



УДК 577.352.4:582.282.23:57.043

УСТОЙЧИВОСТЬ МЕМБРАН ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* К ХОЛОДОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

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

Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины,
Украина, 61015, г. Харьков,
ул. Переяславская, 23.

E-mail: irynagor@gmail.com

Исследованы целостность мембран клеток *S. cerevisiae* после цикла замораживание-отогрев (-196°C – $+30^{\circ}\text{C}$), обработанных озоном в различных дозах перед замораживанием, а также жизнеспособность клеток, обработанных озоном в различных дозах после замораживания-отогрева. После цикла замораживание-отогрев клеток в физиологическом растворе без обработки озоном мембраны повреждаются у 60% клеток. В образцах клеток, обработанных озоном в дозе 29 пмоль $\text{O}_3/10^6$ кл перед замораживанием, количество клеток с неповрежденными мембранами близко к 90%, что объясняется существованием перекрестной адаптации между окислительным стрессом и стрессом, вызванным замораживанием-отогревом. Обработка клеток озоном в дозе 29 пмоль $\text{O}_3/10^6$ кл после замораживания-отогрева способствует повышению показателей жизнеспособности клеток (число КОЕ/мл) на 30–50% по сравнению с клетками, не обработанными озоном. Данный эффект объясняется гормезисом – стимуляцией живой системы слабым внешним раздражителем, интенсивность которого недостаточна для проявления вредных воздействий.

Ключевые слова: окислительный стресс, озон, *Saccharomyces cerevisiae*, перекрестная адаптация.

Введение

Известно, что индукция слабого стресса повышает устойчивость клеток к последующему более сильному действию того же стрессора и в некоторых случаях вызывает защиту от других видов стресса [1–3]. Это общее свойство живых систем, которое сформировалось эволюционно. Известен ряд работ, в которых описаны механизмы специфических реакций на различные типы стрессов. Адаптация к холодовому шоку при температуре выше точки замерзания была достаточно широко исследована на примере *Escherichia coli*, которые испытывают холодовой стресс при попадании в окружающую среду из организма животного, а также для *Bacillus subtilis* и *S. cerevisiae* [4–8].

Однако существуют также неспецифические ответы на разные виды стрессов, например, определенные группы генов экспрессируются как при тепловом шоке, так и при оксидативном и других видах стресса. [9–11]. Flattery-O'Brien с соавт. [10] установили, что как оксидативный стресс, так и тепловой шок приводят к появлению, по крайней мере, десяти полипептидов, которые могут быть ответственны за перекрестную адаптацию к этим двум видам стресса. Действие осмотического стресса запускает синтез веществ, задействованных в репарации окислительных повреждений, и наоборот [11]. В работе [12] была показана роль антиоксидантного ответа при адаптации дрожжевых клеток к гиперосмотическому стрессу. Все эти данные указывают, что дрожжи *S. cerevisiae*, имеют необходимые молекулярные механизмы, чтобы выжить и адаптироваться к холоду, и что это, вероятно, одна из причин, почему этот вид настолько широко распространен. Таким образом, исследование реакции дрожжей *S. cerevisiae* на холодовой шок и путей запуска адаптационного ответа клеток на холодовые воздействия имеет существенное значение как с практической точки зрения (криоконсервирование и длительное хранение), так и для фундаментальных исследований адаптации живых систем к холоду [13, 14].

Целью настоящей работы явилось исследование влияния обработки дрожжей *S. cerevisiae* озоном в различных дозах на их устойчивость к холодовым воздействиям и эффективность их восстановления после цикла замораживания–отогрева.

Материалы и методы

Дрожжи *S. cerevisiae* (промышленный штамм получен в Санкт-Петербургском отделении Российского НИИ Хлебопекарной промышленности) для исследований выращивали на скошенном сусло-агаре в течение 48 часов при 30°C и смывали с питательной среды физиологическим раствором.

Суспензии клеток дрожжей *S. cerevisiae* в физиологическом растворе замораживали в криопробирках фирмы Corning (США) до -196°C погружением в жидкий азот. После достижения температуры в образце -196°C , его выдерживали в жидком азоте в течение 10 минут, после чего извлекали и оттаивали на водяной бане при 30°C .

