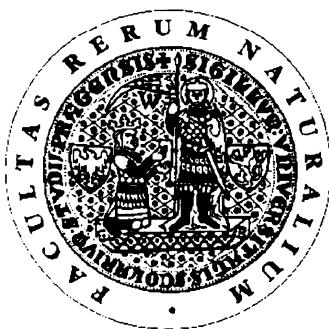


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

---



# HIBERNAČNÍ TRIGERY A KRYOGENY FYZIOLOGICKÁ PODSTATA ÚČINKU

Bakalářská práce studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Praha 2007

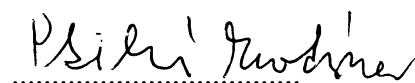
Martina Plašilová

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Doc.RNDr.Stanislavu Vybíralovi CSc. za odborné vedení a zájem o tuto práci,za velké množství cenných rad a připomínek v průběhu jeho zpracování. Dále děkuji rodičům za péči, kterou mi věnovali během celého mého studia.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury, pod vedením školitele Doc.RNDr. Stanislava Vybírala, CSc.

Praha 2007 30.8.2007



Martina Plašilová

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	5
1. ÚVOD.....	6
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	7
2.1. Hibernace.....	7
2.2. Hibernační triger.....	11
3. DADLE.....	13
3.1. Termoregulační účinek DADLE.....	13
3.2. Hypothermní účinek DADLE.....	14
4. VLIV NEUROPEPTIDŮ NA TERMOREGULAČNÍ MECHANISMY.....	16
4.1. Bombesin.....	16
4.2. Neurotensin.....	17
5. VYUŽITÍ HIBERNAČNÍHO MODELU V HUMÁNNÍ MEDICÍNĚ.....	19
5.1. Hibernace jako model orgánové ochrany.....	19
6. TERÉNI MĚŘENÍ.....	21
6.1. Abiotické faktory.....	21
6.2. Závislost výletu netopýrů na intenzitě osvětlení.....	22
7. DISKUSE.....	25
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	26

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>ACTH</b>	adenokortikotropní hormon
<b>ADP</b>	adenosindifosfát
<b>AMP</b>	adenosinmonofosfát
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>βLPH</b>	beta –lipotropní hormon
<b>BOM</b>	bombesin
<b>CNS</b>	centrální nervový systém
<b>DADLE</b>	D –alanin D-leucin enkefalin
<b>GIT</b>	gastrointestinální trakt
<b>HT</b>	hibernační triger
<b>L</b>	lux (jednotka intenzity osvětlení)
<b>METH</b>	methanfetamin
<b>NT</b>	neurotensin
<b>SP</b>	set – point
<b>Th</b>	teplota hypotalamu
<b>Tk</b>	teplota kůže
<b>Tt</b>	tělesná teplota

# 1. ÚVOD

Schopnost některých homoiothermních organismů měnit svou tělesnou teplotu ( $T_t$ ), během období pro život nepříznivého, je unikátní proces. Poznání fyziologických a biochemických procesů hibernace může mít zásadní teoretický i praktický význam.

Ukazuje se, že by mohla přinést nové poznatky v biomedicíně. Především v prevenci a léčbě neurodegenerativních onemocnění, ale také různých oběhových selháních jako např.: Alzheimerova choroba, mozková mrtvice, ischemie a jiných civilizačních onemocnění u lidí. Dále se taky ukazuje že studium hibernace může přinést zásadní poznatky, týkající se ochrany orgánů určených k transplantaci. Nelze vyloučit, že některé poznatky by mohly sloužit jako cenné informace pro již zmíněnou problematiku transplantace orgánů.

Cílem mé bakalářské práce je shrnout poznatky o hibernaci a jeho využití. Součástí předložené práce je i jednoduchý experiment týkající se této problematiky.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Hibernující savci podstupují každoročně celou řadu změn fyziologických, morfologických ale i změn v chování.

Udržování stálé tělesné teploty je jednou ze základních podmínek existence teplokrevných živočichů. Tato teplotní homeostaze je obecně podmíněna rovnováhou mezi výdejem tepla z organismu a tepelnou produkcí. K zajištění této rovnováhy je organismus vybaven receptorovými, integračními a výkonnými systémy.

Řízení tělesné teploty na centrální úrovni u homoiotermních živočichů je popsáno více či méně dokonalými modely. Zcela specifickou skupinu, pokud jde o udržování teplotní homeostaze pak představují homoiotermní živočichové, kteří jsou schopni hibernovat.

### 2.1. Hibernace

Schopnost některých homoiotermů aktivně snižovat svoji tělesnou teplotu v nepříznivých zimních podmínkách je známa již po staletí. Fyziologická studia jasně prokázala, že u savců a ptáků je tato schopnost aktivně řízena. Hibernace není tedy vyvolána nedostatečnou činností termoregulačních mechanismů, ale představuje nový typ cíleného řízení tělesné teploty, fungujícího tak, aby byla zachována tepelná homeostaze, jak v bdělém, tak i v hypotermním stavu. Hibernaci tedy nemůžeme ztotožňovat se sezónním podchlazením poikilotermů, nebo dokonce s hypotermií vyvolanou umělými zásahy. Oba tyto děje se od hibernace liší, a to především tím že jsou to děje pasivní. Uměle podchlazení živočichové mohou sice v tomto stavu určitou dobu přežívat, nemohou však vlastními prostředky, bez přispění vnějšího ohřívání, tomuto stavu uniknout. Hibernující živočichové se liší od normotermů v tom, že mohou přežívat tělesné teploty v rozsahu od 3°C do 37°C. U normotermů podchlazení pod 28°C (u člověka), nebo pod 20°C (laboratorní zvířata) většinou končí smrtelně z důvodů srdeční fibrilace (Jánský, 1990).

Vzhledem k tomu, že hibernanti patří do různých skupin živočichů, nejsou jejich hibernační vlastnosti úplně stejné, ale liší se v některých detailech. Rozlišujeme dva základní typy hibernujících živočichů :

**a) Obligatorní hibernanti** (např. *Glis glis* nebo *Spermophilus citellus*)

Patří mezi ně živočichové kteří mají schopnost snižovat Tt úzce spojenou se změnou potřeby přijímat potravu. Tzn., že tyto druhy před nástupem do hibernace silně zvyšují příjem potravy a v důsledku toho jejich tělesná hmotnost stoupá. V průběhu hibernace naopak tyto druhy potravu vůbec nepřijímají a spotřebovávají energii ze svých vnitřních rezerv. Změněný příjem potravy je podmíněn periodickým útlumem činnosti centra sytosti, které leží ve ventromediální části hypotalamu.

