or endogenous factors. Haemolysis is the pathological process in human organism and in aspect of disease can be treated successfully. Medicines, which doctors use to treat this disorder are not completely good because always mechanism of its activity contains only the symptomatic treatment. It seems that Diamond Powder Particles can be used as the alternative therapy of anemia haemolytica [6].

lekarzy i niejednokrotnie nie powodują całkowitego wyleczenia, a działają wyłącznie objawowo. Wydaje się, że zastosowanie proszku diamentowego może być alternatywnym sposobem leczenia tego rodzaju zaburzeń [6].

Słowa kluczowe: proszek diamentowy, hemoliza, stres oksydacyjny
[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 70-73]

Wprowadzenie

Narządem krwiotwórczym, w którym zachodzi hematopoeza u dorosłego człowieka jest szpik kostny. Hematopoeza czyli krwiotworzenie jest procesem ciągłym, w wyniku którego z wielopotencjalnej komórki macierzystej pnia, znajdującej się w szpiku kostnym, powstają wyspecjalizowane komórki, krążące we krwi. Krążą we krwi obwodowej około 120 dni. Pełnią one jedną z podstawowych funkcji w organizmie, która polega na transporcie cząsteczek tlenu z płuc do tkanek. Krwinki czerwone charakteryzują oznaczane wielkości. Najważniejsze z nich to: liczba w 1 litrze krwi obwodowej - RBC, wskaźnik hematokrytu - Hct, zawartość hemoglobiny - Hb. Otoczka krwinek czerwonych jest błoną półprzepuszczalną, przez którą cząsteczki wody z łatwością dyfundują. [3, 4].

Hemoliza jest procesem w wyniku którego na skutek uszkodzenia krwinek czerwonych dochodzi do zniszczenia erytrocytu, a zatem do skrócenia jego czasu życia.

Przyczynami pierwszego rodzaju hemolizy są defekty w błonie komórkowej erytrocytu. Ten typ uszkodzenia erytrocytu spowodowany jest czynnikami wewnątrzkrwinkowymi. Są to wrodzone zmiany w budowie erytrocytu, jego układzie enzymatycznym oraz budowie hemoglobiny.

Drugi typ hemolizy wywołują czynniki pozakrwinkowe i wtedy mamy do czynienia z hemolizą spowodowaną czynnikami zewnątrzkrwinkowymi, tj: przeciwciała, bakterie, czynniki fizyczne i toksyczne [5].

Wszystkie błony biologiczne zawierają lipidy jako głów-

Introduction

Bone marrow is the central organ which is responsible for haematopoiesis in adult people. Haematopoiesis is the continuous process. The result of this process is the formation from the stem cell in bone marrow the specialized cell presence in peripheral blood.

Erythrocytes circulate in peripheral blood about 120 days. The basic role of erythrocyte in human organism is the transport of the molecules of oxygen from lungs to tissues.

Red blood cells are characterized by the following parameters: The most important of them are: the amount of erythrocytes in 1 litre of peripheral blood - RBC; hematocrit - Hct; the amount of hemoglobin in erythrocyte - Hb.

The erythrocyte membrane is cell membrane fluidity. The molecules of water can easy go into cell and outside [3, 4].

Haemolysis is the process in human body which is connected with damage of red blood cells.

The result of haemolysis is the cutting short of its life time. The reasons of the first type of haemolysis are the defects in erythrocyte membrane skeleton. This type of damage of erythrocytes is the haemolysis caused by factors in the same red blood cell: These damages are connected with the inborn changes in cell membrane structure and its enzymatic system and the structure of hemoglobin.

The second type of this pathological process is the haemolysis caused by factors besides erythrocyte membrane. The presence of these factors in human organism is the symptom of many diseases. There are: antibodies, bacteria, physics and toxic factors [5].

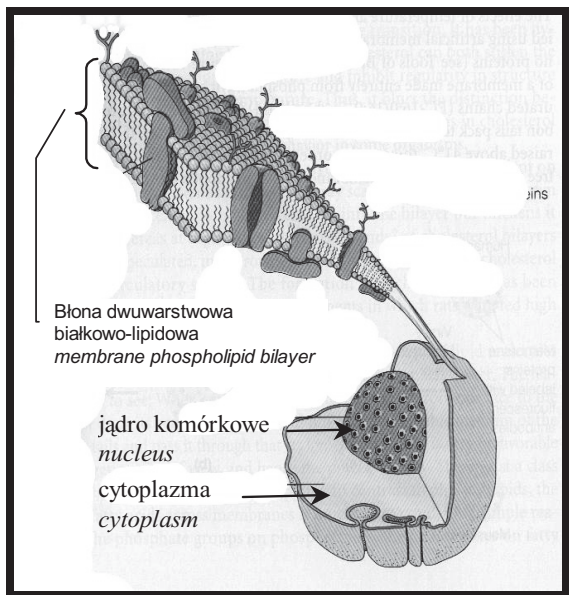
All biological membranes contain lipids as major constituents. The four major classes of membrane-forming lipids: glycerophospholipids, sphingolipids, glycosphingolipids and glycolipids. The membranes of living cells are remarkable bits of molecular architecture, with many and varied functions. To say that a membrane is essentially a phospholipid bilayer is a gross oversimplification. Much of our current understanding concerning biological membrane is based upon the fluid mosaic model proposed by S.J.Singer and G.L.Nicholson in 1972. The fluid, asymmetric lipid bilayer carries within it a host of protein.

