

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

OTPORNOST NA TEMPERATURNE OSCILACIJE I KRIOGENEZA

RESISTANCE TO TEMPERATURE FLUCTUATIONS AND CRYOGENICS

SEMINARSKI RAD

Nora Pacenti
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: doc.dr.dc. Duje Lisičić

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1. Uvod.....	2
2. Fiziologija šumske žabe pri niskim temperaturama	4
2.1. Stvaranje leda	5
2.2. Krioprotektant	5
2.3. Odmrzavanje	7
2.4. Pomoćni mehanizmi	7
3. Stres pri zamrzavanju	8
3.1. Dehidracija	8
3.2. Ishemija	9
4. Primjena krioprezervacije	10
5. Zaključak	11
6. Literatura	12
7. Sažetak	13
8. Summary	13

1.UVOD

Sisavci održavaju svoju tjelesnu temperaturu homeostatskim mehanizmima kako bi bila konstantna. Centar za regulaciju tjelesne temperature u sisavaca nalazi se u hipotalamusu. Hipotalamus prima informacije od termoreceptora smještenih po tijelu te sukladno tome odgovara na povećanje ili sniženje vanjske temperature. Prosječna ljudska temperatura iznosi oko 37 stupnjeva Celzijevih. Pad tjelesne temperature može predstavljati ozbiljan problem za ljudsko zdravlje. Ukoliko se temperatura snizi ispod 35 stupnjeva, dolazi do stanja koje nazivamo hipotermija. Hipotermija može biti izazvana hladnoćom ili raznim bolestima. Simptomi uključuju drhtanje, manjak koordinacije, plitko disanje, ljubičaste prste, raširene zjenice, zbunjenost. Tjelesne tekućine postaju viskoznije, otežano je njihovo pumpanje po tijelu. Zbog zadržavanja topline u unutarnjim organima javljaju se ozeblina na ekstremitetima.

Blaga hipotermija (34-35 C) uzrokuje povećanje krvnog tlaka i brzine otkucaja srca jer srce mora jače pumpati da bi krv cirkulirala kroz stegnute krvne žile. Umjerena hipotermija uzrokuje bradikardiju (usporen rad srca), aritmiju i hipotenziju (nizak krvni tlak). Poremećena je acido-bazna ravnoteža. Javlja se acidoza uslijed hipoventilacije, pH plazme pada, a CO₂ u plazmi lagano je povišen. Ukoliko temperatura padne ispod 30 C, dolazi do srčanog zastoja.

Kada se tijelo pothladi, regulatorni centri aktiviraju mehanizme za povećano stvaranje topline. Dolazi do vazokonstrikcije krvnih žila u koži kako bi se spriječio gubitak topline preko kože. Vazokonstrikcija nastaje kao posljedica podraživanja simpatičkih središta u stražnjem dijelu hipotalamusa. Dolazi do piloerekcije, tj. nakostriješenja dlaka što ima bitniju ulogu u životinja nego u ljudi. Simpatička stimulacija izaziva kontrakciju mišića podizača dlaka vezanih uz folikul. Te dlake zarobljavaju debeli sloj izolacijskog zraka neposredno uz kožu, tako da je prijenos topline u okolinu minimalan. Organizam pokušava povećano stvarati toplinu termogenezom. Metabolizam potiče drhtanje, stvaranje topline simpatičkom aktivacijom (adrenalin i noradrenalin potiču oksidativnu fosforilaciju bez stvaranja ATP-a) i lučenje tiroksina (u životinja). U stražnjem dijelu hipotalamusa smješten je primarni motorički centar za drhtanje koji je u normalnim uvjetima inhibiran, a aktivira se signalima iz receptora za hladnoću smještenim u koži i leđnoj moždini. Oni ne uzrokuju stvarno drhtanje, već povećavaju tonus skeletnih mišića u cijelom tijelu (Guyton i Hall, 2006).

