



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Studium odpovědi *Hypsibius dujardini* na stres

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jana Lušňáková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2020

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Lušňáková
Název práce	Studium odpovědi <i>Hypsibius dujardini</i> na stres
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Želvušky patří mezi nejodolnější mnohobuněčné organismy, neboť se u nich vyvinula řada adaptací a ochranných mechanismů. Díky tomu jsou vhodným modelovým organismem ke studiu stresu. Cílem této práce bylo otestovat hypotézu, že rezistence želvušek <i>Hypsibius dujardini</i> ke stresu je ovlivnitelná předešlou expozicí témuž stresoru, případně i stresoru jiné povahy. Prezentovány jsou pilotní experimenty se třemi abiotickými stresory – zářením UVC, zvýšenou teplotou a peroxidem vodíku jako zdrojem reaktivních kyslíkových forem.</p>
Klíčová slova	<i>Hypsibius dujardini</i> , stresová odpověď, želvušky, teplotní šok, oxidativní stres, radiační poškození
Počet stran	51
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Jana Lušňáková
Title of thesis	Stress response in <i>Hypsibius dujardini</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>Tardigrades are one of the most resistant multicellular organisms thanks to an array of adaptations and protective mechanisms acquired during evolution. They are therefore a suitable model organisms for stress response research.</p> <p>In this study, we test a hypothesis postulating that stress resistance of tardigrade <i>Hypsibius dujardini</i> can be modulated by a previous exposure to the same stressor or even to a stressor of a different type. Presented are the pilot experiments with three abiotic stressors – UVC, increased temperature and hydrogen peroxide as a source of reactive oxygen species.</p>
Keywords	<i>Hypsibius dujardini</i> , tardigrades, stress response, heat shock, oxidative stress, radiation damage
Number of pages	51
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

Podpis .....

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas a cenné rady při vypracování mé bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. Dominiku Vítkovi za pomoc v laboratoři a praktické rady týkající se kultivace želvušek. Ing. Janu Červenému, Ph.D. děkuji za zásobování potravou pro želvušky.

## OBSAH

### Seznam zkratek

1	Úvod.....	9
2	Cíle práce.....	10
3	Co jsou želvušky?.....	11
3.1	Anatomie.....	11
3.2	Rozmnožování.....	13
3.3	Ekdyze.....	14
3.4	Biogeografie a ekologie.....	14
3.5	Životní cyklus v nepříznivých podmínkách.....	15
3.5.1	Diapauza.....	15
3.5.1.1	Zapouzdření.....	15
3.5.1.2	Cyklomorfóza.....	16
3.5.2	Kryptobióza.....	16
3.5.2.1	Osmobióza.....	17
3.5.2.2	Anoxybióza.....	17
3.5.2.3	Kryobióza.....	17
3.5.2.4	Anhydrobióza.....	18
3.5.3	Dormance ve vajíčkách.....	21
3.5.4	Přežití klidových stádií.....	22
3.6	Rezistence k abiotickému stresu.....	23
3.6.1	Teplota.....	23
3.6.2	Hydrostatický tlak.....	24
3.6.3	Osmotický stres.....	24
3.6.4	Oxidační stres.....	25
3.6.5	Ionizující záření.....	26
3.6.6	UVC záření.....	27
4	Materiály a metody.....	28
4.1	Biologický materiál.....	28
4.2	Laboratorní materiál.....	28
4.3	Přístroje.....	28

4.4	Kultivace <i>H. dujardini</i> .....	29
4.5	Odebírání želvušek na experiment.....	29
4.6	Hodnocení odpovědi na stres.....	29
5	Výsledky.....	31
5.1	Hodnocení citlivosti k jednorázovému působení stresoru.....	31
5.2	Hodnocení citlivosti k opakovanému působení stresoru.....	33
5.3	Stanovení citlivosti k vyšší kultivační teplotě.....	33
5.4	Hodnocení schopnosti předešlé expozice stresu chránit proti jednorázovému a opakovanému působení stresoru.....	33
5.5	Vliv kultivační teploty na rezistenci ke zvýšené teplotě.....	42
6	Diskuze a závěr.....	44
	Seznam použité literatury.....	46

## Seznam zkratk

AFP – antifreeze protein, proteiny bránící zmrznutí

CAHS – cytoplasmic abundant heat soluble, teplem rozpustné proteiny hojné v cytoplasmě

