

УДК 577.352.4:582.282.23:57.043

В.Д. Зинченко*, И.П. Горячая, И.А. Буряк, И.П. Высеканцев

Предобработка озоном повышает устойчивость мембран дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при замораживании-отогреве

UDC 577.352.4:582.282.23:57.043

V.D. Zinchenko*, I.P. Goryachaya, I.A. Buryak, I.P. Vysekantsev Pretreatment with Ozone Elevates the Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Membranes during Freeze-Thawing

Реферат: Методами флуоресцентного окрашивания и проточной цитофлуориметрии исследовали влияние озона на повреждение мембран дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при замораживании до -196°C и последующем отогреве до 30°C . Показано, что замораживание-отогрев клеток *S. cerevisiae* в физиологическом растворе приводило к повреждению мембран у $(65,6 \pm 1,6)\%$ клеток из общей популяции. Обработка клеток озоном в дозе 29–240 пмоль $\text{O}_3/10^6$ кл перед замораживанием позволяла значительно уменьшить количество поврежденных клеток до $(16,1 \pm 0,9)\%$ от общей популяции. Данный эффект объясняется перекрестной адаптацией, вызванной введением озона: в состоянии адаптивного ответа на слабый окислительный стресс запускаются генетически детерминированные механизмы защиты от других видов стресса, в том числе и от стресса при замораживании-отогреве.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, замораживание-отогрев, озон, перекрестная адаптация, окислительный стресс, адаптивный ответ.

Реферат: Методами флуоресцентного забарвлювання та проточної цитофлуориметрії досліджували вплив озону на пошкодження мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* при заморожуванні до -196°C і наступному відігріванні до 30°C . Показано, що заморожування-відігрівання клітин *S. cerevisiae* у фізіологічному розчині призводило до пошкодження мембран у $(65,6 \pm 1,6)\%$ клітин із загальної популяції. Обробка клітин озоном у дозі 29–240 пмоль $\text{O}_3/10^6$ кл перед заморожуванням дозволяла знизити кількість пошкоджених клітин до $(16,1 \pm 0,9)\%$ від загальної популяції. Ефект пояснюється перехресною адаптацією, що викликана введенням озону: у стані адаптивної відповіді на слабкий окисдаційний стрес запускаються генетично детерміновані механізми захисту від інших видів стресу, в тому числі й від стресу при заморожуванні-відігріванні.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, заморожування-відігрівання, озон, перехресна адаптація, окисний стрес, адаптивна відповідь.

Abstract: The effect of ozone on injury of *Saccharomyces cerevisiae* yeast membranes following freezing (down to -196°C) and warming (up to 30°C) was investigated using fluorescent staining and flow cytometry. It has been shown that freeze-thawing of *S. cerevisiae* cells in physiological solution resulted in the injury of membranes in 65.6% of total cells population. Treatment of the cells with ozone in a dose of 29–240 pmol $\text{O}_3/10^6$ cells prior to freezing allowed to reduce significantly the number of damaged cells: $(16.1 \pm 0.9)\%$ of total population. The observed effect was explained by cross-adaptation caused by ozone introduction: the adaptive response to slight oxidative stress initiated the genetically determined mechanisms of responses to other stresses, including the one caused by freeze-thawing.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, freeze-thawing, ozone, cross adaptation, oxidative stress, adaptive response.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, как и все одноклеточные организмы, в естественных условиях существования подвергаются влиянию окружающей среды (изменение питания, кислотности, осмолярности, температуры, а также воздействие токсических агентов и радиации). Для выживания в изменяющихся природных условиях все живые организмы запрограммированы отвечать на стрессорные воздействия. Клетки дрожжей также способны адаптироваться к разным видам стресса.

Like all the protozoans, *Saccharomyces cerevisiae* yeasts during their existence are affected by an environment (changes in nutrition, pH, osmolarity, temperature, influence of toxic agents and radiation as well). Living organisms are programmed for response to stresses to survive under changing environmental conditions. Yeast cells are capable of adaptation to different types of stresses. For example, they respond to heat shock [4], effect of hydrogen peroxide [3], free radicals generating agents [8], and osmotic stress [22].

Отдел криобиофизики, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

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

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: vd_zin@mail.ru

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: vd_zin@mail.ru

Поступила 02.07.2013
Принята в печать 05.02.2014

Received July 02, 2013
Accepted February 5, 2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №1. – С. 38–46.
© 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(1): 38–46.
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Например, в них индуцируется ответ на тепловой шок [8], действие перекиси водорода [7], агенты, генерирующие свободные радикалы [12], осмотический стресс [25].

Одним из стрессовых состояний живого организма является отклонение температуры внешней среды от физиологических значений. Выживание и рост клеток при низких температурах связаны с изменениями физических и биохимических свойств клеток. Например, понижение температуры влияет на текучесть клеточных мембран, что повышает их устойчивость к низкотемпературным воздействиям [5]. При снижении текучести мембран замедляются латеральная диффузия мембранных белков и трансмембранный перенос веществ, а также уменьшается активность мембрано-связанных ферментов [26]. Известно, что мембранная текучесть может быть модифицирована одним из двух путей: связыванием сахаридов [14] или изменением содержания фосфолипидов и нейтральных липидов [21]. Также при понижении температуры в *S. cerevisiae* синтезируются метаболиты – трегалоза и глицерин, обладающие криопротекторной активностью [14, 18]. Наблюдается значительное «перекрытие» экспрессии генов теплового шока, окислительного стресса и других видов стресса [9, 11, 13, 23]. Оксидативный стресс, как и тепловой шок приводят к появлению, по крайней мере, 10 полипептидов, которые отвечают за перекрестную адаптацию к этим двум видам стрессов [5]. Таким образом, естественные защитные механизмы, которые обеспечивают клеткам способность сохранять свою структуру и функции при действии одного стрессорного фактора, могут запускаться в ответ на действие другого. Возможность использования данного свойства в криобиологии для повышения устойчивости клеток к холодным воздействиям к настоящему времени исследована недостаточно.

