

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ
НАН УКРАЇНИ**

ГОРЯЧА ІРИНА ПЕТРІВНА

УДК 57.043:582.23+611.018.51:577.352.4

**СТІЙКІСТЬ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
ТА ЕРИТРОЦИТІВ ДО ХОЛОДОВИХ ВПЛИВІВ В УМОВАХ
ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ**

03.00.19 – кріобіологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор

Зінченко Василь Демидович,

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, головн. наук. співроб., м. Харків.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор

Малова Наталія Георгіївна,

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України», зав. лабораторії фармакології, м. Харків.

кандидат біологічних наук

Гаташ Сергій Васильович,

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, доцент кафедри молекулярної і медичної біофізики, м. Харків.

Захист відбудеться «26» січня 2016 р. о 13³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «11» грудня 2015 року.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01

доктор біологічних наук, професор

Л. Ф. Розанов

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Протягом часу, що пройшов після відкриття кріозахисного дії гліцерину (Polge С., 1949), зберігання клітин шляхом кріоконсервування стало звичайною процедурою в багатьох областях біотехнології та медицини. Додавання кріопротекторів – стандартний етап у більшості використовуваних протоколів кріоконсервування. Механізми дії кріопротекторів на сьогодні багато в чому вивчені і описані в ряді публікацій (Hunt С.J., 2011; Nicacio А.С. et al., 2012; Towey J.J. et al., 2013; Abazari А., 2013; Fahmy M.D. et al., 2014).

Однак, на шляху подальшого розвитку кріобіології в напрямку клінічного застосування кріоконсервованих клітин і тканин залишається актуальним підвищення ефективності існуючих методів кріоконсервування живих систем.

Удосконалення методів кріоконсервування клітин ґрунтується на підборі складу кріозахисних середовищ, маніпуляціях із режимами охолодження і нагріву, підборі температур зберігання (Nicacio А.С. et al., 2012; Fahmy M.D. et al., 2014). При цьому важливо враховувати токсичність кріопротекторів, що накладає обмеження на підвищення концентрації кріозахисних речовин (Lawson А. et al., 2011; Almansoori К.А. et al., 2012; Sun Н. et al., 2012). Кріопротектори, що найбільш широко застосовуються є токсичними при високих концентраціях та згубно впливають на біологічні функції клітин. Тому виникає необхідність видаляти кріопротектори після відігрівання, що потребує затрат часу і коштів. У зв'язку з цим, у світі ведуться дослідження щодо пошуку методів захисту клітин від кріоушкоджень, які б дозволяли знизити концентрацію кріопротекторів.

Метод надшвидкого охолодження використовується для зниження концентрації кріозахисних речовин або для кріоконсервування біологічного матеріалу без кріопротекторів (Nowshari М.А. et al., 2000). Існують підходи, що базуються на модифікації проникності клітинних мембран перед заморожуванням з метою ослаблення осмотичного удару при експозиції клітин з кріопротекторами і кристалізації льоду (Wagner С.Т. et al., 2002; Suga М. et al., 2003). Була також запропонована ідея застосування речовин природного походження як добавок до традиційних кріопротекторів. Вони являють собою низькомолекулярні органічні осмоліти, що акумулюються або синтезуються мікроорганізмами в умовах дії високих концентрацій солей або інших стресів (Sun Н. et al., 2012).

Одним із шляхів підвищення стійкості живих систем до холоду є, на нашу думку, використання в технологіях кріоконсервування природних захисних механізмів, які запускаються при адаптивній відповіді на стрес. Таким індуктором може бути слабкий попередній стрес, що підвищує стійкість живої системи до стресу іншого типу.

Для виживання в природних умовах, що змінюються, у організмів існує стратегія адаптації, тобто вони запрограмовані для відповіді на стреси. Існують загальні механізми сприйняття і реакції організмів на зовнішні впливи: набір захисних реакцій є у будь-якого організму, від чого залежить його пристосовуваність до зовнішніх впливів. Різні за стійкістю організми можуть

реагувати на вплив однотипно, але швидкість і амплітуда фізіологічних перебудов у них відрізняються (Alexieva V. et al., 2003; Storey K.B., Wu C.-W., 2013). При цьому у багатьох випадках спостерігається гормезис, тобто стимулююча потенційно небезпечних стресорів на системи організму, якщо сила їх дії недостатня для проявлення негативного впливу на живу систему (Calabrese E.J., 2010). Після дії одного стресорного фактора стійкість живої системи до наступного стресу може змінюватись; при цьому розрізняють випадки гомологічного (*homologous*) і гетерологічного (*heterologous*) пост-стресових станів, якщо наступний стрес є таким же, як і початковий або відмінний від початкового. Це багато в чому зумовлене значним «перекриттям» в експресії генів теплового шоку, окисного стресу і інших видів стресу (Lu F. et al., 2005; Lunt H.C., 2010; Storey K.B., 2013). Таким чином, природні захисні механізми, що забезпечують клітинам здатність зберігати свою структуру і функції за умов дії одного стресорного фактора, можуть запускатися у відповідь на дію іншого стресу (перехресна адаптація).

Раніше було показано, що мікроорганізми та еритроцити у стані адаптивної відповіді на попередній «слабкий» оксидативний стрес, викликаний обробкою низькими дозами озону, стають стійкішими до заморожування-відігрівання і ефективніше відновлюються після кріоконсервування в порівнянні з клітинами без такої обробки. Були запропоновані методи практичного застосування даних ефектів (Зинченко В.Д. и др., 2005, 2007, 2012; Буряк И.А. и др., 2007; Белых И.А. и др., 2004, 2007). Ці результати свідчать про можливість застосування в кріобіології адаптивних реакцій живих систем на стрес не холодової природи. На шляху подальшого розвитку даного підходу і застосування його в кріогенних біотехнологіях постають задачі більш поглибленого вивчення взаємодії між різними стресами, контролю за ступенем впливу стрес-фактора на живу систему і адаптивною реакцією цієї системи.

Дана робота спрямована на експериментальне вивчення взаємозв'язку між ступенем впливу стрес-фактора не холодової природи і зміною стійкості біологічного об'єкта до дії низьких температур. Вивчалася можливість комбінації захисних ефектів класичного кріопротектора і стрес-індукованих ефектів підвищення стійкості біологічного об'єкта до холоду і розроблений спосіб кріоконсервування еритроцитів, у якому даний підхід реалізується на практиці.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відділі кріобіофізики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України у рамках відомчих науково-дослідних тем «Дослідження дії оксидативного стресу на кріорезистентність клітин та реакції теплокровних тварин на холод» (номер держреєстрації 0110U000405).

Мета і задачі дослідження. На прикладі дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і еритроцитів бика встановити взаємозв'язок між ступенем попередньо викликаного стресу і адаптивною відповіддю клітин, що проявляється у вигляді підвищення їхньої стійкості до холодкових впливів.

Для досягнення мети необхідним були поставлені наступні задачі:

1. Визначити діапазон доз озону, під дією яких фізіологічна реакція клітин *S. cerevisiae* на викликаний озоном оксидативний стрес знаходиться на стадіях тривоги, стійкості і виснаження;
2. Вивчити вплив обробки клітин *S. cerevisiae* озоном у різних дозах перед заморожуванням на збереженість їх мембран у циклі заморожування до -196°C і відігрівання до 30°C ;
3. Дослідити відновлення клітин *S. cerevisiae* після заморожування - відігрівання при індукції в них явища гормезису озоном;
4. Розробити та виготовити установку для реєстрації хемілюмінесценції біологічних об'єктів;
5. Визначити загальну антиоксидантну ємність (ЗАОЄ) дріжджів *S. cerevisiae* на підставі вивчення їх реакції на уведення активного кисню – озону;
6. Дослідити можливість використання реакції на стрес в еритроцитах бика, викликаній антисептиком-стимулятором Дорогова (АСД-2), на підвищення їхньої стійкості до заморожування - відігрівання під захистом кріопротекторів;
7. Розробити середовище кріоконсервування еритроцитів із використанням ефектів перехресної адаптації на стрес, як механізму підвищення стійкості клітин до холододових впливів.