**b) Permisivní hibernanti** (např. *Mesocricetus auratus*)

Mezi ně se řadí ty druhy, kteří svojí schopnost přijímat potravu v průběhu hibernace zásadně nemění. Tyto druhy přijímají potravu i při občasném probouzení z hibernace. Permisivní hibernanti mohou vstoupit do hibernace v kterémkoliv ročním období za předpokladu, že jsou vystaveni stresovým vlivům. Nevykazují tedy cirkunální rytmus hibernace. Schopnost hibernace je u nich geneticky podmíněna, podobně jako u hibernantů obligatorních.

Hibernační problematikou se začali více zabývat již experimentátoři v 19. století. Poprvé použil termín zimní spánek Horvath v roce 1881 a první ucelené poznatky o zimním spánku byly publikovány Johnsonem v roce 1931. Větší zájem vzbudila hibernace po druhé světové válce, pojem hibernace byl více upřesněn.

Hibernace je tedy považována za aktivní, fyziologicky kontrolovaný proces charakterizovaný změněným řízením termoregulačních mechanismů, projevujícím se potlačením tepelné produkce, snížením tělesné teploty, strnulostí, schopností tělesných tkání zůstat funkčními i v podmínkách podchlazení a konečně, při probouzení dokázat vlastní produkcí tepla ohřát tělo na výchozí teplotu (Hudson a Bartholomew 1964, South a kol. 1975, Wang 1978).

Hibernace není kontinuálním dějem, ale skládá se z řady hibernačních period, během kterých tělesná teplota živočichů poklesá na úroveň teploty okolí (viz obr. 1).

Typická hibernační sezóna je charakteristická prodloužením hibernační periody a to z několika dnů až na 5 týdnů u některých druhů živočichů. Během strnulosti je bazální metabolismus redukován na 2-4% z normálního stavu a tělesná teplota je během několika dní (při hibernaci) udržována několik stupňů nad teplotou okolí. Nejnižší tělesná teplota co kdy byla naměřena byla u druhu *Spermophilus parryii* (zemní syseľ) a byla pouhých -3°C (Barnes 1989).