Niske temperature nepovoljno utječu na stanične membrane mijenjajući konformaciju, orijentaciju i pokretljivost lipida što narušava izmjenu tvari poprijeko membrane. Temperatura također utječe na konformaciju proteina i interakcije enzim-ligand. Ozbiljan

problem predstavlja kolaps membranskog potencijala pri kojem ATP ionske pumpe, ograničene količinom ATP-a u hladnoći, ne mogu održati protok iona u suprotnom smjeru. Posljedica je nekontroliran unos kalcija u stanicu.

Izrazitim sniženjem temperature, voda u stanicama počinje se zamrzavati. Kristali leda koji se formiraju, osim što oštećuju staničnu arhitekturu, uzrokuju smanjenje staničnog volumena zbog povlačenja vode van stanice. Led može nepovratno oštetiti stanice i kapilare, prekinuti međustaničnu komunikaciju, poremetiti ionsko-osmotsku regulaciju. Kako je sastav ledenih kristala isključivo voda, formacija istih dehidrira stanicu i povećava koncentraciju otopljenih tvari. Oba efekta denaturiraju proteine i kidaju veze između makromolekula. Izvanstanično zamrzavanje predstavlja stanici osmotski šok zbog brze redistribucije vode i otopljenih tvari poprijeko membrane (Storey,1989).

2. FIZIOLOGIJA ŠUMSKE ŽABE PRI NISKIM TEMPERATURAMA

Preživljavanje mnogih organizama pri niskim temperaturama ovisi o mogućnosti zamrzavanja, tj. pretvaranju vode u tijelu u led. Šumska žaba, *Rana Sylvatica* (Sl.1.), služi kao model za istraživanje procesa zamrzavanja zbog opširnih informacija o njenoj fiziologiji, biokemiji i molekularnoj biologiji. Osim šumske žabe, i mnoge druge životinje toleriraju zamrzavanje, počevši od beskralježnjaka (insekata i člankonožaca) pa sve do ostalih vodozemaca (bezrepci i repaši) i gmazova (gušteri i kornjače) (Storey,2004). Na preživljavanje utječu različiti čimbenici, npr. godišnje doba, temperatura, stopa zamrzavanja, koncentracija krioprotektanta i drugi. Šumska žaba može preživjeti sa 65-70% vode pretvorene u led najmanje dva tjedna (laboratorijski dokazano). Donja granica temperature preživljavanja je -6 stupnjeva Celzijevih tijekom zime (Storey, 1984). Spori pad temperature omogućava polagano stvaranje leda što na koncu omogućava dovoljno vremena za opskrbu krioprotektantom (Storey,1985). Vidljivi dokazi smrzavanja su ukočeni udovi, čvrst trbuh, neprozirne oči; metabolizam je usporen, žaba ne diše i krv ne cirkulira (Storey i Storey ,1984).



Slika 1. *Rana sylvatica*

(www.dogonews.com/2015/3/19/tiny-wood-frogs-survive-winter-by-partially-freezing-their-bodies)

2.1 Stvaranje leda

Kad temperature padnu tik ispod temperature ledišta tjelesnih tekućina, usporava se nakupljanje leda kako bi ostalo dovoljno vremena za adaptacije preživljavanja (sinteza krioprotektanta). 30 sekundi nakon izlaganja kristalima leda, zamrzavanje započinje. Sinteza krioprotektanta potaknuta je prvim komadićima leda na koži. Led ulazi kroz pore na koži te dolazi u kontakt s vanstaničnom tekućinom u tijelu. Maksimalna koncentracija leda dostignuta je nakon 12-24 sata. Led se formira u trbušnoj i prsnoj šupljini, te okružuje ostale organe. Srce i jetra posljednji su organi koji se zamrznu (Storey i Storey ,2004).



Slika 2. Tijek zamrzavanja

(www.dogonews.com/2015/3/19/tiny-wood-frogs-survive-winter-by-partially-freezing-their-bodies)

