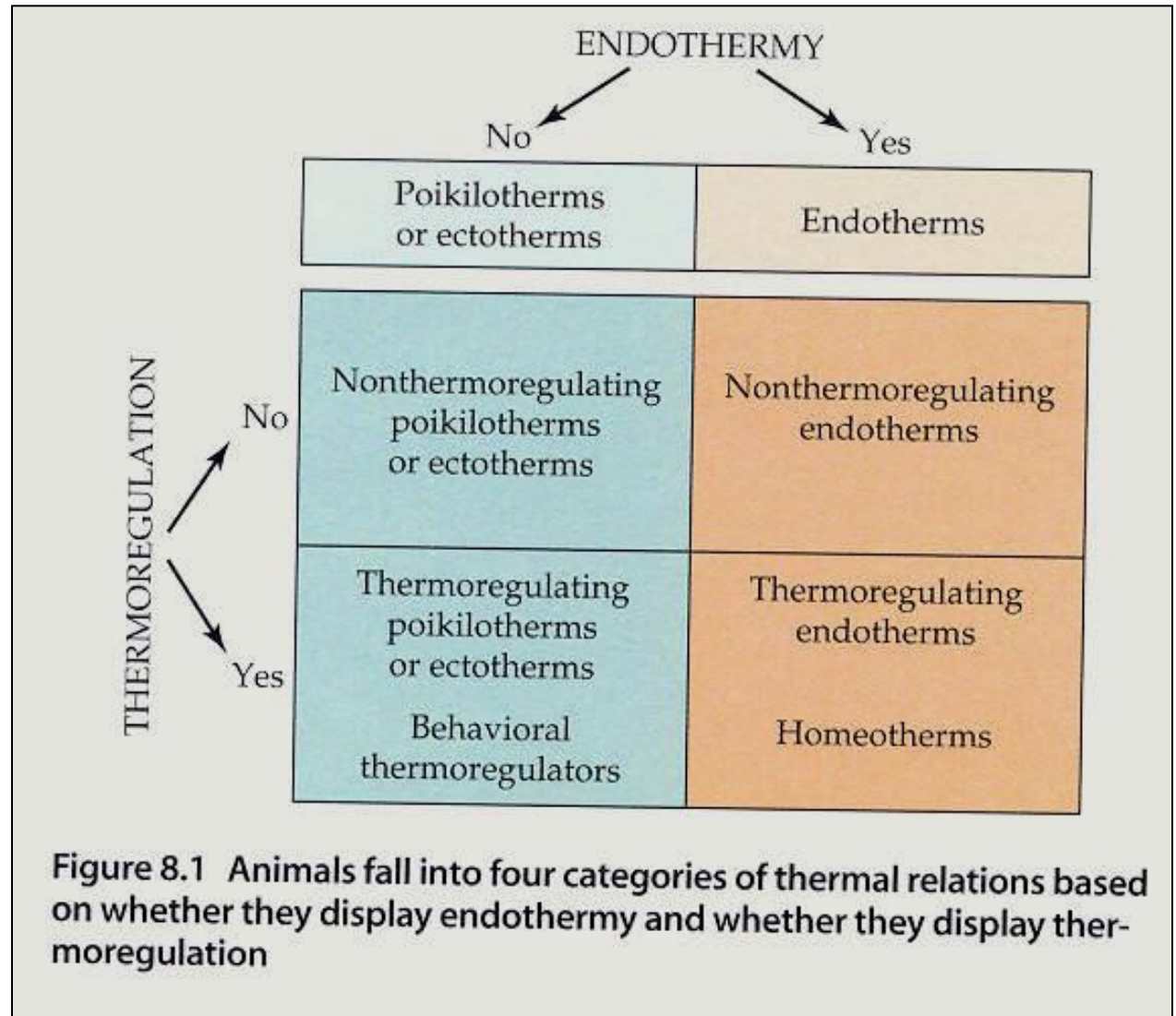


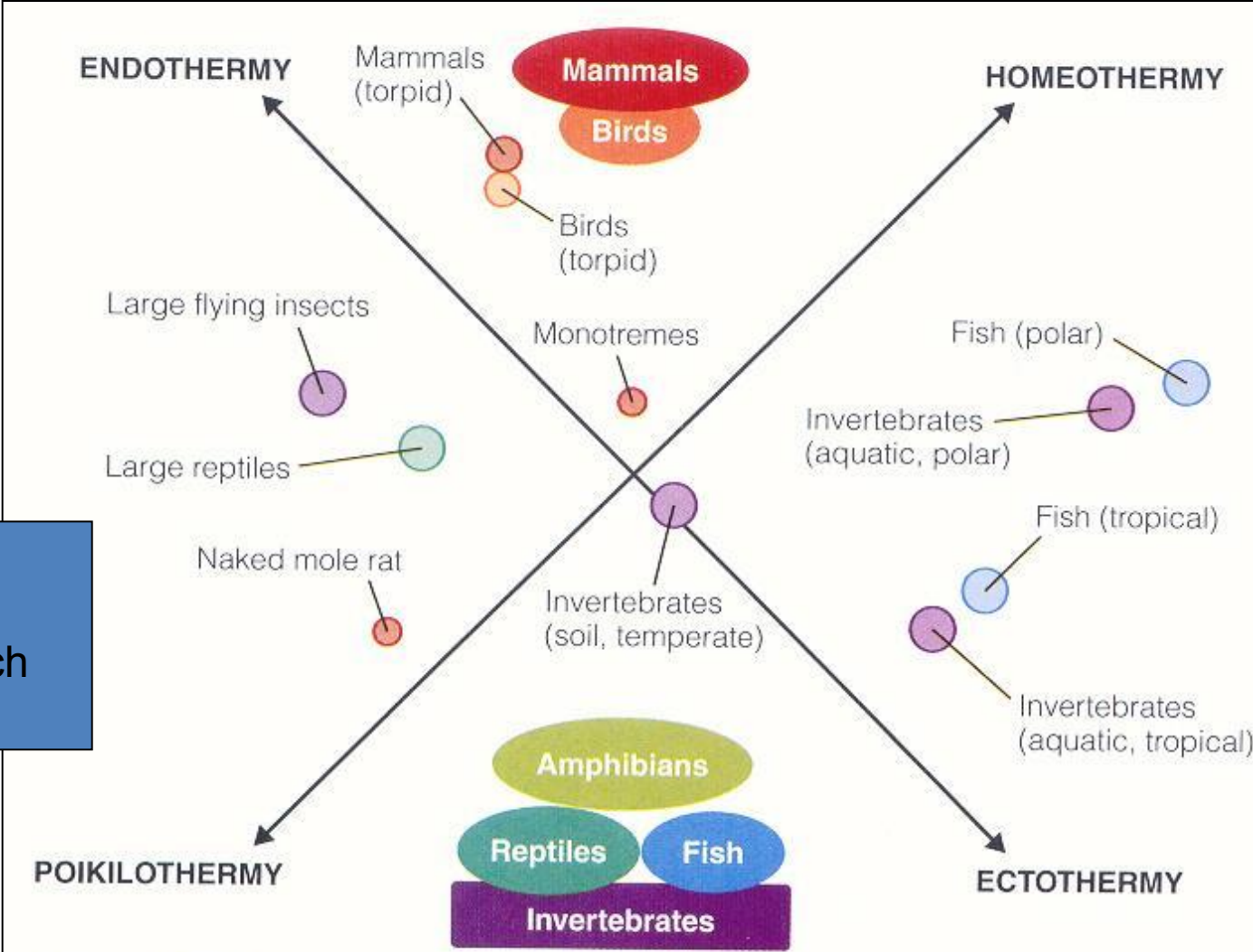
# Termální fyziologie

Teplota jako zásadní faktor prostředí a postavení bezobratlých při termoregulaci.

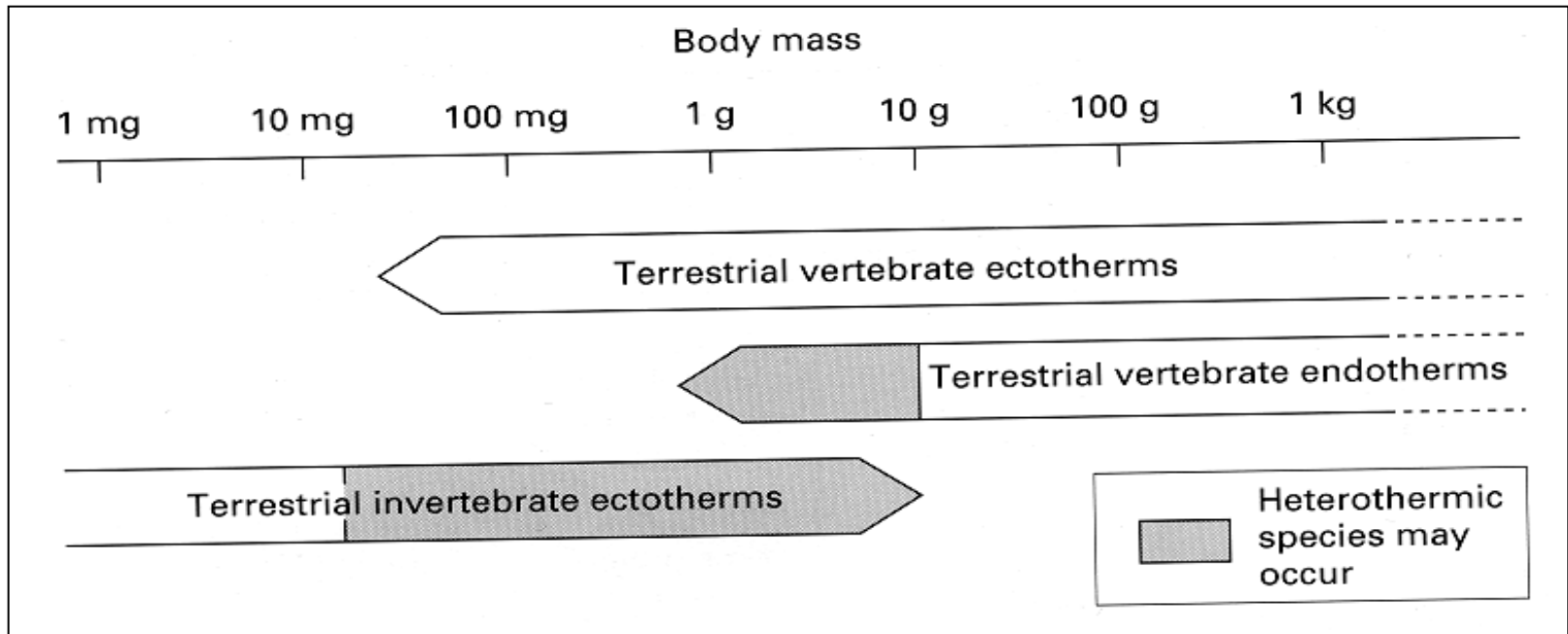
Rozmezí teplot, v němž žijí různé organismy na Zemi je velmi široké – od -80 st.C. po teploty nad 100 st.C. Podstatné je také časové kolísání teplot.