Целью данной работы явилось исследование влияния окислительного стресса на запуск механизмов естественной холодоустойчивости клеток *S. cerevisiae* при их замораживании-отогреве.

Материалы и методы

Исследования проводили на промышленном штамме дрожжей *S. cerevisiae* (раса 608), полученном из Российского НИИ хлебопекарной промышленности (Россия). Дрожжи выращивали на скошенном сусло-агаре в течение 48 ч при 30°C и смывали с питательной среды физиологическим раствором. Озон получали путем электролиза, пропуская газообразный кислород через разработанный нами озонатор [1] и растворяли барботированием озono-кислородной смеси через физиоло-

Variation of temperatures of external environment around physiological values is one of the stressors for a living organism. Survival of cells and their growth under low temperature conditions are associated with the changes of physical and biochemical properties of cells. For instance, temperature reduction affects fluidity of cell membranes, increasing their resistance to low temperature influences [1]. Decreased membrane fluidity impedes lateral diffusion of membrane proteins and transmembrane transport of substances, as well as inhibits membrane-linked enzymes [23]. It has been known that membrane fluidity may be modified either by binding saccharides [10] or changes in phospholipid and neutral lipid contents [19]. Decreasing of temperature is accompanied also by a synthesis of such metabolites as trehalose and glycerol, known as cryoprotectants [10, 18]. There is a significant 'overlapping' in expression of genes associated with heat shock, oxidative stress and other types of stress [5, 7, 9, 20]. Oxidative stress along with thermal shock lead to the appearance of at least 10 polypeptides, responsible for a cross adaptation to these two types of stresses [1]. Thus, the natural protection mechanisms, which provide the ability of cells to preserve their structure and functions under the action of a stress factor, could be initiated in response to the action of another one. The possibility of using such property in cryobiology to elevate the resistance of cells to cold exposures is studied insufficiently to date.

The research aim was to investigate the influence of oxidative stress on initiation of mechanisms of a natural cold resistance for *S. cerevisiae* cells during their freeze-thawing.

Materials and methods

The investigations were carried out with industrial yeast strain *S. cerevisiae* obtained from Russian Research Institute of Baking Industry (St. Petersburg, Russia). The yeast were grown on slant wort-agar for 48 hours at 30°C and washed with physiological solution to remove growth medium. Ozone was obtained by electrosynthesis by passing gaseous oxygen through the ozonator of our construction [24] and then the ozone-oxygen mixture was dissolved in physiological saline (0.15 M NaCl) by bubbling. Concentration of dissolved ozone was determined spectrophotometrically with Specord UV VIS (Carl Zeiss, Germany) assessing the extinction in Hartley's band [16]. Ozonized physiological saline was added directly into the cell suspension prior to freezing. Thereafter the cell suspensions of 2 ml were frozen in plastic tubes (Corning, USA) by plunging into liquid nitrogen. The samples were thawed in water bath at 30°C.

Chemiluminescence was recorded using luminometer of our design [25]. The samples were investiga-



гический раствор. Концентрацию растворенного озона определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Specord UV VIS («Carl Zeiss Jena», Германия) по значению экстинкции на полосе Хартли [2]. Озонированный физиологический раствор вводили в суспензию клеток непосредственно перед замораживанием. Суспензии клеток в физиологическом растворе объемом 2 мл замораживали в пластиковых пробирках («Corning», США) погружением в жидкий азот, отогревали на водяной бане при температуре 30°C.

Хемилюминесценцию регистрировали с помощью разработанного нами люминометра [3]. Для работы с исследуемыми образцами использовали специальную кювету с прозрачным в ультрафиолетовой области окном из фторопластовой пленки [4]. Кювету, содержащую суспензию клеток *S. cerevisiae* с концентрацией 5×10^7 кл/мл, помещали в биолюминометр. Реакцию запускали добавлением 0,1 мл озонированного физиологического раствора с требуемой концентрацией озона к 0,5 мл суспензии клеток. Вспышку люминесценции регистрировали на компьютере, в качестве интерфейса использовали электронный осциллограф «Hantek DSO-2150» (Китай).

Повреждение мембран регистрировали с помощью липофильного флуоресцентного зонда Square-460 («Setabiomedicals», США), окрашивающего в нормальных условиях плазматическую мембрану, а при ее повреждении проникающего в клетку. Благодаря данному свойству зонда с помощью метода цитофлуориметрии могут быть зарегистрированы клетки с поврежденными мембранами [1]. Для окрашивания клеток зонд, растворенный в этаноле, вводили после отогрева в суспензию клеток в концентрации 40 мкмоль/л и после 15-минутной инкубации отмывали путем центрифугирования при 800g в течение 3 мин. Окрашенные клетки исследовали на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США) при возбуждении на длине волны 488 нм.