Об'єкт дослідження – процеси перехресної адаптації, викликані стресс-факторами не холодової природи у підвищенні стійкості еритроцитів та дріжджів *S. cerevisiae* до холододових впливів.

Предмет дослідження – вплив озону на проліферацію дріжджів *S. cerevisiae*, вплив АСД-2 на стійкість еритроцитів бика проти заморожування-відігріву.

Методи дослідження. Для вирішення поставлених задач у роботі використані наступні методи: хемілюмінесценція, мікроскопія, проточна цитофлуориметрія, спектрофотометрія, спектрофлуориметрія, диференціальна скануюча калориметрія. Отримані результати обробляли статистично на персональному комп'ютері, використовуючи програму "Origin 8.5".

Наукова новизна отриманих результатів. У роботі вперше на прикладі дріжджів *S. cerevisiae* експериментально встановлено, що антиоксидантна ємність є межею рівня оксидативного стресу, нижче якої стрес являє собою для клітин сигнал тривоги, а фізіологічна реакція клітин полягає в запуску механізмів захисту не лише від оксидативного, але і від інших видів стресу, в тому числі і від холододового стресу.

Показано, що підвищення стійкості клітин до холододових впливів шляхом індукції в них ефектів перехресної адаптації може бути досягнуте за допомогою різних стрес-агентів – сильного окисника (озону) або біологічно активних речовин, що входять до складу АСД-2. При цьому залежність ефекту від рівня стресу має якісно схожий прояв для різних клітин і для різних стрес-агентів, а саме вона має U-подібну форму, характерну для горметичної відповіді живої системи на слабкий стрес.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблене і захищене патентом середовище для кріоконсервування еритроцитів бика, при створенні якого була реалізована ідея про використання в кріобіології ефектів перехресної адаптації для підвищення стійкості живої системи до холодного стресу шляхом індукції адаптивної відповіді на інший вид стресу.

Розроблений, виготовлений та захищений патентом біолюмінометр, що має більш широкі у порівнянні з відомими моделями можливості аналізу сигналів люмінесценції.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно отримані представлені в роботі експериментальні дані, проведена їх статистична обробка, підготовлено аналітичний огляд літератури за темою дисертації. Дисертантом самостійно, за консультативної допомоги керівника, проаналізовано отримані результати досліджень і сформульовано висновки. В опублікованих із співавторами роботах особистий внесок здобувача полягає в наступному:

- у роботах [1, 18] – автором виконані експерименти і написана частина, присвячена експериментальному дослідженню різних доз індукторів окисного стресу на характер адаптивної відповіді живої системи;

- у роботі [2] – пошук літератури з проблеми, у виконанні експерименту з вивчення озон - стимульованої люмінесценції дріжджів *S. cerevisiae* та в оформленні роботи;

- у роботі [4] – в експериментальному визначенні залежності інтенсивності спалаху хемілюмінесценції дріжджів *S. cerevisiae* від дози озону і в участі у формулюванні принципу визначення загальної антиоксидантної активності живої системи;

- у роботі [3] - в експериментальному дослідженні впливу різних доз озону на флуоресцентні характеристики клітин дріжджів *S. cerevisiae* із зондом Square-460 при кріодії та в обробці результатів досліджень;

- у роботі [5] – в експериментальному дослідженні дії озону на цілісність мембран дріжджів *S. cerevisiae* після заморожування - відігрівання за умов попередньої обробки клітин озоном у різних дозах та у встановленні умов обробки клітин озоном, що забезпечують максимальне збереження їх мембран після заморожування - відігрівання;

- у роботі [6] – в побудові схеми експерименту щодо дослідження фізіологічної реакції клітин на оксидативний стрес залежно від дози озону ;

- у патенті [7] – у проведенні експериментальних досліджень дії АСД-2 у складі кріозахисного середовища на ефективність кріоконсервування еритроцитів бика і в підборі оптимального складу кріозахисного середовища із додаванням АСД-2;

- у патенті [8] – у розробці схеми роздільної реєстрації сигналів хемілюмінесценції одночасно по різних каналах і в сполученні аналогового виходу біолюмінометра з комп'ютером;

- у патенті [9] – в розробці загальної геометрії кювети з металевим корпусом і зі знімним вікном;

- у роботах [10] – в експериментальному обґрунтуванні застосування препарату АСД -2 при кріоконсервуванні еритроцитів бика;
- у роботі [11, 19] – в узагальненні результатів щодо впливу на стійкість клітин до холоду не лише оксидативного стресу, але й інших видів стресу;
- у роботах [12, 13] – автором були запропоновані аргументи на користь того, що позитивна дія низьких доз озону і охолодження на фізіологічні функції еритроцитів пов'язані з гормезисом;
- у роботі [14] – в експериментальному дослідженні можливості застосування флуоресцентного зонда Square-460 як маркера ушкоджень мембран клітин при кровпливах;
- у роботі [15] – автором було експериментально продемонстровано виникнення хемілюмінесценції клітин *S. cerevisiae* під дією озону;
- у роботі [16] – в експериментальному визначенні доз озону, що сприяють підвищенню збереженості клітин *S. cerevisiae* після кріоконсервування;
- у роботі [17] – в узагальненні відомих з літератури даних спільно з власними результатами щодо стійкості еритроцитів до холодових впливів при слабкому оксидативному стресі.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на щорічних конференціях молодих учених ІПКіК НАН України спільно з кафедрою UNESCO «Холод в біології та медицині» (м. Харків, 2012, 2013); на міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Україна, м. Львів, 2010); на міжнародній конференції «18th Meeting of the European Association for Red Cell Research» (Польща, м. Вроцлав, 2011); на міжнародній конференції "Biologically active substances: fundamental and applied problems (Україна, Крим, 2009); на VII міжнародній науково-технічній конференції «Актуальные вопросы биологической физики, физики и химии. БФФХ-2011» (Україна, м. Севастополь, 2011); на міжнародній конференції «Development and application of new fluorescent materials and methods» (Latvia, Daugavpils, 2012); на 17-й міжнародній Пуцинській школі-конференції молодих вчених «Биология – наука XXI века» (Росія, м. Пушино, 2013); на IX Всеросійській науко-практичній конференції з міжнародною участю «Озон, активные формы кислорода, оксид азота и высокоинтенсивные физические факторы в биологии и медицине» (Росія, м. Нижній Новгород, 2013).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових робіт, у тому числі 5 статей у наукових фахових журналах, глава в монографії і 10 тез доповідей у збірниках наукових робіт науково-практичних конференцій та симпозіумів, отримано 3 патенти.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, розділу, присвяченому опису матеріалів і методів досліджень, розділу з результатами власних досліджень та їх обговоренням, висновків і списку використаної літератури. Матеріал викладено на 135 сторінках друкованого тексту. Дисертаційна робота містить вступ, огляд літератури, розділ «Матеріали та методи досліджень», результати власних досліджень та їх обговорення,

узагальнення, висновки, бібліографічний список (254 джерела, з яких 205 – латиницею, на 25 сторінках). Робота містить 27 рисунків і 5 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** наведено загальну характеристику роботи, обґрунтовано актуальність обраної теми, вказано зв'язок дисертації з науковими програмами і темами, сформульовано мету і задачі дослідження, виділено особистий внесок здобувача, наукову новизну та науково-практичне значення отриманих результатів, наведено відомості про апробацію і публікацію результатів та структуру дисертації.

У **розділі 1** представлено огляд наукової літератури, де висвітлено і проаналізовано сучасні наукові відомості щодо природної холодостійкості живих систем, про механізми природної адаптації живих систем до холоду і перехресну адаптацію, тобто зміну стійкості живої системи до стрес-фактора під дією іншого стрес-фактора. Розглянуті методи дослідження реакцій живих систем на стрес, особлива увага приділена оксидативному стресу. На підставі огляду літератури обґрунтовується мета роботи.

У **розділі 2** представлені матеріали та методи досліджень. Для досліджень використовували дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, раса Y-126, що були отримані з закладу «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов ГосНИИгенетика» (Росія).

Еритроцити отримували з крові бика (дорослі особини), яка люб'язно надавалася співробітниками Харківської державної зооветеринарної академії.