Teplota jako zásadní faktor prostředí a postavení bezobratlých při termoregulaci.



**Figure 13.6 Thermal strategies** Most animals can be classified as homeotherm or poikilotherm, or alternately, ectotherm or endotherm. This figure illustrates the many species whose thermal strategies combine elements of multiple strategies. For example, monotremes are less homeothermic and less endothermic than other mammals.



Jen velcí si mohou dovolit termoregulovat.  
 Behaviorální termoregulace je ale dostupná i malým.  
 Termoregulace jako evoluční krok k volným nikám.

## Teplota a metabolismus u ektotermů a endotermů.

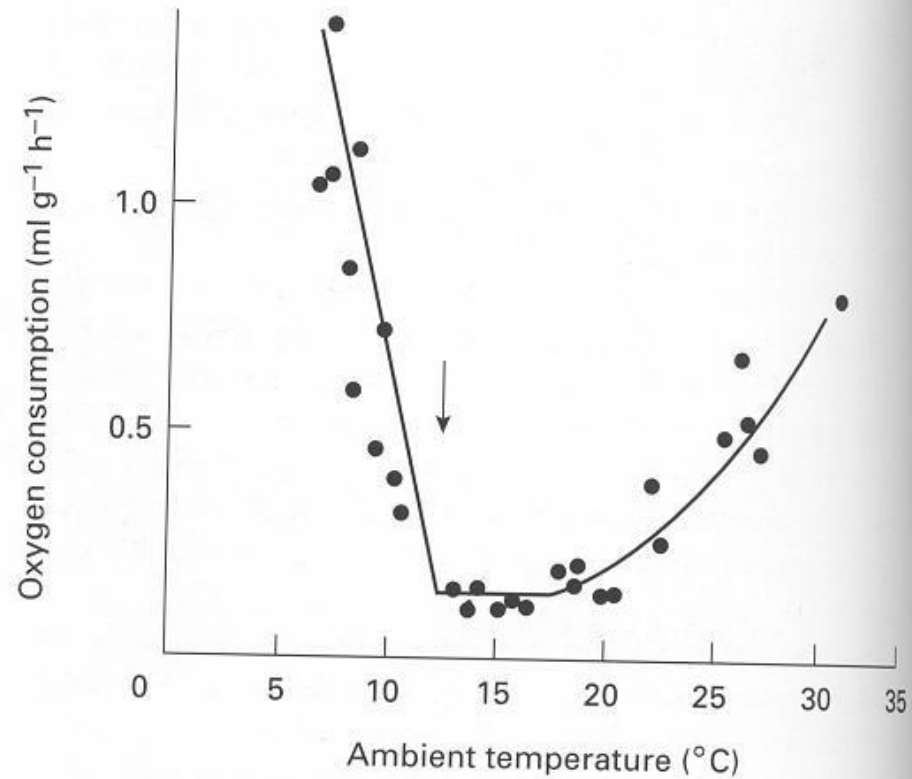
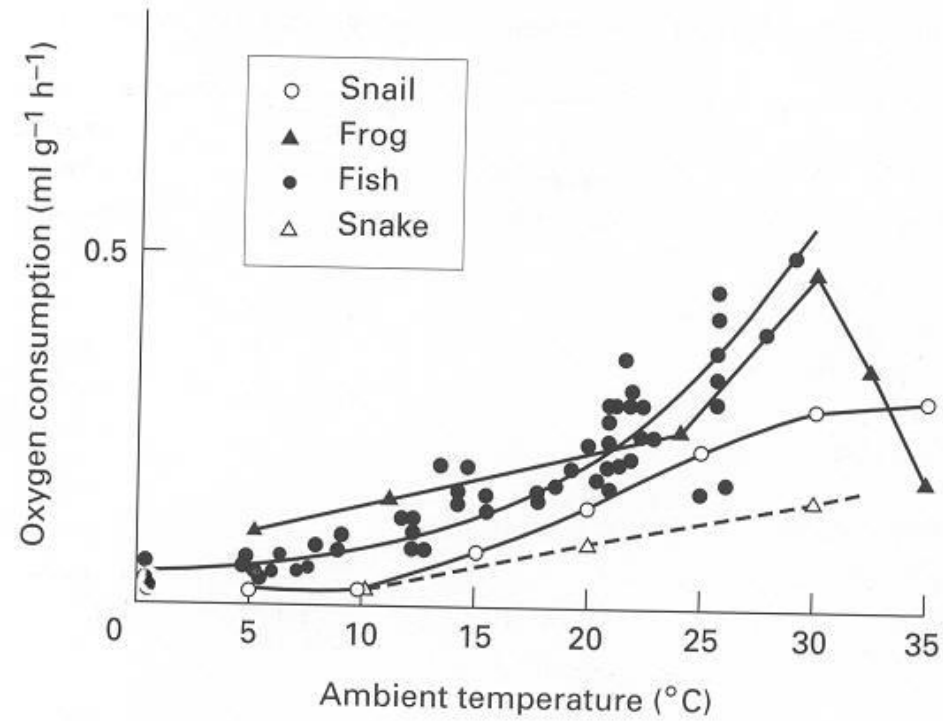
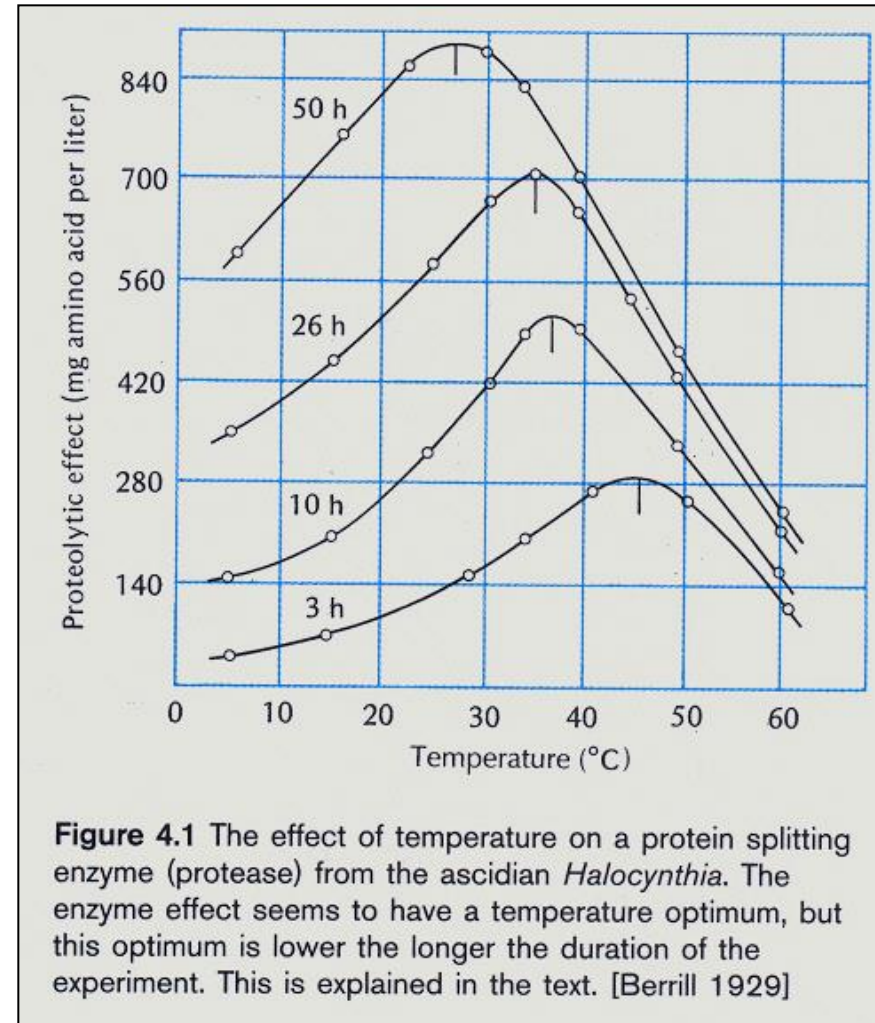


Fig. 6.17 Relationship between ambient temperature and metabolic

Mění se aktivita enzymů, vlastnosti membrán (gel x tekutost).

Protože zejména slabé vazby jsou teplotou ovlivněny, mění se vlastnosti proteinů a lipidů. H můstky a van der W. síly s teplotou slábnou, hydrofobní interakce (vazby) sílí. Záleží tedy na relativní důležitosti a zastoupení vazeb.

Teplotní optimum proteázy sumky a čas trvání experimentu. Při ochlazení se adaptuje – roste aktivita, a optimum se posouvá do nižších teplot.



# Adaptace, Aklimace

Existují velké rozdíly v teplotách, jimž jsou různé druhy přizpůsobeny. Např. *Thermobia* (šupinušky, Apterygota) jsou aktivní v rozmezí 12 - 50 °C. *Grylloblatta*, cvrčovec, který žije ve vysokých horách Severní Ameriky, je aktivní při teplotě -2.5 - 11.5 °C, teplotu 20 °C. již nesnese.