Результаты представлены по данным не менее 5 независимых экспериментов. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ «Microsoft Excel 2010» и «Origin 8.5», используя параметрический t-критерий Стьюдента. Данные приведены в виде средних арифметических \pm среднеквадратическая ошибка средней величины. Различия между данными считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены точечные диаграммы клеток *S. cerevisiae* перед замораживанием до -196°C и после отогрева замороженных клеток до 30°C .

ted in a special cuvette with ultraviolet-transparent window of fluoroplastic film to investigate the studied samples [26]. Cuvette containing suspension of *S. cerevisiae* cells with concentration of 5×10^7 cells per ml was placed into bioluminometer. The reaction was initiated by adding 0.1 ml of physiological saline with appropriate concentration of ozone to 0.5 ml of cell suspension. Data of luminescence bursts were recorded with computer. Electron oscillograph Hantek DSO-2150 USB (China) was used as an interface.

Membrane damage was assessed with lipophilic fluorescence probe Square-460 (Setabiomedicals, USA), which normally stains cell plasma membrane and after its damage penetrates into the cell. This feature of the probe could be used for cytofluorimetric assessing the number of damaged cells [9]. To stain cells the ethanol solution of the probe (40 $\mu\text{mol/l}$) was added following thawing into a cell suspension and after 15-minute incubation washed-out using centrifugation at 800g for 3 min. The stained cell suspensions were examined with FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) at excitation wavelength of 488 nm.

The results are based on at least 5 independent experiments. Statistical processing of the results was performed using Microsoft Excel and Origin 8.5 software and Student's t-test. The data are presented as arithmetic mean values \pm error of the mean. Differences between the data were considered as significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Fig. 1 represents dot plots of *S. cerevisiae* cell suspension fluorescence before freezing down to -196°C and following thawing up to 30°C .

Fluorescence of cells bound Square-460 probe was recorded in 'red' channel FL3 (650 nm). For cells not exposed to freezing or ozone treatment the fluorescence was found within the range values of FL3 $0-10^2$. After freeze-thawing the cells with damaged membranes had higher fluorescence (gate within the range values of FL3 10^2-10^4 , Fig. 1, B).

After freeze-thawing the samples not treated with ozone had $(65.6 \pm 1.6)\%$ of cells with damaged membranes.

Pre-freezing treatment of cells with ozone doses of $29-240 \text{ pmol O}_3/10^6$ resulted in a decreased number of cells with damaged membranes measured after freeze-thawing (Fig. 1C, D). In dot plots of fluorescence measured in the cells post thaw, the gate shifted to FL3 values below 10^2 , that corresponded to the indices of cells with intact membranes (Fig. 1, A, B).

Increasing of ozone dose up to $320 \text{ pmol O}_3/10^6$ of cells the number of cells with damaged was high even before freezing, and the following freeze-thawing the index increased even more (Fig. 1F).

Fig. 2 shows the relative number of cells with damaged membranes after freeze-thawing averaged



Данные о флуоресценции клеток, связавших зонд «Square-460», регистрировали в «красном» канале FL3 (650 нм). Для клеток не подвергавшихся замораживанию или обработке озоном, флуоресценция регистрировалась в области значений FL3 0–10² (рис. 1, А). После замораживания-отогрева появлялись клетки с поврежденными мембранами, отличавшиеся более интенсивной флуоресценцией (гейт в области значений FL3 10²–10⁴, рис. 1, В).

При замораживании-отогреве образцов, не обработанных озоном, мембраны повреждались у (65,6 ± 1,6)% клеток.

Обработка клеток озоном в дозах 29–240 пмоль O₃/10⁶ кл перед замораживанием приводила к тому, что количество клеток с поврежденными мембранами после цикла замораживания-отогрева снижалось (рис. 1, С, D). На точечных диаграммах клеток после их отогрева гейт смещался к значениям FL3 ниже 10², соответствовавшим клеткам с неповрежденными мембранами (рис. 1, А, В).

from 5 experiments. Cells were treated with ozone of different doses prior to freezing. Such treatment reduced the number of cells with damaged membranes post thaw, and the effect depended on the dose of ozone. If the ozone dose was 29 pmol O₃/10⁶ cells the effect was the most pronounced: in this case we observed (16.1 ± 0.8)% of cells with damaged membranes vs. (65.6 ± 1.6)% in the samples not treated with ozone. Increasing ozone dose resulted in decrease of the effect: the number of cells with damaged membranes reached (33.6 ± 1.3)% of total population if ozone dose was 240 pmol O₃/10⁶ cells, and the cells were damaged before freezing if the dose was 320 pmol O₃/10⁶ cells (data not shown in Fig. 2). Thus, the ozone treatment of *S. cerevisiae* cells prior to freezing enabled to reduce membrane damage during freeze-thawing of cells without cryoprotectants application, and the effect depended on ozone dose.

The response of *S. cerevisiae* cells to treatment by various ozone doses was assessed by a chemiluminescence, which bursts were observed following intro-