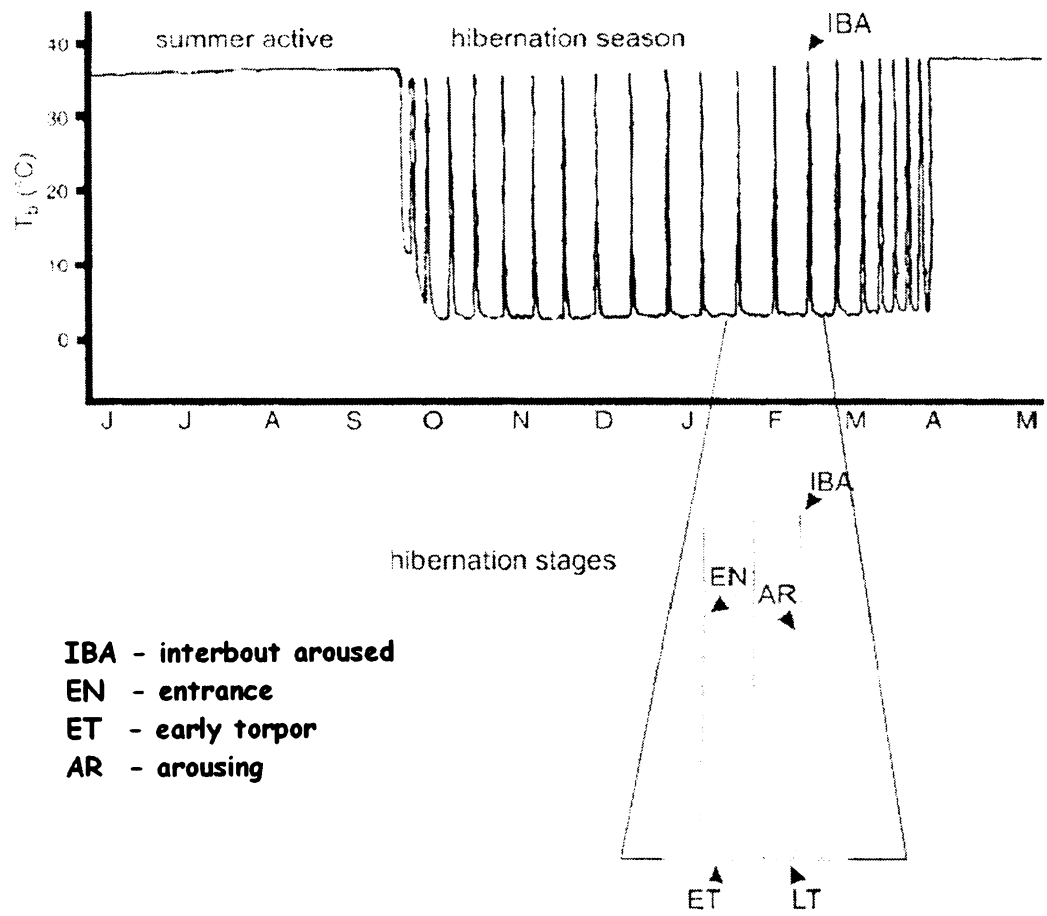


## Vstup do hibernace

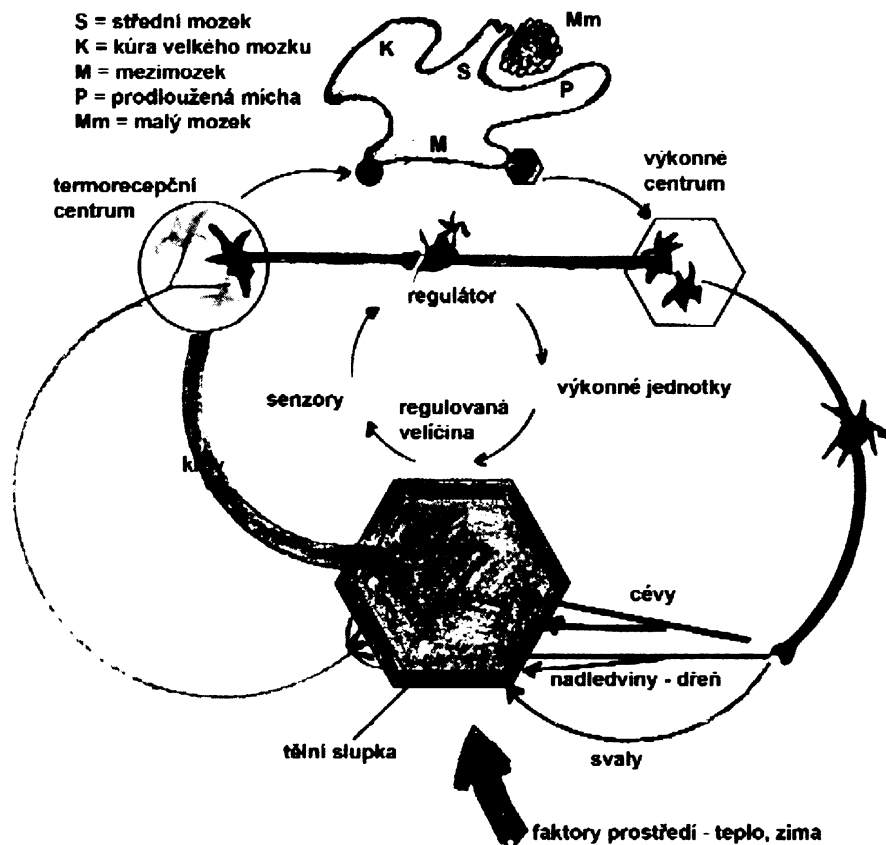
Vstup do hibernace je podmíněn změnou abiotických i biotických faktorů. Teprve když fyziologické změny v těle hibernantů dosáhnou stavu plné hibernační připravenosti, začne se proces hibernace realizovat. Prehibernační období trvá asi 8 týdnů. Vstup do hibernace nastává obvykle postupně, formou schodovitých poklesů tělní teploty, které následují za sebou tak dlouho, až teplota živočicha dosáhne úrovně teploty prostředí. Usínání trvá 6 i více hodin. Je nesporné že v tomto období se musí nejprve potlačit činnost termoregulačních center tak, aby přestaly aktivovat orgány produkující teplo. Hibernace je tedy vyvolána především aktivní nervovou inhibicí chladové termogeneze. Dochází k snižování „set-pointu“ (SP) tj. teploty mozku, od které se termoregulační mechanismy uvádějí v činnost. Schopnost řídit produkci tepla je zachována i při hluboké hibernaci. Poklesne-li teplota okolí pod určitou hranici, která může ohrožovat hibernanta na životě, začne hibernující zvíře zvyšovat svoji produkci tepla a udržuje si tělesnou teplotu na stálé úrovni, tudíž se začne rozdíl mezi  $T_t$  a teplotou okolí zvětšovat. Tento stav může trvat i po delší dobu, někdy však působení velmi nízkých teplot vede k probuzení živočichů. To dokazuje, že hibernanti si uchovávají funkceschopnost nervové a hormonální soustavy i za velmi nízkých teplot. Např. sluchové nervy vedou vzruchy v teplotách nižších než  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . U některých druhů hibernantů přetrvává spontánní elektrická aktivita mozkové kůry i v  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Jánský, 1990).

Současně také nastává i omezení činnosti oběhové soustavy. První známkou nástupu hibernace je náhlý pokles srdeční frekvence, současně s pozvolným poklesem krevního tlaku. Pokles srdeční frekvence a snížení krevního tlaku předchází poklesu tělesné teploty, takže tyto děje nemohou být následkem podchlazení. Snížení tepové frekvence je dosaženo prodloužením doby mezi jednotlivými srdečními stahy a vynecháním některých srdečních stahů. (Jánský, 1990)

Během probouzení tělesná teplota vzrůstá na přibližně  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  a je udržována po 12 – 24 hodin, než se hibernující živočich vrátí do stavu strnulosti. Během hluboké hibernace je většina fyziologických funkcí snížena na velmi malé hodnoty. Například je během hibernace srdeční oběh redukován z normálních 200 – 300 na 3 – 5 tepů za minutu, dýchání je sníženo ze 100 – 200 na 4 – 6 výdechů za minutu. A oproti tomu je zcela pozastaven reprodukční cyklus. Tyto a jiné fyziologické funkce jsou obnoveny během periody probouzení (Carey, Andrews and Martin, 2003).



Obr.1 : hibernační periody (Epperson and Martin,2002)



Obr.2 : schéma regulace teploty

## 2.2.Hibernační trigger

Všechny přirozené abiotické faktory prostředí takové jako : krácení dnů,teplota,světlo,možnost potravy ale i změna magnetického pole,sice hibernaci významně usnadňují,ale zůstává otázkou , co je vlastním spouštěcím mechanismem , který umožňuje vstup do hibernace čili co způsobuje posun SP. Je pravděpodobné ,že změněný neurohumorální status, ke kterému v průběhu hibernace dochází , může být kromě jiného vyvolán specifickou látkou , která je vyplavována do krve hibernujících zvířat.

Prvé experimenty ,které měly potvrdit přítomnost této hypotetické látky , byly prováděny již v roce 1932 ,kdy Nitschke a Mayer injikovali extrakt z lymfatických uzlin,odebraných hibernujícímu živočichovi,jak klasickému homiotermovi , tak bdělému hibernantovi. Výsledným efektem tohoto experimentu bylo snížení spotřeby kyslíku , tělesné teploty a pokles hladiny krevního cukru v obou případech(cit. Jánský 1981).

Další tkání která přitahovala zájem experimentátorů byla hnědá tuková tkáň, kdy například Senft (1937) intraperitoneálně aplikoval extrakt z hnědé tukové tkáně laboratornímu potkanovi, čímž vyvolal snížení metabolismu. Kroll v roce 1952 jako první vyslovil myšlenku o existenci látky, která vyvolává hibernaci a o rok později tento autor publikoval své pokusy s extraktem z hnědého tuku, získaného z hibernujících ježků nebo křečků, který aplikoval kočce jako nehibernujícímu homoiotermovi. Pozoroval sice spánku podobný stav, ale spojitost s hibernací nebyla jednoznačně prokázána, poněvadž tělesná teplota nebyla signifikantně snížena.