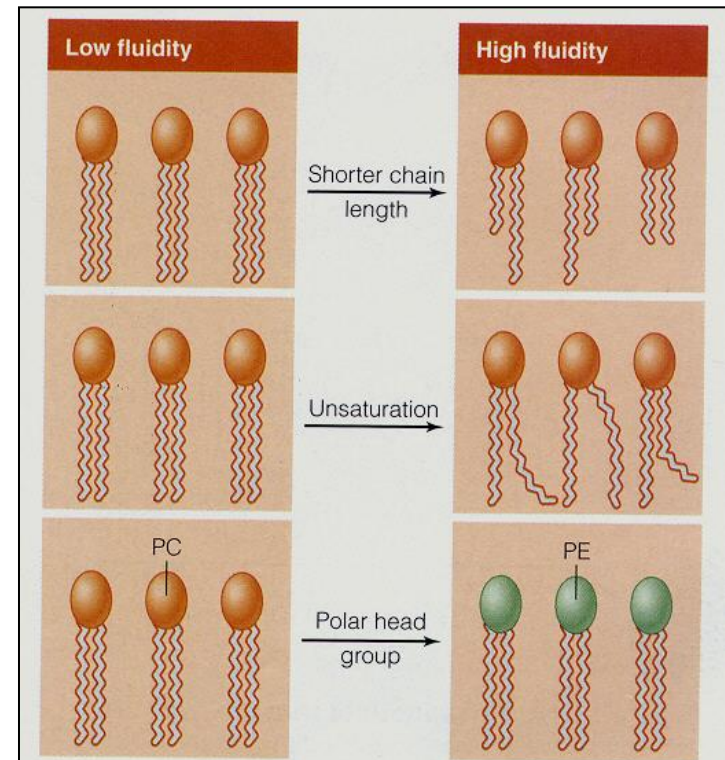
I u téhož jedince může dojít ke změně odolnosti vůči abnormálním teplotám v důsledku adaptací. Např. šváb adaptovaný na teplotu 36°C upadá do stavu strnulosti (chladový šok) při snížení teploty na 9.5°C. Byl-li však chován alespoň 24 hod při teplotě 15 °C., pak dojde ke chladovému šoku až při 2°C.

## A. Kontrola fluidity membrán

- Délka řetězce
  - Saturace
  - Fosfolipidová třída  
(fosfatidilcholin x fosfatidylethanolamin)
4. Cholesterol – udržuje fluiditu za nízkých T

## B. Syntéza ochranných látek (teplo i chlad)

## C. Změny spektra izoenzymů



**Figure 13.12 Phospholipid properties and membrane fluidity** Cells change the fluidity of membranes by altering the composition of membrane phospholipids.

## **Vlivy vysokých teplot:**

Letálním limitem je denaturace a koagulace proteinů – inaktivace enzymů.

Rozpad navazujících enzymatických drah s různými teplotními optimy - smrt.

Některé případy života při teplotách kolem 130° C jsou záhadou.

## Termoregulující hmyz.

Matabolismus včel (včetně frekvence křídel) klesá s rostoucí teplotou.



As the air temperature falls, incubating queen bumblebees thermoregulate by increasing their metabolic rate and thus the rate at which they generate heat.

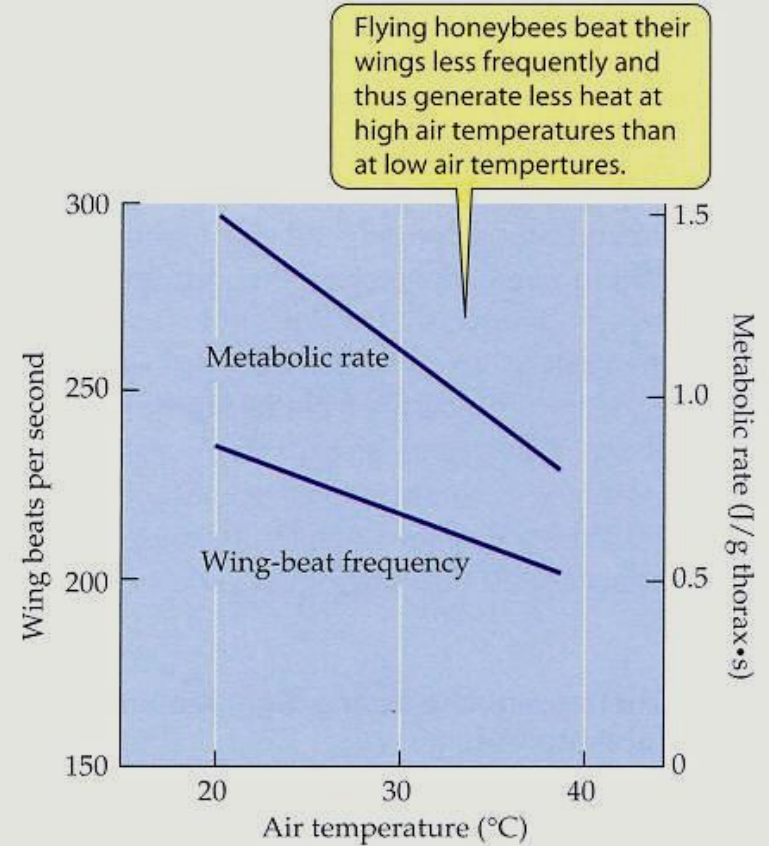
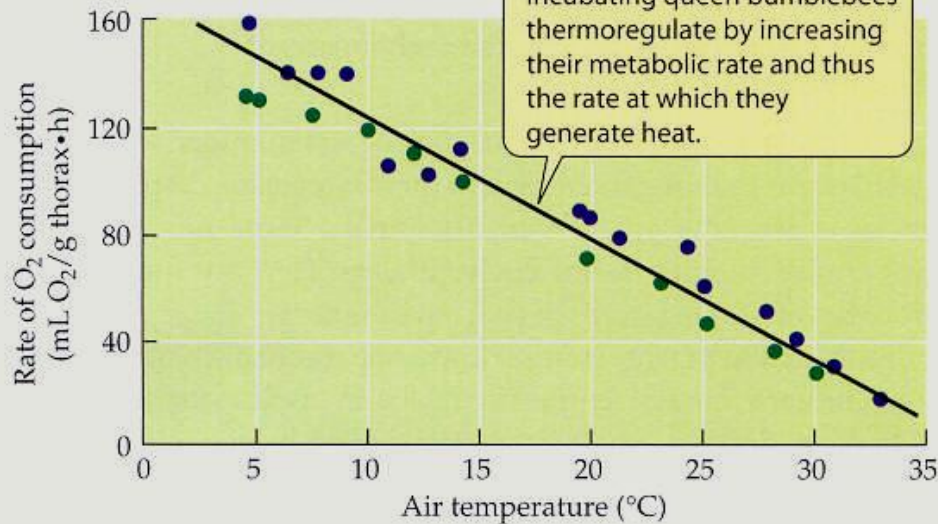


Figure 8.44 The effect of air temperature on wing-beat frequency and metabolic rate in flying honeybees (*Apis mellifera*). The lines are average-response lines, based on hundreds of individual measurements.

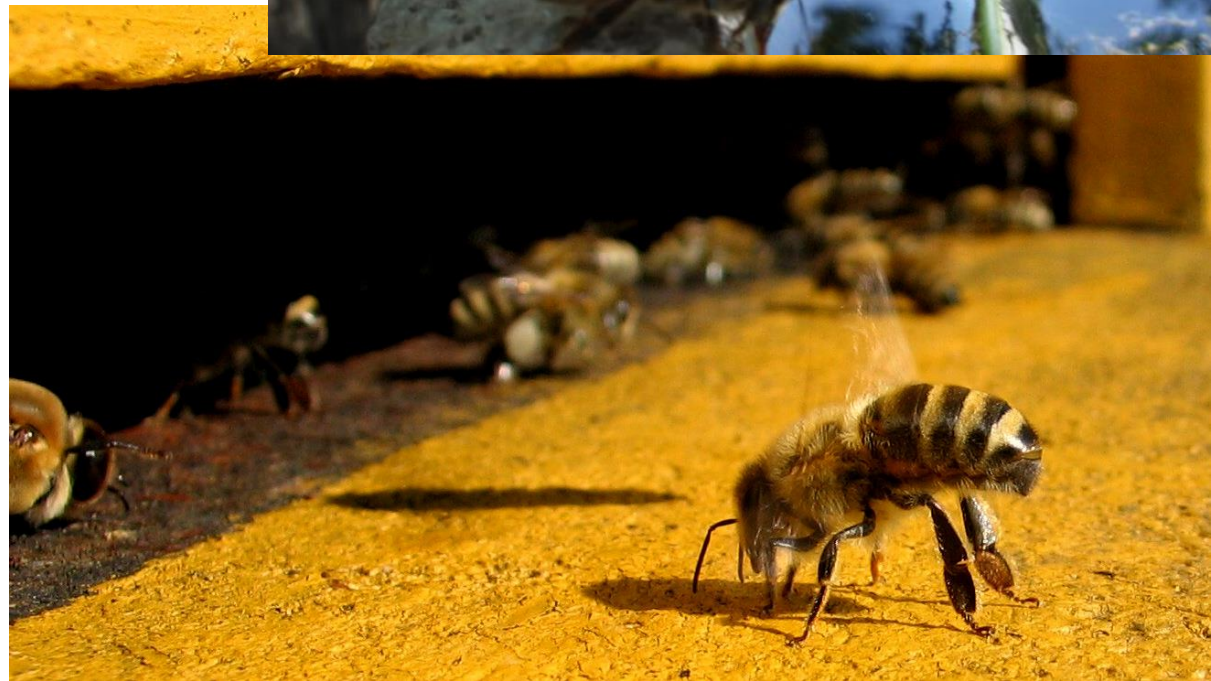


## Termoregulující hmyz.

Chlazení odpařováním vody – kapička u úst. Stojí na česně a větrají úl, kde se odpařuje voda z medu a tak se ochlazuje.