Всі експерименти з біоматеріалом узгоджені з комітетом біоетики при ІПКіК НАН України.

Дріжджі *S. cerevisiae* вирощували на скошеному сусло-агаровому середовищі при 22°C протягом 48 годин. Культура дріжджів на цьому етапі перебуває в стаціонарній фазі росту. Клітини змивали з агарової підкладки фізіологічним розчином і використовували в експерименті.

Всі зразки крові стабілізувалися з використанням консервантів «Глюгіцир» або гепарину (ЗАТ «Біолік», Україна) залежно від умов експерименту. Зберігання крові здійснювалося при температурі 4°C протягом 1-2 діб.

Як кріопротектор використовували диметилсульфоксид (ДМСО) марки х.ч. («Реахим», Росія), додатково очищений шляхом вакуумної перегонки. Низькотемпературне консервування еритроцитів здійснювали у кріоконсервуючих розчинах наступного складу (кількості вказані в об'ємних відсотках):

– 7,5 % і 12,5 % ДМСО; 0,9 % NaCl; 10 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 7,4;
– 7,5% і 12,5% ДМСО; 5%, 10%, 15% і 20% АСД-2; 0,9% NaCl; 10 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 7,4.

Заморожування зразків здійснювали шляхом занурення зразків об'ємом 1 мл у пластикових контейнерах до температури рідкого азоту, відігрівання - на водяній бані при 30°C.

Відмивання кріопротекторів після розморожування проводили поетапно: 1 етап - відмивання 0,6 М NaCl; 2 етап - відмивання 0,15 М NaCl.

Хемілюмінесцентні дослідження проводилися на спеціально розробленому нами біоломінометрі.

Спостереження за змінами цілісності мембран проводили з використанням флуоресцентного барвника Square-460 («Setabiomedicals», США) люб'язно наданого співробітниками ДНУ «Інститут монокристалів» НАН України. Фарбування клітин барвником здійснювали після обробки їх озоном і після заморожування-відігріву.

Флуоресцентні мікрофотографії отримували за допомогою мікроскопа Axio Observer Z1 («Carl Zeiss», Німеччина). Використовували набір фільтрів для флуоресценції 20 («Carl Zeiss»).

Розподіл клітин за інтенсивністю флуоресценції барвника визначали на цитофлуориметрії BD FACS Calibur (США). Флуоресцентні вимірювання проводили на спектрофлуориметрії Varian Cary Eclipse (США).

Спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі Perkin Elmer Lambda 35 (США).

Оксидативний стрес викликали дією на клітини дозованих кількостей озонованого фізіологічного розчину, який отримували шляхом барботування фізіологічного розчину озono-кисневою сумішшю при температурі танучого льоду. Озон отримували з газоподібного кисню на озонаторі безбар'єрного типу, розробленому в Харківському фізико-технічному інституті. Концентрацію озону в розчині визначали за величиною екстинкції при довжині хвилі 255 нм (смуга Хартлі).

Гемоліз визначали за вмістом вільного гемоглобіну в супернатанті спектрофотометричним способом на спектрофотометрі Pye Unicam SP8000 за екстинцією при довжині хвилі 543 нм.

Використовували препарат АСД-2 виробництва фірми «Ареал Медікал» (Росія).

Фазові переходи досліджували за допомогою методу диференціальної скануючої калориметрії.

Використовували Trolox («Sigma» США) який розчиняли в етанолі до концентрації 10мМ і далі розводили фізіологічним розчином до потрібних концентрацій.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення «Origin 8.5» («OriginLab Corporation», США) та «Microsoft Office Excel» (США). Дані на рисунках і в таблицях наведено як середнє значення \pm стандартне відхилення. При порівнянні двох виборок застосовували t-тест Ст'юдента. Статистично значимими вважали розходження при $p < 0,05$.

У розділі 3 представлені результати досліджень та їх обговорення.

Дослідження впливу озону на збереження мембран *S. cerevisiae* у циклі заморожування-відігрів. Для спостереження пошкоджень мембран клітин використовували властивість флуоресцентного барвника Square-460 фарбувати

мембрани непошкоджених клітин і проникати всередину клітини при пошкодженні мембран.

На рис. 1 представлені зображення клітин *S. cerevisiae*, отримані за допомогою флуоресцентного мікроскопа.

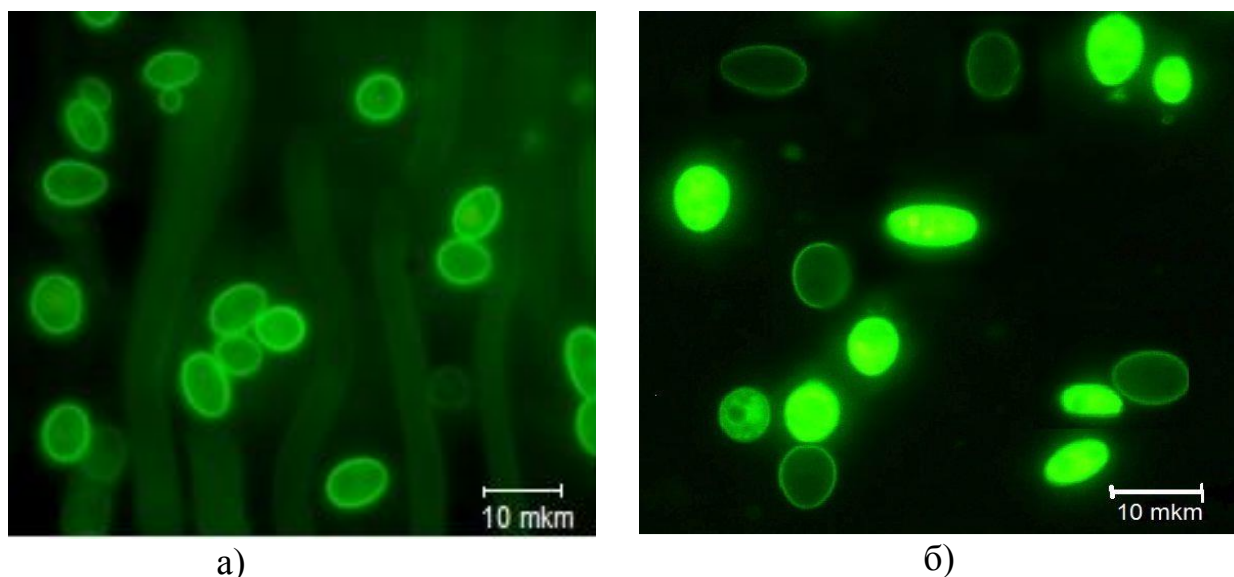


Рис. 1 Клітини дріжджів *S. cerevisiae*, пофарбованих барвником Square-460: а) клітини без обробки озоном; б) клітини після впливу озону в дозі 280 $\mu\text{моль}/10^6$ кл.

Можна бачити, що барвник фарбує лише оболонки непошкоджених клітин і має обмежене проникнення всередину клітин (рис 1а), про що свідчить менш яскраве світіння цитоплазми. На рис. 1б представлено зображення клітин після додавання озону в дозі 280 $\mu\text{моль}/10^6$ кл. В поле зору потрапляють клітини з цитоплазмою, що яскраво світиться, що вказує, як ми вважаємо, на пошкодження мембран високою дозою озону. Різна інтенсивність флуоресценції дає можливість реєструвати клітини з пошкодженими і непошкодженими мембранами за допомогою проточного цитофлуориметра.

На рис. 2 представлені точкові діаграми клітин *S. cerevisiae* перед заморожуванням і після циклу заморожування до -196°C і наступного відігрівання до 30°C . На діаграмах в «червоному» каналі (650 нм) реєструється флуоресценція клітин, що зв'язали барвник Square-460. Для клітин з непошкодженими мембранами, флуоресценція реєструється в області значень FL3 від 0 до 10^2 . Після заморожування-відігрівання з'являються клітини з пошкодженими мембранами, що мають більш інтенсивну флуоресценцію (гейт в області значень FL3 від 10^2 до 10^4). Після заморожування-відігрівання зразків, необроблених озоном, мембрани пошкоджуються у $65,6 \pm 1,6\%$ клітин. Обробка клітин озоном в дозах нижче $29 \mu\text{моль O}_3/10^6$ кл перед заморожуванням призводить до того, що кількість клітин з пошкодженими мембранами знижується після циклу заморожування-відігрівання. На точкових діаграмах клітини після їх відігрівання гейт зміщується до значень FL3 нижче 10^2 , що відповідає показникам клітин з непошкодженими мембранами.