HSP – heat shock proteins, proteiny teplotního šoku

INA – ice-nucleating agent, činidlo indukující nukleaci ledu

LEA – late-embryogenesis abundant, proteiny hojné při pozdní embryogenezi

LLT – lower lethal temperature, spodní smrtelná teplota

LD50 – dávka stresoru, která způsobuje úhyn 50 % jedinců

LT50 – teplota, kdy dochází k úhynu 50 % jedinců

ROS – reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku

SAHS – secretory abundant heat soluble, teplem rozpustné secernované proteiny

THF – thermal hysteresis factor, faktor tepelné hystereze

UVC – ultrafialové záření typu C



## 1 Úvod

Želvušky jsou kmen mikroskopických bezobratlých, kteří se vyskytují celosvětově, a to jak ve sladké i slané vodě, tak i na pevnině (Miller 1997, Møbjerg et al. 2011). Druhy žijící na pevnině se mohou vyskytovat v mechu, lišejnících, půdě nebo rostlinném odpadu (Glime 2017). Všechny druhy však vyžadují alespoň tenký vodní film k reprodukci a k udržení aktivního stavu. Kvůli této závislosti na vodě jsou všechny druhy považované za akvatické (Miller 1997). Jelikož voda není v terestrickém prostředí vždy k dispozici, vyvinuly si tyto druhy želvušek řadu strategií k přežití (Erdmann & Kaczmarek 2016). Mezi tyto adaptace patří klidové období označované jako dormance, což je stav, kdy se dočasně zastavují aktivní projevy života, zpomaluje se metabolismus a vývoj. Dormanci můžeme rozdělit na diapauzu a kviescenci. První typ je pod kontrolou vnitřních faktorů (Guidetti et al. 2011). Druhý typ je naopak vyvolán vnějšími environmentálními faktory. Extrémní forma kviescence, kdy se metabolická aktivita utlumuje až na nepostřehnutelné hodnoty, se nazývá kryptobióza (Keilin 1959, Guidetti et al. 2011). Lze ji rozlišit na čtyři druhy, v závislosti na tom, jaký stresor ji vyvolal, a to na kryptobiózu, osmobiózu, anoxybiózu, kryobiózu a anhydrobiózu (Guidetti et al. 2011). V klidovém stádiu jsou želvušky schopny přečkat nepříznivé podmínky jako je vysychání, mráz, vakuum, vysoký tlak, radiaci, extrémní pH, anoxii, vysoké teploty a působení toxinů (Møbjerg et al. 2011). Díky těmto adaptacím jsou želvušky zajímavým modelovým organismem pro studium odpovědi na stres.

## **2 Cíle práce**

1. Vypracovat rešerši literatury týkající rezistence želvušek ke stresu.
2. Experimentálně charakterizovat odpověď želvušek druhu *Hypsibius dujardini* na vybrané abiotické stresory a jejich kombinaci.

### 3 Co jsou želvušky?

Želvušky jsou mikroskopičtí bezobratlí o přibližné velikosti 0,1 - 1,2 mm. Byly objeveny v 18. století s rozvojem mikroskopie. Poprvé je pozoroval německý zoolog Johann A. E. Goeze v roce 1773, který je pojmenoval „vodní medvídci“ díky jejich vizuální podobnosti s medvědy (Møbjerg et al. 2011). Tři roky poté dostaly svůj latinský název Tardigrada (z latinského tardigradus = pomalu se pohybující), který zavedl italský biolog Lazzaro Spallanzani a odkazuje na jejich pomalý a nemotorný způsob pohybu. V roce 1962 byly uznány jako samostatný kmen Tardigrada (Møbjerg et al. 2011). Tento kmen patří do oddělení Ecdysozoa, nicméně o jejich přesném fylogenetickém zařazení se vedou debaty. Není jasné, zda jsou příbuzní spíše s Nematoda a Nematophora nebo s Arthropoda a Onychophora (Aguinaldo et al. 1997, Dunn et al. 2008, Edgecombe 2010).

Kmen Tardigrada se dále dělí do tříd Eutardigrada, Heterotardigrada a Mesotardigrada (Møbjerg et al. 2011). Mesotardigrada zahrnuje pouze jeden druh *Thermozodium esakii*, který byl objeven Gilbertem Rahmem v roce 1937 v horkých pramenech v Japonsku. Tato lokalita však byla zničena při zemětřesení a další exempláře poté již nebyly nalezeny. Existence této třídy je tedy někdy zpochybňována. Třída Heterotardigrada se dále dělí na dva řády Arthrotardigrada a Echiniscoidea, kdy první řád zahrnuje až na jednu výjimku pouze mořské druhy a druhý převážně suchozemské druhy. Eutardigrada se potom dělí na třídy Apochela a Parachela. První zahrnuje suchozemské druhy a druhá druhy převážně suchozemské a sladkovodní (Nelson 2002). Celý kmen pak čítá více jak 1200 druhů (Degma et al. 2019).