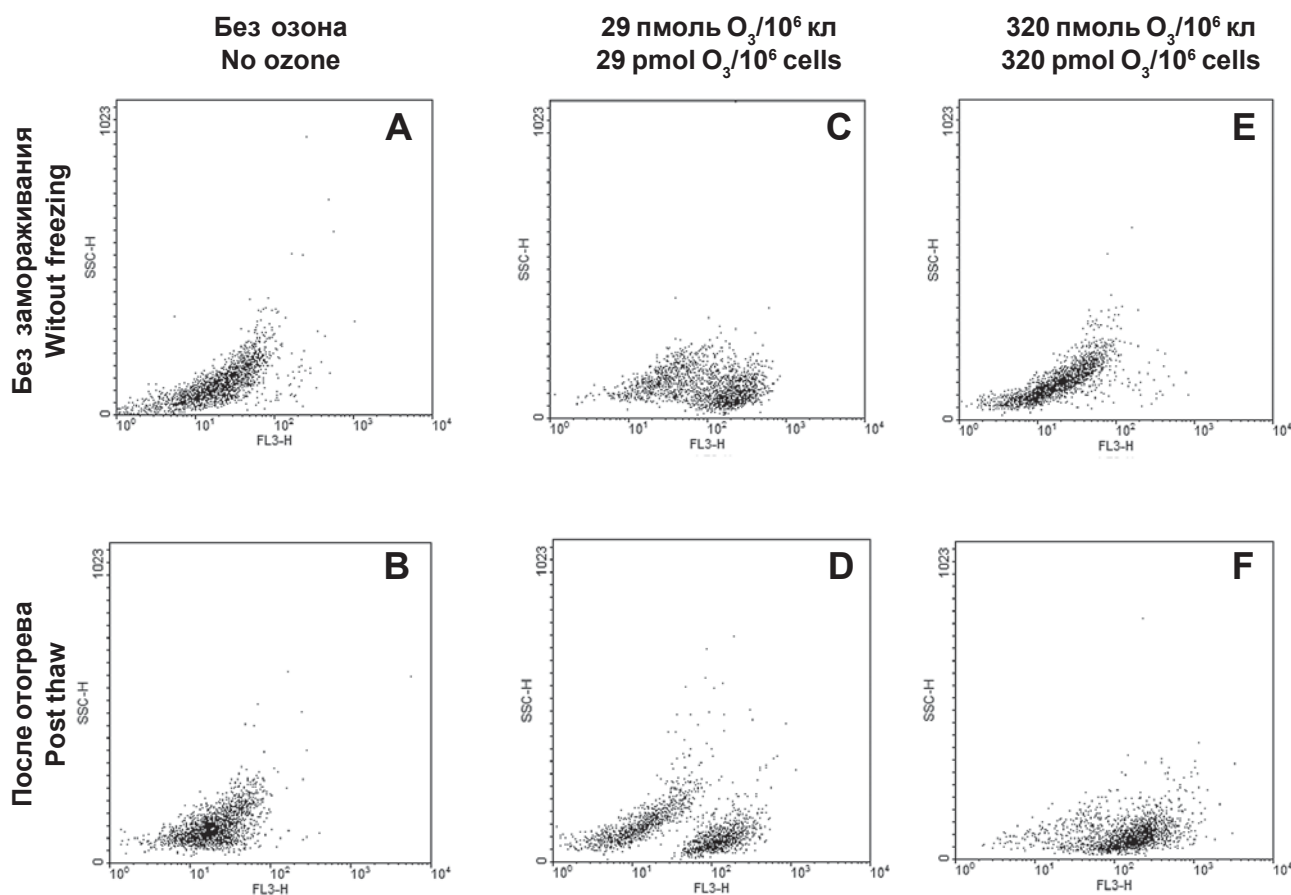


Рис. 1. Точечные гистограммы флуоресценции дрожжей *S. cerevisiae* без/после обработки озоном в различных дозах: **А, С, Е** – без замораживания; **В, D, F** – после замораживания-отогрева. Окрашивание «Square-460». Цитофлуориметрическое исследование.

Fig. 1. Dot plots of fluorescence measured in *S. cerevisiae* yeast without/after treatment with ozone in various doses: **A, C, E** – without freezing; **B, D, F** – after freeze-thawing. Cytofluorimetric study.

Повышение дозы озона до 320 пмоль $O_3/10^6$ кл приводило к повреждению мембран еще перед замораживанием клеток (рис. 1, Е), количество клеток с поврежденными мембранами дополнительно увеличивалось после замораживания-отогрева (рис. 1, Е).

На рис. 2 представлены усредненные по результатам 5 экспериментов значения относительного содержания клеток с поврежденными мембранами после замораживания-отогрева. Перед замораживанием клетки обрабатывали озоном в разных дозах. Такая обработка позволяла уменьшить количество клеток с поврежденными мембранами после замораживания-отогрева, причем действие озона зависело от его дозы. Эффект озона наиболее был выражен после использования дозы 29 пмоль $O_3/10^6$ кл: в этом случае наблюдали $(16,1 \pm 0,8)\%$ клеток с поврежденными мембранами против $(65,6 \pm 1,6)\%$ в образцах, не обработанных озоном. При увеличении дозы озона указанный эффект уменьшался: клетки с поврежденными мембранами при дозе озона 240 пмоль $O_3/10^6$ кл составляли $(33,6 \pm 1,3)\%$ от общей популяции, а при дозе 320 пмоль $O_3/10^6$ кл и выше клетки повреждались еще до замораживания. Таким образом, обработка клеток *S. cerevisiae* озоном перед замораживанием позволила снизить уровень повреждения мембран при замораживании-отогреве клеток без применения «классических» криопротекторов, причем эффект зависел от дозы озона.

Для исследования реакции клеток *S. cerevisiae* на обработку различными дозами озона использовали метод хемилюминесценции, вспышка которой наблюдалась при введении в суспензию клеток озона. По нашему мнению, этот эффект связан с работой антиоксидантных систем клетки в процессе нейтрализации избыточного экзогенного окислителя, поскольку хемилюминесценция исчезала после инактивации клеток нагреванием до 100°C . При достижении определенной пороговой дозы озона хемилюминесцентный ответ клеток не регистрировался.