Жизнеспособность клеток дрожжей после криоконсервирования определяли чашечным методом Коха по количеству макроколоний (число КОЕ/мл), образованных на агаризованных средах [15, 16]. Клетки культивировали в течение 48 часов при 30°C , после чего проводили подсчет макроколоний.

Окислительный стресс вызывали действием на клетки дозированными количествами озона. Озон для исследований получали из газообразного кислорода производства Харьковского кислородного завода (ГОСТ 5583-78) на озонаторе безбарьерного типа, разработанном в Харьковском физико-техническом институте [17]. Концентрация озона в газовой озонкислородной смеси на выходе озонатора составляла 30 мг/л при потоке 2 л/мин. Озонирование физиологического раствора проводили путем его барботирования озонкислородной смесью. Концентрацию озона в растворе определяли по величине экстинкции на длине волны 255 нм (полоса Хартли) [18, 19] на спектрофотометре «Specord UV VIS» («Carl Zeiss», Германия). Исходная концентрация озона, растворенного в физиологическом растворе, составляла 5 мг/л. Необходимую для введения в суспензию клеток концентрацию озона подбирали эмпирически, разбавляя исходный озонированный раствор физиологическим раствором.

Наблюдения за изменениями целостности мембран проводили с использованием флуоресцентного зонда Square-460, синтезированного в ГНУ «Институт монокристаллов» НАН Украины и предоставляемого фирмой «Setabiomedicals» (США). Распределение клеток по интенсивности флуоресценции и параметры светорассеяния клетками дрожжей регистрировали с помощью проточного цитофлуориметра «FACS Calibur» («BD», США) [20; 21] при длине волны возбуждения 488 нм. Флуоресцентные микрофотографии получали при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Германия). Использовали набор фильтров для флуоресценции 20 («Carl Zeiss»). Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 470 нм. Клетки окрашивали путём 15-тиминутной инкубации в среде, содержащей краситель «Square-460» в концентрации 40–70 мкмоль/л для микроскопических исследований или 4–7 мкмоль/л для исследований на проточном цитофлуориметре, отмывали свободный краситель с помощью центрифугирования в течение 3 мин при 800 g.

Результаты представлены по данным не менее 5 независимых экспериментов. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы «Origin 8.5». Данные оценивали, используя параметрический t-критерий Стьюдента. Результаты приведены в виде средних арифметических значений, их разброс описан среднеквадратической ошибкой средней величины ($p < 0.05$).

Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы исследовали влияние обработки клеток дрожжей *S. cerevisiae* озоном после замораживания-отогрева на целостность их мембран и жизнеспособность. На рис. 1 представлены флуоресцентные микрофотографии клеток *S. cerevisiae*, окрашенных зондом Square-460 без замораживания и после замораживания-отогрева.



а б
Рис. 1. Флуоресцентные микрофотографии клеток *S. cerevisiae*, окрашенных зондом Square-460 без замораживания (а) и после замораживания-отогрева (б)

Клетки, не подвергавшиеся замораживанию, характеризуются однородным свечением оболочек (см. рис. 1а). После замораживания-отогрева (см. рис. 1б) в некоторых клетках воз-



растает четкость флуоресценции внутренних структур, что объясняется перераспределением красителя внутри клетки. Одновременно наблюдаются полностью разрушенные клетки, утратившие свою начальную форму. У таких клеток сильно повышается общая интенсивность флуоресценции, что объясняется накоплением в них красителя, который проникает в клетки после нарушения целостности клеточных стенок и мембран.

На рисунке 2 представлены точечные гистограммы клеток *S. cerevisiae* до и после замораживания-отогрева без обработки озоном.

