

Поведение клеток в неизотонических условиях: дифференцированный подход к механизмам структурных нарушений и адаптации

В.А. БОНДАРЕНКО¹, О.К. ПАКУЛОВА², А.Е. ЖУЙКОВА²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Cell Behaviour Under Non-Isotonic Conditions: Differentiated Approach to Mechanisms of Structural Disorders and Adaptation

V.A. BONDARENKO¹, O.K. PAKULOVA², A.E. ZHUYKOVA²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²V.N. Karazin Kharkov National University, Ukraine

В настоящее время большой интерес представляет исследование реакции клеток на изменение параметров среды, в которой они находятся. Многие клетки реагируют на изменение условий среды включением внутренних адаптационных механизмов, которые еще до конца не исследованы, причем указанные механизмы характеризуются выраженной функциональной специфичностью, и соответственно клетки могут адекватно реагировать на разнообразные стимулы, включая изменения температуры, осмолярности, pH и ионной силы среды. Адаптивные реакции клеток носят как кратковременный, так и долговременный характер. В первом случае адаптация обеспечивается преимущественно мембранными механизмами, а во втором – процессами биосинтеза, происходящими в клеточном ядре. В итоге устанавливаются новые режимы интеграции систем клетки, обеспечивающие необходимый уровень адаптации к новым условиям. Данные, полученные при исследовании эритроцитов, доказывают, что адаптивный потенциал клеток по отношению к изменениям условий среды зависит от исходных условий, в которых они находятся. Это означает, что комбинация определенных начальных параметров среды программирует поведение клеток при дальнейших ее изменениях.

Помимо обратимости изменений, другим важным критерием является скорость изменений условий среды, когда выход за границу адаптации тем более вероятен, чем больше скорость этих изменений. При значительном нарушении согласованности между изменениями параметров среды и адаптивными изменениями, происходящими в клетке, результирующая реакция проявляется как «шок». Функциональный диапазон этих условий широк, в одних случаях можно говорить о сенсibilизации клеток, а в других – об адаптации. При этом важно отметить, что температурно-осмотическая адаптация клеток одинакова как при температурах выше 0°C, так и в условиях замораживания клеток, что свидетельствует о значительном потенциале клеток, возможность реализации которого зависит от оптимальной комбинации исходных параметров среды, и возможности направленно индуцировать процессы, позволяющие существенно расширить границы адаптации клеток. Значительный экспериментальный материал позволяет выдвинуть несколько гипотез относительно механизмов повреждений клеток при изменении осмотических условий среды и охлаждении. Роль цитоскелет-мембранного комплекса может рассматриваться как ключевая в процессах, приводящих к инициации, формированию и стабилизации трансмембранных пор. Общей основой указанных процессов, по-видимому, являются фазово-структурные изменения мембранных липидов. Именно это объясняет высокую эффективность амфифильных соединений в качестве агентов, модифицирующих процессы, связанные с формированием пор. Другой важный фактор – транспорт ионов и воды, а также состояние водных растворов электролитов и неэлектролитов, в которых экспонируются клетки.

Очевидно, в перспективе значительные усилия будут сосредоточены на изучении роли воды в механизмах адаптации на молекулярно-клеточном уровне.

Nowadays of great interest is to investigate the cell response on changed parameters of medium, where cells are. Many cells respond on a change in medium composition by triggering the internal adaptive mechanisms, which have still remained poorly studied, moreover the mentioned mechanisms are characterised by a manifested functional specificity and, as a result, the cells may adequately respond to different stimuli, including changes in temperature, osmolarity, pH and medium ion strength. Cell adaptive responses are of both short- and long-term characters. In the first case the adaptation is provided mostly by the membrane mechanisms but in the second one by biosynthesis processes, occurring in cell nucleus. New regimens of cell system integration, providing a necessary adaptive level to new conditions have been finally established. The data obtained during erythrocyte studies demonstrate the cell adaptive potential towards changes in medium conditions as depending on the initial conditions where they are. This means that the combination of certain initial medium parameters programmes the cell behaviour during its further changes.