#### 3.1 Anatomie

Tělo želvušek je vypouklé na dorzální straně a zploštělé na ventrální straně. Je bilaterálně symetrické se čtyřmi páry končetin a je rozděleno do pěti segmentů. První segment je tvořen hlavou, tři segmenty tvoří trup a poslední je kaudální segment. Kromě prvního segmentu každý nese jeden pár nečlámkovaných nohou zakončených drápky. Na povrchu se nachází flexibilní kutikula, která může být hladká, nebo pokrytá různými pláty či výběžky (Nelson 2015, Erdmann & Kaczmarek 2016). Kutikula je syntetizovaná hypodermis, která se skládá z polyglonálních buněk. Želvušky mohou mít různá zbarvení jako šedá, hnědá, namodralá, žlutohnědá, načervenalá. Některé druhy jsou velmi tmavé a zcela neprůsvitné, především co se týče starších jedinců, jiné jsou naopak bezbarvé a průsvitné. Zbarvení je způsobené pigmenty v kutikule, hypodermis, rozpuštěnými látkami v tělní tekutině nebo obsahem trávicího ústrojí či zásobních buněk (Pennak 1989).

Želvušky obvykle mají 40 až 140 dlouhých tenkých somatických svalů. Přesný počet je druhově specifický. Každý sval je jedna jediná vláknitá buňka s jedním jádrem, případně jde o spojení několika takovýchto buněk (Pennak 1989). Kromě somatických svalů želvušky mají také útrobní svaly, svaly jícnu a svaly styletů. Kruhové svaly se nevyskytují (Nelson 2015).

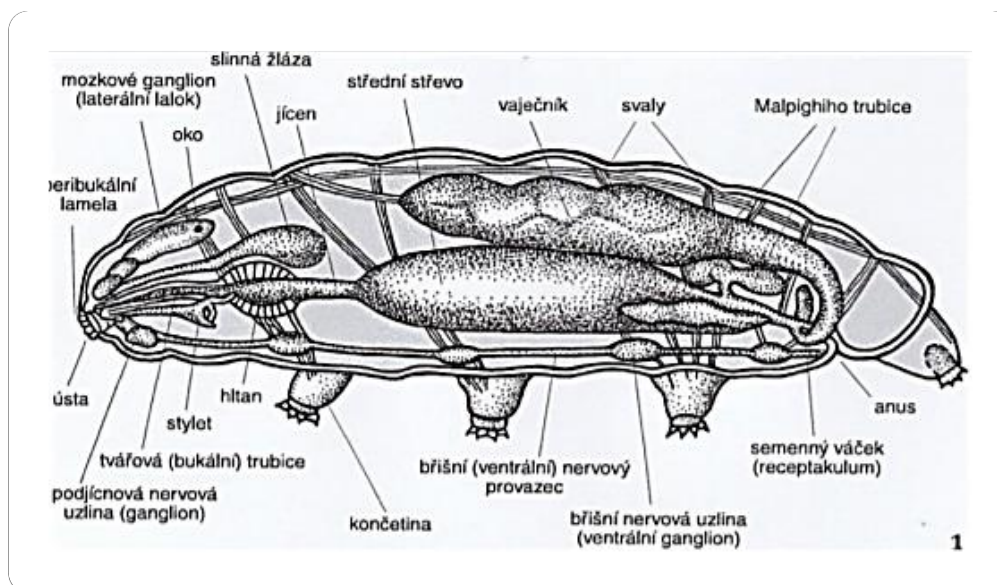
Želvušky nemají respirační a oběhovou soustavu. Respirace probíhá přes kutikulu. Cirkulace je zajištěna pohybem tekutiny v tělní dutině a pohybem coelomocytů, což jsou volně se pohybující zásobní buňky (Nelson 2015).

Nervová soustava je tvořená z obústního nervového centra, které představuje

mozek, z něhož vybíhají dva nervové provazce se čtyřmi dvoulaločnými gangliemi, jedna pro každý pár nohou. Mohou být přítomna jednoduchá očka, která obsahují fotoreceptory a smyslové orgány jako chemoreceptory a papily (Persson et al. 2012, Nelson 2015).