Hledání této hypotetické substance nazývané „hibrin“ či „hibernin“ pokračovalo i nadále na mnoha pracovištích, ale snaha potvrdit předchozí nálezy s aplikací extraktu hnědého tuku nejen z hibernanta na bdělého hibernanta, ale především na klasického homoiotherma zůstávala bez efektu (Morison a Allen 1962, Bigelow a kol. 1964, Johannsen 1973). V tomto období byly publikovány práce o termogenních schopnostech hnědého tuku při adaptaci na chlad a jeho mimořádné produkci tepla u králičích mláďat nebo novorozených jedinců (Morison a Allen 1962, Ball 1965).

Díky těmto poznatkům bylo zjištěno, že hnědý tuk není zdrojem hormonu indukujícího hibernaci, ale je důležitou teplo produkční tkání u hibernujících i nehibernujících živočichů.

Hledání látky, která by se měla vyskytovat v krvi hibernujících zvířat a měla by usnadňovat vstup do hibernace, pokračovalo. Hypotetická substance byla nazvána hibernačním triggerem (HT) (Dawe a Spurrier 1968) a rok poté byl její účinek prokázán v pokusech, jelikož transfúze krve hibernujícího sysla syslu nehibernujícímu vyvolala hibernaci. Při těchto experimentech bylo podstatné zjištění, že hibernační substance je přítomna pouze v krvi hibernujících zvířat, je druhově nespecifická a zachovává si při uchování v chladu dlouhodobou účinnost (Dawe a Spurrier, 1970).

### **3. D –Alanin – D – Leucin enkefalin (DADLE)**

Bylo zjištěno že DADLE je jednou z látek umožňující vstup do hibernace. Nachází se v séru hibernujících živočichů a zdá se, že slouží jako protekce orgánů proti ischemickému poškození. Proto je DADLE a HT v poslední době věnována velká pozornost v oblasti humánní medicíny (Drew, Rice, Kuhn, Smith, 2001).

DADLE patří do třídy opioidů a bylo v poslední době zjištěno že navozuje hibernaci stejně jako nalezený HT v séru hibernujících savců (Yamanouchi a kol., 2003).

Mozky hibernujících savců jsou chráněny proti rozmanitým poruchám, které jsou škodlivé pro lidi a jiné nehibernující druhy. Studie hibernace nabízí neobvyklé přístupy v léčbě mozkového poškození a neurodegenerativních onemocnění u lidí takové jako Alzheimerova choroba a infarktu (Drew, Rice, Kuhn, Smith, 2001).

Hibernace je působivá ochranná strategie jak pro periférii tak pro centrální nervový systém (CNS). Bylo zjištěno že HT je asi 88 kD velký peptid. Část sekvence tohoto peptidu je podobná inhibitoru metaloproteinázy. DADLE je zkoumán jako enkefalin navozující hibernaci a bylo zjištěno že HT a DADLE prodlužuje přežití orgánů takové jako jsou plíce, srdce, játra a ledviny uchovaných v blocích nebo jako jednotlivé preparáty. Dále bylo zjištěno, že DADLE podporuje přežívání neuronů v CNS. Vystavení dávce DADLE zvětšilo životnost buněk u krys ve fetálních dopaminergických buňkách. Následná transplantace těchto DADLE-léčených dopaminergických buněk do mozku potkanů s Parkinsonovou nemocí přineslo větší přežití „roubovaných“ buněk. Zajímavé je, že dodání samotného DADLE ochránilo proti dopaminergickému vyčerpání hlodavce s Parkinsonovou chorobou. Podobně, DADLE blokoval a zvrátil dopaminergické poškození indukované methamfetaminem (METH). Bylo zjištěno, že použití DADLE chrání periferní i CNS (Borlongan, Wang, Su, 2004).

#### **3.1. Termoregulační účinek DADLE**

Pokles vnitřní teploty vede k aktivaci chladových a inhibici tepelných drah, to se projeví omezením tepelných ztrát z organismu a aktivací mechanismů tepelné produkce. Udržování stálé T<sub>t</sub> spočívá v opakující se aktivitě a interakci chladových a tepelných neuronů. Nastavená hodnota T<sub>t</sub> (set-point) se vyznačuje minimální a vyrovnanou aktivitou termoregulačních center pro aktivaci tepelné produkce a tepelných ztrát. Každá její změna

pak aktivuje příslušné výkonné termoregulační mechanismy tj. evaporativní a neevaporativní ztráty tepla a třesovou a netřesovou produkci tepla.

### **Centrální aplikace**

Byl sledován termoregulační účinek aplikace DADLE do předního hypotalamu v základní dávce 25 $\mu$ g u králíka v průběhu intestinálního chlazení. Bylo zřejmé že oproti kontrole nastupují první změny v kožní teplotě a dechové frekvenci dříve, i když vlastní prahové hodnoty centrální teploty pro tyto děje nebyly ovlivněny, takže výsledkem byla pouze snížená hypotalamická termosenzitivita. Dále z pokusu vyplynulo, že prahová hodnota pro třes je po aplikaci DADLE signifikantně snížena o 0,7 °C. Hypotalamická termosenzitivita ani kapacita tohoto děje však nejsou ovlivněny. Obdobného výsledku bylo dosaženo i při podání dvojnásobné dávky kdy posun prahu pro chladovou termogenezi dosahuje 0,9 °C. Obdobný charakter odpovědi byl nalezen i při nejnižší použité dávce 5  $\mu$ g, posun prahové hodnoty pro třes je v tomto případě nesignifikantní a činil 0,3°C. Podstatnou skutečností u všech uvedených koncentrací je vznik mezi prahové zóny pro děje zajišťující obranu proti přehřátí a proti chladu. (Vybíral a ost., 1994)

Z pokusů vyplynulo, že vlastní termoregulační odezva na DADLE probíhá ve dvou odlišných fázích. Oproti hypotermii pozorované 20 min. po aplikaci, došlo v dalším průběhu reakce naopak ke slabé nesignifikantní hypertermii, která přetrvávala asi 120 min. po podání látky. Je zřejmé, že tato hypertermie je způsobena zvýšením termoregulačního prahu pro veškeré sledované děje. (Vybíral a ost., 1994)