На рис. 3 представлена зависимость интенсивности вспышки хемилюминесценции от суммарной дозы введенного озона при последовательном добавлении в суспензию клеток одинаковых порций озонированного физиологического раствора. При суммарной дозе озона менее 240 пмоль $O_3/10^6$ кл вспышка люминесценции сопровождала каждое введение порции озонированного физиологического раствора, причем её интенсивность в данном диапазоне доз озона изменялась слабо. После превышения указанного значения интенсивность вспышки люминесценции постепенно снижалась, а при

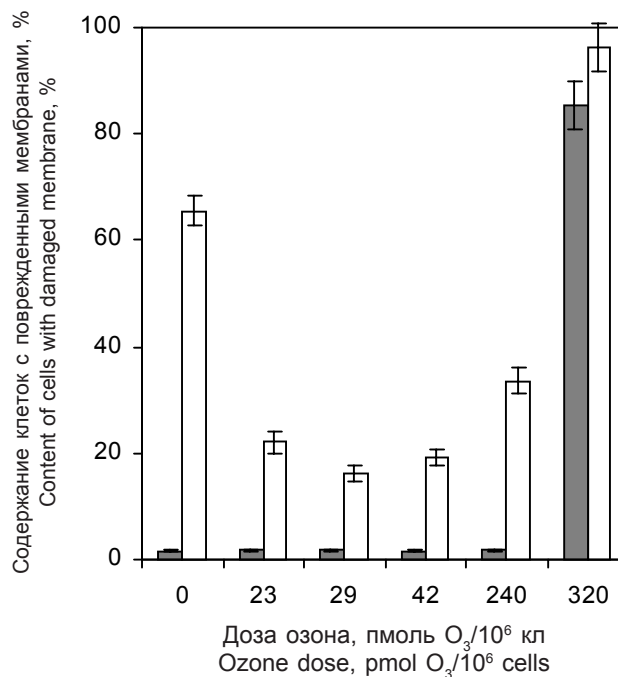


Рис. 2. Относительное содержание клеток *S. cerevisiae* с поврежденными мембранами после обработки озоном в различных дозах: □ – обработка озоном без замораживания; ■ – после обработки озоном и последующего замораживания-отогрева. Данные усреднены по результатам 5 экспериментов.

Fig. 2. Relative number of *S. cerevisiae* cells with damaged membranes after treatment with different doses of ozone: □ – treated with ozone without freezing; ■ – after treatment with ozone and following freeze-thawing. Data are the averaged values of 5 experiments.

duction of ozone to cell suspension. In our opinion, this effect was the result of cell antioxidant systems activity for neutralization of excessive exogenous oxidant, as far as the chemiluminescence disappeared after cell inactivation caused by heating up to 100°C . When reaching a certain threshold ozone dose a chemiluminescent response of cells was absent.

Fig. 3 represents the dependence of chemiluminescence burst intensity vs. total dose of introduced ozone, which was the sum of equal portions of ozonized physiological solution sequentially introduced to cell suspension. If total dose of ozone was less than 240 pмol $O_3/10^6$ cells the luminescence burst accompanied each introduction of ozonized saline portion, moreover its intensity changed slightly within mentioned range. After surpassing of the stated value the intensity of luminescence burst reduced gradually, and if total ozone dose was higher than 510 pмol $O_3/10^6$ of cells no chemiluminescent response of cells to ozone introduction was observed.

Comparing the obtained dependence with the above data of ozone effect on the integrity of cell membranes, it can be concluded that the cell membranes are



суммарной дозе выше $510 \text{ пмоль } \text{O}_3/10^6 \text{ кл}$ хемилюминесцентный ответ клеток на озон не был обнаружен.

Сравнивая полученную зависимость с представленными выше данными о влиянии озона на целостность мембран клеток, можно заключить, что мембраны клеток повреждаются при использовании высоких доз озона, даже без замораживания (см. рис. 1, Е).

Можно считать, что снижение интенсивности хемилюминесценции при повышении суммарной дозы введенного озона связано с повреждением части клеток озоном и уменьшением количества жизнеспособных клеток, антиоксидантные системы которых способны нейтрализовать его действие (см. рис. 3). Повышение устойчивости мембран клеток *S. cerevisiae* к повреждению при замораживании наблюдается при низких дозах озона, которые не истощают антиоксидантные ресурсы клеток. При этом их адаптивная реакция клеток на слабый окислительный стресс запускает защитные механизмы на другие виды стрессов, в том числе и на действие низких температур.

Таким образом наши результаты показывают, что клетки *S. cerevisiae* приобретают индуцированную устойчивость к замораживанию-отогреву в состоянии адаптивного ответа на окислительный стресс. Выраженность эффекта зависит от степени воздействия стрессорного фактора, т. е. от степени отклонения данной живой системы от условий нормального гомеостаза. Слабый окислительный стресс является сигналом «тревоги» для адаптивных систем клетки, реакция на который предусматривает генетически детерминированную упреждающую защиту от неблагоприятных факторов среды.