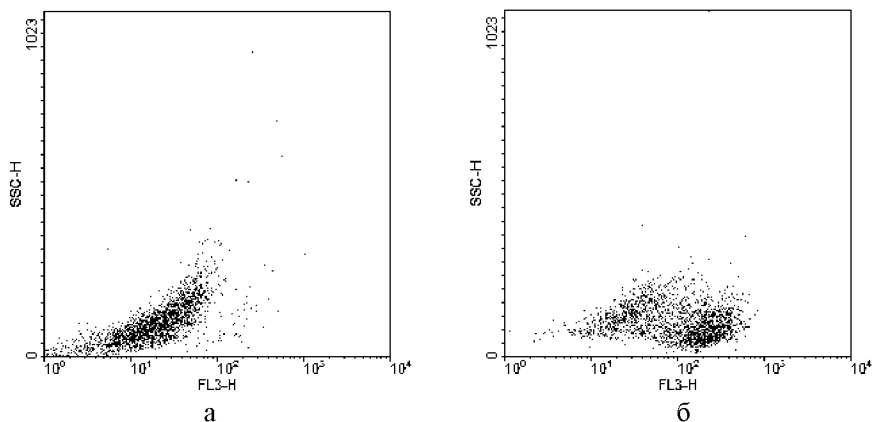


Рис. 2. Точечные гистограммы клеток *S. cerevisiae* окрашенных зондом Square-460: а) до замораживания; б) после замораживания до -196°C и отогрева до 30°C

Можно видеть, что замораживание-отогрев клеток приводит к появлению гейта в области значений FL3-H 10^2 - 10^3 (см. рис. 2б), что соответствует клеткам с поврежденными мембранами. Зонд Square-460 проникает в клетки с поврежденными мембранами, вызывая повышение интенсивности их флуоресценции [22] Регистрируется также пул клеток с более низким уровнем флуоресценции, мембраны которых не были повреждены в ходе замораживания-отогрева. Количество клеток с поврежденными мембранами составляет около 60% от общего пула.

После отогрева клетки обрабатывали озоном в различных дозах. Полученная зависимость показателей колониеобразования дрожжей *S. cerevisiae* от дозы озона представлена в таблице 1. В диапазоне низких доз озона (менее 42 пмоль $\text{O}_3/10^6$ кл) наблюдается тенденция к повышению жизнеспособности дрожжей в ответ на введение озона.

Таблица 1

Жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* после замораживания-отогрева и обработки озоном в различных дозах

Концентрация озона в образце, мг/л	Доза озона, пмоль $\text{O}_3/10^6$ кл	Жизнеспособность, число КОЕ/мл $\times 10^7$
0 (контроль)	0	3.6 ± 0.06
0.05	13	$4.2 \pm 0.1^*$
0.07	23	$4.6 \pm 0.05^*$
0.09	29	$7.3 \pm 0.06^*$
0.13	42	$4.9 \pm 0.08^*$
0.2	65	3.8 ± 0.02
0.3	97	$4 \pm 0.3^*$
0.38	120	$2.8 \pm 0.07^*$
0.75	240	1.1 ± 0.02

Примечание: * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Показатели жизнеспособности дрожжей, обработанных озонированным физиологическим раствором с конечной дозой озона 29 пмоль $\text{O}_3/10^6$ кл, достоверно выше, чем показатели жизнеспособности дрожжей в контрольных образцах, не обработанных озоном. При указанной дозе озона эффект стимуляции колониеобразования максимален, число КОЕ увеличивается примерно на 50% по сравнению с его значением для необработанных клеток.

При увеличении дозы озона более 65 пмоль $\text{O}_3/10^6$ кл эффект повышения жизнеспособности дрожжей не наблюдается, однако, до дозы 120 пмоль $\text{O}_3/10^6$ кл не происходит инактивация дрожжей. При достижении дозы озона 240 пмоль $\text{O}_3/10^6$ кл, жизнеспособность дрожжей снижает-

ся в 3 раза по сравнению с контролем. Доза озона свыше 240 пмоль $O_3/10^6$ кл (в табл. 1 не показаны) вызывают резкое снижение жизнеспособности клеток вплоть до их гибели.

Таким образом, экспериментально установлено, что стимуляция пролиферативной активности замороженных-оттаянных дрожжей *S. cerevisiae* проявляется при введении озона в дозах менее 42 пмоль $O_3/10^6$ кл в суспензию клеток после их оттаивания.

