

Proč se hmyz hodí pro základní výzkum chladové odolnosti živočichů?

Již mnohokrát v minulosti se hmyz výjimečně dobře osvědčil jako modelový organismus pro základní biologický výzkum (Bellen a kol. 2010). Pro tuto jeho obecnou vhodnost existuje mnoho důvodů. Např. můžeme dosti levně udržovat velké populace jedinců s krátkou generační dobou. Odpadá většina etických otázek, které nás trápí při výzkumu prováděném na obratlovcích a přitom základní biologické principy platí shodně pro hmyz i obratlovce včetně člověka. Stačí si vzpomenout na klíčové postavení mušek octomilek *Drosophila (Sophophora) melanogaster* v historii klasické genetiky, při objasňování principů dědičnosti a také při rozvoji moderní molekulární genetiky (viz např. Živa 2004, 3: 98–101). Mnohé současné výzkumné směry biologie tak byly zásadně ovlivněny principiálními objevy u hmyzího modelu (např. diferenciace buněk a vývoj mnohobuněčného organismu, učení a paměť nebo biologické hodiny). Octomilky jsou široce využívány i v orientovaném medicínském výzkumu (např. metabolický syndrom a obezita, poruchy spánku, Parkinsonova nemoc a další). Vhodnost hmyzu pro studium chladové odolnosti je samozřejmě dána všemi výše uvedenými obecnými důvody. Navíc ale jedním zcela specifickým: hmyz prostě v chladové odolnosti vyniká. V souladu s Kroghovým metodologickým principem (Krogh 1929) je rozumné studovat určitý jev právě u takového modelu, u něhož se nejlépe rozvinul.

Nejprve si chladovou odolnost stručně definujeme jako schopnost aktivně žít, nebo alespoň přežít při teplotách pod optimální tělesnou teplotou (hypotermie), popřípadě až při teplotách pod rovnovážným bodem mrznutí tělních tekutin (kryotermie). Optimální tělesná teplota endotermních živočichů (euteremie), jako jsou savci nebo ptáci, bývá obvykle velmi přesně nastavenou a přísně střeženou hodnotou (např. $36,8 \pm 0,5$ °C u člověka; jde o teplotu tzv. tělního jádra, tedy orgánů v dutině břišní, hrudní a v hlavě, kdežto teplota periferií, jako pokožky nebo končetin, může být mnohem nižší). U ektotermů (s nestálou tělesnou teplotou) je rozmezí teplot umožňujících aktivní život sice širší, ale také u nich můžeme jasně zjistit optimální teplotu. Rovnovážený bod mrznutí se u naprosté většiny živočichů pohybuje při poklesu tělesné teploty na hodnoty mezi $-0,5$ °C až $-1,5$ °C. Např. u lidské krve jde

o $-0,55$ °C. Při této teplotě může v tělní tekutině dojít k přechodu kapalně vody do pevné fáze, k tvorbě ledových krystalů. Měli bychom tedy rozlišovat odolnost hypotermickou a kryotermickou. Zatímco hypotermii můžeme v zásadě studovat u jakéhokoli živočicha, kryotermii zvládá jen nemnoho živočišných druhů (viz Živa 2014, 2: 76–78). Právě zde se uplatní hmyz jako vhodný model, jak uvidíme dále.

Limity pro přežití chladu u endo- a ektotermních obratlovců

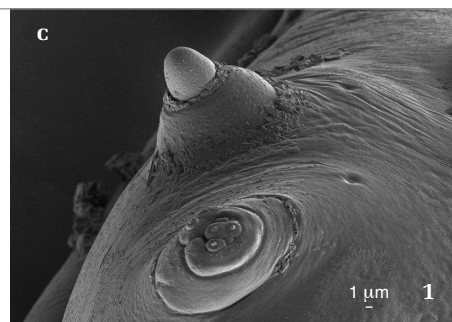
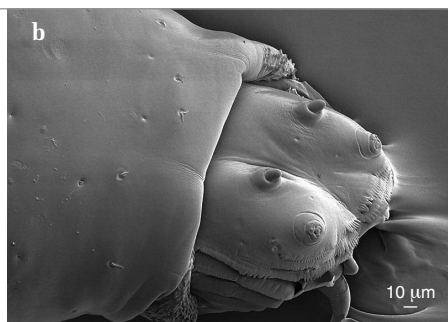
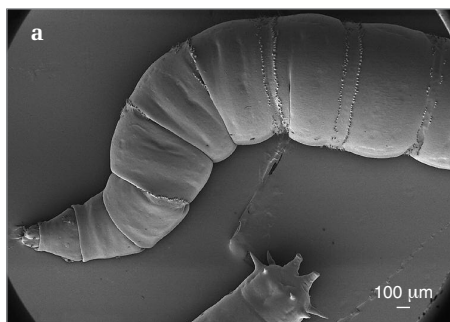
Porovnejme si minimální teplotní limity přežití u různých (skupin) živočichů. Člověk trpí prvními příznaky celkového podchlazení při poklesu tělesné teploty pod 35 °C a teplota 25 °C se již považuje za hranici závažného poškození nebo smrti. Větší - na ostatních savců a ptáků (endotermních živočichů) je na tom podobně, ale některé dokážou řízeně snížit svou tělesnou teplotu