The erythrocytes of mammals are among the simplest of all cells. The plasma membrane of erythrocytes contains far fewer proteins than are found in most other cell membranes, in keeping with the simple metabolism of these cells. The erythrocyte, like many other cells, has a complex "skeleton" of proteins underlying and attached to its plasma membrane. The normal state of equilibrium for a substance that can pass through a membrane is equalization of the concentration on both sides. In active transport, substances are moved across a membrane against a concentration gradient. Coupling ATP hydrolysis to the transport usually provides the required free energy. The Na⁺ - K⁺ pump acts in all cells to maintain higher concentrations of K⁺ inside and Na⁺ outside [10].

The influence of Diamond Powder Particles on biochemical processes in living organism is based on specific, unusual properties of diamond. This biological activity of Diamond Powder Particles contains the phenomenon of the inhibition of oxidative free radical damage in vitro [8,11].

Materials and methods

The effect of nanocrystalline diamond on the hemolysis of human erythrocytes induced by 2,2'-azobis (2-

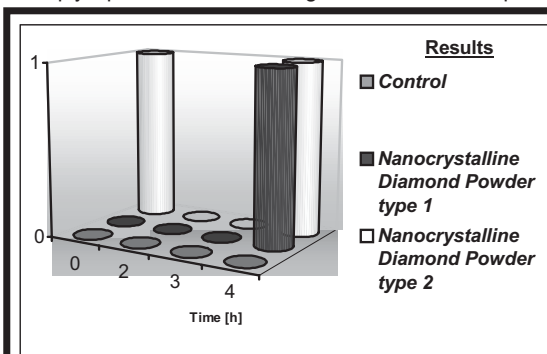


RYS. 1. Budowa typowej błony komórkowej (dwuwarstwa białkowo-lipidowa) [10].
FIG. 1. Structure of a typical cell membrane (phospholipid bilayer) [10].

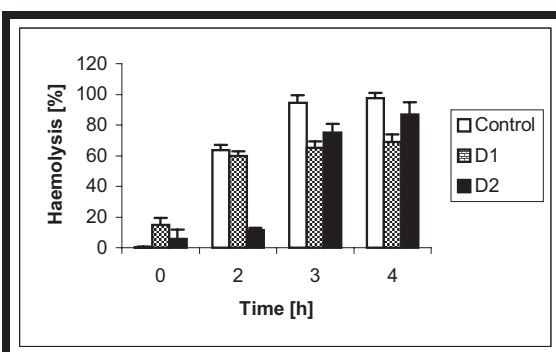
ne składniki. Wyróżniamy 4 główne klasy lipidów budujących błonę komórkową: glicerofosfolipidy, sfingolipidy, glikosfingolipidy i glikoglicerolipidy. Błony żywych komórek są znaczącym elementem budowy molekularnej, ponieważ pełnią wiele różnych funkcji. Stwierdzenie, że błona jest głównie dwuwarstwą lipidową jest ogromnym uproszczeniem. Wiele z aktualnych doniesień dotyczących błon biologicznych jest opartych na "płynnym modelu mozaikowym" proponowanym przez S.J.Singera i G.L.Nicholsona w 1972. Płynna, asymetryczna dwuwarstwa lipidowa, zawiera obok lipidów mnóstwo białek.

Erythrocyty ssaków są najprostszymi wśród wszystkich komórek. Błona komórkowa erythrocytów zawiera znacznie mniej białek znalezionych w większości w błonach innych komórek, co wynika z prostego metabolizmu tych komórek. Erythrocyt, jak wiele innych komórek posiada kompleks białek szkieletowych, ukrytych i przylegających do ich błony komórkowej. Normalny stan równowagi dla substancji, które mogą przechodzić przez błonę jest równoważony poprzez stężenie po obu stronach błony. W transporcie aktywnym substancje są przemieszczane przez błonę wbrew gradientowi stężeń. Hydrolyza ATP zwykle dostarcza do tego transportu potrzebnej wolnej energii. Pompa sodowo-potasowa we wszystkich komórkach utrzymuje wysokie stężenia jonów potasu wewnątrz komórki i jonów sodu na zewnątrz komórki [10].