Представленная в таблице 1 зависимость показателей деления и роста от дозы озона согласуется с существующими представлениями о характере адаптивного ответа живой системы на стресс, в зависимости от величины стресса (триада Селье) [23, 24]. Обобщенная схема ответа живой системы на стресс представлена на рисунке 3. Стресс начинается стадией тревоги (alarm – реакции), во время которой мобилизуются защитные силы клетки. На этапе тревоги стресс запускает адаптивные функции клетки – активируется экспрессия стрессовых генов. Во многих случаях на стадии тревоги наблюдается активация процессов жизнедеятельности – гормезис [25–27].



Рис. 3. Характер ответа клеток на действие озона, в зависимости от его дозы

Обычно в ответные реакции при гормезисе вовлекаются белки ионных каналов и киназы, а также факторы транскрипции, регулирующие экспрессию генов, которые кодируют белки защиты клеток. Некоторые из белков гормонального стресса, присутствующие в больших количествах, в настоящее время идентифицированы, включая белки-шапероны, такие как белки теплового шока, антиокислительные ферменты – супероксид дисмутаза и глутатион пероксидаза и факторы роста - инсулин-подобные факторы роста [28, 29]. Таким образом, описанное выше увеличение активности деления и роста клеток *S. cerevisiae*, которое наблюдается при дозах озона менее 42 пмоль $O_3/10^6$ кл, может быть объяснено явлением гормезиса. Более всего данный эффект выражен при дозе озона 29 пмоль $O_3/10^6$ кл.

Во второй фазе триады Селье – фазе адаптации – в живой системе на основании изменений, прошедших во время первой фазы, включаются главные механизмы адаптации. Они характеризуются снижением активности гидролитических и катаболических реакций и усилением процессов синтеза, при этом происходит обратимое торможение деления и роста клеток [30]. В эксперименте с клетками *S. cerevisiae* данное явление наблюдается при дозах озона, близких к 10^2 пмоль $O_3/10^6$ кл. Дальнейшее усиление стрессорного воздействия приводит к третьей фазе стресса – фазе истощения, что ведет к гибели клеток [4, 30, 31]. На клетках *S. cerevisiae* это наблюдается в диапазоне доз озона 10^3 пмоль $O_3/10^6$ кл и выше (в табл. 1 не показано).

Представляет интерес использовать адаптивный ответ клеток на стресс, вызываемый перед замораживанием, для повышения устойчивости их к факторам замораживания. В этом состоял второй этап данной работы.

Клетки *S. cerevisiae* в физиологическом растворе перед замораживанием обрабатывали озоном в различных дозах и методом проточной цитофлуориметрии регистрировали появление клеток с поврежденными мембранами в общей популяции сразу после обработки озоном без замораживания и после замораживания-отогрева. На рисунке 4 представлены полученные точечные гистограммы клеток *S. cerevisiae*.

Обработка клеток озоном в дозах ниже 240 пмоль $O_3/10^6$ кл не вызывает повреждений мембран в отсутствие замораживания (см. рис. 4).