### **Periferní aplikace DADLE**

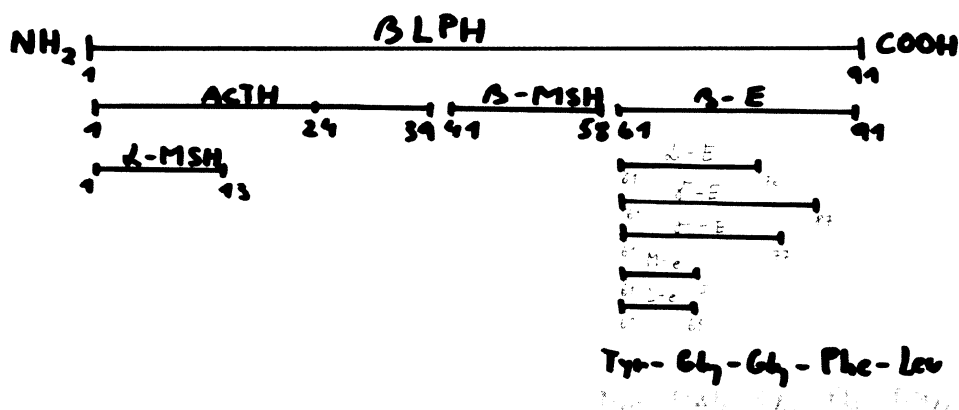
Intravenózní podání DADLE v širokém koncentračním rozmezí 0,05 – 1 mg/kg nevedlo k významné změně termoregulačních vlastností.

### 3.2. Hypothermní účinek DADLE

Jedna z důležitých vlastností kterou se DADLE liší od ostatních enkefalinů je jeho spíše hypothermní účinek.

Na Obr. 3 je znázorněno několik důležitých hormonů a enkefalinů. Zdá se, že látky sekvenčně v levé části tohoto obrázku vykazují charakter spíše hypothermní např. adenokortikotropní hormon (ACTH). U ACTH byl zjištěn i kromě hypothermního účinku také účinek antipyretický (Vybíral, Černý, Jánský, 1988).

I když skupiny enkefalinů sekvenčně v pravé části obrázku jsou spíše charakteru hyperthermního, účinek DADLE se zdá být spíše hypothermní. Také proto hraje důležitou roli při vstupu do hibernace a napomáhá hibernujícím živočichům při snižování tělesné teploty (viz výše uvedené výsledky Vybíral a ost., 1994).



Obr. 3 : Sekvence  $\beta$ LPH a základních biogenních peptidů

## 4.VLIV NEUROPEPTIDŮ NA TERMOREGULAČNÍ MECHANISMY

Neuropeptidy mohou ovlivňovat celou řadu nejrůznějších fyziologických funkcí zahrnující oblasti od endokrinologie, přes fyziologii bolesti, elektrofyziologii, studium chování až k termoregulaci. Mezi neuropeptidy s výrazným termoregulačním účinkem patří i neurotensin a bombesin.

### 4.1. Bombesin

**Aminokyselinová sekvence BOM :**

**pGlu–GLN–ARG–LEU–GLY–ASN–GLN–TRP–ALA–VAL–GLY–HIS–LEU–MET – NH<sub>2</sub>**

Bombesin (BOM) je tetradekapeptid, který poprvé izolovali Anastazi a ost. V roce 1971 z kůže dvou evropských žab rodu *Bombina*. Kromě BOM bylo z kůže dalších druhů žab získáno několik dalších neuropeptidů (litorin, renatensin a atylesin), které mají podobnou strukturu a obdobný fyziologický účinek.

BOM je nejvíce rozšířen v centrálním nervovém systému (CNS) a gastrointestinálním traktu (GIT) některých živočišných druhů včetně člověka.

U BOM byla prokázána celá řada účinků na fyziologické funkce. Tyto účinky jsou závislé na způsobu aplikace. Po periferní aplikaci BOM vyvolá hypertenzi u psa, kočky, králíka a křavy a hypotenzi u opice. Způsobuje kontrakci hladké svaloviny mnoha druhů živočichů. Ovlivňuje některé ledvinové funkce a sekreci látek v GIT. Zvyšuje hladinu neurotensinu (NT) v plazmě a působí na sekreci hormonů z adenohipofýzy. Po centrální aplikaci BOM vyvolá hyperglykémii a ovlivňuje sekreci žaludečních šťáv. Působí na uvolňování některých hormonů. Má elektrofyziologické účinky na některé neurony, zvyšuje pohybovou aktivitu a má termoregulační účinky (Nemeroff a kol., 1983)

**Termoregulační účinky BOM :**

Na Přírodovědecké fakultě v Praze byly prováděny pokusy na bdělých králících v místnosti s teplotou 20°C. Byly měřeny následující parametry : teplota hypotalamu



(Th),teplota kůže (Tk),spotřeba kyslíku a dechová frekvence.Bylo zjištěno,že aplikace BOM (250ng) do hypotalamu posune prahovou hodnotu pro produkci tepla o 1,2°C k nižší Th. Intenzita a velikost metabolické odpovědi byly výrazně sníženy.BOM ovlivnil i vazomotoriku,neboť v průběhu chlazení posunul prahovou hodnotu pro vazokonstrikci k nižší Th. Termoregulační účinek BOM přetrvával více než 24hodin.Dávka 125 ng měla obdobné účinky jako 250 ng,ale dávka 500ng BOM byla již letální(Vybíral a ost.,1985).

## 4.2. Neurotensin

**Aminokyselinová sekvence NT :**

**pGLU-LEU-TYR-GLU-ASN-LYS-PRO-ARG-ARG-PRO-TYR-ILE-LEU-OH**

Neurotensin (NT) byl izolován roku 1973 (Carraway,Leeman) z hovězího hypotalamu.NT je především rozšířen v CNS a v GIT mnoha živočišných druhů.Přitom v mozku je obsaženo asi 10 % a převážná většina NT se nachází v GIT.

NT ovlivňuje celou řadu fyziologických funkcí ale stejně jako u BOM jsou jeho účinky rozdílné pro periferní a centrální aplikaci.Po periferní aplikaci způsobuje vazodilataci a hypotenzi u psa a krysy,vazokonstrikci a hypertenzi v tukové tkáni,ovlivňuje srdeční frekvenci a střevní mobilitu.Má specifické účinky na metabolismus cukrů,působí na sekreci některých hormonů z adenohipofýzy,ovlivňuje sekreci žaludečních šťáv,zvyšuje hladinu cholesterolu a uvolňuje histamin z retikuloendoteliárního systému(Nemeroff a kol. 1983).