Следует отметить существование общих механизмов восприятия и быстрой реакции организмов на внешние воздействия: набор защитных реакций имеется у любого организма, независимо от его приспособленности. Организмы, имеющие разную устойчивость, могут реагировать на воздействие однотипно, но скорость и амплитуда физиологических перестроек у них при этом различаются [6]. В ответ на действие неблагоприятных факторов среды возникают неспецифические и специфические реакции, характерные для конкретного стрессового воздействия. Пример неспецифической реакции – торможение обмена веществ, поскольку при этом чувствительность объекта снижается [5, 18]. Ко второму типу реакций можно отнести увеличение концентрации ионов в клетке при повышении осмолярности внешней среды [19, 25]. Тем не менее именно неспецифические защит-

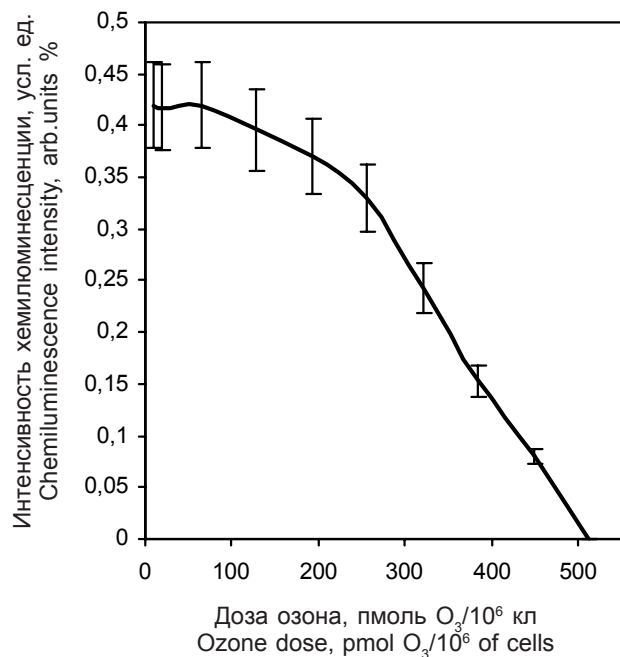


Рис. 3. Зависимость интенсивности вспышки хемилюминесценции от суммарной дозы введенного озона (за усл. ед. принято напряжение на выходе измерителя светового потока).

Fig. 3. Dependence of chemiluminescence burst intensity vs. total dose of introduced ozone (arbitrary units represent the output voltage of light-flux detector).

damaged by high doses of ozone, even without freezing (Fig. 1E).

We can assume that the decrease of chemiluminescence intensity in case of high total doses of introduced ozone is associated with damage of part of cells by ozone molecules and corresponding reduction of number of viable cells, which antioxidant systems are able to neutralize the oxidative effect (see Fig. 3). The increasing of *S. cerevisiae* cell membranes resistance to damage caused by freeze-thawing is observed in case of low doses of ozone, which do not exhaust the antioxidant capabilities of cells. Moreover, their adaptive response to a weak oxidative stress initiates protective mechanisms to other types of stress, including those associated with low temperatures.

Thus, our results indicate that *S. cerevisiae* cells gain a resistance to freeze-thawing initiated by an adaptive response to oxidative stress. The power of the effect depends on level of stress factor impact, i. e. how far the living system diverges from normal homeostasis conditions. Weak oxidative stress could be an ‘alarm’ signal for adaptive systems of cell, initiating a reaction of genetically determined preventive protection from unfavourable environmental factors.

It should be noted that there are common mechanisms of perception and quick response of organisms to an external influence: any organism, regardless of

ные реакции – наиболее «экономный» и универсальный способ сохранения равновесия биосистем с внешней средой, обеспечивающий их надежность в быстро изменяющихся условиях существования. На этой стадии ответа на стресс живая система, подверженная действию одного стрессорного агента, может увеличивать свою сопротивляемость к действию других неблагоприятных факторов (перекрестная адаптация). Например, водный дефицит увеличивает сопротивляемость растений к низким температурам [6], окислительный стресс повышает осмотическую устойчивость *S. cerevisiae* [19], тепловой и солевой шок *S. cerevisiae* повышают их толерантность к замораживанию и другим стрессорным воздействиям [18]. Однако повышение устойчивости живой системы к стрессу по механизму перекрестной адаптации наблюдается не всегда, известны примеры синергизма в негативном действии разных стрессорных агентов [6].

После того, как первичная кратковременная адаптация достигнута и природа стрессора для организма ясна, запускаются механизмы основной фазы адаптации, в которой вместе с множеством неспецифических реакций обнаруживаются и специфические ответы [10, 15–20, 25, 26]. Организм приспосабливается к существованию в изменившихся условиях внешней среды. Стрессовое состояние преодолевается путем изменения обмена веществ, т. е. метаболических приспособлений [21, 22, 24]. Последние требуют больших энергетических затрат, так как связаны с включением репаративных механизмов, направленных на предотвращение или исправление повреждения.

Дальнейшие исследования в данной области, расширяя наши знания о реакции различных организмов на неблагоприятные условия существования, могут предоставить новые для криобиологии пути улучшения адаптационных возможностей живых систем к низкотемпературным воздействиям.