v různých letargických stavech (spojených s denním či nočním spánkem nebo s nedostatkem potravy) a zejména pak při hibernaci neboli zimním spánku. Malí hibernující savci dovolují pokles své teploty až blízko k 0 °C, ale hlubšímu poklesu se aktivně brání zahřátím při spalování hnědého tuku a probuzením do eutermního stavu. Jen zcela výjimečně byl u savců zaznamenán pokles tělesné teploty až na kryotermní hodnoty. Vlastně existuje jediný vědecky dobře doložený záznam (Barnes 1989), kde teplota těla hibernujících sýslů Parryových (*Spermophilus parryi*, nyní *Urocitellus parryi*) z Aljašky klesala těsně pod kryotermní hranici a tělní periferie vykazovaly minimální teplotu až $-2,9$ °C. Tento údaj je nejnižším dosud známým limitem pro savce a rovněž pro ptáky.

Ektotermní obratlovci (resp. ryby, obojživelníci a plazi, o nichž máme dostatek informací) na tom nejsou (alespoň co se týče limitů) o mnoho lépe než endotermní živočichové se stálou tělesnou teplotou. Sladkovodní ryby hledají obvykle k přezimování hlubší místa s typickou teplotou vody okolo 4 °C, málokdy blíže k 0 °C (při teplotě 4 °C totiž voda dosahuje nejvyšší hustoty, klesá ke dnu a rybí tělo má teplotu shodnou s okolím). Ryby v polárních oceánech chrání před zmraznutím speciální protimraznoucí proteiny (AFPs, antifreeze proteins), takže mohou prožít celý život v kryotermním stavu s tělesnou teplotou až $-1,9$ °C. Hynou však již při ochlazení o pouhých několik desetin stupně pod tuto hranici. Ani obojživelníky a plazy většinou nepovažujeme za rekordmanky v chladové odolnosti. I když mezi obratlovci jimi nakonec jsou! Areály výskytu několika málo druhů zasahují až do chladných arktických oblastí. Obojživelníci a plazi si hledají zimní úkryty v teplejší hrabance nebo v půdě, ale teplota jejich těla může občas klesnout až na kryotermní hodnoty, a pak nezbyvat, než se nějak vyrovnat s možností vzniku ledu v tělních tekutinách. Nabízejí se dvě základní strategie přežití: buď tvorbě ledu zabránit a oddálit ji k nižším

1 a–c Larva severské octomilky *Chymomyza costata* pozorovaná elektronovým kryomikroskopem (FESEM JEOL 7401F) za teploty -135 °C. Na obr. a lze vidět, že larvy jsou plně hydratované.

Obr. b zachycuje teleskopicky vysunutý předek těla s ústními háčky zarývajícími se do podložky. Obr. c pak dokumentuje zachovalost jemných struktur, čichové senzily (kónický útvar nahoře) a chuťové senzily (plošší útvar dole) při kryokonzevací. Larvy dokáží přežít i toto pozorování elektronovým mikroskopem! Snímky: J. Nebesářová, J. Vaněček a V. Košťál