Želvušky mají kompletní trávicí soustavu, která je přizpůsobena typu potravy. Mohou být jak býložravé, tak dravé. Živí se rostlinami, řasami, kvasinkami, bakteriemi a drobnými živočichy jako jsou Nematoda a Rotifera. Potravou mohou být i ostatní želvušky. Soustava se skládá ze tří částí, a to přední, střední a zadní část. Přední část tvoří bukální aparát, hltan a trojdílný jícen. Střední část představuje největší část trávicí soustavy a probíhá zde vlastní trávení (Nelson 2015, Erdmann & Kaczmarek 2016). Trávení napomáhá rozdílné pH, které je kyselé ve oblasti předního střeva a zásadité ve střední oblasti. Zadní část se skládá z rekta a končí buď kloakou u Eutardigrada, nebo řitním otvorem u Heterotardigrada. Přední a střední střevo jsou vystlané kutikulou. Ústní ústrojí je tvořeno párem jehlovitých styletů z uhličitanu vápenatého a opěrnými strukturami. Stylety jsou uloženy v lumenu bukálních žláz. Tento systém slouží k propíchnutí buněk a k vysátí jejich obsahu (Nelson 2015, Erdmann & Kaczmarek 2016). Exkrece může probíhat několika způsoby, a to pomocí bukálních žláz při svlékání kutikuly, svlékání kutikuly s nashromážděnými odpadními látkami, stěny střední části trávicí soustavy nebo pomocí exkretčních žláz jako jsou Malpighické trubice (Nelson 2015).

Želvušky mohou být gonochoristé i hermafrodité, kdy samice a hermafrodité mají jednu pohlavní žlázu a samci dvě. U Heterotardigrada pohlavní soustava končí jako gonopor a u Eutardigrada pohlavní soustava vyúsťuje spolu se soustavou trávicí v kloaku (Nelson 2015). Obojí kloaka i řitní otvor pak vyúsťují mezi posledním párem nohou. U některých druhů může být přítomen pohlavní dimorfismus, a to v tvaru a struktuře kutikuly posledního páru nohou, nebo ve tvaru a zakřivení drápů. U některých druhů jsou samci menší než samice (Pennak 1989).



Obrázek 1. Stavba těla želvušky (Czerneková 2011)

### 3.2 Rozmnožování

Rozmnožování může probíhat jak sexuálně, tak asexuálně s vnějším, nebo vnitřním oplozením. U řady druhů se navíc vyskytuje partenogeneze, při které samice produkují další samice bez oplození (Miller 1997, Nelson 2015). Při vnějším oplození samice uvolní starou kutikulu, samec nebo více samců na ní vyšplhají a vypustí sperma, které se přes kloaku nebo gonopor dostane do prostoru mezi starou kutikulou a tělem samice. Samice pak do staré kutikuly naklade vajíčka a opustí ji. V exuvii pak dojde k oplození vajíček. Při vnitřním oplození sperma vnikne do těla samice přes kloaku nebo gonopor a k plození vajíček dojde ještě před jejich naklazením. Většinu populace tvoří samice. Populace samců je největší v zimě, nebo brzy na jaře. U některých druhů nebyli samci vůbec zaznamenáni. Tyto druhy se nejspíš rozmnožují exkluzivně partenogenezí. V mírném pásu je vrchol rozmnožování od listopadu do května, ale samice s vajíčky lze najít po celý rok (Pennak 1989). Produkce vajíček se ale snižuje během zimního období (Miller 1997). Vajíčka jsou kladena buď volně do prostředí, nebo jsou uložena ve staré exuvii. Volná vajíčka mohou být kladena po jednom, nebo ve skupině. Často jsou lepivá, což umožňuje přichycení k podkladu (Pennak 1989). Povrch vajíčka může být hladký, nebo drsný a různě vzorovaný. Můžou být přítomny prohlubeniny, nebo hřeben (Miller 1997). Spekuluje se, že drsný povrch může mít několik funkcí. Kromě zajištění přichycení k povrchu a ochrany proti predátorům může sloužit jako vodní rezervoár nebo zajišťovat regulaci výměny plynů mezi prostředím a vajíčkem. Velikost, tvar a povrch vajíček jsou u některých druhů jediné známé rozdíly a slouží proto k jejich identifikaci (Miller 1997). Některé druhy produkují dva typy vajíček, tenkostěnné a tlustostěnné. První typ vzniká nejspíš partenogenezí, druhý typ vzniká pohlavním rozmnožování při nepříznivých podmínkách.

Pod povrchem obalu se nachází tenká membrána, která obklopuje embryo, délka jeho vývoje závisí na druhu a vnějších podmínkách (Pennak 1989). Na základě experimentu provedeném na *Paramacrobiotus richtersi* byly rozlišeny čtyři kategorie

vajíček v závislosti na rozdílných schématech líhnutí, a to spontánní, opožděné, neúspěšné a diapauzující „odpočívající“ (Guidetti et al. 2011, Altiero et al. 2010).