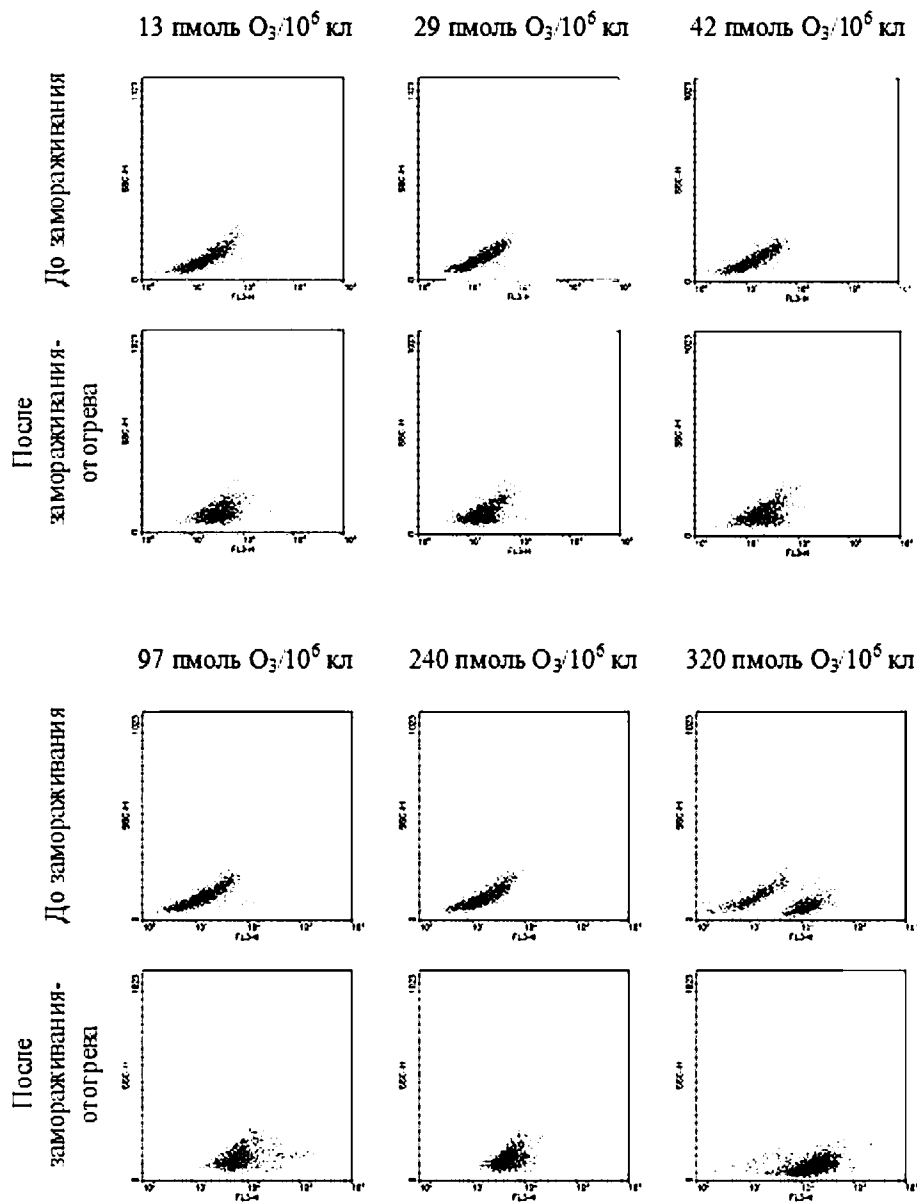


Рис. 4. Точечные гистограммы дрожжей *S. cerevisiae* после обработки озоном в различных дозах

Однако после замораживания-отогрева основная часть мембран клеток, обработанных озоном в дозах 13–22 пмоль $O_3/10^6$ кл, повреждается. Об этом свидетельствует смещение гейта к высоким значениям (до 10^2) флуоресценции FL3-H. При дозах озона выше 240 пмоль $O_3/10^6$ кл наблюдается повреждение мембран уже на этапе обработки клеток озоном, причем замораживание приводит к увеличению количества клеток с поврежденными мембранами (синергизм повреждающего действия озона в высоких дозах и замораживания).

При дозе озона 29–42 пмоль $O_3/10^6$ кл гейт расположен в области значений FL3-H ниже 10^2 , что соответствует неповрежденным клеткам (см. рис. 2). Следовательно, обработка клеток *S. cerevisiae* в дозе 29–42 пмоль $O_3/10^6$ кл перед замораживанием позволяет избежать повреждений их мембран при замораживании до -196°C и последующем отогреве. Мы объясняем этот факт запуском естественных защитных механизмов, как результат перекрестной адаптации при адаптивном ответе клеток на окислительный стресс.

Микроорганизмы, которые сталкиваются с серьезными перепадами температур в их естественной среде обитания, должны быть оснащены клеточными механизмами ответа на эти изменения и адаптации к ним.