The rate of changes in medium conditions when the over-running of adaptation limit is more probable with higher rate of these changes, is the another important criterion besides the change reversibility. Under significant disorder of conformity between changes of medium parameters and adaptive changes, occurring in a cell, the resulting response is manifested as a “shock”. Functional range of these conditions is wide, in one case we may suggest about cell sensibilisation, in other about adaptation. At the same time of note is the fact that the temperature and osmotic cell adaptation is equal both at temperature higher than 0°C and under cell freezing, testifying to a significant cell potential, which possible realisation depends on an optimal composition of medium initial parameters and a possibility of a directed induction of processes, enabling a considerable extension of cell adaptation limits. A huge experimental materials allows making some hypotheses in respect of cell damage mechanisms when changing medium osmotic conditions and cooling. The role of cytoskeleton-membrane complex may be emphasised as a key one in the processes, resulting in the initiation, formation and stabilisation of transmembrane pores. The common base for the mentioned processes is apparently the phase and structural changes in membrane lipids, which should be referred to both temperature-dependent changes and those, caused by cell dehydration. Namely this fact explains a high efficiency of amphiphil compounds as agents, modifying processes, related to the pore formation. Another important fact is the ion and water transport, as well as the state of electrolyte and non-electrolytes aqueous solutions, where cells are exposed.

Obviously, in future the great efforts will be focused in studying the role of water in adaptive mechanisms on molecular and cell levels.

Метаболические и молекулярные особенности адаптации гидробионтов к условиям экстремальной гипоксии, аноксии и гипотермии

А. А. СОЛДАТОВ¹, Т. И. АНДРЕЕНКО¹, И. А. ПАРФЕНОВА², И. В. ГОЛОВИНА¹

¹Институт биологии южных морей НАН Украины, г. Севастополь, АР Крым

²Таврический национальный университет, г. Симферополь

Metabolic and Molecular Adaptive Peculiarities of Hydrobionts to Extreme Hypoxia, Anoxia and Hypothermia Conditions

A.A. SOLDATOV¹, T.I. ANDREYENKO¹, I.A. PARFENOVA², I.V. GOLOVINA¹

¹Institute of Biology of the Southern Seas National Academy of Sciences of Ukraine, Sevastopol, Crimea, Ukraine

²Tavrisheskiy National University, Simferopol, Ukraine

В условиях эксперимента исследовали влияние экстремальной гипоксии, аноксии и гипотермии на метаболические процессы, состояние молекулярных систем транспорта и утилизации кислорода у ряда морских рыб и моллюсков.

Среди представителей донной ихтиофауны выявлена группа видов, у которых в условиях крайнего дефицита кислорода и гипотермии реализуется комплекс адаптивных изменений на уровне молекулярных систем. В условиях внешней гипоксии организм этих рыб допускает быстрое снижение напряжения кислорода в артериальной крови и скелетных мышцах без видимых признаков развития анаэробноза. В клеточных системах отмечено сбалансированное угнетение метаболических и мембранных функций. Это выразилось в снижении активностей ряда ферментов: Na⁺-, K⁺-АТФ-азы и гексокиназы, при сохранении основных показателей жизнеспособности клеток: градиентов по Na⁺ и K⁺ на мембране и внутриклеточной концентрации АТФ.

Кровь рыб, устойчивых к гипоксии, обладала одновременно высоким сродством к кислороду и повышенной чувствительностью к рН (эффект Бора). Это качество становилось еще более выраженным в условиях дефицита кислорода. Оно определялось свойствами гемоглобина и не зависело от условий внутриэритроцитарного микроокружения (концентрации НТФ, Mg²⁺). В гемоглобиновой системе при помощи диск-электрофореза в ПААГ был выявлен компонент, имеющий низкие значения показателя P₅₀ и коэффициента Хилла при выраженном эффекте Бора и слабом эффекте Рута. Его содержание в крови существенно повышалось в условиях внешнего дефицита кислорода и направленно изменяло кислородосвязывающие характеристики крови в целом. Дыхательная цепь митохондрий скелетных мышц рассмотренных видов имела нескомпенсированный тип стехиометрии с повышенным содержанием цитохромов терминальной группы (aa₃). Отношение b/aa₃ было меньше единицы. Это способствовало утилизации следовых количеств тканевого кислорода.