2.2 Krioprotektant

Krioprotektanti svojim koligativnim svojstvima ograničavaju redukciju staničnog volumena i stabiliziraju strukturu membrane. Ugljikohidrati niske molekulske mase nagomilavaju se u stanicama i omogućuju otpor gubitku vode. Dobro su topljivi, lako se kreću kroz membranu, sintetiziraju se iz rezervi ugljikohidrata, stabiliziraju strukturu proteina te su benigni u visokim koncentracijama. Šumska žaba kao krioprotektant upotrebljava glukozu, čija produkcija započinje kad krene zamrzavanje. Koncentracija glukoze povisi se s 5 mM (5 C) na 200-300 mM. Ovakva ekstremna hiperglikemija može se usporediti s dijabetesom u ljudi kod kojih se javljaju brojne metaboličke nepravilnosti uslijed povećanog nivoa glukoze u krvi (10-50 mM). Jetra je jedini organ u tijelu žabe koji pokazuje trošenje glikogena te je zaključeno da je ona mjesto sinteze glukoze iz rezervi glikogena koje su nakupljene tijekom ljeta i rane jeseni.

Put sinteze krioprotektanta jednak je onome u svih kralježnjaka za sintezu glukoze iz glikogena. Sinteza se odvija bez ATP-a i reducirajućih agensa (NADPH) u tri koraka:

Glikogen → glukoza-1-fosfat → glukoza-6-fosfat → glukoza

Enzimi uključeni u sintezu su glikogen fosforilaza (GP) koja cijepa jedinice heksoza fosfata sa glikogena, fosfoglukomutaza i glukoza-6-fosfataza koja suprimira aktivnost heksokinaze (koja pretvara glukozu u glukoza-6 fosfat) i pojačava aktivnost glukoza-6-fosfataze da bi se G6P reciklirala natrag u glukozu. Aktivacija glikogen fosforilaze u jetri stimulira protein kinazu uz pomoć cAMP-a i konvertira fosforilazu b u fosforilazu a. Povećava se koncentracija glukoze, a time bi se trebala povećati sekrecija inzulina da zaustavi otpuštanje glukoze. Koncentracija inzulina se povećava, ali interakcija s receptorima na membrani jetre blokirana je tijekom zamrzavanja. Nadalje, inzulin šumske žabe pokazuje anomaliju u strukturi koja bi mogla ograničiti njegovu efikasnost, što omogućuje da se količina glukoze poveća iznad normalne razine. Inzulin žabe sadrži dvije aminokiseline (lizin i prolin) na N kraju A lanca koje ostali kralježnjaci nemaju (Storey i Storey, 2004).

Životinje koriste razne druge molekule kao krioprotektante, npr. glicerol, ureu...no glukoza ima svoje prednosti, a to su: stabilizira makromolekule, potpomaže fermentaciju, usporava metabolizam i održava stanični volumen iznad kritičnog (Storey, 1989).

Table 3. Levels of some metabolites in heart and kidney of *R. sylvatica* from control versus freezing exposed frogs

	Concentration ($\mu\text{mol/g}$ wet weight)	
	Control	Freezing exposed
<i>Heart</i>		
Glycogen	48.1 \pm 2.45	43.9 \pm 12.6
Glucose	2.06 \pm 0.46	198.3 \pm 27.3
Lactate	6.17 \pm 1.00	31.0 \pm 1.24
<i>Kidney</i>		
Glycogen	39.2	27.1 \pm 5.28
Glucose	3.15	120.8 \pm 14.1
Lactate	8.15	35.2 \pm 2.36

Slika 3. Koncentracije metabolita
(Storey i Storey, 1984)

2.3 Odmrzavanje

Odmrzavanje započinje u centralnim organima i širi se prema periferiji. Otkucaji srca uspostavljaju se i prije no što je cijela žaba odmrznuta, slijedi plućna ventilacija, protok krvi kroz tkiva, motoričke sposobnosti i refleksi. Većina funkcija obnovljena je dan ili dva nakon početka odmrzavanja. Prilikom odmrzavanja, žabe su ekstremno hiperglikemične i trebaju se riješiti viška glukoze koja može dovesti do metaboličkih oštećenja. Koncentraciju glukoze od 200 do 300 mM bubrezi ne mogu u potpunosti reapsorbirati, pa se izlučuje u urin. Glukoza iz urina nije izgubljena, već se efikasno reapsorbira iz mokraćnog mjehura i pretvara u glikogen u jetri pod utjecajem glikogen sintetaze (Storey, 2004).