Wpływ proszku diamentowego na biochemiczne procesy



RYS. 2. Wykres jakościowej oceny procesu hemolizy.
FIG. 2. The graph of qualitative opinion of haemolysis.



RYS.3. Wykres ilościowej oceny procesu hemolizy.
FIG. 3. The graph of quantitative opinion of haemolysis.

amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was studied.

In these examinations I used as the material Diamond Powder Particles. We have examined two types of diamond powder D1 i D2: were manufactured by detonation method in Russia [9]. Erythrocytes (hematocrit of 1%) were exposed to 50 mM AAPH in phosphate-buffered saline at 310°K. To mixture of reaction were added the suspensions of D1 and D2 in amount $1 \times 10^{-3} \text{g} / 1 \times 10^{-3} \text{l}$ and after incubation at 310°K the time course of hemolysis was monitored by qualitative method and measurement of absorbance of hemoglobin in the supernatants at $\lambda = 414 \times 10^{-9} \text{m}$ after 0, 2, 3, 4 h [7].

Conclusions and discussion

1. Induction of erythrocytes in the presence of DPP with 2,2,-azo-bis(2-amidinopropane) (AAPH) lead to some degree of haemolysis induced apparently by mechanical damage to the red blood cell membrane (FIG. 2). However, much higher degree of haemolysis was induced by incubation with AAPH. In this case, the presence of DPP decreased the level of hemolysis (FIG. 3).

2. The haemolysis induced by AAPH is due to the oxidative damage of erythrocyte membrane by peroxy radicals formed from primary products of thermal hemolysis of AAPH .

3. Diamond Powder Particles presents at concentrations of $1 \times 10^{-3} \text{g} / 1 \times 10^{-3} \text{l}$ significantly decreased the level of hemolysis

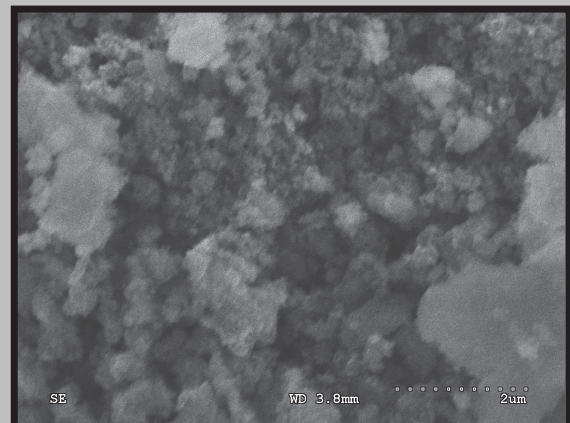
Kontrola - erythrocyty od zdrowych pacjentów
Control - erythrocytes from health patients

Proszek diamentowy typ 1 (biały)-wytworzony metodą detonacyjną -
DPP (white) manufactured by detonation method [9]

Proszek diamentowy typ 2 (czarny)- wytworzony metodą detonacyjną -
DPP (black) manufactured by detonation method [9]

H - hemoliza - hemolysis

0 - brak hemolizy - we have not observed haemolysis
1 - mechaniczne uszkodzenie próbki przez nanokryształki diamentu -
mechanical damage of sample by nanocrystalline diamond powder



RYS. 4. Obraz SEM nanokryształicznego diamentu wytworzonego metodą detonacyjną (D2).
FIG. 4. SEM micrograph of DPP manufactured by detonation method (D2).

sy w żywym organizmie jest oparty na specyficznych, niezwykłych właściwościach diamentu. Ta biologiczna aktywność proszku diamentowego przejawia się w zjawisku hamowania stresu oksydacyjnego in vitro [8, 11].

Materiały i metodyka

Badanie wpływu proszku nanokrystalicznego diamentu na proces hemolizy ludzkich erytrocytów indukowany 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH).

W tych badaniach został zastosowany jako materiał proszek diamentowy. Zbadaliśmy 2 typy proszków diamentowych D1 i D2 wytworzonych metodą detonacyjną w Rosji [9]. Erytrocyty, w których oznaczony hematokryt wynosił 1 % były ekspozowane na 5×10^{-2} M AAPH w buforze fosforanowym w temperaturze 310°K w celu wywołania hemolizy. Do mieszaniny reakcyjnej dodano zawiesiny proszków diamentowych D1 i D2 w ilości 1×10^{-3} g/ 1×10^{-3} l. i także inkubowano w temperaturze 310°K. Proces hemolizy był monitorowany metodą jakościową po 0, 2, 3, 4 godzinach oraz metodą ilościową został dokonany pomiar absorbancji hemoglobiny w supernatancie przy długości fali 414×10^{-9} m [7].