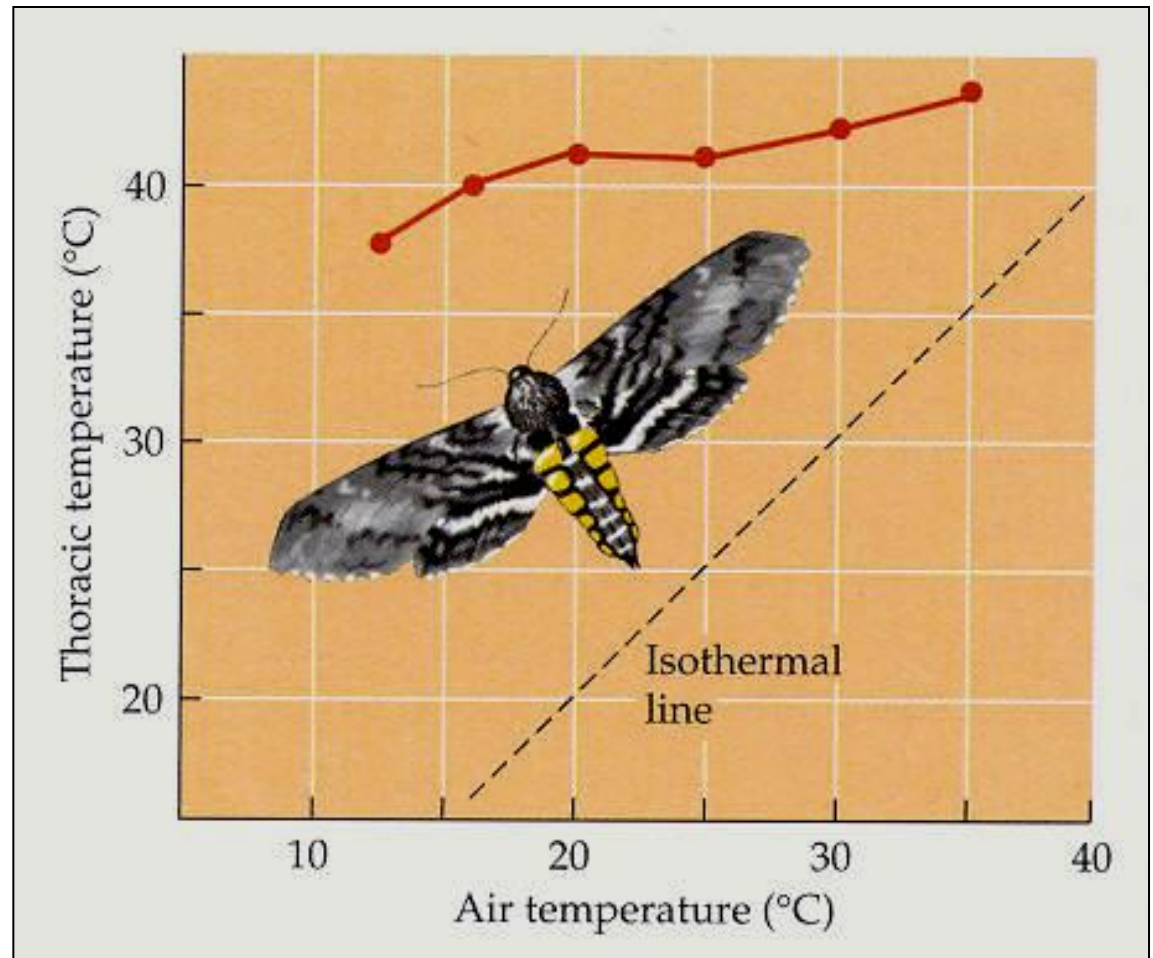
Včely se zahřívají svalovou činností – bez viditelných vibrací křídla jsou kutikulární záložkou zaseknuta v jedné poloze.

Když zahřívají plod, vlezou si do prázdných buněk mezi obsazenými nebo tisknou hrud' k víčku.



## Termoregulující hmyz.

Velcí lišajové (*Sphingidae*) nemohou vzlétnout bez zahřátí svaloviny třesem a vibracemi křídel dokud teplota nevystoupí nad 30 °C. Třes vzniká současným zatínáním opozičních svalů. Současně s třesem srdeční hřbetní céva se kontrahuje jen pomalu a slabě a proudění hemolymfy je tak omezeno v podstatě pouze na hrudní svalovinu. Pak vzlétnou a během letu teplota dosahuje až nad 40 °C. Frekvence a intenzita stahů hřbetní cévy se zvyšují a teplo je odváděno i do zadečku, což má zase naopak význam pro prevenci přehřátí. Na regulaci směru a intenzity proudění se podílí i ventrální diafragma.

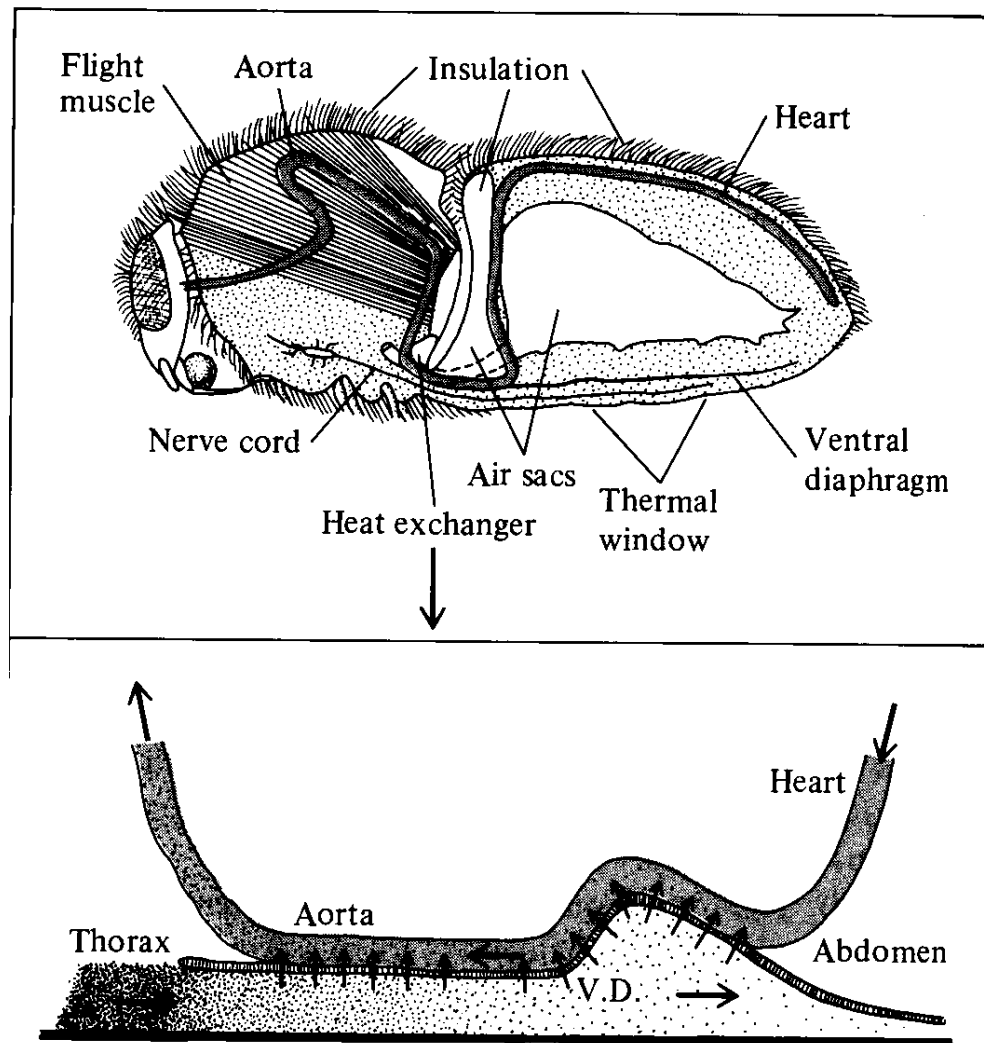


## Termoregulující hmyz. Tepelný výměník lišajů i včel.

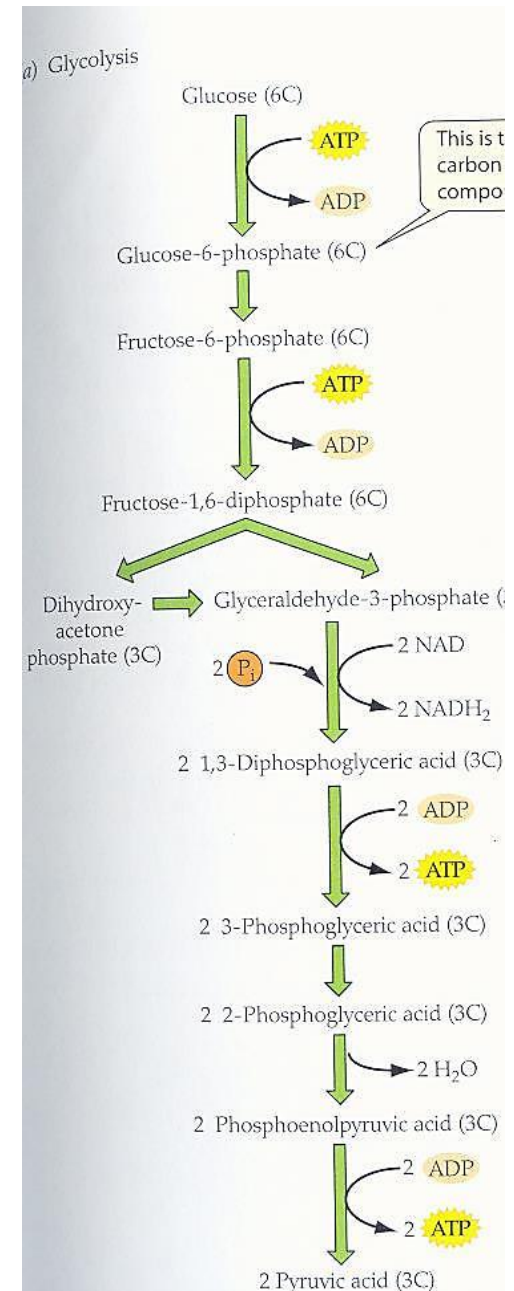
Současně s třesem se srdeční hřbetní céva kontrahuje jen pomalu a slabě a proudění hemolymfy je tak omezeno v podstatě pouze na hrudní svalovinu.

Pak vzlétnou a během letu teplota dosahuje až nad 40 °C. Frekvence a intenzita stahů hřbetní cévy se zvyšují a teplo je odváděno i do zadečku, což má zase naopak význam pro prevenci přehřátí.