2.4 Pomoćni mehanizmi

U crijevu šumske žabe nalaze se bakterije *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* i *Enterobacter agglomerans* koje su aktivne pri temperaturama između -2 i -3 C. U vanjskoj membrani bakterija nalzi se repetitivna sekvenca aminokiselina koja ima ulogu u kristalizaciji i pomaže žabi inducirati zamrzavanje ukoliko već nije prvim dodiranjem kristalića leda. Način na koji ove bakterije djeluju još nije u potpunosti istražen (Lee i Minges, 1995).



Slika 4. Područja kristalizacije-jetra se posljednja smrznu
(www.exploratium.edu/frogs/woodfrog/index.html)

3. STRES PRILIKOM ZAMRZAVANJA

3.1. Dehidracija

Žabe imaju propusnu kožu koja mora biti vlažna da bi omogućila izmjenu plinova. Propusna koža predstavlja rizik gubitka vode evaporacijom s njene površine. Zato žabe biraju vlažna staništa prekrivena slojevima mahovina. Eksperimenti sa žabama u suhim i vlažnim posudama koje su izlagane hladnoći pokazali su da žabe u suhim posudama gube puno više vode nego one u vlažnim. Osim toga, prilikom stvaranja izvanstaničnog leda, zbog povećanja osmotskog tlaka, voda izlazi iz stanica da bi izjednačila koncentraciju unutar i van stanice i dehidrira ih. Led povlači za sobom vodu iz organa. S pozitivne strane dehidracija smanjuje količinu leda u organima, a time i mogućnost ozljeđivanja uslijed stvaranja kristala, ali može poremetiti pravilan rad organa. Gubitak vode smanjuje stanicu ispod kritičnog volumena, mijenja pH i koncentraciju otopljenih tvari (problem se javlja ako su toksične); također remeti homeostazu organa i organskih sustava. Šumska žaba preživljava sporo zamrzavanje, dok brzo ne zbog toga što voda iz organa ne stigne izići, stanice ne stignu dehidrirati. 24 sata nakon zamrzavanja jetra i crijevo izgube u prosjeku oko 58% vode, dok je kod skeletnih mišića dehidracija slabije izražena, vjerojatno zbog bržeg nastanka leda. Cjelokupna rehidracija može potrajati do 48 sati. Glukoza se veže za molekule vode sprječavajući dehidraciju, no čak ni vrlo visoke koncentracije glukoze nisu učinkovite pri temperaturama nižim od -8 C.

Dehidracija ljudskih organa mogla bi spriječiti mehaničke ozljede nastale stvaranjem leda unutar tkiva. Led se formira i širi vaskularnim sustavom, osmotski tlak nezamrznutih tekućina unutar žila raste i povlači vodu iz susjednih stanica. Šumska žaba izbjegava mehaničke ozljede evakuiranjem vode iz organa i uspješno se oporavlja od ozbiljne dehidracije. Programirana dehidracija prije zamrzavanja mogla bi povećati potencijal očuvanja ljudskih organa u ledu (Lee i sur. ,1992).

3.2. Ishemija

Zamrzavanje krvi ima za posljedicu smanjen ili potpuno prekinut optok krvi (kisika i nutrijenata) kroz organe, odstranjivanje otpadnih tvari, komunikaciju hormonima. Organi mogu preživjeti koristeći jedino svoje unutarnje zalihe. Svaka stanica mora imati adekvatnu zalihu fermentacijskih metabolita i mogućnost korištenja ATP-a proizvedenog anaerobnim putevima. Šumske žabe vrlo dobro izdržavaju uvjete manjka kisika; troše ATP i akumuliraju krajnje produkte glikolize, kao što su laktat i alanin.

Dobro razvijen antioksidativni sustav omogućava prevladavanje oksidativnog stresa prilikom izlaska iz anoksičnog stanja. ROS (reactive oxygen species), spojevi visokog oksidacijskog stanja nastali anaerobnom razgradnjom mogu oksidirati makromolekule ili stvoriti komplekse peroksida i lipida koji oštećuju staničnu membranu. Uz ROS, i slobodna glukoza sklona je autooksidaciji u prisustvu metala (željezo, bakar) s kojima stvara reaktivne dikarbonilne molekule i vodikove peroksidge. Šumska žaba zimi eksprimira više peroksiredoksina, enzima koji reducira organske hidroperoksidge i vodikove peroksidge, izbjegavajući moguću štetu. Također, u svim organima osim mozga pronađen je visok sadržaj glutaciona, metaboličkog antioksidansa, dok se aktivnost glutacion peroksidaze povećala s 20 na 150 % (Storey i Storey, 2004).