Wnioski i dyskusja

1. Indukcja erytrocytów w obecności proszku diamentowego i 2,2,-azo-bis(2-amidinopropane) (AAPH) prowadzi do niewielkiego stopnia hemolizy indukowanej widocznie na skutek mechanicznego uszkodzenia błony komórkowej erytrocytów (RYS.2).

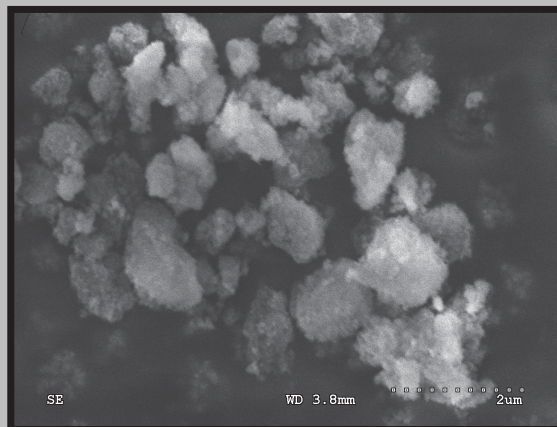
2. Jakkolwiek, większy stopień hemolizy był indukowany poprzez inkubację z AAPH. Z tego powodu obecność proszku diamentowego zmniejszyła poziom hemolizy (RYS.3). Hemoliza indukowana przez AAPH jest skutkiem stresu oksydacyjnego w błonie komórkowej erytrocytu, spowodowanego wolnymi rodnikami jako pierwotnymi produktami termicznej hemolizy AAPH.

3. Proszek diamentowy obecny w stężeniu 1×10^{-3} g/ 1×10^{-3} l znacznie zmniejsza poziom hemolizy indukowanej przez AAPH.

Efekt ten wydaje się być wynikiem oddziaływania nanokrystalicznego diamentu z wolnymi rodnikami. Wyniki te potwierdzają tezę o bardzo wysokiej aktywności biologicznej proszku diamentowego w żywym organizmie na poziomie molekularnym. Mechanizm hamowania stresu oksydacyjnego przez proszek diamentowy in vitro został poprzez te nowe wyniki poszerzony o wpływ na reakcje wolnorodnikowe w krwinkach czerwonych.

Podziękowania

1. Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2002-2005 jako zadanie badawcze zamawiane nr KBN-082/T08/09.
2. Dla Pana mgr inż. Grzegorza Bogusławskiego.



RYS. 5. Obraz SEM nanokrystalicznego diamentu wytworzonego metodą detonacyjną (D1).
FIG. 5. SEM micrograph of DPP manufactured by detonation method (D1).

induced by AAPH.

The effect seems to be due to the reaction of nanocrystalline diamond with peroxy radicals. These conclusions proved that Diamond Powder Particles has very high biological activity in living organism on molecular level. The mechanism of inhibition of oxidative stress by Diamond Powder Particles in vitro was developing about the new results which show the influence on free radical damage reaction in red blood cells.

Acknowledgements

1. The works were financed by the Polish State Committee in years 2002 - 2005 for Scientific Research Nr KBN-082/T08/09.
2. For Msc Grzegorz Bogusławski.

Piśmiennictwo

References

- [1] G. Bartosz: Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995.
- [2] K. Bąkiewicz, S. Mitura: "Biocompatibility of NCD", JOURNAL OF WIDE BANDGAP MATERIALS, Vol. 9, No. 4 - April (2002), 261-272.
- [3] W. Traczyk: Fizjologia człowieka w zarysie. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1989.
- [4] T. Robak: Hematologia kliniczna w zarysie. Akademia Medyczna w Łodzi, 1998.
- [5] F. Kokot: Choroby wewnętrzne. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1991.
- [6] M. Bartosz, J. Kędziora, G. Bartosz: "Antioxidant and prooxidant properties of captopril and enalapril", Free Radical Biology and Medicine, Vol. 23, No. 5, (1997), 729-735.
- [7] C.G. Zou, N.S. Agar, G.L. Jones: "Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture", Life Sci. 2001 May 25, 69, (1), 75-86.
- [8] J. Ristein, M. Riedel, F. Maier, B.F. Mantel, M. Stammer, L. Ley: "Surface doping: a special feature of diamond", Journal of Physics: Condensed Matter, 13, (2001), 8979-8987.
- [9] K.J. Amada: "Shock synthesis of a new cubic form of carbon", Carbon, Vol. 41, No. 6, (2003), 1309-1313.
- [10] Ch.K. Mathews, K.E. van Holde, K.G. Ahern: Biochemistry, An Imprint of Addison Wesley Longman, 2000.
- [11] S. Mitura, K. Bąkiewicz: "Bioactivity of diamond", 13 th Conference on Diamond, Diamond - Like Materials, Carbon Nanotubes, Nitrides and Silicon Carbide, Abstract Book, September 2002, Granada, Spain.