Выводы

Обработка клеток *S. cerevisiae* озоном перед замораживанием позволяет уменьшить количество клеток с поврежденными в ходе замораживания-отогрева мембранами. Действие озона зависит от дозы и наиболее выражено при 29 пмоль/10⁶ кл: после замораживания (до –196°C) и отогрева (до 30°C) мембраны повреждаются у меньшего количества клеток ((16,1 ± 0,9)%) по сравнению с клетками, не обработанными озоном ((65,6 ± 1,6)%). Наблюдаемый эффект объясняется адаптивной реакцией клеток на окислительный стресс,

individual fitness, has several sets of protective reactions. Organisms possessing different resistance may respond to impact in the same manner, but the rate and amplitude of physiological alterations would be different [2]. Unfavourable environmental factors result in nonspecific or specific reactions characteristic for certain stress. Inhibition of metabolism is an example of nonspecific reactions, since it is accompanied with reduction of an biological specimen sensitivity [1, 14]. To other type of reactions could be referred a rise in concentration of ions observed in a cell under increased osmolarity of extracellular environment [15, 22]. Nevertheless, exactly non-specific protective reactions are the most ‘sparing’ and universal way to keep the balance of biological systems and external environment, which provide their safety under rapidly changing conditions of an organism existence. At this stage of response to stress the living system, exposed to one particular stress agent could increase the resistance to the action of other unfavourable factors (cross-adaptation). For instance, water deficiency increases the resistance of plants to low temperatures [2], oxidative stress rises the osmotic resistance of *S. cerevisiae* [15], thermal and saline shock survived by *S. cerevisiae* elevates their tolerance to freezing and other stress influences [14]. However, such an increased resistance of living system to stress caused by cross-adaptation is not universal, there are the examples about synergy of negative effect caused by different stress agents [2].

When the initial short-term adaptation is achieved and the nature of stressor is clear for an organism, the mechanisms of main phase of adaptation are initiated, which contain both nonspecific reactions and several specific responses [6, 11–15, 17, 22, 23]. An organism adapts for existence in changing environments. Stress-initiated state is conquered by the changes in metabolism, *i.e.* metabolic adaptations [18, 19, 21]. The latter requires a high metabolic expenditures, as they are associated with initiation of reparative mechanisms directed to prevent or repair damages.

Further research in this field would expand our knowledge about the response of different organisms for unfavorable conditions of existence and could provide cryobiology with new ways to improve adaptive capabilities of living systems to low temperature exposures.

Conclusions

Ozone treatment of *S. cerevisiae* cells prior to freezing enables to reduce the number of cells with damaged membranes following freeze-thawing. Ozone impact depends on its dose and is the most expressed in the dose of 29 pmol O₃/10⁶ cells: after freezing



в результате которого запускаются естественные механизмы защиты от других видов стресса, в том числе и стресса при замораживании-отогреве.

Литература

1. Горячая И.П., Дюбко Т.С., Зинченко В.Д. и др. Сквараиновый краситель «Square-460» как маркер повреждения мембран при криовоздействиях // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №4. – С. 347–350.
2. Зинченко В.Д., Голота В.И., Сухомлин Е.А. и др. Лабораторное оборудование для применения озоновых технологий в биологии и медицине // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №2. – С. 68–72.
3. Лунин В.В., Попович М.П., Ткаченко С.Н. Физическая химия озона. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1998. – 480 с.
4. Пат. № 72111, Украина, МПК7 G01N 21/76 (2006.01). БиOLUMинометр / В.Д. Зинченко, И.П. Горяча, И.В. Говор; заявл. 05.01.2012; опубл. 15.08.2012. Бюл. №15.
5. Пат. №73452, Украина, МПК7 G01N 23/03 (2006). Кювета для био- і хемілюмінометрів / В.Д. Зинченко, И.П. Горяча, И.В. Говор; заявл. 05.03.2012; опубл. 25.09.2012. Бюл. №18.
6. Aguirrela J., Randez-Gil F., Prieto J.A. Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions of old mechanisms // FEMS Microbiol. Rev. – 2007. – Vol. 31, №3. – P. 327–341.
7. Alexieva V., Ivanov S., Sergiev I., Karanov E. Interaction between stress // Bulg. J. Plant Physiol. – 2003. – Special Issue. – P. 1–17.
8. Collinson L., Dawes I. Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress // J. Gen. Microbiol. – 1992. – Vol. 138. – P. 329–335.
9. Coote P.J., Cole M.B., Jones M.V. Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH // J. Gen. Microbiol. – 1991. – Vol. 137, №7. – P. 1701–1708.
10. Craig E.A. Chaperones: helpers along the pathways to protein folding // Science. – 1993. – Vol. 260, №5116. – P. 1902–1903.
11. Ermolenko D.N., Makhatadze G.I. Bacterial cold-shock proteins // Cell Mol. Life Sci. – 2002. – Vol. 59, №11. – P. 1902–1913.
12. Estruch F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast // FEMS Microbiol. Rev. – 2000. – Vol. 24, №4. – P. 469–486.
13. Flattery-O'Brien J., Collinson L. P., Dawes I. W. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide // J. Gen. Microbiol. – 1993. – Vol. 139, №3. – P. 501–507.
14. Homma T., Iwahashi H., Komatsu Y. Yeast gene expression during growth at low temperature // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46, №3. – P. 230–237.
15. Iwahashi H., Obuchi K., Fujii S., Komatsu Y. The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane structure in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Cell. Mol. Biol. – 1995. – Vol. 41, №6. – P. 763–769.
16. Jiang W., Hou Y., Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272, №16. – P. 196–202.
17. Kandror O., Bretschneider N., Kreydin E. et al. Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones // Mol. Cell. – 2004. – Vol. 13, №6. – P. 771–781.
18. Kohrer K., Domdey H. Preparation of high molecular weight RNA // Meth. Enzymol. – 1991. – Vol. 194. – P. 398–405.
19. Lewis J.G., Learmonth R.P., Watson K. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiology. – 1995. – Vol. 141, №3. – P. 687–694.