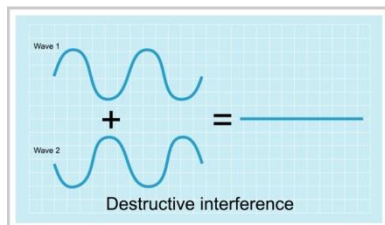
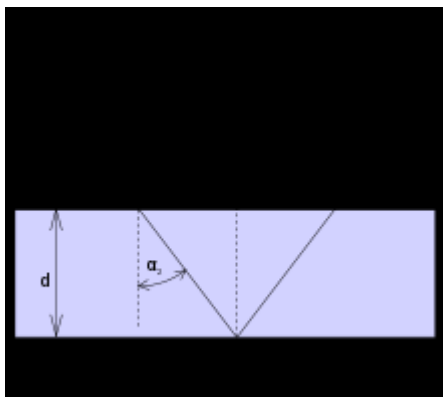
Na regulaci směru a intenzity proudění se podílí i ventrální diafragma.



Jsou i mimosvalové cesty tvoření tepla z chemických vazeb. Čmelák *Bombus affinis* má F-1,6 - fosfatázu asi 40 krát aktivnější než včela. To mu umožňuje intenzivní metabolický cyklus mezi F-6-P a F-1,6-DP za spotřeby ATP, čímž se ovšem generuje teplo a je udržena teplota hrudi. Výsledkem je, že může létat a krmít se za mnohem nižších teplot, než to mohou včely.

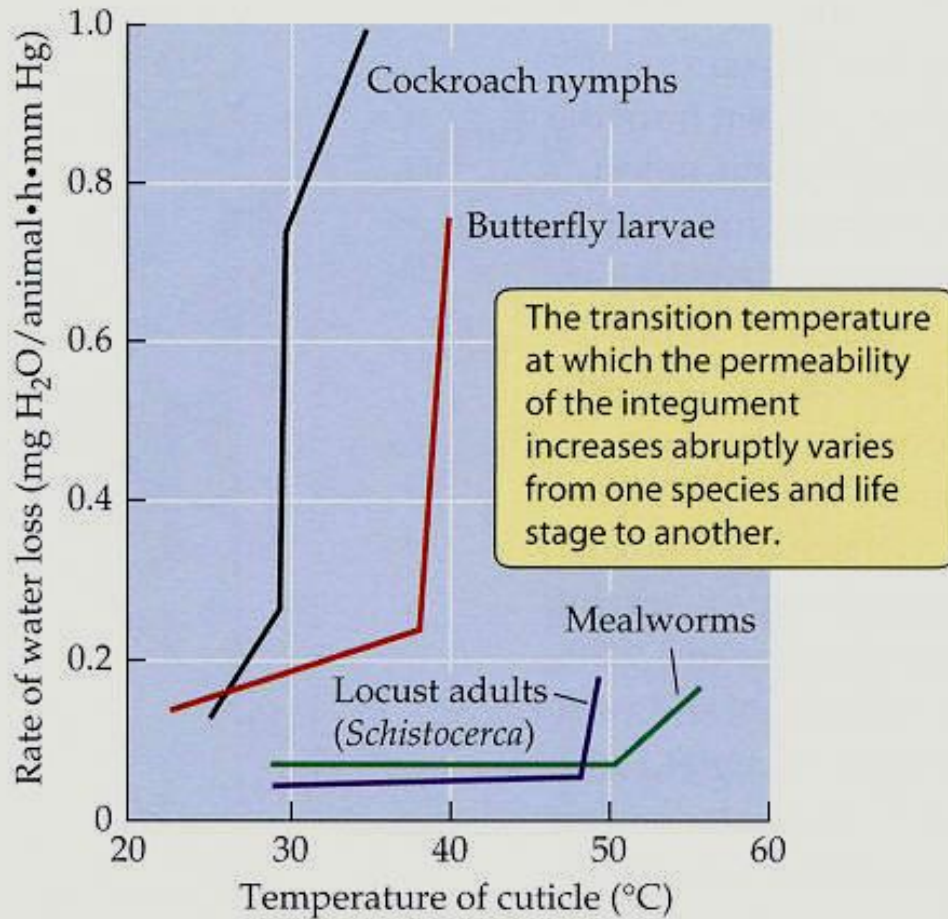


Šupiny a chlupy mūr a včel i jiná izolační zařízení pomáhají udržovat teplotu těla za letu. Mnoho druhů hmyzu využívá k zahřátí těla energie slunečního svitu. Nepatrné změny v tloušťce vrstev šupin mohou velmi významně ovlivnit, zda je sluneční tepelná energie odražena nebo naopak absorbována (interferenční děje) Rozdíly v tloušťce asi 10 nm, přesto jsou zásadní. Je-li tloušťka šupinky rovna asi 1/4 vlnové délky světla, vlny odražené od horního a dolního povrchu jsou posunuty o polovinu fáze, interferují - odečítají se a veškerou energii ve formě tepla odevzdají chitinu šupinky.

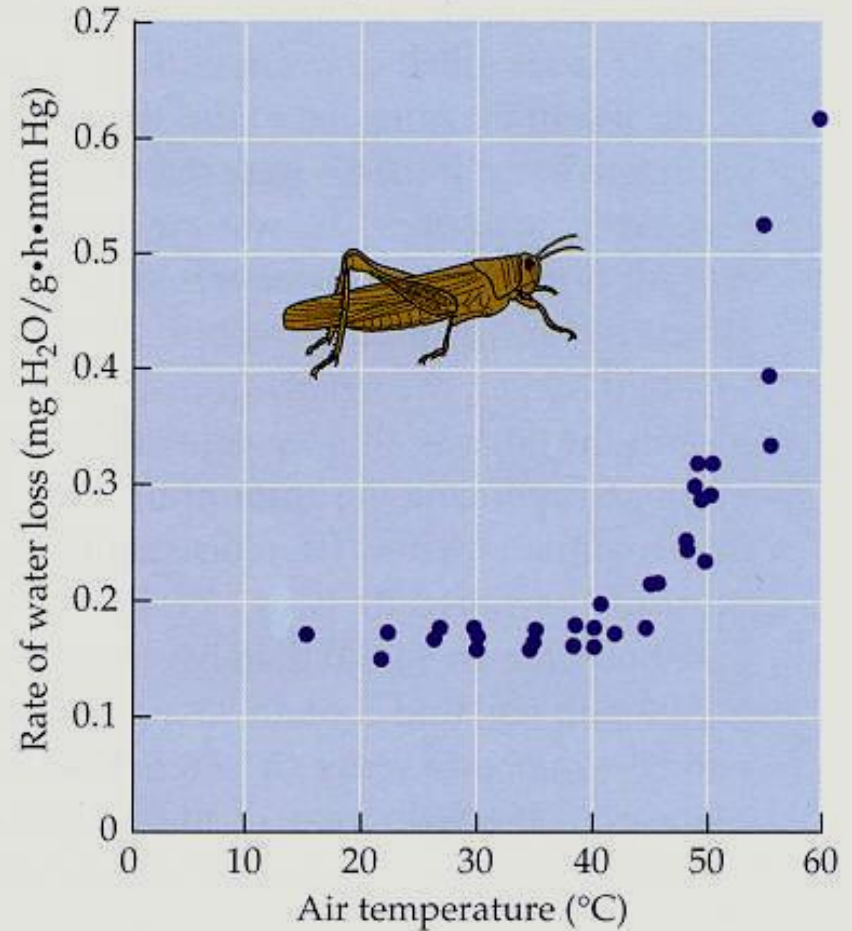


Všeho moc škodí – horní limit teploty pro kutikulu a ztráty vody.

(a) Average responses of four species



(b) Data for adult migratory locusts (*Locusta*)



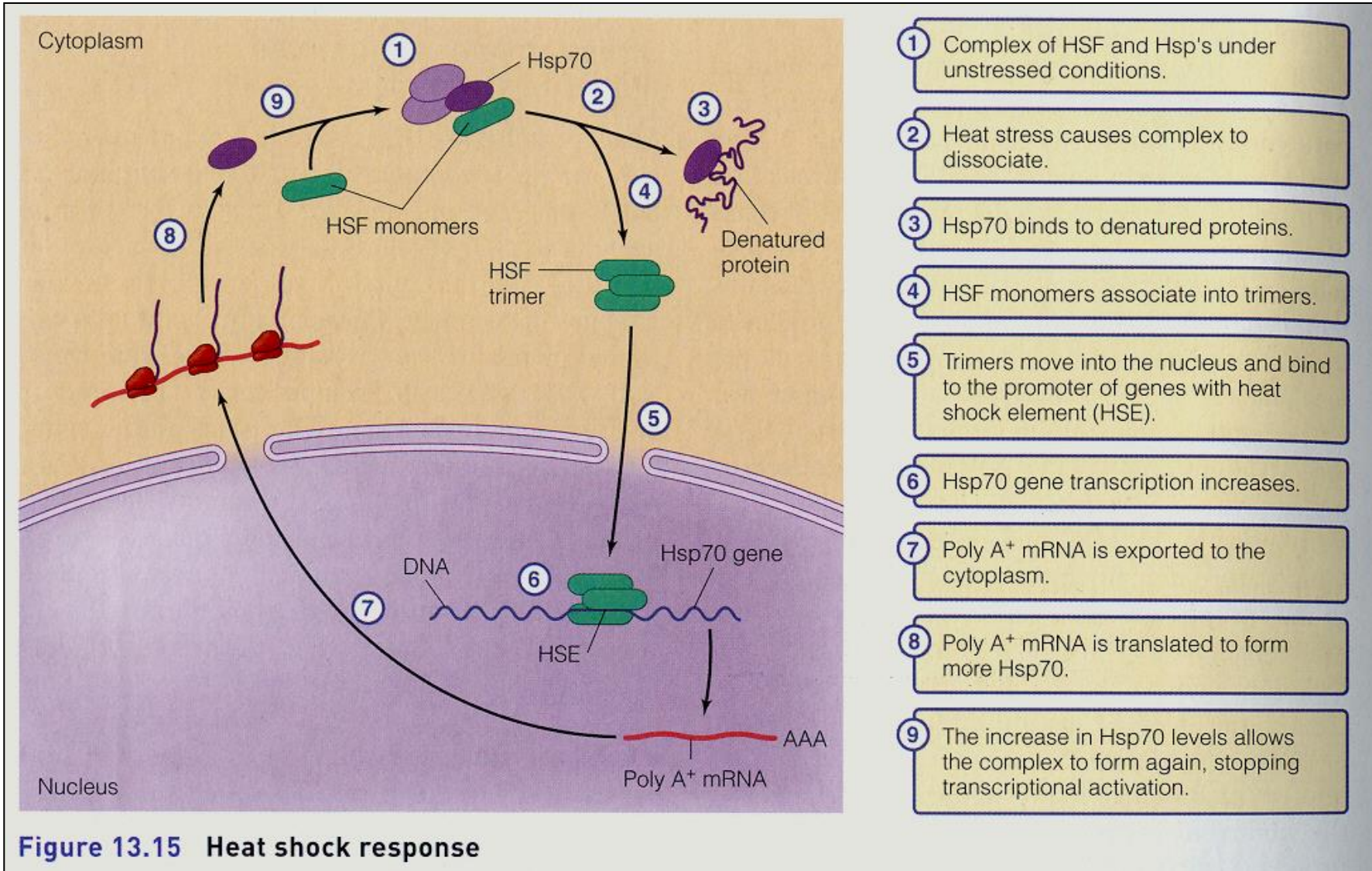
## Vlivy vysokých teplot:

Jestliže jsou poikilotermové krátce vystavení stresující ale neletální vysoké teplotě, rychle syntetizují proteiny zvané **heat shock proteins** nebo stresové proteiny - chaperony. Jsou známy od téměř všech skupin organismů a jsou zřejmě evolučně velmi staré, neboť jejich aminokyselinová sekvence je téměř shodná.

Jsou to proteiny, které užívají energie ATP k tomu, aby opravily terciární strukturu jiných bílkovin poškozeným reverzibilní denaturací teplem. Chaperony jsou strážci, kteří kontrolují a zabezpečují správnou prostorovou strukturu proteinů a brání vzniku nesprávných vazeb. Chaperony [hsp60](#) dokonce umí špatně sbalené proteiny opět rozbalit.

Např. u měkkýšů skalnatých pobřežních pásem, kde teplota značně kolísá na slunci a ve vodě, je syntéza těchto proteinů běžná.

# Heat shock proteins - chaperons



**Figure 13.15 Heat shock response**



## Vlivy nízkých teplot:

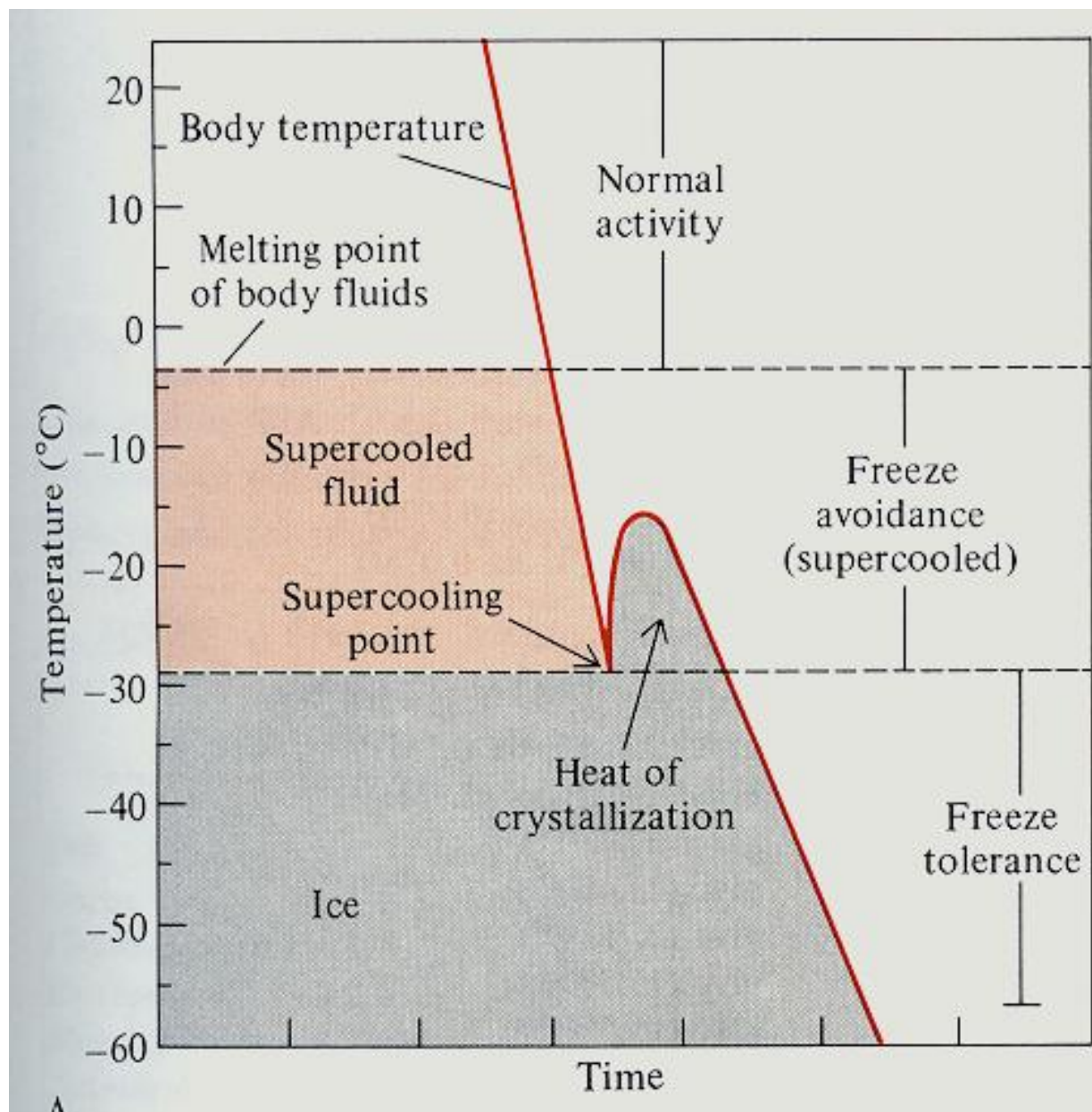
Vícesložkové proteiny se rozdělí na jednotlivé části již za teplot kolem 0 °C a nižší teploty mohou způsobit nevratnou denaturaci neboli přechod z funkčního do nefunkčního prostorového uspořádání.

Rovněž biologické membrány přecházejí z funkční fluidní fáze do nefunkční fáze gelové.

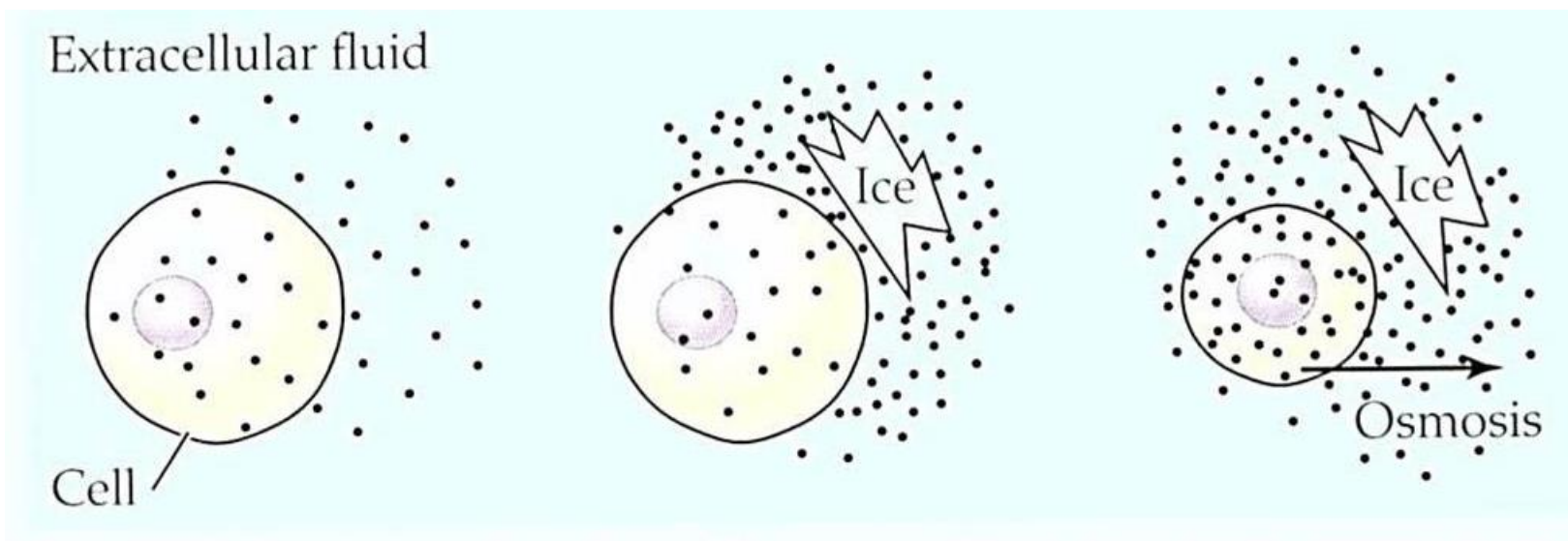
Tvorba ledových krystalů uvnitř buněk je letální.

Tři stavy vody a tomu odpovídající strategie přežití při chladu.

Tělní voda začíná mrznout někde mezi  $-0,5$  a  $-38$  °C. Jakmile se zformuje zárodečný krystal, poslouží jako nukleační jádro, k němuž se rychle připojují další molekuly vody. Projeví se to náhlým uvolněním skupenského tepla, jež můžeme snadno měřit jako reálný bod mrznutí (neboli bod podchlazení)



Různé druhy hmyzu přezimují v centrální Aljašce pod odlupující se kůrou odumírajících smrků a osik, plně vystaveni teplotám klesajícím až na  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pokud je z organismu odstraněna voda, hlavní problém je vyřešen. Anhydrobiotický organismus přežije téměř všechno, včetně zchlazení na teplotu kapalného helia. Musí se ale umět vyrovnat s hyperosmotickým prostředím, nahromaděním reaktivních radikálů.