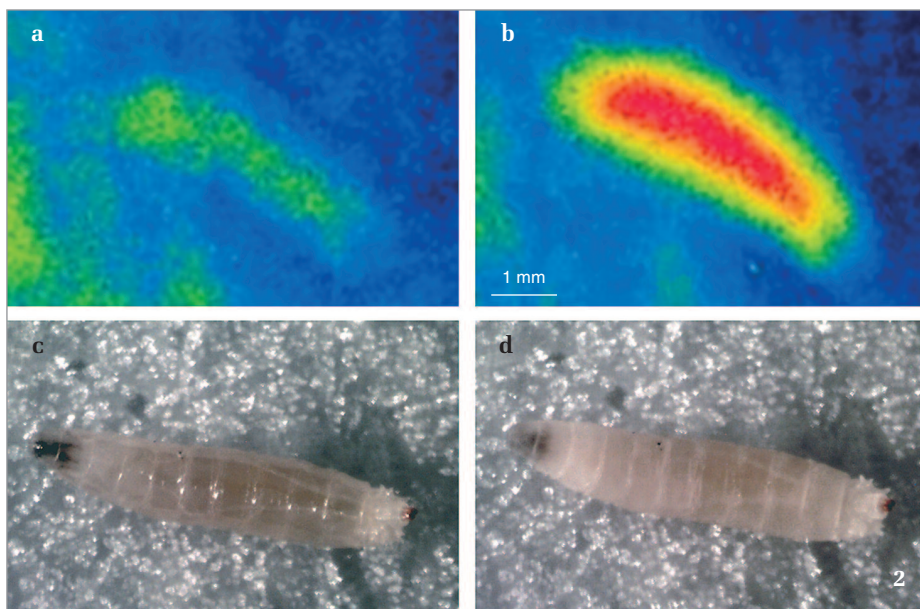


teplotám (podchlazovat se), nebo podlehnout (zmrznout). Podchlazení je častější strategií, ale většinou jde o toleranci pouze krátkodobého poklesu teploty (v řádu dnů) nehluboko pod rovnovážný bod mrznutí (v řádu jednotlivých °C). Víme jen o nemnoha druzích (několik druhů žab, mláďata některých vodních želv těsně po vylíhnutí, některé populace ještěrky živorodé – *Zootoca vivipara*), které našly způsob jak přežít i po zmrznutí, s ledem v těle. Dobře doložené údaje hovoří o minimální teplotě přežití u skokana lesního (*Rana sylvatica*, nyní *Lithobates sylvaticus*) z kanadského severu až do -6 °C, kdy je zhruba 65 % tělní vody přeměněno v led (Storey a Storey 1986). Sibiřští pamloci *Salamandrella keyserlingii* snad přežijí ještě o něco nižší teploty. To jsou nejnižší limity kryotermního přežití platné pro všechny obratlovce.

Limity pro přežití chladu u hmyzu

U bezobratlých živočichů máme zdaleka nejvíce informací pro různé druhy hmyzu (pro stovky až tisíce zástupců). Také u hmyzu najdeme dvě základní strategie přežití, rozdělené podle fázového chování vody v těle: udržet ji v kapalném stavu podchlazením, nebo dovést k zmrznutí a přeměnu části vody do pevné fáze. Další elegantní možnosti, jak se vyhnout problémům s mrznutím vody, je zbavit se jí (téměř) úplně (desikovat) – i tohle určité druhy hmyzu dělají (např. arktičtí chvostokosci *Onychiurus arcticus*, Holmstrup a Somme 1998). Za speciálních okolností pozorujeme dokonce přeměnu do skelné fáze (sice do pevné fáze, ale bez jakékoli krystalické struktury; tzv. vitrifikace). Vějíř možností je tedy širší než u obratlovců. A limity přežití hmyzu leží daleko hlouběji pod bodem mrazu. Tropické druhy hmyzu nemají příliš velkou chladovou odolnost. Prahové hodnoty pro zastavení vývoje, poškození chladem a smrt zůstávají poměrně vysoké nad 0 °C. Např. octomilka *D. melanogaster* zastavuje svůj vývoj při teplotách pod 11 °C, poškození chladem se rychle (v řádu dnů) projevuje již pod 6 °C a při teplotě 0 °C přežije minuty až hodiny (Košťál a kol. 2011). Většina druhů mírného pásu je na tom podobně, ale pouze v období své letní aktivity a vývoje. Na zimu vstupuje do klidového stavu nazývaného diapauza. Ta se v mnoha ohledech podobá savčí hibernaci a umožňuje výrazně sezonní zvýšení chladové odolnosti.

Druhy, které společně s podchlazením (a těch je většina), jsou schopny udržovat tělní vodu v kapalném stavu a bránit se letálnímu zmrznutí při teplotách v rozmezí -5 °C až -25 °C. Fyzikální hranice podchlazování malého množství čisté vody je zhruba na -38 °C. Některé druhy hmyzu však dokáží podchlazovat na mnohem nižší teploty (a přežít). Absolutní rekord, dosahující -58 °C, byl zaznamenán u larev arktických broků lesáků *Cucujus clavipes* (Carrasco a kol. 2012). Podchlazení na hodnoty pod -38 °C je umožněno částečnou dehydratací, zvýšením viskozity a nekovalentní vazbou zbylých molekul vody na biologické membrány a do hydratačních obalů jiných molekul (proteinů, glykogenu, metabolitů) a iontů. Vázané vody mají omezený pohyb, a tudíž se ani nemohou připojovat ke krystalické mřížce ledu.