Strategije antioksidativne obrane koje omogućuju životinjama uzastopne cikluse zamrzavanja i odmrzavanja bez oksidativnih stresova od velikog su interesa znanstvenicima za razumijevanje mehanizama ishemije koji bi se mogli primijeniti na krioprezervaciju ljudskih organa. Studije su pokazale da korištenje antioksidansa pri očuvanju organa pridonose postransplantacijskoj vijabilnosti.

Atrijski natrij-uretički peptid (ANP) je hormon kojeg otpušta srce i regulira količinu vode, natrija i kalija u organizmu i sudjeluje u homeostazi. Prilikom zamrzavanja, u žabi je poremećena dinamika fluida te ANP ima ulogu u odgovoru organa na takve promjene. ANP reguliran je cGMP putom i smanjuje ishemiju i oštećenja koja se mogu dogoditi prilikom ponovnog uspostavljanja protoka krvi kroz tkiva (Storey, 2004).

4.PRIMJENA KRIOPREZERVACIJE

U Americi postoje tvrtke koje zamrzavaju ljude nakon smrti tako što im isisaju što više krvi iz tijela te ju zamijene antifrizom i pohrane ih u komore s tekućim dušikom na -196 C. Problem leži u tome što ne znaju hoće li ih nakon nekoliko stotina godina moći oživiti, i ako ih uspiju oživiti hoće li ti ljudi funkcionirati normalno (<http://news.bbc.co.uk/2/hi/2133961.stm>).

Za sada su uspješno zamrznuti muško sjeme, krv (stanice za transfuziju i matične stanice), uzorci tkiva poput tumora, embriji, oocite te tkiva jajnika. Za zamrzavanje koriste se 3 grupe krioprotektanata:

- a) prodirajući krioprotektanti niske molekulske mase poput metanola, etilen glikola, DMSO (dimetilsulfoksid), glicerola
- b) neprodirajući krioprotektanti niske molekulske mase poput galaktoze, glukoze, saharoze, trehaloze
- c) neprodirajući krioprotektanti velike molekulske mase kao što su polivinil alkohol, polivinil pirolidon, natrijev hijaluronat i drugi polimeri (Palasz i Mapletoft, 1996.)

Uspješno su zamrznuti jajnici 7 štakora s dijelovima jajovoda i gornjim dijelom maternice tretirani fruktozom i DMSO-om 30 minuta, te zatim pohranjeni u tekući dušik preko noći. Sljedeći dan odmrznuti su, krioprotektant je postupno ispran i transplantirani su. 4 jajnika su ovulirala nakon odmrzavanja, dok je jedna životinja začela sa transplantiranim jajnikom (Gosden, 2002.).

Oocite, embriji i tkivo jajnika pohranjuju se na niske temperature zbog rizika mladih pacijenata od sterilnosti ili rane menopauze, s namjerom za odmrzavanje ukoliko požele začeti. Krioprezervacija pri niskim temperaturama (u tekućem dušiku pri -196 C) poželjna je zbog bioloških i komercijalnih razloga; smanjuje trošak, genetički drift i bolesti. Protokoli za zamrzavanje dijele se na brze i spore s obzirom na brzinu hlađenja i koncentraciju krioprotektanata koja se upotrebljava. Osnovni principi su jednaki u tome da štite stanice od nastanka unutarstaničnih kristala leda, dehidracije i nakupljanja toksina. Da bi se spriječio nastanak kristala, unutarstanična voda zamjenjuje se prodirajućim krioprotektantom. Pri sporom hlađenju, stanice se stave u medij koji sadrži 10-11% krioprotektanta, dok je pri brzom hlađenju koncentracija krioprotektanta puno veća što brzo povlači vodu van stanice (Shaw i sur., 2000.).