Četné druhy hmyzu však přezimují v plně hydratovaném stavu. Takže se musí nějak vyrovnat s fázovým přechodem vody.

**Existují dvě možnosti jak to učinit, a hmyz využívá obě.** Buď je možné oddálit tvorbu ledu a udržet vodu v kapalném podchlazeném stavu, nebo tolerovat promrznutí, či je dokonce řízeně zahájit při poměrně vysokých teplotách.

Některé druhy hmyzu pak posunuly podchlazovací schopnost až za hranici teoretických limitů, téměř na  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . I za těchto teplot v nich nalézáme kapalnou vodu a žádný led. Jak je to možné?

1. jde o velmi malý objem, v němž se silně uplatňují **kapilární vlivy** při interakci vody s povrchy membrán a makromolekul.
2. metabolismus hmyzu produkuje ohromující množství **kryoprotektivních** látek, *etylenglykol* u lýkožrouta *Ips acuminatus*. Běžnějším kryoprotektantem hmyzí říše je *glycerol* (v koncentracích až 5000 mM) a dále různé vícesložkové směsi, obsahující kromě glycerolu jednoduché cukry a od nich odvozené polyoly.
3. biosyntéza speciálních proteinů (**anti-freeze proteins**, AFPs). Ty dokážou „obalit“ zárodečný krystal ledu a zabránit mu v dalším růstu. Funkčně podobné proteiny najdeme také u antarktických ryb.
4. Je potřeba se **zbavit nukleátorů** ledu, například vyprázdnit střevo a odstranit nukleační bakterie.

## Hmyzí kryoprotektanty

Hmyz přezimující v podchlazeném stavu v mírném pásmu velmi často hromadí směsí cukrů a polyolů (řádově stovky miliosmolů na kg). Takové množství nijak významně nesníží bod podchlazení. Přesto zvýšená koncentrace těchto látek většinou dobře koreluje se schopností přežít v chladu. V naší laboratoři jsme prokázali, že i malé množství kryoprotektantů může zlepšit odolnost vůči chladu, avšak jiným způsobem. Nesnižuje bod podchlazení vody, ale patrně chrání funkční prostorové uspořádání proteinů a biologických membrán.

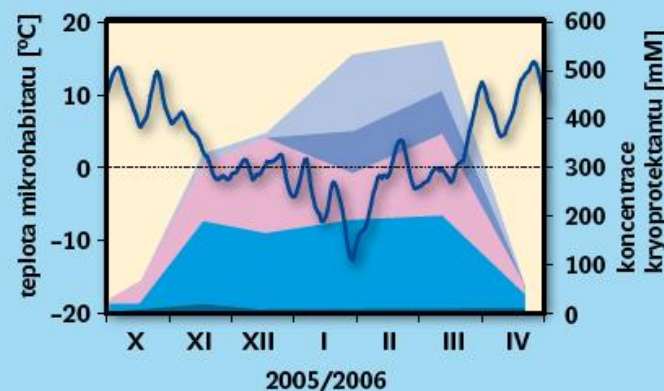
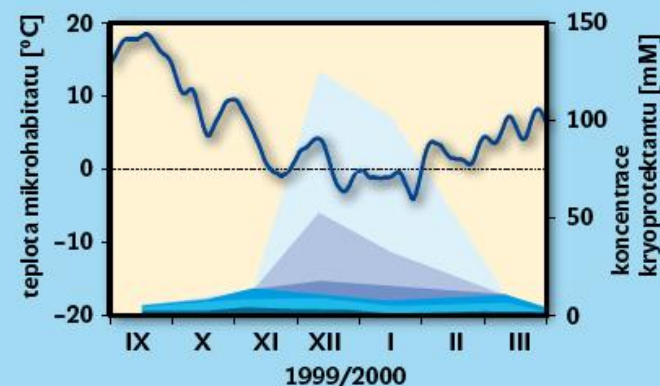


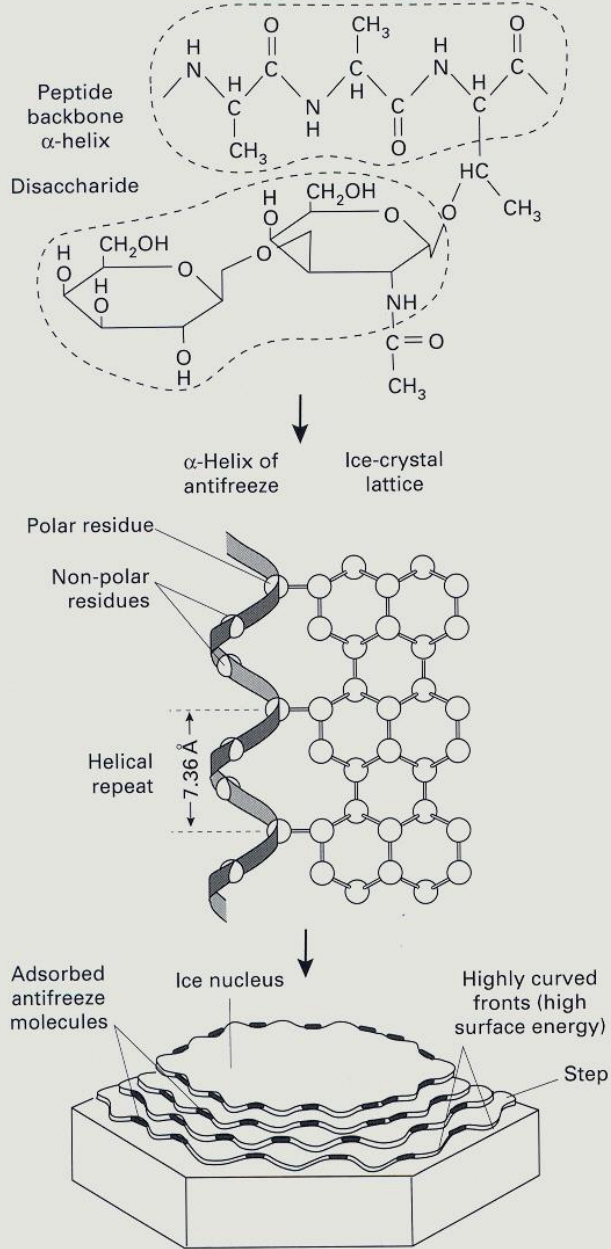
**Pyrrhocoris apterus**



**Ips typographus**

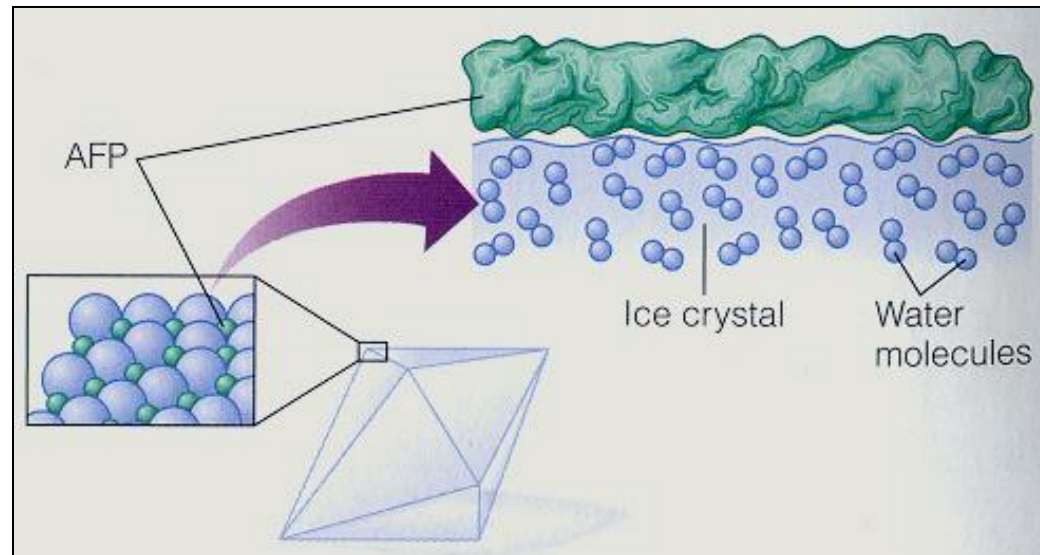
Dynamika vícesložkových kryoprotektantů u lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*), jehož dospělce přezimuje v lýku napadených smrků, a ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*), která přečkává zimu v opadance pod lipami. Teplota mikroprostředí závisí na vystavení výkyvům počasí. Zatímco pod kůrou stojících smrků je zima, v opadance může být poměrně teplo, zvláště pod sněhovou pokrývkou. Snímky © Vladimír Košťál (ploštice) a František Weyda (lýkožrout).





**Fig. 8.13** The repeating structure of glycopeptide antifreezes; and a model of how this may allow adsorption to ice crystals, preventing growth at the sites of attachment and forcing intermediate sites to grow out into a series of curved ice fronts of high surface energy which require lower temperatures for further growth.

Antifrizy zabraňují růstu ledového krystalu.



**Figure 13.16 Antifreeze proteins** Antifreeze proteins bind to the surface of ice crystals to prevent their growth. They bind along the face of the ice crystal, where the protein forms weak bonds with water molecules immobilized in the ice crystal. Because ice growth is very orderly, the presence of the bound protein prevents ice crystal growth. [Source: Modified from Davies et al. 2002]

## Druhá strategie – tolerance promrznutí.

Strategie vzácná u obratlovců, kromě několika žab, ale běžná u hmyzu, plžů, mlžů, kroužkovců a hlístů.

Některé druhy hmyzu dosahují úplné kryobiózy při  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Důležité je zmrznout včas a pomalu. Led může být tolerován pouze extracelulárně, i tak jsou buňky vystaveny osmotickému i mechanickému stresu.