Исследование особенностей течения метаболических процессов в организме моллюсков показало, что виды (*Anadara inaequalis* Br.) способные существовать в условиях гипоксии и аноксии имеют сниженные кислородные потребности и активно используют белковые субстраты в энергетическом обмене. Их ткани располагают повышенным пулом свободных аминокислот, донором которых выступает гепатопанкреас. Отличительной чертой этих моллюсков является высокоэффективный анаэробный ферментативный комплекс, представленный малатдегидрогеназой, аланин- и аспартатаминотрансферазами. Он позволяет функционировать организму в условиях дефицита кислорода без накопления токсических метаболитов (лактата).

The effects of extreme hypoxia, anoxia and hypothermia on metabolic processes, state of molecular systems of oxygen transport and utilisation in some sea-fishes and shells, have been investigated.

The group of species with realising the complex of adaptive changes under conditions of extreme oxygen deficiency and hypothermia at the level of molecular systems, has been revealed among the representatives of bottom-living fish fauna. Under outer hypoxia the organism of these fishes allows a rapid decrease of oxygen tension in arterial blood and skeletal muscles with no visible signs of anaerobiosis development. A balanced suppression of metabolic processes and membrane functions was noted in cell systems. This was manifested in a decrease in activities of some enzymes: Na⁺-, K⁺-ATPase and hexokinase with preserved main indices of cell viability: gradients by Na⁺ and K⁺ on membrane and ATP intracellular concentration.

Blood of fishes, resistant to hypoxia had simultaneously a high affinity to oxygen and an increased sensitivity to pH (Bohr effect). These parameters were much more manifested under oxygen deficiency. They were determined by hemoglobin properties and did not depend on endoglobular microenvironment conditions (NTP, Mg²⁺ concentrations). The component with low values of P₅₀ index and Hill coefficient under manifested Bohr and slight Root effects was revealed in hemoglobin system using the disk-electrophoresis in PAAG. Its content in blood significantly increased under conditions of external oxygen deficiency and directly changed the oxygen-binding blood characteristics in a whole. Respiratory mitochondrial chain of skeletal muscles of considered species was of non-compensated stoichiometry type with an increased content of cytochromes of terminal group (aa₃). The ratio b/aa₃ was less than one. This contributed to utilisation of tissue oxygen trace quantities.

Research of peculiarities of metabolic processes course in shell organism has demonstrated that the species (*Anadara inaequalis* Br.) capable to live under hypoxia and anoxia conditions have the reduced oxygen needs and actively utilise protein substrates in energetic metabolism. Their tissues possess an increased pool of free aminoacids, which donor is hepatopancreas. A distinctive feature of these shells is a highly efficient anaerobic enzyme complex, presented by malate dehydrogenase, alanine- and aspartate aminotransferases. It enables an organism functioning under conditions of oxygen deficiency with no toxic metabolite (lactate) accumulation.

Криотермосанация и озонотерапия очагов деструктивного туберкулеза почек

Ю.И. Козин

Харьковский национальный медицинский университет

Cryothermosanation and Ozone Therapy of Renal Destructive Tuberculous Foci

Yu.I. KOZIN

Kharkov National Medical University

По данным мировой статистики уровень ежегодной заболеваемости органным туберкулезом составляет 4,5 млн человек, а ежегодная смертность от туберкулеза – 3 млн человек. В Украине уровень ежегодной заболеваемости туберкулезом мочеполовых органов с преимущественным выявлением деструктивно-кавернозных форм составляет 1 человек на 100 тыс. населения. Это обусловлено низкой результативностью современной химиотерапии, изменчивостью флоры, быстрым появлением полирезистентных форм, снижением общей реактивности системы иммуно-компетентных клеток и невозможностью добиться гарантированной санации очагов казеозно-некротической деструкции.