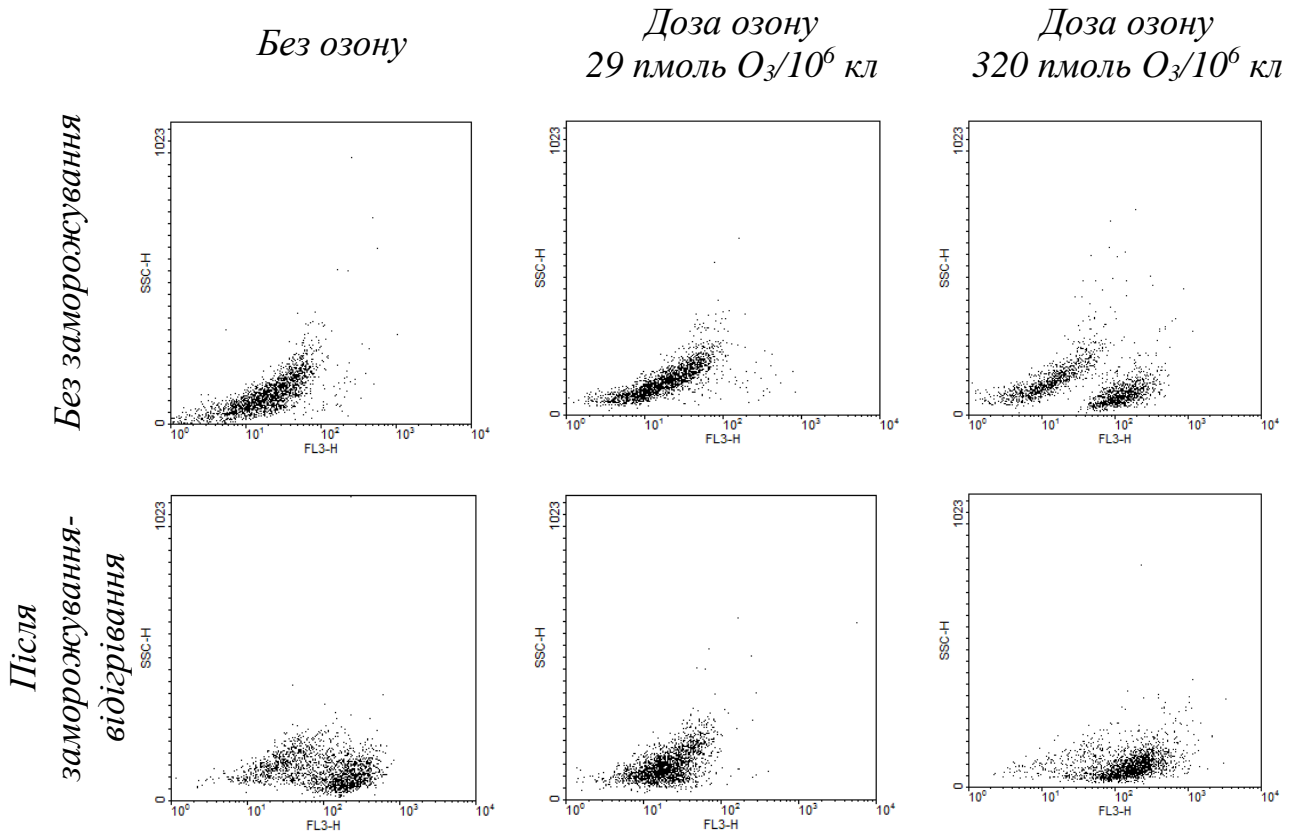


Рис. 2. Точкові діаграми дріжджів *S. cerevisiae*, що заморожувались без обробки і після обробки озonom у різних дозах.

На рис. 3 представлені значення відносної кількості клітин *S. cerevisiae* з пошкодженими мембранами після заморожування-відігрівання.

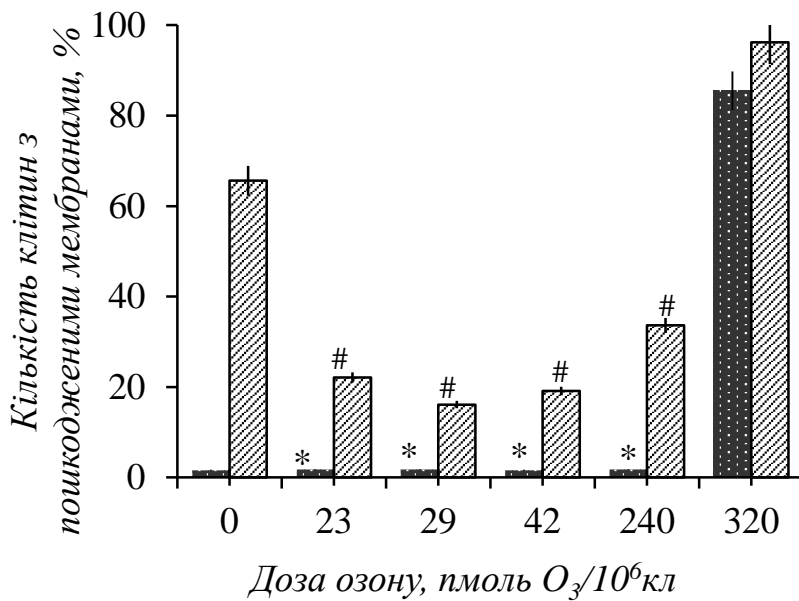


Рис. 3. Відносна кількість клітин *S. cerevisiae* з пошкодженими мембранами, які були оброблені перед заморожуванням озonom у різних дозах (n=5): ■ – без заморожування; □ – після заморожування-відігрівання. Примітка: * – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Перед заморожуванням клітини оброблялись озonom у різних дозах. Така обробка дозволяє зменшити кількість клітин з пошкодженими мембранами після заморожування-відігрівання, причому дія озону залежить від його дози. Ефект

був найбільш виражений при дозі 29 пмоль $O_3/10^6$ кл – $16,1 \pm 0,8\%$ клітин з пошкодженими мембранами у порівнянні з $65,6 \pm 1,6\%$ для клітин, необроблених озоном. При збільшенні дози озону понад указане значення його ефект зменшується, а при дозах 320 пмоль $O_3/10^6$ кл і більше сам озон пошкоджує мембрани. Отже, обробка клітин *S. cerevisiae* озоном перед заморожуванням дозволяє знизити рівень пошкоджень мембран у циклі заморожування-відігрівання без застосування кріопротекторів, причому ефект залежить від дози озону.

Даний ефект пояснюється адаптивною реакцією клітин на оксидативний стрес, в результаті якого запускаються природні механізми захисту від інших видів стресу, в тому числі і стресу при заморожуванні-відігріванні.

Гормезис і відновлення клітин після кріоконсервування. Відомо, що низькі дози подразника здатні впливати позитивно на біологічні функції живої системи, тоді як високі дози даного подразника виявляють пригнічуючу дію – явище, відоме як гормезис. Вказана властивість використовувалась у даній роботі, як спосіб підвищення ефективності відновлення клітин після циклу заморожування-відігрівання. Клітини *S. cerevisiae* заморожували без кріопротектора у фізіологічному розчині і після відігрівання обробляли озоном у різних дозах. Отримана залежність показників колонієутворення (КУО) дріжджів *S. cerevisiae* від дози озону представлена в таблиці 1. У діапазоні «низьких» доз озону (менше 42 пмоль $O_3/10^6$ кл) спостерігається тенденція до підвищення життєздатності дріжджів у відповідь на введення озону.