Mušky druhu *Chymomyza costata* obývají sever Evropy, Asie a Ameriky a žijí i v České republice. Jejich larvy přezimují v dormantním stavu pod kůrou padlých stromů. Během přezimování jsou schopny se podchlazovat, ale přežijí i promrznutí. Jejich larvy naplňují kryogenický sen. Přestože mají plně vyvinuté orgány, dokážeme je postupně zchladit až na teplotu kapalného dusíku, a to v plně hydratovaném stavu. A larvy to přežijí! Podmínkou jejich úspěšné kryoprezervace je předchozí pomalá laboratorní aklimatizace. Během ní se mění struktura buněčných membrán a hromadí se potenciální kryoprotektanty a anhydroprotektanty – prolin a trehalóza.

# Kryobióza



Záznam letálního promrzání larvy *Chymomyza costata*. Zhruba 5 mm dlouhá larva je umístěna na podložku o teplotě  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Začne promrzat, až když tělní teplota klesne pod  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Do této teploty zůstává tělní voda v kapalném, podchlazeném stavu. Promrznutí bylo velmi rychlé a odehrálo se mezi 15. a 18. sekundou. Podmínkou pro přežití promrznutí je však zcela jiný způsob mrznutí:

- voda musí zmrznout za relativně vysoké teploty blízko  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  (to je zajištěno přímým kontaktem s okolním ledem);
- následný pokles teplot musí být pomalý (pomalejší než  $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ );
- teprve když tělní teplota dosáhne zhruba  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , může být larva prudce zchlazena až na teplotu kapalného dusíku ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Všechny snímky © František Weyda.



## Obě strategie – srovnání.

**Table 8.5** Freeze tolerance and freeze avoidance.

<b>Characteristic</b>	<b>Freeze-avoiders</b>	<b>Freeze-tolerators</b>
Ice formation	Lethal	Extracellular ice tolerated
LCT	-5 to -20°C (rarely -60°C)	-20 to -70°C
Supercooling capacity	High	Low
Supercooling point	Close to LCT	Well above LCT
Ice-nucleating agents	Absent or masked	Present and active (proteins)
Antifreezes	Polyols ± peptides in fish	-
Cryoprotectants	-	Polyols, ± trehalose, ± proline
Occurrence	Many invertebrates	Common in invertebrates
	Some vertebrates, notably polar fish	A few frogs

LCT, lower critical temperature.

# Kryptobióza

Klesá-li teplota, zpomaluje se pohyb částic a s ním všechny biofyzikální děje. Snižuje se energie částic a jejich schopnost vstupovat do biochemických reakcí. Při určité teplotě se tedy život zcela zastaví. Je však možné, aby po následném zvýšení teploty život opět pokračoval? Možnosti cestování prostorem a časem (?).

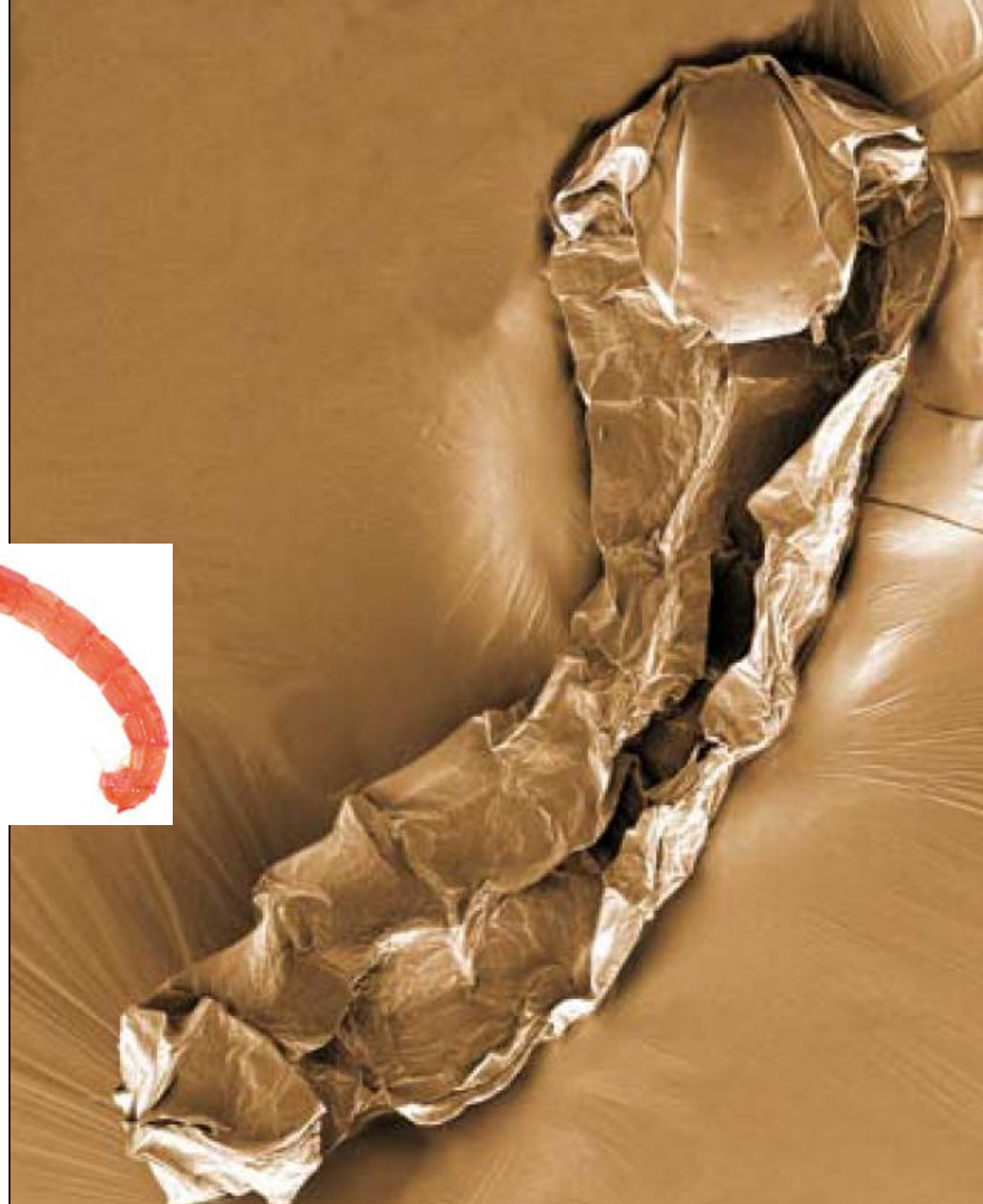


## Anhydrobióza

Vyschnutí – hrozba, ale i  
ochrana před mrazem



hlístice, vířníci, želvušky,  
larva pakomára *Polypedilum*



Pomalým vysušováním klesne obsah vody kolem 2 %, hluboko pod mezní hranicí pro aktivní biochemické procesy. Pokud jsou anhydrobiotické larvy skladovány v suchu, temnu a při pokojové teplotě, vydrží minimálně 19 let i víc.

Anhydrobiotické organismy vydrží ovšem i leccos jiného: zchlazení na teplotu kapalného helia ( $-270\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), zahřátí na teplotu  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , koupel v 100% alkoholu nebo v organických rozpouštědlech, pobyt ve vakuu, vysoké dávky rentgenového záření či tlak 6000 atmosfér.

Tyto extrémní výkony přivedly některé vědce k myšlence testovat schopnost přežití anhydrobiotů v otevřeném vesmíru. Želvušky byly na 10 dnů vystaveny působení vakua, UV radiace a kosmického záření. Přežily! Další test v kosmu s anhydrobitickými pakomáry. Jejich plánovaný měsíční pobyt v otevřeném prostoru se kvůli hurikánu nakonec protáhl na celý rok. Američtí astronauti museli opustit oběžnou dráhu o den dříve a nestihli již odmontovat z vnějšího pláště speciální kontejner s pakomáronauty. Přežili.



Postupná dehydratace aktivuje biosyntézu cukerných látek – u bezobratlých trehalózu. Ta může činit až 20 % celkové hmotnosti těla. U larev pakomárů je to kolem 18 %.

Pozitivní působení trehalózy: Termodynamické vlastnosti systému voda-trehalóza-protein (membrána) znesnadňují denaturaci proteinů (popřípadě změnu vlastností membrány) při vzrůstající koncentraci destabilizujících iontů v roztoku, ze kterého postupně mizí voda.

Pokračující dehydratace vede až ke ztrátám molekul vody přímo z hydratačních obalů proteinů a membrán. V prostředí bez trehalózy by to znamenalo fatální ztrátu funkčního prostorového uspořádání. Proteiny by denaturovaly a agregovaly, membrány by přešly do gelové nebo hexagonální fáze.

Mezi trehalózou a povrchem proteinu či membrány se však vytvoří vodíkové můstky, jež nahradí chybějící molekuly vody.

Koncentrovaný roztok trehalózy je navíc silně viskózní a může přecházet až do amorfni sklovité, syropovité struktury. Vitrifikace užívaná při kryoprezervaci. Biochemické procesy se zastavují, volný prostor po molekulách vody vyplňuje trehalóza.

Zdá se, že vlastnosti velmi podobné trehalóze mají i některé **proteiny**. Nález LEA proteinů u vysychajících hlístic a vířníků potvrdil jejich rozšíření i mezi živočichy. LEA proteiny jsou poměrně malé a silně hydrofilní. Mohou proto vázat ionty koncentrující se ve vysychající buňce, zvyšovat viskozitu prostředí a podporovat přechod do skelné fáze. Interagují rovněž s povrchem proteinů a membrán a konzervují jejich strukturu.

Kromě toho patrně (stejně jako trehalóza) vychytávají volné kyslíkové radikály. To je důležité, neboť ochrana proti oxidativnímu poškození je dalším významným opatřením pro přežití v dehydratovaném stavu. Tento ochranný systém a také systém šokových proteinů jsou obvykle aktivovány nejen při vysychání, ale i při různých jiných stresových stavech, do kterých se živé buňky dostávají.

**Praktické aplikace:** Využití trehalózy při dlouhodobém skladování buněk, orgánů nebo celých organismů v suchém stavu a za pokojových teplot zní jako velmi lákavá alternativa k nákladnému a složitému uchovávání hluboko pod bodem mrazu.