При замораживании-отогреве, как и при других видах стрессов в дрожжах *S. cerevisiae* синтезируются стрессовые белки [32] или метаболиты, такие как трегалоза и глицерин [33, 34]. Трегалоза стабилизирует структуру внутриклеточной воды и клеточные мембраны в условиях стресса [33]. Гибкость клеточных мембран считается важным фактором при замораживании-оттаивании, так как мембрана является основной мишенью повреждений при замораживании-оттаивании. Известно, что мембранная гибкость может быть модифицирована путем связывания сахаридов, действующих как криопротекторы [33], или путем изменения фосфолипидов и нейтральных липидных композиций [35]. Адаптивная реакция на слабый окислительный стресс служит пусковым механизмом для включения генетически детерминированных защитных реакций клеток на холодовой стресс.

Выводы

Показано, что в клетках *S. cerevisiae*, обработанных перед замораживанием озоном в дозе 42 пмоль $O_3/10^6$ кл снижается уровень повреждения мембран, что указывает на существование перекрестной адаптации между холодовым и окислительным стрессами. Обработка клеток озоном в дозе 29 пмоль $O_3/10^6$ кл после замораживания-отогрева способствует повышению эффективности восстановления их деления и роста, что объясняется явлением гормезиса.

Список литературы

1. Park J.-I., Grant C.M., Atfield P.V., Dawes I.W. The Freeze-Thaw Stress Response of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Growth Phase Specific and Is Controlled by Nutritional State via the RAS-Cyclic AMP Signal Transduction Pathway // Applied and Environmental microbiology. – 1997. – Pp. 3818–3824.
2. Mager W., Ferreira M. Stress response of yeast // Biochem. J. – 1993. – Vol. 290. – Pp. 1–13.
3. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems // Science. – 1970. – Vol. 168. – Pp. 939–949.
4. Weber M.H., Marahiel M.A. Bacterial cold shock responses // Sci. Prog. – 2003. – Vol. 86. – Pp. 9–75.
5. Ermolenko D.N., Makhatadze G.I. Bacterial cold-shock proteins // Cell.Mol. Life Sci. – 2002. – Vol. 59. – Pp. 1902–1913.
6. Zhang L., Ohta A., Horiuchi H., Takagi M., Imai R. Multiple mechanisms regulate expression of low temperature responsive (LOT) genes in *Saccharomyces cerevisiae* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – Vol. 283. – Pp. 531–535.
7. Phadtare S., Yamanaka K., Inouye M. The cold shock response. In: Storz G., Hengge-Aronis R., editors. Bacterial stress responses // ASM Press, Washington, D.C. – 2000. – Pp. 33–45.
8. Inouye M., Phadtare S. Cold shock response and adaptation at near-freezing temperature in microorganisms // Sci STKE. – 2004. – Vol. 2004, №237. – Pp 26–29.
9. Davidson J.F., Whyte B., Bissinger P.H., Schiestl R.H. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae* // Proc Natl Acad Sci USA. – 1996. – Vol. 93. – Pp. 5116–5121.
10. 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. – Pp. 501–507.
11. Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts // Microbiol. Mol. Bio Rev. – 2002. – Vol. 66. – Pp. 300–372.
12. Adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to hyperosmotic and oxidative stress / F. Lu, Y. Wang, D. Bai, L. Du // Process Biochemistry. – 2005. – Vol. 40. – Pp. 3614–3618.
13. Aguilera J., Randez-Gil F., Prieto J.A. Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old Mechanisms // FEMS Microbiol. – 2007. – Vol. 31 – Pp. 327–341.
14. Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress / A. Winkler, C. Arkind, C.P. Mattison et al. // Eukaryot. Cell. – 2002. – Vol. 1. – Pp. 163–173.
15. Лабинская В.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина. – 1978. 394с.
16. Юдин И.П. Современные подходы к оценке жизнеспособности бактерий с акцентом на феномене некультурабельности // Труды института микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины. – 2007. – №3. – С.8–15.
17. Зинченко В.Д., Голота В.И., Сухомлин Е.А. Лабораторное оборудование для применения озоновых технологий в биологии и медицине // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16; №2. – С. 68–72.
18. Лунин В.В., Попович М.П., Ткаченко С.Н. Физическая химия озона. – М.: Изд-во МГУ, 1998 – 480 с.
19. Хайдуков С.В. Многоцветный анализ в проточной цитометрии для медико-биологических исследований: Дис...д-ра биол. наук. – СПб, 2008 – 52 с.
20. Kruth H.S. Flow cytometry: rapid biochemical analysis of single cells // Analytical Biochemistry. – 1982. – Vol. 125; № 2. – Pp. 225–242.
21. Cabrita E., Martinez F., Real M. The use of flow cytometry to assess membrane stability in fresh and cryopreserved trout spermatozoa // CryoLetters. – 2001. – Vol. 22; № 4. – Pp. 263–272.
22. Сквараиновский краситель Square-460 как маркер повреждения мембран при криовоздействиях / И.П. Горячая, Т.С. Дюбко, В.Д. Зинченко и др. // Проблемы криобиологии. – 2013. – Т. 23; № 4. – С. 347–350.