Таблиця 1

Життєздатність клітин *S. cerevisiae* після заморожування-відігрівання і обробки озоном у різних дозах

Доза озону, пмоль $O_3/10^6$ кл	Життєздатність, число КУО/мл $\times 10^7$
0	$3,6 \pm 0,06$
13	$4,2 \pm 0,10^*$
23	$4,6 \pm 0,08^*$
29	$7,3 \pm 0,06^*$
42	$4,9 \pm 0,05^*$
65	$3,8 \pm 0,02^*$
97	$4,0 \pm 0,30^*$
120	$2,8 \pm 0,07^*$
240	$1,1 \pm 0,02^*$

Примітка: $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Показники життєздатності дріжджів, оброблених озонованим фізіологічним розчином з кінцевою дозою озону 29 пмоль $O_3/10^6$ кл, достовірно вищі, ніж показники життєздатності дріжджів у контрольних зразках, не оброблених озоном. При вказаній дозі озону ефект стимуляції КУО

максимальний, число КУО збільшується приблизно на 50% порівняно з його значенням для необроблених клітин.

При збільшенні дози озону більше 65 пмоль $O_3/10^6$ кл ефект підвищення життєздатності дріжджів не спостерігається, однак, до дози 120 пмоль $O_3/10^6$ кл не відбувається інактивація дріжджів. При досягненні дози озону 240 пмоль $O_3/10^6$ кл, життєздатність дріжджів знижується в 3 рази порівняно з контролем. Доза озону понад 240 пмоль $O_3/10^6$ кл (в табл. 1 не показано) викликає різке зниження життєздатності клітин впритул до їх загибелі.

Отже, експериментально встановлено, що стимуляція проліферативної активності заморожених-відігрітих дріжджів *S. cerevisiae* проявляється при введенні озону в дозах менше 42 пмоль $O_3/10^6$ кл в суспензію клітин після їх відігрівання. В даному діапазоні доз озону проявляється гормезис – позитивний вплив озону, як індуктора оксидативного стресу, на відновлення клітин після заморожування-відігрівання.

Загальна антиоксидантна ємність (ЗАОЄ) клітин *S. cerevisiae*. В даній роботі для оцінки ступеня дії озону на клітини *S. cerevisiae* використовується метод визначення ЗАОЄ, заснований на аналізі здатності клітин утилізувати надлишок уведеного ззовні озону, як однієї з форм активного кисню, а показником ЗАОЄ вважається максимальна кількість озону, яку здатні нейтралізувати антиоксидантні системи клітини.

В основу методу покладене явище хемілюмінесценції живих клітин при введенні до них озону. На рис. 4 представлена залежність інтенсивності хемілюмінесцентної відповіді клітин *S. cerevisiae* при введенні порцій озонованого фізіологічного розчину від дози введенного озону.

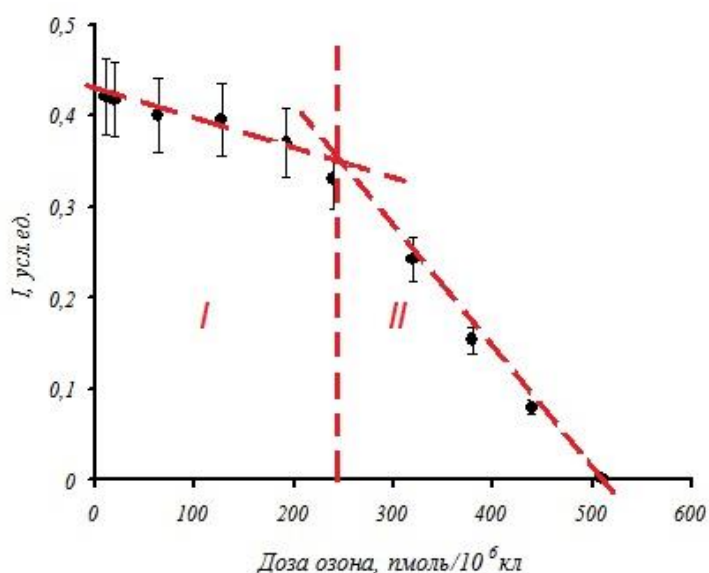


Рис. 4. Залежність інтенсивності хемілюмінесцентної відповіді клітин *S. cerevisiae* при введенні порцій озонованого фізіологічного розчину від дози введенного озону

У діапазоні низьких доз озону I амплітуда спалаху слабо залежить від дози озону, а в діапазоні більш високих доз II спостерігається різке зниження амплітуди спалаху з ростом дози озону. Точка зламу відповідає дозі озону, вище якої спостерігається пошкодження мембран.

Знайдене таким чином значення граничної дози озону приймається в даній роботі як міра ЗАОЄ клітин. Для клітин *S. cerevisiae* це значення склало 240 ± 20 пмоль/10⁶ кл.

Загальноприйнятим стандартом для порівняння антиоксидантних властивостей різних об'єктів є Trolox, водорозчинний аналог вітаміну С. В цьому випадку антиоксидантні властивості виражаються в одиницях TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), тобто в умовних одиницях концентрації, отриманих при порівнянні антиоксидантних властивостей об'єкта з властивостями даного стандарту. Стосовно запропонованого в даній роботі способу визначення ЗАОЄ, значення ЗАОЄ в одиницях TEAC означає кількість Trolox, яка здатна нейтралізувати стільки ж озону, що і клітини, які досліджуються. Були виконані вимірювання, які показали, що значенню ЗАОЄ 240 ± 20 пмоль O₃/10⁶ кл відповідає значення TEAC $73,8 \pm 7$ пмоль Trolox /10⁶ клітин.

Отримане значення ЗАОЄ відповідає деякому порогові, при переході через який змінюється характер адаптивної відповіді клітин *S. cerevisiae* на оксидативний стрес. В діапазоні доз нижче ЗАОЄ клітини *S. cerevisiae* проявляють стійкість до дії озону. В цьому діапазоні доз компенсаторний біологічний процес, який запускається у відповідь на короткочасне порушення гомеостазу, проявляється у вигляді позитивного впливу оксидативного стресу на поділ і ріст клітин – гормезис. Горметична відповідь клітин на оксидативний стрес сприяє підвищенню стійкості клітин до кріовпливів. При дозах озону, вищих від ЗАОЄ, спостерігається пошкодження мембран клітин і зниження їх проліферативної активності.

Дослідження перехресної адаптації при кріоконсервуванні еритроцитів бика. Адаптивна відповідь на стрес і перехресна адаптація як відомо мають багато схожих рис для різних біологічних об'єктів і для різних індукторів стресу. Тому є підстави сподіватися, що ефект підвищення стійкості до кріовпливів за рахунок попередньо викликаного «слабкого» стресу буде проявлятися на різних клітинах і з різними індукторами стресу.

Для досліджень були обрані еритроцити бика, а як стресорний агент використовували АСД-2.

На рис. 5 представлені термограми ДСК розчинів 12,5% ДМСО, приготованих на дистильованій воді, фізіологічному розчині і на розчині 15% АСД-2. Температури плавлення двох останніх розчинів відрізняються незначно, в межах 0,1°C. В області склування величина скачка теплопоглинання і його амплітуда співпадають. На термограмі виникають піки кристалізації і плавлення евтектик, які за температурами відрізняються від тих, що характерні для ДМСО. Отже, вони повинні бути віднесені до кристалізації і плавлення водорозчинних речовин із складу АСД-2, які не утворюють щільних комплексів з ДМСО. В цілому вплив 15% АСД-2 на осмотичні властивості кріозахисного розчину 12,5% ДМСО є порівняним з впливом фізіологічного розчину.