5. ZAKLJUČAK

Istraživanja na žabama i ostalim kralježnjacima fascinantni su primjeri kompleksnih adaptacija na zamrzavanje, te bi uvelike pripomogla u krioprezervacijskoj tehnologiji organa i transplantacijskoj medicini. Šumske žabe dobar su model za krioprezervaciju stanica sisavaca jer koriste glukozu kao krioprotektant .

Istraživanja na životinjama s mogućnošću zamrzavanja vrše se u nadi da će se otkriti metode za krioprezervaciju ljudskih organa, a time i pohranjivanje zamrznutih organa za kasniju transplataciju. Uspješno zamrzavanje organa, pa čak i ljudi omogućilo bi čovječanstvu nastavak života gdje smo stali prije smrti, tj. mogućnost preživljavanja dok se ne nađe lijek za smrtonosnu bolest, ili odlazak u svemir bez utroška metabolizma što bi bio velik korak naprijed. Zabilježeni su slučajevi beba koje su preživjele nekoliko sati na izrazito niskim temperaturama (14 C) (www.lifesaving.com), što nam daje nadu da zamrzavanje ipak nije ograničeno na ektoterman svijet životinja.

6. LITERATURA

Fuller B., Lane N., Benson E. (2004.): Life in the Frozen State. U: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Vertebrate Freeze Tolerance: The Wood Frog, CRC Press, London str. 243-269

Guyton A., Hall J. (2006.): Textbook of Medical Physiology. Elsevier Saunders, Pennsylvania

Gosden R. (2002.): Gonadal tissue cryopreservation and transplantation

Lee M., Lee R., Gunderson J., Minges S. (1995.): Isolation of ice nucleating active bacteria from freeze-tolerant frog, *Rana sylvatica*

Lee R., Costanzo J., Davidson E., Layne J. (1992.): Dynamics of body water during freezing and thawing in a freeze-tolerant frog

Palasz A.T., Mapletoft R.J. (1996.): Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances

Shaw J.M., Oranratnachai A., Trounson A.O. (2000.): Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue

Storey K. (2004.): Strategies for exploration of freeze responsive gene expression: advances in vertebrate freeze tolerance

Storey K. (1989.): Biochemistry of natural freeze tolerance in animals: molecular adaptations and applications to cryopreservation

Storey K., Storey J. (1985.): Triggering of cryoprotectant synthesis by the initiation of ice nucleation in the freeze tolerant *Rana sylvatica*

Storey K., Storey J. (1984): Biochemical adaptations for freezing tolerance in the wood frog, *Rana sylvatica*

www.dogonews.com/2015/3/19/tiny-wood-frogs-survive-winter-by-partially-freezing-their-bodies

www.exploration.edu/frogs/woodfrog/index.html

<http://news.bbc.co.uk/2/hi/2133961.stm>

7. SAŽETAK

Već dugi niz godina ljudi se pitaju kako produžiti životni vijek organa čuvanih u ledu za transplantaciju. Odgovor je možda toliko jednostavan da ga ne primjećujemo. Mnoge životinje u prirodi uspješno prevladavaju niske temperature i oporavljaju se od zamrzavanja. Jedna od takvih je i šumska žaba, *Rana sylvatica*, koja svojim brojnim mehanizmima održava vijabilnost organa tijekom uzastopnih ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. Njene adaptacije poslužile bi kao model za zamrzavanje tkiva, organa, a možda i ljudi.

U ovom radu izložen je kratki pregled prilagodbi koje šumska žaba koristi kao posljedicu izlaganja niskim temperaturama.

8. SUMMARY

For a long time humans are asking how to prolong lifetime of the organs stored in ice for transplantation. The answer might be so simple we might not even see it. A lot of animals in nature survive low temperatures and freezing. One of them is the wood frog, *Rana sylvatica*. The wood frog has many mechanisms for maintaining viability of organs during periods of freezing and thawing. It's adaptations could serve as a model for freezing human tissues, organs and maybe even whole organisms.

In this work has been presented a short review of adjustments that wood frog developed as a result of influence of low temperatures on its body.