Целесообразность применения сверхнизких температур и гипертермии (криотермоциклирования) для внутрикавернозной дезинфекции и стимуляции резервционно-регенераторной способности окружающей почечной ткани изучена в экспериментальном разделе на 789 суспензиях микобактерий туберкулеза (446 штамм “Academia” и 343 “больничных” лекарственно-устойчивых штаммов) и на 141 беспородной собаке. Возможность достижения бактерицидного эффекта при воздействии озона (O_3) на суспензию микобактерий туберкулеза (МБТ) в 0,9 % растворе натрия хлорида (изучена на 92 суспензиях) после 10–15-минутного барботажа кислородно-озоновой смесью с концентрацией O_3 8 ± 1 мг/л, что позволяло достичь гарантированного разрушения бактериальных клеток.

Экспериментальное исследование новых методов внутрикавернозного криоорошения (парожидкостными струями азота повторно по 30 с при принудительном отогреве $44 \pm 1^\circ C$) и криотермоапликационного воздействия с помощью созданного нами совместно с ФТИНТ АН СССР “Аппарата для локальной криотермодеструкции урологического” (АЛКУ-01) позволило выявить их атравматичность и высокую эффективность (90,9–93,1 %) в абациллировании казеозно-некротических очагов туберкулезной инфекции. Гарантированная дезинфекция патологических очагов с их быстрым рубцеванием достигалась нами при внутрикавернозном криотермоциклировании со скоростью охлаждения тканей $250 \pm 50^\circ C/мин$ до температуры $-80 \pm 5^\circ C$ и экспозицией воздействия 3 ± 1 мин с последующим нагревом со скоростью $40 \pm 5^\circ C/мин$ до температуры $50 \pm 10^\circ C$ и экспозицией воздействия 3 ± 1 мин. Оптимальная структурно-функциональная реабилитация почек получена нами, когда абациллированные вышеописанным способом казеозно-некротические ткани эвакуировали путем аспирации из полости каверны, после чего ее поверхность обрабатывали (обдув) в течение 10–15 мин озонородной смесью с концентрацией O_3 10 мг/л и скоростью потока 1 л/мин через двухходовой дренаж или струйно промывали озонированным физиологическим раствором с концентрацией O_3 10–20 мг/л в течение 5 мин с последующим ушиванием микротомического доступа (А.с. № 1821161 СССР, МКИ А61В17/36). Для последнего способа характерна выраженная стимуляция репаративно-регенераторных свойств окружающей кавернозное образование паренхимы.

According to the world statistics the level of annual disease incidence of organ tuberculosis and the annual tuberculous death rate are 4.5 and 3 mln persons, correspondingly. The level of annual urogenital tuberculous disease incidence in Ukraine is 1 person per 100,000 population with mostly revealed destructive and cavernous forms. This is stipulated with a low efficiency of actual chemotherapy, flora variability, rapid appearance of polyresistant forms, decrease in total reactivity of immune competent cell system and the impossibility to ensure the sanation of caseous and necrotic destructive foci.

The expediency of applying ultralow temperatures and hyperthermia (cryothermocycling) for intracavernous disinfection and stimulation of resorption-regenerative capability of surrounding renal tissue has been studied in experimental part in 789 tuberculous micobacteria suspensions (446 strain “Academia” and 343 “hospital” medicine-resistant strains) and in 141 breedless dogs. A possibility to achieve a bactericidal effect under ozone (O_3) effect to the tuberculous micobacteria suspension (ТМБ) in 0.9% sodium chloride solution (studied in 92 suspensions) after 10–15 min bubbling with oxygen-ozone mixture with 8 ± 1 mg/l O_3 concentration, that enabled to achieve a guaranteed bacterial cell destruction.