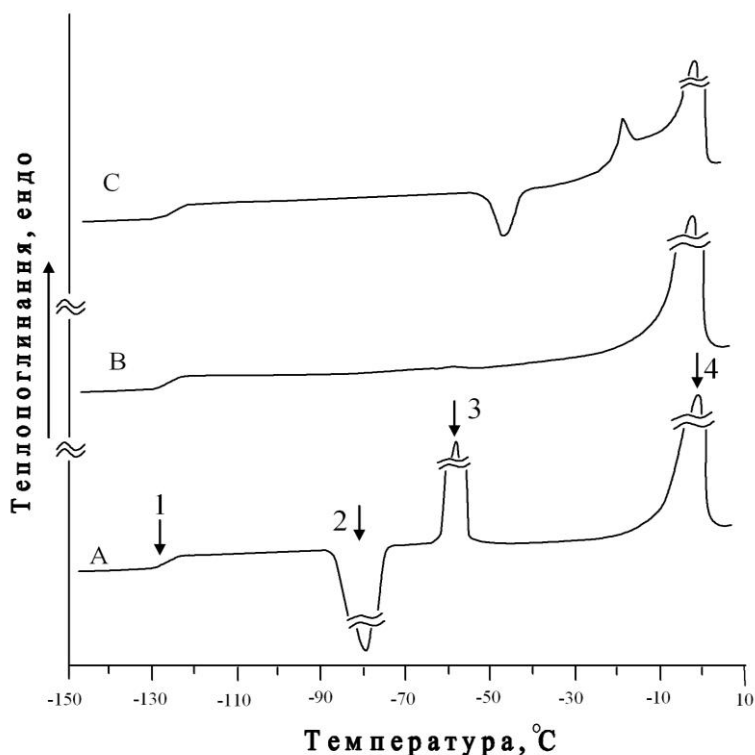


Рис. 5 Термограми ДСК розчинів 12,5% ДМСО, приготованих на 15% розчині АСД-2 (А), фізіологічному розчині (В) і дистильованій воді (С).

Досліджували вплив ДМСО (7,5 и 12,5 об. %), АСД-2 (5, 10, 15, 20 об. %) та їх поєднання на гемоліз еритроцитів після заморожування-відігріву. На рис. 6 представлені значення гемолізу еритроцитів бика після заморожування-відігріву у присутності АСД-2 без добавок інших криозахисних речовин.

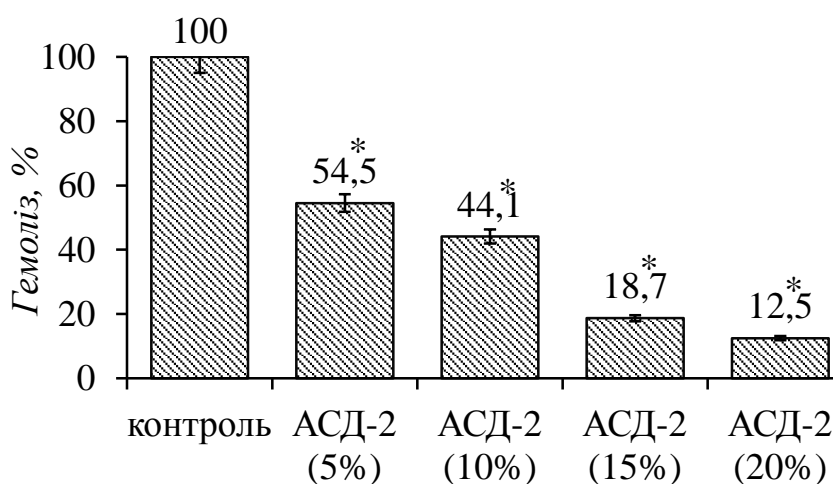


Рис. 6 Вплив АСД-2 на рівень гемолізу еритроцитів бика після заморожування-відігріву. Середні значення гемолізу вказані цифрами над стовпцями.

Примітка: $p < 0,05$ порівняно з контролем

Додавання АСД-2 істотно знижує рівень гемолізу еритроцитів при їх заморожуванні-відігріві. Слід зазначити, що АСД-2 не можна віднести до класичних криопротекторів. Оскільки АСД-2 являє собою водний розчин з масовою долею розчинених речовин близько 6%, то добавка до досліджуваного зразка клітин 15% АСД-2 означає введення в зразок близько 0,9% водо-розчинних речовин. Така

концентрація недостатня для того, щоб викликати склування великої маси рідини в суспензії клітин або істотно вплинути на характер льодоутворення в ній при зниженні температури. Тому зниження рівня гемолізу еритроцитів в даному експерименті слід пояснювати дією інших механізмів. На нашу думку, це стрес-реакція еритроцитів на АСД-2 і, можливо, пов'язана з цим модифікація їх мембран.

На рис 7 і 8 представлені дані про вплив АСД-2 на рівень спонтанного гемолізу еритроцитів бика після заморожування-відігріву у присутності ДМСО у концентраціях 7,5% і 12,5%.

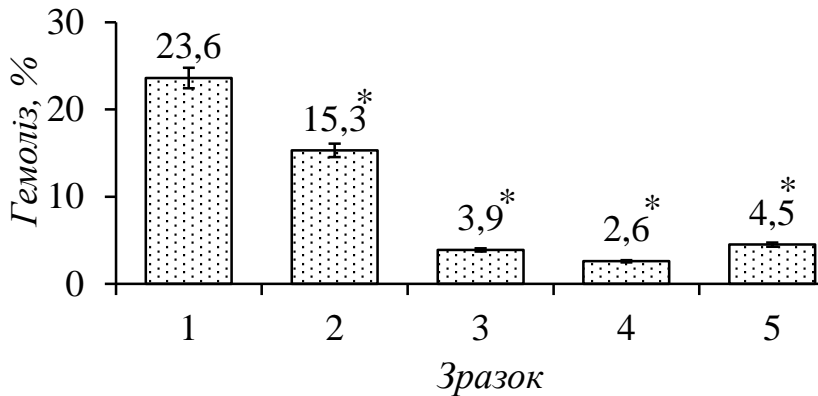


Рис. 7. Вплив ДМСО (7,5%) і АСД-2 на рівень гемолізу еритроцитів бика після заморожування-відігріву. Величина гемолізу вказана цифрами над стовпцями. 1) без АСД-2; 2) АСД-2 (5%); 3) АСД-2 (10%); 4) АСД-2 (15%); 5) АСД-2 (20%).

Примітка: $p < 0,05$ порівняно з контролем

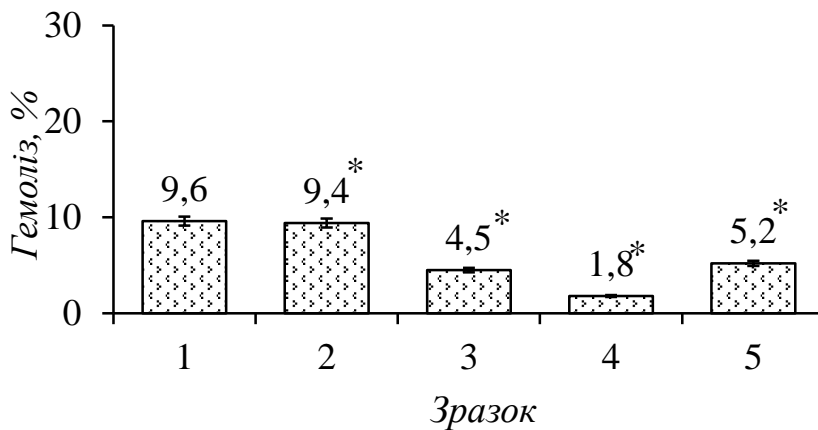


Рис. 8. Вплив 12,5% ДМСО і АСД-2 на рівень гемолізу еритроцитів бика після заморожування-відігріву. Величина гемолізу вказана цифрами над стовпцями. 1) без АСД-2; 2) АСД-2 (5%); 3) АСД-2 (10%); 4) АСД-2 (15%); 5) АСД-2 (20%).

Примітка: $p < 0,05$ порівняно з контролем

Гемоліз еритроцитів після заморожування-відігріву в крізахисному розчині, що містить 7,5% ДМСО (рис. 7) складає $23,6 \pm 1,2\%$. В крізахисному розчині 7,5% ДМСО + 15% АСД-2 гемоліз складає $2,6 \pm 0,1\%$. Найнижче значення гемолізу ($1,8 \pm 0,1\%$) досягається при комбінації 12,5% ДМСО і 15% АСД-2 (рис. 8).