23. Селье Г. На уровне целого организма. -М.: Наука. 1972. – 121 с.
24. Селье Г. Концепция стресса как мы ее представляем в 1976 г. // Новое о гормонах и механизме их действия. – Киев: Наукова думка, 1977. - С. 27–51.
25. Calabrese E.J. Hormesis: principles and applications for pharmacology and toxicology // Am. J. Pharm. Toxicol. – 2008. – Vol. 3; № 1. – Pp. 56–68.
26. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2006. – Vol. 216; № 3. – Pp. 493–504.
27. Mattson M.P. Hormesis Defined// Ageing. Res. Rev. – 2008. – Vol. 7. – № 1. – Pp. 1–7.
28. Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress / J. Mathers, J.A. Fraser, M. McMahon et al. // Biochem Soc Symp. – 2004. – Vol. 71; № 1. – Pp. 157–176.
29. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol / J.C. Young, V.R. Agashe, K. Siegers, F.U. Hartl // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2004. – Vol. 5. – Pp. 781–791.
30. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! / W.A. Pryor, K.N. Houk, C.S. Foote et al. // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. – 2006. – Vol. 291; № 3. – P. 491–511.
31. Farrugia G., Balzan R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast // Front Oncol. – 2012. – Vol. 2 (64). Available at: <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fonc.2012.00064/full>
32. Do heat shock proteins provide protection against freezing? / Y. Komatsu, S.C. Kaul, H. Iwahashi, K. Obuchi // FEMS Microbiol. Lett. - 1990. – Vol. 72. – Pp. 159–162.
33. The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane structure in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cell / H. Iwahashi, K. Obuchi, S. Fujii, Y. Komatsu // Mol. Biol. – 1995. – Vol. 41. – Pp. 763–769.
34. 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. – Pp. 687–694.
35. Murakami Y., Yokoigawa K., Kawai H. Lipid composition of freeze-tolerant yeast, *Torulaspora delbrueckii*, and its freeze-sensitive mutant // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1995. – Vol. 44. – Pp. 167–171.

RESISTANCE OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* YEAST MEMBRANES TO COLD EXPOSURES AT OXIDATIVE STRESS

I.P. Goriacha,
V.D. Zinchenko,
I.A. Buryak

*Institute for Problems of Cryobiology
& Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of Ukraine;
23 Pereyaslavskaya St, Kharkov,
61015, Ukraine*

E-mail: irynagor@gmail.com

Integrity of cell membranes for *Saccharomyces cerevisiae* after freeze-thawing cycle (-196C+30C) treated with ozone at different doses prior to freezing as well as the viability of cells treated with ozone after freeze-thawing were studied. After freeze-thawing of cells in physiological solution with no ozone treatment the membranes were injured in 60% of cells. In the samples of cells treated with ozone in a dose of 29 pmol O₃/10⁶cells prior to freezing the number of cells with non-damaged membranes is close to 90% that is explained by the existence of cross-adaptation between oxidative stress and that caused by freeze-thawing. The treatment of cells with ozone in a dose of 29 pmol O₃/10⁶cells after freeze-thawing contributes to increased indices of cell viability (number of CFU/ml) by 30–50% if compared with ozone-non-treated cells. This effect is explained by hormesis, stimulation of living system with outer irritant, the intensity of which is insufficient for manifesting harmful effects.

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