Experimental study of new methods for intracavernous cryoirrigation (vapor-liquid nitrogen streams repeatedly by 30 sec under forced thawing at $44 \pm 1^\circ C$) and cryothermoapplication effect by means of the ALCU-01 “Apparatus for local cryothermodestruction urological”, we designed together with the Institute for Low Temperature Physics and Engineering, enabled to reveal their injury-free and a high efficiency (90.9–93.1%) in abacillating the caseous and necrotic foci of tuberculous infection. The ensured disinfection of pathological foci with their rapid scarring was achieved under intracavernous cryothermocycling with $250 \pm 50^\circ C/мин$ tissue cooling rate down to $-80 \pm 5^\circ C$ and 3 ± 1 min effect exposure with following heating with $40 \pm 5^\circ C/мин$ rate up to $50 \pm 10^\circ C$ and 3 ± 1 min effect exposure. We obtained the optimal structural and functional renal rehabilitation when the caseous and necrotic tissues, abacillated as described above, were evacuated by aspiration from cavern cavity afterwards its surface was treated (air-flow) within 10–15 min with ozone-oxygen mixture with 10 mg/l O_3 concentration and 1 l/min flow rate through a two-way drainage or washed by stream infusion with ozonized physiological solution of 10–20 mg/l ozone concentration for 5 min with following microtome access closure (Certificate of authorship N 1821161 USSR, IPC A61B17/36). Manifested stimulation of reparative and regenerative properties of parenchyma, surrounding a cavernous formation, was typical for the latter way.

Морфологический ответ эритроцитов – закономерная реакция формы клетки на изменение ионного окружения

С.В. РУДЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Morphological Response Erythrocytes As Regular Response of Cell Shape to Ion Environment Changes

S.V. RUDENKO

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Известно, что ионная сила, pH, состав или осмолярность внешней среды приводят к изменению ионного состояния эритроцитов и переходу из одного исходного устойчивого состояния в другое, соответствующее новым условиям. Этот переход связан с функционированием различных ион-транспортных систем эритроцитов. В тех же самых условиях, как правило, происходит изменение формы клеток из дискоцитов в эхиноциты или стоматоциты, что позволяет предположить: процессы ионного транспорта и изменение формы могут быть взаимосвязаны. Мы установили, что перенос клеток в изотоническую неэлектролитную среду сахарозы вызывает динамические преобразования формы эритроцитов, состоящие из трех фаз: быстрой сферуляции (фаза 1), восстановления дискоидной формы (фаза 2) и вторичной сферуляции в сторону стоматоцитов (фаза 3). Такая последовательность морфологических преобразований, т. е. морфологический ответ (МО), является специфической реакцией клеток на изменение ионного окружения и зависит от множества факторов, среди которых можно выделить ионную силу среды, pH, исходное состояние эритроцитов, которое задается составом и pH раствора, в котором инкубируются клетки, а также состав раствора сахарозы, т. е. наличия в нем дополнительных анионов, катионов, ингибиторов анионного транспорта и других дополнительных ингредиентов. При их наличии указанные фазы МО могут значительно изменяться в сторону ингибирования и активирования, что зависит от концентрации и типа действующего вещества. При этом различные фазы могут регулироваться независимо друг от друга.

Полученные данные указывают на сложную и неоднозначную связь между ионными потоками и динамикой изменения формы эритроцитов, что позволяет рассматривать МО в сахарозной среде как закономерную реакцию формы клеток на изменение ионного окружения.

Ion strength, pH, composition or osmolarity of environment are known as resulting in a change of erythrocyte ion state and a transfer from one initial resistant state into another one, corresponding to new conditions. This transfer is associated to the functioning of different ion-transport erythrocyte systems. Under the same conditions a change in cell shape from a discocytes to echinocytes or stomatocytes occurs, thereby enabling to suggest as follows: the processes of ion transport and shape change may be related. We have established that cell transfer into isotonic non-electrolyte sucrose medium causes a dynamic transformation of erythrocyte shape, consisting of three phases: rapid spherulation (1 phase), recovery of discoid shape (2 phase) and secondary spherulation towards stomatocytes (3 phase). Such a sequence of morphological transformations, i.e. morphological response (MR) is a specific cell response to a change in ion environment and depends on many factors, among which there may be emphasized, such as the medium ion strength, pH, initial state of erythrocytes, fixed by solution composition and pH, where cell are incubated, as well as the composition of sucrose solution, i.e. the presence in it of additional anions, cations, anion transport inhibitors and other additional ingredients. With their presence the mentioned MR phases may be significantly changed towards inhibition and activation, that depends on concentration and type of active substance. At the same time the different phases may be regulated independently on each other.

The data obtained indicate a complicated and non-uniform relationship between ion fluxes and dynamics of a change in erythrocyte shape, that enables considering MR in sucrose medium as a regular response of cell shape to a changed ion environment.