Загальний вигляд залежностей показників гемолізу від концентрації АСД-2 на рис. 7 і рис. 8 якісно схожий з наведеною на рис. 3 залежністю ступеня

збереження мембран від дози озону, тобто існує концентрація АСД-2, при якій його дія найбільш виражена. У всіх випадках це U-подібна залежність, характерна для горметичної відповіді живої системи на слабкий стрес. Тому описані ефекти підвищення стійкості еритроцитів до холодкових впливів можуть бути пояснені перехресною адаптацією клітин у стані адаптивної відповіді на слабкий стрес під дією АСД-2.

ВИСНОВКИ

У роботі наведено теоретичне і експериментальне узагальнення та нове вирішення наукової проблеми, пов'язаної з можливістю підвищення стійкості клітин *S. cerevisiae* та еритроцитів бика до холодкових впливів шляхом використання індукторів їх природних захисних механізмів.

1. Визначений діапазон доз озону, під дією яких фізіологічна реакція клітин *S. cerevisiae* на озон знаходиться на стадіях тривоги, стійкості і виснаження (менше 42 пмоль $O_3/10^6$ кл, 65-240 пмоль $O_3/10^6$ кл та більше 240 пмоль $O_3/10^6$ кл відповідно). Вперше експериментально показано, що перехресна адаптація і підвищення стійкості клітин *S. cerevisiae* до холодкових впливів спостерігається при такому ступені оксидативного стресу, при якому доза індуктора оксидативного стресу менша ЗАОЄ клітин. При цьому дія індуктора оксидативного стресу є сигналом тривоги, що запускає механізми адаптивної відповіді клітини, в тому числі і механізми захисту від холодкових впливів.

2. Експериментально, на прикладі клітин *S. cerevisiae* показано, що в умовах попередньо індукованої адаптивної відповіді клітин на оксидативний стрес певної сили пошкодження мембран при заморожуванні-відігріванні може бути знижене порівняно з мембранами клітин, що не пройшли такої обробки.

3. Знайдена ЗАОЄ клітин *S. cerevisiae* у відношенні до озону – 240 пмоль $O_3/10^6$ кл, як доза озону, яку здатні нейтралізувати антиоксидантні системи клітини.

4. Показано, що при дозах озону, менших від ЗАОЄ спостерігається гормезис, що дозволяє покращити відновлення клітин після заморожування-відігрівання.

5. Досліджена можливість використання реакції еритроцитів бика на стрес, викликаний АСД-2 для підвищення їх стійкості до заморожування-відігрівання у присутності кріопротектора. Отримані результати підтверджують, що ефекти перехресної адаптації і підвищення стійкості клітин до холодкових впливів можуть бути досягнуті застосуванням різних стресорних агентів, включаючи АСД-2.

6. Розроблене і захищене патентом середовище для кріоконсервування еритроцитів бика, при створенні якого була реалізована ідея про застосування в кріобіології ефектів перехресної адаптації.

7. Розроблений, виготовлений і захищений патентом біолюмінометр, що має більш широкі порівняно з відомими моделями можливості аналізу сигналів хемілюмінесценції.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Люминесценция дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces boulardii* под действием озона // В. Д. Зинченко, И. П. Горячая, И. В. Говор // Вестник ХНУ. Серия: биология. – 2012. – Вып. 16, №1035. – С. 45–51.
2. Зонд Square-460 как маркер повреждения мембран при криовоздействиях / И. П. Горячая, Т. С. Дюбко, В. Д. Зинченко, И. А. Буряк, Л. Д. Паценкер, А. Л. Татарец // Проблемы криобиологии. — 2013. — Т. 23, № 4. – С. 347–350.
3. Antioxidant capacity and sustainability of *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to ozone / I. P. Goriacha, V. D. Zinchenko, T. S. Dyubko, E. A. Romodanova, A. L. Tatars // Biopolymers and Cell. – 2014. –Vol. 30, № 4. – P. 299–304.
4. Предобработка озоном повышает устойчивость мембран дрожжей *Saccharomices cerevesiae* при замораживании-отогреве / В. Д. Зинченко, И. П. Горячая, И. А. Буряк, И. П. Высеканцев // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №1. – С. 38–46.
5. Устойчивость мембран дрожжей *Saccharomices cerevesiae* к холодовым воздействиям в условиях окислительного стресса / И. П. Горячая, В. Д. Зинченко, И. А. Буряк // Научные ведомости БелГУ. Серия: естественные науки. – 2014. – Вып. 26, № 3 (174). – С. 72–78.
6. Индукция эффектов перекрестной адаптации при помощи оксидативного стресса для повышения эффективности криоконсервирования биологических объектов / В. Д. Зинченко, И. А. Белых, И. А. Буряк, И. П. Горячая, И. В. Говор // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины ; под. ред. А. Н. Гольцева. — Х., Райдер, 2012. — С. 271–294.
7. Пат. 60437 Україна, А01N 1/02. Спосіб кріоконсервування еритроцитів бугая / Дюбко Т. С., Бондаренко О. Б., Горяча І. П., Зінченко В. Д., Денисова О. М., Жегунов Г. Ф., заявник і власник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № u201011938; заявл. 08.10.2010, опубл. 25.06.2011, Бюл. № 12.
8. Пат. 72111 Україна, МПК⁷ G01N 21/76 (2006.01). Біолюмінометр / Зінченко В. Д., Горяча І. П., Говор І. В., заявник і власник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № u201200179; заявл. 05.01.2012; опубл. 15.08.2012, Бюл. № 15.
9. Пат. 73452 Україна, МПК⁷ G01N 23/03 (2006). Кювета для біо- і хемілюмінометрів / Зінченко В. Д., Горяча І. П., Говор І. В., заявник і власник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № u201202623; заявл. 05.03.2012; опубл. 25.09.2012, Бюл. № 18.
10. Застосування препарату АСД-2 при кріоконсервуванні еритроцитів тварин / І. П. Горячая, Т. С. Дюбко, Г. Ф. Жегунов, В. Д. Зінченко, О. Б. Бондаренко // Збірник тез VI Міжнар. наук. конфер. «Молодь і поступ біології», 21–24 вересня 2010 р. – Львів, 2010. – С. 216.
11. Dose-depended ozone effect on blood proteins in isolated state and under ozone introduction into organism / T. S. Dyubko, V. D. Zinchenko, Yu. I. Kozin, A. D. Roshal, O. A. Sokolik, I. A. Belykh, I. A. Buriak, O. B. Bondarenko,

- I. P. Goriacha, K. Kshiminski // Scientific conference «Biologically active substances: Fundamental and Applied Problems». – Novy Svet, AR Crimea, Ukraine, May 25-30, 2009. – Kiev, 2009. – P. 266
12. Moderate oxidative stress and low temperature combined action on human erythrocytes / I. P. Goriacha, Yu. I. Kozin, O. B. Bondarenko, V. D. Zinchenko, T. S. Dyubko // 18th meeting of European Association for Red Cell Researches EARCR, 12-15 May, 2011: book of abstract. – Wroclaw, Poland. –2011. – P. 36.
 13. Роль модификации мембран эритроцитов в их сохранности при криоконсервировании / И.П. Горячая, В.Д. Зинченко, Т.С. Дюбко, О.Б. Бондаренко // VII Международная научно-техническая конференция «Актуальные вопросы биологической физики, физики и химии. БФФХ-2011». Севастополь, 26-30 апр. 2011. – С. 117-118.
 14. Styryl derivatives as a new probes for yeast cell vitality determination / I.P. Goriacha, T. Deligeorgiev, T.S. Dyubko, I.V. Govor, L.D. Patsenker // Development and application of new fluorescent materials and methods, 12 September, 2012: book of abstracts. – Daugavpils, Latvia. – 2012. – P. 25.
 15. Горячая И.П. Исследование реакции делящихся клеток на оксидативный стресс методом хемилюминесценции // Материалы конференции молодых учёных ИПКиК НАН Украины «Холод в биологии и медицине», май 2012, Харьков. — Проблемы криобиологии. — 2012. — Т. 22, №2. — С. 207.
 16. Адаптивный ответ и оксидативный стресс в криобиологии / И. П. Горячая, В. Д. Зинченко, И. В. Говор // Материалы научной конференции с международным участием, посвященной 40-летию ИПКиК НАН Украины «Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины», октябрь 2012, Харьков. — Проблемы криобиологии. — 2012. — Т. 22, № 3. — С. 317.
 17. Горячая И.П. Антиоксидантный статус и устойчивость мембран клеток *Saccharomyces cerevisiae* к действию озона / И. П. Горячая, В. Д.Зинченко. // Материалы 17-й международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», апрель, 2013. – Пущино. – С. 140.
 18. Горячая И.П. Адаптивный ответ на окислительный стресс и устойчивость к холодовым воздействиям дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. // Материалы конференции молодых учёных ИПКиК НАН Украины «Холод в биологии и медицине», май 2013, Харьков. — Проблемы криобиологии. – 2013. – Т. 23, №2. – С. 175.
 19. Адаптивный ответ эритроцитов на холодовые воздействия и окислительный стресс / И. П. Горячая, И. А. Буряк, В. Д. Зинченко // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Озон, активные формы кислорода, оксид азота и высокоинтенсивные физические факторы в биологии и медицине», сентябрь 2013, Нижний-Новгород. - Мед. Альманах. – 2013. –Т.12,№3. – С. 40-41.