Mnohé druhy hmyzu se vůbec nesnaží tělní vodu udržet v kapalném stavu, ba naopak. Na podzim syntetizují speciální proteiny, jež podporují časné zmrznutí v mimobuněčném prostoru již za teplot těsně pod nulou (strategie zmrznutí). Krystaly ledu, vytvořené v hemolymfě, vážou část molekul vody do krystalické mřížky, tím se zahustí zbylý roztok a dojde k osmotickému „odsátí“ vody zevnitř buněk. Tato mrazová dehydratace buněk brzy dosáhne svého maxima (již za teplot mezi -5 °C až -10 °C), takže veškerá „volná“ voda (viz výše) promrzne. V závislosti na druhu a fyziologickém stavu je podíl zmrzlé vody někde mezi 40 % a 75 % celkové tělní vody. Takže adaptace pro přežití zmrznutí se v lecčems podobá adaptaci na dehydrataci, jelikož obě vyžadují schopnost přežít ztrátu kapalné vody. Pravděpodobnou adaptivní výhodou zmrznutí oproti podchlazení je, že ve zmrzlém stavu se omezí ztráty tělní vody (podchlazená voda má tendenci se odpařovat a připojovat se k okolním krystalům ledu v půdě, sněhu nebo námraze, zatímco zmrzlá voda zůstává vázána), a také se snižuje rychlost metabolismu, a tím se šetří energetické zásoby (led brání difuzi kyslíku, zmrzlá hemolymfa neumožňuje transport látek, takže buňky se dostávají do anoxického a ischemického stavu; navíc vazba molekul vody v buňkách zpomaluje či zastavuje biochemické reakce).

Kryokonzervace hmyzu

Ve zmrzlém stavu hmyz přežívá pokles teplot až na -30 °C. Minimálně u jednoho druhu, a to u larev severské octomilky *Chymomyza costata*, jsme však zjistili schopnost přežít daleko hlubší zmrazení, až na teplotu kapalného dusíku, tj. -196 °C (Košťál a kol. 2011, obr. 1). Za těchto teplot se už zastavují i biofyzikální procesy přeměn krystalů a teoreticky lze biologický materiál skladovat neomezenou dobu (naš nejdelší záznam kryokonzervace larev zatím trval jen několik měsíců, ale bez jakékoli ztráty životaschopnosti). Podařilo se nám prokázat, že po zmrznutí přechází nezmrzlá část tekutin do skelného stavu. Tento proces je patrně stimulován přítomností velkého množství volného prolinu – aminokyseliny, kterou si larvy syntetizují v pří-

2 a–d Záznam mrznutí larvy tropické octomilky *Drosophila melanogaster* pomocí termokamery (FLIR P660, nahoře) a digitální kamery (dole). Obr. a, c jsou pořízeny těsně před inokulací podchlazené larvy okolními ledovými krystaly (proniknutí krystalů z okolí do těla larvy), při teplotě těla -1,65 °C (zelená barva) a teplotě okolí asi -1,9 °C (světle modrá barva). O 10 sekund později (obr. b, d) byla zaznamenána inokulace a rychlé promrznutí tělních tekutin doprovázené krátkodobým přechodným ohřátím až na teplotu blízko 0 °C po uvolnění skupenského tepla mrznutí (posun přes žlutou až k červené barvě). Snímky: T. Štětina a V. Košťál

pravě na zimu, při přechodu do diapauzy. Severská octomilka zůstává pozoruhodná nejen jako biologická „zvláštnost“ (možná bude podobná schopnost nalezena také u jiných druhů bezobratlých). Zajímá nás i jako jediný popsáný příklad úspěšné kryokonzervace komplexního organismu v plně hydratovaném stavu.

Nešlo by poznatků využít i pro rozvoj metod kryokonzervace jiného biologického materiálu? Vždyť zatím se tyto techniky podařilo vyvinout pouze pro buňky (spermie, vajíčka, mikroorganismy), pro časná embrya (v zásadě shluky buněk) a výjimečně pro komplexní tkáně (např. myši nebo lidské vaječníky). Severská octomilka přítomností nabízejí recept pro celý rozvinutý mnohobuněčný organismus. Prozatím se nám podařilo učinit malý krůček vpřed v tomto směru. Znalosti získané u *C. costata* jsme použili k relativně jednoduchému ovlivnění vývoje a biochemického složení těla *D. melanogaster* a z tropického druhu velmi citlivého na chlad se stal organismus, který přežije za teplot pod nulou po zmrznutí třetí čtvrtiny své tělní vody (Košťál a kol. 2012, obr. 2).

Závěrem lze shrnout, že chceme-li se něco nového dozvědět o adaptacích mnohobuněčných organismů pro přežití pod bodem mrazu, dokonce až při teplotách blízkých se k absolutní fyzikální nule, musíme sáhnout po vhodném druhu hmyzu.

Použitá literatura uvedena na webu Živý.