Po centrální aplikaci NT dochází také k ovlivnění sekrece žaludečních šťáv a k uvolnění některých hormonů.Působí na chování některých živočichů,snižuje spontánní motorickou aktivitu,vyvolává analgetické účinky,ovlivňuje elektrofyziologické děje některých neuronů.(Nemeroff a kol.1983)

Významným účinkem NT je modifikace termoregulačních dějů mnoha druhů živočichů.

### **Termoregulační účinky NT :**

Vliv NT na termoregulaci poprvé prokázali Bissette a kol. v roce 1976. Intracisternální aplikace 0,03 - 30 $\mu$ g NT u myši vystavených chladu vyvolala signifikantní pokles rektální teploty. Velikost takto navozené hypotermie byla přímo úměrná použité dávce. Také v okolní teplotě 25 ° C odpovídali myši na injekci NT poklesem rektální teploty, ale toto snížení bylo menší než v hladu (Lipton a kol. 1977).

Z údajů vyplývá , že hypothermní účinek nelze vyvolat periferní aplikací ale pouze aplikací do CNS, neboť stejně jako BOM nemůže volně procházet krevně mozkovou bariérou (Bissette a kol. 1978).

## 5. VYUŽITÍ HIBERNAČNÍHO MODELU V HUMANNÍ MEDICÍNĚ

Mozky hibernujících savců jsou chráněny proti rozmanitým poruchám, které jsou škodlivé pro lidi a jiné nehibernující druhy. Taková ochrana je spojena s množstvím fyziologických a biochemických adaptací včetně hypotermie, ochrany proti antioxidantům, metabolické zástavě aj.

Neuroprotektivní mechanismy během hibernace mohou přinést neobvyklé přístupy v léčbě mozkového poškození a civilizačních chorob u lidí takové jako Alzheimerova choroba a poruchy krevního zásobování (Drew, Rice, Kuhn, Smith, 2001).

### 5.1. Hibernace jako model orgánové ochrany

V protekci orgánů určených k transplantaci, se stále vyskytují problémy související s prodloužením doby uskladnění orgánů v chladu. Životně důležité orgány hibernujících živočichů jsou chráněny proti poškození i při minimálním průtoku krve oběhovým systémem (možný vznik trombů). Hibernanti nabízejí jedinečnou příležitost co je v podstatě přírodní verze ochrany orgánů (Crey, Andrews, Martin, 2003).

Podpora iontové regulace a membránového toku je základ pro správnou funkci buněk a jejich přežití při nízké tělní teplotě. Odlišnosti mezi hibernujícími a nehibernujícími druhy jsou zvláště v sodno-draselném transportu a  $\text{Ca}^{2+}$  pumpách. Ty jsou sdružené se změnami v lipoproteinové plasmatické membráně a vnitřní mitochondriální membráně. Byly vedeny řady studií na chycených Richardsonových skupinách zemních syslů, které byly drženy v laboratorních podmínkách jako model pro hypothermickou ochranu orgánů. Tkáňové funkce byly srovnávány během léta (nehibernační sezóna) a zimy kdy zvířata mohla být :

- a) v hluboké hibernaci v chladné komoře při 4°C
- b) udržovány při teplotě okolí 4°C v aktivním stavu
- c) udržovány při teplotě okolí 22°C v aktivním stavu

Po provedení této studie byly zkoumány orgány hibernujících i nehibernujících zemních syslů např. uskladnění celých orgánů a životaschopnost orgánů při transplantaci, měření funkce štítné žlázy, měření celkových nukleotidů- ATP, ADP a AMP (pro přehled viz. Green, 2000).

Značné odlišnosti v odolnosti proti chladu byly zejména mezi orgány z hibernujících versus nehibernujících jedinců. Zvláště pak ledviny transplantované ze zvířat v hluboké hibernaci byli schopny odolávat až 72 hodin v chladu, zatímco orgány odebrané z nehibernujících sýslů odolávaly „pouhých“ 24 hodin (Green, 2000).

Poznání mechanismů přináší široké uplatnění v protekci orgánů určených k transplantaci.

## 6. TERÉNI MĚŘENÍ

Součástí mé bakalářské práce je i malý experiment, který se týká problematiky vlivů vnějšího prostředí na živé organismy. V mém terénním měření jsem se zaměřila na sledování aktivity netopýra *Myotis daubentonii* a četnosti jeho výletů na intenzitě osvětlení.

### 6.1. Abiotické faktory

#### Světlo

Záření ze Slunce poskytuje nejen tepelnou energii, která udržuje teplotu Země na biologicky vhodné úrovni, ale je též zdrojem energie světelné. Tato energie je primární energetickou produkcí. Světlo a jeho periodické změny, jsou důležitým biologickým faktorem, který ovlivňuje orientaci živočichů v čase a prostoru a umožňuje jejich přežití. Určité druhy živočichů (ptáci, hmyz aj.) mění v průběhu roku své chování např. ptáci se stěhují nebo hmyz střídá vývojová stádia. (Jánský, 1977).

#### Teplota

Tepelná energie je nejsnáze měřitelný faktor vnějšího prostředí. Teplota vzduchu, vody a půdy je závislá na intenzitě dopadajícího záření na povrch Země. Dále je teplota ovlivněna tepelnou kapacitou, měrným teplem, tepelnou a teplotní vodivostí. Dalším z důležitých faktorů ovlivňující teplotu je nadmořská výška. Pro měření teplot se využívá celá řada teploměrů, podle toho jaká teplota se měří. (např. půdní teploměr, teploměry na měření teploty vzduchu aj.)

#### Tlak

Tlak vzduchu neboli barometrický tlak je dán hmotností sloupce vzduchu v daném místě. S rostoucí nadmořskou výškou se zmenšuje výška vzduchového sloupce a hustota vzduchu, takže barometrický tlak klesá. V dané nadmořské výšce hodnota barometrického tlaku je ovlivňována prouděním, vlhkostí a teplotou. V meteorologii se nejčastěji využívá jednotka hektopascal – hPa. Pro měření tlaku se nejčastěji používají tyto přístroje např.: aneroid, barofrag a digitální přístroje.

## **Proudění vzduchu**

Pod tímto pojmem si obvykle představíme horizontální složku tohoto pohybu známou jako vítr. Proudění vzduchu je podmíněno tlakovým spádem vznikajícím jako důsledek různého ohřívání zemského povrchu. Vítr je vektorová veličina charakterizovaná směrem a rychlostí pohybu.