(down to -196°C) and thawing (up to 30°C) the membranes are damaged in $(16.1 \pm 0.9)\%$ of the cells, that is considerably lower if compared with the cells not treated with ozone ($(65.6 \pm 1.6)\%$). The observed effect is explained with the adaptive response of cells to oxidative stress, leading to initiation of natural protective mechanisms against other types of stress, including those of freeze-thawing.

References

1. Aguirrela J., Randez-Gil F., Prieto J.A. Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions of old mechanisms. FEMS Microbiol Rev 2007; 31(3): 327–341.
2. Alexieva V., Ivanov S., Sergiev I., Karanov E. Interaction between stress. Bulg J Plant Physiol 2003; Special Issue: 1–17.
3. Collinson L., Dawes I. Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. J Gen Microbiol 1992; 138: 329–335.
4. Coote P.J., Cole M.B., Jones M.V. Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. J Gen Microbiol 1991; 137(7): 1701–1708.
5. Craig E.A. Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. Science 1993; 260(5116): 1902–1903.
6. Ermolenko D.N., Makhatadze G.I. Bacterial cold-shock proteins. Cell Mol Life Sci 2002; 59 (11). – P. 1902–1913.
7. Estruch F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. FEMS Microbiol Rev 2000; 24(4): 469–486.
8. Flattery-O'Brien J., Collinson L. P., Dawes I. W. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. J Gen Microbiol 1993; 139(3): 501–507.
9. Goryachaya I.P., Dyubko T.S., Zinchenko V.D. et al. Squaraine dye Square-460 as a marker of membrane cryodamage. Problems of Cryobiology and Cryomedicine 2013; 23(4): 347–350.
10. Homma T., Iwahashi H., Komatsu Y. Yeast gene expression during growth at low temperature. Cryobiology 2003; 46(3): 230–237.
11. Iwahashi H., Obuchi K., Fujii S., Komatsu Y. The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane structure in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cell Mol Biol 1995; 41(6): 763–769.
12. Jiang W., Hou Y., Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. J Biol Chem 1997; 272(16): 196–202.
13. Kandror O., Bretschneider N., Kreydin E. et al. Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. Mol Cell 2004; 13(6): 771–781.
14. Kohrer K., Domdey H. Preparation of high molecular weight RNA Meth Enzymol 1991; 194: 398–405.
15. Lewis J.G., Learmonth R.P., Watson K. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 1995; 141(3): 687–694.
16. Lu F., Wang Y., Bai D., Du L. Adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to hyperosmotic and oxidative stress. Process Biochemistry 2005; 40(11): 3614–3618.
17. Lunin V.V., Popovich M.P., Tkachenko S.N. Physical chemistry of ozone. Moscow: Moscow University; 1998.
18. Martinez-Pastor M.T., Marchler G., Schuller C. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). EMBO J 1996; 15(9): 2227–2235.



20. Lu F., Wang Y., Bai D., Du L. Adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to hyperosmotic and oxidative stress // *Process Biochemistry*. – 2005. – Vol. 40, №11. – P. 3614–3618.
21. Martinez-Pastor M.T., Marchler G., Schuller C. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE) // *EMBO J.* – 1996. – Vol. 15, №9. – P. 2227–2235.
22. Murakami Y., Yokoigawa K., Kawai H. Lipid composition of freeze-tolerant yeast, *Torulasporea delbureckii*, and its freeze-sensitive mutant // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1995. – Vol. 44, №2. – P. 167–171.
23. Murata Y., Homma T., Kitagawa E. et al. Genome-wide expression analysis of yeast response during exposure to 4°C // *Extremophiles*. – 2006. – Vol. 10, №2. – P. 117–128.
24. Ruis H., Schuller C. Stress signaling in yeast // *Bioessays*. – 1995. – Vol. 17, №11. – P. 959–965.
25. Thieringer H.A., Jones P.G., Inouye M. Cold shock and adaptation // *Bioessays*. – 1998. – Vol. 20, №1. – P. 49–57.
26. Varela J.C.S. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity // *Microbiology*. – 1996. – Vol. 142, №4. – P. 721–731.
27. Vigh L., Maresca B., Harwood J.L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? // *Trends Biochem. Sci.* – 1998. – Vol. 23, №10. – P. 369–374.
19. Murakami Y., Yokoigawa K., Kawai H. Lipid composition of freeze-tolerant yeast, *Torulasporea delbureckii*, and its freeze-sensitive mutant. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995; 44(2): 167–171.
20. Murata Y., Homma T., Kitagawa E. et al. Genome-wide expression analysis of yeast response during exposure to 4°C. *Extremophiles* 2006; 10(2): 117–128.
21. Ruis H., Schuller C. Stress signaling in yeast. *Bioessays* 1995; 17(11): 959–965.
22. Thieringer H.A., Jones P.G., Inouye M. Cold shock and adaptation. *Bioessays* 1998; 20(1): 49–57.
23. Varela J.C.S. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity. *Microbiology* 1996; 142(4): 721–731.
24. Vigh L., Maresca B., Harwood J.L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem Sci* 1998; 23(10): 369–374.
25. Zinchenko V.D., Golota V.I., Sukhomlin E.A. et al. Laboratory equipment to use ozone technologies in biology and medicine. *Problems of Cryobiology* 2006; 16(2): 68–72.
26. Zinchenko V.D., Goryachaya I.P., Govor I.V. Bioluminometer. Patent 72111 (Ukraine), IPC7 G01N 21/76 (2006.01).
27. Zinchenko V.D., Goryachaya I.P., Govor I.V. Cuvette for bio- and chemiluminometers Patent 73452 (Ukraine), IPC7 G01N 23/03 (2006).