АНОТАЦІЯ

Горяча І.П. Стійкість дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та еритроцитів до холодкових впливів в умовах оксидативного стресу. - На правах рукопису.

Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків. – 2015.

Дисертація присвячена вивченню можливості застосування природних захисних механізмів живих систем для підвищення їх стійкості до холодкових впливів.

Індукція слабкого оксидативного стресу за допомогою озону перед заморожуванням клітин *S. cerevisiae* знижувала кількість пошкоджених клітин в чотири рази без застосування традиційних кріопротекторів. В цих же клітинах після заморожування-відігріву вплив оксидативного стресу певної сили призводив до збільшення показників життєздатності клітин (число КУО/мл) на 30–50% порівняно з клітинами без такого впливу. Визначена загальна антиоксидантна ємність клітин *S. cerevisiae* - 240 ± 20 пмоль O_3 /кл. Показано, що антисептик-стимулятор Дорогова АСД-2 може сприяти підвищенню стійкості еритроцитів бика до кріоконсервування під захистом ДМСО.

Вся сукупність отриманих результатів демонструє можливість використання індукції слабкого стресу в живій системі для запуску адаптивних механізмів стійкості до іншого виду – до дії холоду.

Ключові слова: кріобіологія, кріоконсервування, холодостійкість живих систем, адаптація, гормезис, природні захисні механізми.

АННОТАЦИЯ

Горячая И.П. Устойчивость дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и эритроцитов к холодковым воздействиям в условиях окислительного стресса. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2015.

Диссертация посвящена изучению возможности использования естественных защитных механизмов живых систем для повышения их устойчивости к холодковым воздействиям. Используются эффекты перекрестной адаптации и гормезиса, которые наблюдаются в условиях адаптивного ответа живой системы на слабый стресс. Для запуска процессов адаптации клеток *S. cerevisiae* к холоду использовали окислительный стресс, который вызывали действием озона. Клетки замораживали до температуры жидкого азота без применения традиционных крипротекторов. Перед замораживанием клетки обрабатывали озоном в разных дозах. Такая обработка позволяет уменьшить количество клеток с поврежденными мембранами после замораживания-отогрева, причем действие озона зависит от его дозы. Эффект озона наиболее был выражен при использовании дозы 29 пмоль $O_3/10^6$ кл: $16,1 \pm 0,8\%$ клеток с поврежденными мембранами против $65,6 \pm 1,6\%$ клеток, не обработанных озоном. Наблюдаемый эффект объясняется адаптивной реакцией

клеток на окислительный стресс, в результате которого запускаются естественные механизмы защиты от других видов стресса, в том числе и стресса при холодовых воздействиях.

В этих же клетках после замораживания-отогрева воздействие окислительного стресса определенной силы приводило к увеличению показателей жизнеспособности клеток (число КОЕ/мл) на 30–50% по сравнению с клетками, без такого воздействия. Данный эффект объясняется гормезисом – стимуляцией физиологических функций живой системы слабым внешним раздражителем, интенсивность которого недостаточна для проявления вредных воздействий.

В качестве стресс-агента при криоконсервировании эритроцитов быка использовали также антисептик-стимулятор Дорогова (АСД-2).

Показано, что в эритроцитах быка после их замораживания-отогрева в консервирующем растворе, содержащем 7,5% ДМСО гемолиз снижался в девять раз с $23,6 \pm 1,2\%$ до $2,6 \pm 0,1\%$ с добавкой 15% АСД-2, а в растворе, содержащем 12,5% ДМСО – в пять раз с $8,3 \pm 0,4\%$ до $1,8 \pm 0,1\%$ с такой же добавкой.

АСД-2 в силу низкой концентрации в нем осмотически активных веществ не может быть отнесен к классическим криопротекторам, защитное действие которых состоит во влиянии на характер кристаллизации жидкой фазы в переводе части жидкости твердоаморфное стеклообразное состояние при понижении температуры. Поэтому снижение уровня гемолиза эритроцитов в данном эксперименте следует объяснять действием других механизмов - стресс-реакцией эритроцитов на биологически активные вещества и, возможно, связанной с этим модификацией их мембран.

Анализ полученных результатов показывает, что повышение устойчивости клеток к холодовым воздействиям вследствие предварительного действия стресс-фактора не холодовой природы имеет схожую для разных стресс-факторов U-образную зависимость от силы стресса, характерную для гормезиса. Это дает основание говорить об общебиологической природе повышения устойчивости живой системы к холодовым воздействиям вследствие предварительного действия других стресс-факторов.

Построена обобщенная зависимость «доза-эффект» для реакции клеток на окислительный стресс, на которой выделены дозовые области гормезиса, обратимой остановки деления и роста клеток и гибели клеток под действием индуктора оксидативного стресса.

Определена общая антиоксидантная емкость клеток *S. cerevisiae*, как количество введенного извне озона, которое способны нейтрализовать антиоксидантные системы клеток - 240 ± 20 пмоль O_3 /кл. В общепринятых единицах ТЕАС (Trolox equivalent antioxidant capacity) это составляет $73,8 \pm 20$ пкМ Trolox / 10^6 кл.

Разработан и защищен патентом билюминометр, предназначенный для решения поставленных в данной работе задач, который по техническим характеристикам не уступает подобным приборам, представленным на рынке научного приборостроения.

Разработана и защищена патентом среда для криоконсервирования эритроцитов быка, при разработке которого была реализована идея об использовании в криобиологии эффектов перекрестной адаптации.

Вся совокупность полученных результатов демонстрирует возможность использования индукции слабого стресса в живой системе для запуска адаптивных механизмов устойчивости к другому виду стресса – к действию холода.

Ключевые слова: криобиология, криоконсервирование, холодоустойчивость живых систем, адаптация, гормезис, естественные защитные механизмы.

ANNOTATION

Goriacha I.P. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and erythrocytes to cold exposure under of oxidative stress conditions – A manuscript.

Dissertation for the candidate of biological sciences degree (PhD equivalent) in specialty 03.00.19 – cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv. – 2015.

The thesis is dedicated to the studying of the possibility of using the natural protective mechanisms of living systems for improving their resistance to low-temperature effects.

Induction of low-level oxidative stress by using ozone before *S. cerevisiae* cell freezing reduced the number of damaged cells four times without the use of traditional cryoprotectants. Oxidative stress of the certain strength led to an increase in cell viability (number of CFU/mL) after freeze-thawing up to 30-50% compared to untreated cells. The general antioxidant capacity of *S. cerevisiae* cells was 240 ± 20 pmol O₃/cell. It has been shown that antiseptic Dorogov's stimulator ASD-2 can enhance the stability of bovine erythrocytes while cryopreserving with DMSO.

The obtained results demonstrate the possibility of using the induction of low-level oxidative stress in a living system for initiation of adaptive resistance mechanisms to the low-temperature stress.

Key words: cryobiology, cryopreservation, cold living systems, adaptation, hormezys, natural defense mechanisms.

Відповідальний за випуск д.б.н. Г. О. Бабійчук