Pro měření směru větru se využívá celá řada přístrojů, počínaje jednoduchými větrnými směrovkami až po složitá registrační zařízení. Pro měření rychlosti větru používáme nejčastěji anemometry. tyto přístroje měří sílu, která je vyvolána prouděním vzduchu.

## **6.2. Závislost výletu netopýrů na intenzitě osvětlení**

K tomuto experimentálnímu měření jsem používala přístroj na měření intenzity osvětlení typ Luxmetr PU 150.

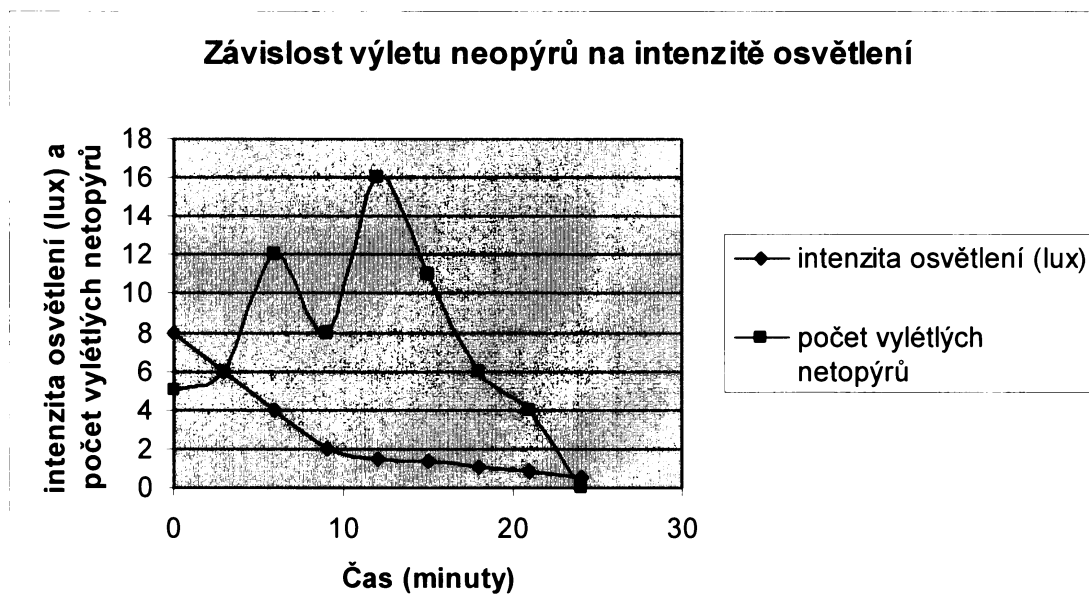
Tento přístroj se skládá z vlastního měřicího přístroje a samostatné měřicí sondy. Měřicí obvod s fotočlánkem je napojen jako paralelní kombinace měřicího magnetoelektrického ústrojí, fotočlánku a jednotlivých justačních odporů pro příslušné měřicí rozsahy. Při měření nejmenších hodnot osvětlení může být stupnice osvětlená zabudovanou žárovkou, která je napojena jako zatěžovací odpor při kontrolním měření napětí v baterii. Zdroj napětí je tvořen třemi bateriemi 1,5V. Měřicí sonda je opatřena selenovým fotočlánkem pro měřicí rozsahy 200Luxů (L), 1000L a 5000L a dále foto odporem pro měření v základním rozsahu do 10L. Pro měření vysokých intenzit osvětlení je luxmetr vybaven výměnným rozptylovačem se stabilně zabudovaným redukčním filtrem, kterým lze zvětšit největší měřicí rozsah 20 krát tzn. na 100000L (interní návody, Vybíral, 2007)

Výsledky mého pozorování jsou uvedeny v následující tabulce a grafu.

Závislost výletu *Myotis daubentonii* na intenzitě osvětlení:

Čas (minuty)	Intenzita osvětlení (Luxy)	Počet <i>Myotis daubentonii</i>
0	8	5
3	6	6
6	4	12
9	2	8
12	1,5	16
15	1,4	11
18	1	6
21	0,8	4
24	0,5	0

Graf 1 :



V kolonii žijící ve stropní dutině opuštěné stavby bylo celkem 71 zástupců druhu *Myotis daubentonii*, z toho 3 během mého pozorování nevyletli vůbec. Tímto experimentem jsem potvrdila že intenzita slunečního záření je pro netopýry druhu *Myotis daubentonii* dominantním faktorem.



**Obr.3 : *Myotis daubentonii* (www.naturfoto.cz)**



## 7. DISKUSE

Cílem mé bakalářské práce bylo pokusit se shrnout současné poznatky o procesu hibernace a přispět k řešení otázky, které z endogenní substitucí se na tomto procesu podílejí. Dalším cílem mé práce bylo shrnout současné informace, které mohou hrát roli při praktickém využití v humánní medicíně.

*Z dosažených výsledků vyplývá, že :*

a) Periferní podání D-alanin-D-leucin enkefalinu (DADLE) nezpůsobilo v provedených experimentech (uváděný experiment Vybíral a ost., 1994) žádnou termoregulační odezvu, zatímco aplikace této látky do předního hypotalamu vyvolala v časné fázi účinku na dávce závislou, krátkodobou hypotermii, způsobenou snížením prahové centrální teploty pro nástup chladové termogenéze. Prahy pro evaporativní a neevaporativní ztráty tepla zůstaly beze změny. Důsledkem těchto změn je vytvoření mezi prahové zóny pro děje zajišťující obranu proti přehřátí a chladu.

Dalšími endogenními peptidy, které lze oprávněně považovat za součást HT jsou NT a BOM, které skutečně snižují prahové hodnoty i u experimentálních homoiothermů.

b) Zdá se, že je stále více přitahována pozornost hibernace, kvůli protekci orgánů a s tím spojených problémů při transplantacích. Objevují se nové studie, které více či méně dokazují jak nám hibernující živočichové mohou poskytnout cenné informace v této problematice. Pozorování fyziologických a biochemických mechanismů jsou velkou nadějí pro léčbu kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění. Funkceschopnost tkání hibernantů zůstává zachována i při velmi nízkých teplotách.

c) Na vybrané druhu netopýra jsem ověřila zásadní vliv jednoho z abiotických faktorů jakým je světlo. V mém případě na *Myotis daubentonii* (pozn. netopýr vodní), pro kterého je intenzita slunečního záření dominantním faktorem.

Hibernace je zcela výjimečný fyziologický a biologický proces, a porozumění fyziologické a biochemické podstaty tohoto děje přinese nejen praktický ale i teoretický význam. Přesto stále zůstává spousta nezodpovězených otázek, ať už se jedná o hibernaci jako takovou nebo o přesné odhalení hypotetické substance v krvi hibernujících živočichů, která napomáhá při vstupu do hibernace (tzv. Hibernační trigger). Uvedené nálezy mohou sloužit jako výchozí podklady pro další studium tohoto unikátního procesu.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

**Ball, E.G.** : Some energy relationship in adipose tissue.

*Ann. N.Y. Acad. Sci.* , 131: 225 – 234 , 1965

**Barnes, B.M.** : Freeze avoidance in a mammal : body temperatures below 0 degrees C in an Arctic hibernator. *Science* 244 : 1593 – 1595, 1989

**Biessette, G., Manberg, P.J., Nemeroff, C.B. , Prange, A.J., Jr.** : Neurotensin a biologically active peptide. *Life Sci.* 23 : 2173 – 2182 , 1978

**Bigelow, W., Trimble, A.S., Schonbaum, E. and Kovats, L.**: A Report on studies *Marmota monax*. 1 . Biochemical and pharmacological investigations of blood fat.

*Ann. Acad. Sci. Fenn. A.4*, 71(3) : 37-50, 1964

**Borlongan, C.V. , Wang, Y. , Su T.P.** : Delta opioid peptide (D-Ala 2 ,D –Leu 5 ) enkephalin : Linking hibernation and neuroprotection.

*Frontiers in bioscience* 9 : 3392 – 3398 *Suppl.* , 2004

**Carey, H.V., Andrews, M.T., Martin, S.L.** : Mammalian hibernation : Cellular and Molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol* 83 : 1153 – 1181 , 2003

**Dawe, A.R. , Spurrier, W.A.** : Hibernation induced in ground squirrels by blood transfusion. *Science*, 163 : 298 -299, 1968

**Dawe, A.R. , Spurrier, W.A. and Armour, J.A.**: Summer hibernation induced by cryogenically preserved blood trigger. *Science*, 168 : 497 – 498 , 1970

**Drew, K.L. , Rice, M.E. , Kuhn, T.B., and Smith, M.A.** : Neuroprotective adaptations in hibernation : therapeutic implications for ischemia-reperfusion, traumatic brain injury and neurodegenerative diseases. *Free Radical Biol Med* 31 : 563 – 573 , 2001

**Epperson, L.E. , Martin, S.L. , :** Quantitative assessment of grand squirrel RNA levels in multiple stages of hibernation. *Physiol Genomics* 10: 93-102 , 2002

**Green ,C. :** Mammalian hibernation : lessons for organ preservativ?  
*Cryo – Letters* 21 : 91 – 98 , 2000

**Hudson, J.W. , and Bartholomew,G.A.:** Terrestrial animals in dry heat : Aestivators,  
v Handbook of Physiology.Adaptation to the enviroment.*American Physiological  
Society, Washington, D.C., Sec. 4, Chap. 34 : pp. 541-550, 1964*

**Jánsý,L. :** Ekofyziologická fyziologie živočichů a člověka , Univerzita Karlova  
v Praze,Přírodovědecká fakulta, *Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1977*

**Jánský, L. :** Vývojová fyziologie I. , Základy termoregulace ,Univerzita Karlova  
v Praze,Přírodovědecká fakulta , *Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1990*

**Jánský,L.Kahlerová,Z.,Nedoma,J.,Andrews,J.F. :** Hukotal kontrol of hibernation in  
golden hamsters.V Survival in the Cold.Eds:Musacchia,X.J.,Jánský,L. Elsevier North-  
Holland,*Inc. New York 1981,pp.13-32, 1981*

**Johannsen ,B.W. :** Effects of druha on hibernation,. v The Pharamcology of  
Thermoregulation,Schonbaum,E. and Lomax,P., eds. *Karger,Basel,pp. 364 – 381 ,1973*

**Lipton, M.A. , Bissette, G. , Nemeroff, C.B. , Loosen, P.T. , Prange, A.J. , Jr. :**  
Neurotensin : a possible mediator of thermoregulation in the mouse.  
In : Drugs,Biogenic Amines , and Body Temperature – Third Synopsium on the  
Pharmacology of Thermoregulation (P.Lomax, E. Schönbaum, B Cox , eds. ) , pp 54 – 57,  
*S.Karger,Basel , 1997*

**Morison, P.R. and Allen, W.T. :** Temperature response of white mice to implants of brown fat. *J. Mammal.*, 43 . 13-77, 1962,

**Nemeroff, C.B. , Luttinger, D. , Prange, A.J. , Jr. :** Neurotensin and Bombesin.  
**In :** The Handbook of psychopharmacology ( L.L. Iversen, S.D. Iversen ,S.H. Snyder , eds.)  
, vol . 16 :363 – 467, Plenum Press, New York , 1983

**South, F.E., Partner, W.C. and Luecke, R.H.:** Response to preoptic temperature manipulation in the awake and hibernating marmot. *Physiol. Rev.* 66 : 235-300, 1975

**Vybíral, S., Černý , L. , Jánký , L. :** Mode of ACTH Antipyretic Action. *Brain Research Bulletin*, Vol. 21 pp : 557 – 562 , 1988

**Vybíral, S. :** Interní návody : Vliv vnějších faktorů na živé systémy, 2007

**Vybíral, S. , Nacházel, J. :** Diplomová práce : Vliv neuropeptidů na termoregulaci králíka, 1985

**Vybíral, S. , Šimková, M. :** Diplomová práce : Hibernační trigery a jiné kryogeny, 1994

**Wang, L.C.H.:** Energetic and field aspects of mammalian torpor : The Richardson's ground squirrel, *Strategies in Cold : Natural Torpidity and Thermogenesis*, Wang, L.C.H. and Hudson, J.W., eds *Academic Press, New York, San Francisco, London*, pp 109-146, 1978

**Kousyou Yamanouchi , M.D. , Katsuhiko Yanaga , M.D. , Sadayuki Okudaira , M.D. , Susumu Eguchi, M.D. , Junichiro Furui , M.D. , Takashi Kanematsu , M.D.:**  
(D-Ala –D –Leu) enkephalin (DADLE) protect liver against ischemia – reperfusion injury in the rat. *Journal of Surgical Research* 114 , 2003

<http://www.naturfoto.cz/netopyr-vodni-fotografie-3>