Líhnutí *P. richtersi* bylo pozorováno v laboratorních podmínkách, i když byla všechna vajíčka uchovávána v stejných podmínkách, délka jejich líhnutí se lišila. Spontánní vajíčka se vylíhnula v době mezi 30 a 40 dny a opožděná vajíčka mezi 41 a 62 dny. Tyto druhy vajíček, na rozdíl od vajíček diapauzujících nepotřebují k vylíhnutí žádný vnější stimul. Vajíčka, která se nevylihla do 90 dní, zahrnovala 13 % diapauzujících vajíček a 87 % neúspěšných vajíček.

Mladým jedincům napomáhají při líhnutí stylety, které propíchnou obaly vajíčka. Tito jedinci pak připomínají zmenšené dospělé. Na rozdíl od dospělců mají nedovyvinutou pohlavní soustavu. Dále jsou přítomny drobné rozdíly v struktuře bukálního a hltanového aparátu a na končetinách mohou být přítomny jen dva drápy (Pennak 1989). Dospělí jedinci žijí dva až několik měsíců (Erdmann & Kaczmarek 2016).

### 3.3 Ekdyze

Během života rostoucí želvušky několikrát svlékají kutikulu, a to čtyřikrát až dvanáctkrát. Pohlavní dospělosti dosáhnou po druhém až třetím svlékání, což trvá několik dní. Svlékání předchází několik dní až několik hodin trvající simplex fáze, při které zaniká bukální – hltanový aparát. V tomto období nedochází k příjmu potravy. Nový aparát je syntetizován pomocí slinných žláz. Jeden či dva dny před vlastní ekdyzí dochází k mírnému zkrácení těla želvušky. Nakonec stará kutikula praská na předním konci a želvuška se vysouká ven. Během tohoto procesu se ztrácí výstelka rekta a drápy, které jsou nově syntetizované pomocí speciálních žláz (Miller 1997, Pennak 1989).

### 3.4 Biogeografie a ekologie

Želvušky jsou běžné a lze je najít na všech kontinentech. Vyskytují se ve sladké i slané vodě i na souši. Všechny druhy jsou ale považovány za akvatické, neboť potřebují alespoň tenký vodní film k pohybu, dýchání a reprodukci (Miller 1997). Obecně tedy bez vodního filmu není možný aktivní život. Jedinci žijící na souši se často vyskytují v mechu nebo lišejnících, neboť je v nich zadržována potřebná voda. Stejně tak vodní mechy mohou poskytovat prostředí pro život želvušek. Kromě mechů a lišejníků se mohou vyskytovat také v rostlinném odpadu a půdě (Glime 2017). Jelikož voda není v terestrickém prostředí vždy k dispozici, prostředí v mechu a lišejnících totiž často vysychá, vyvinuly si tyto druhy želvušek řadu strategií k přežití (Erdmann & Kaczmarek 2016).

### 3.5 Životní cyklus v nepříznivých podmínkách

Život na souši přinutil želvušky vyvinout si ochranné mechanismy, neboť se jedná o striktně akvatické organismy. Mezi ně patří různé období klidu (dormance), které se vyznačují dočasným snížením či zastavením metabolismu a zpomalením vývoje (Guidetti et al. 2011). Známe dva typy dormance – diapauzu a kviescenci. Diapauza je kontrolována endogenně, takže není přímo vyvolána vnějším prostředím (Guidetti et al. 2011). Kviescence je naopak pod vlivem exogenních faktorů a trvá po dobu existence nepříznivých podmínek, po jejich odeznění skončí. Extrémní forma kviescence, při které se metabolismus zpomaluje na nepostřehnutelné hodnoty, se nazývá kryptobióza (Keilin 1959, Guidetti et al. 2011). Jako diapauzu lze označit zapouzdření, cyklomorfózu a „odpočívající“ vajíčka. Kryptobióza se pak dělí na anhydrobiózu, kryobiózu, anoxybiózu a osmobiózu. V závislosti na druhu želvušky mohou být schopné diapauzy, nebo kryptobiózy, případně se mohou vyskytovat oba stavy (Guidetti et al. 2011). Želvušky jsou tedy vhodný modelový organismus pro studium těchto adaptací (Bertolani et al. 2004).

#### 3.5.1 Diapauza

Diapauza se častěji vyskytuje u vodních druhů želvušek (Nelson 2002). Je asociována s předvídatelnými nepříznivými podmínkami, které obvykle souvisí s fotoperiodou a teplotou. Morfologické změny probíhající při diapauze nastávají před příchodem těchto podmínek, nicméně podmínky vyvolávající, udržující a ukončující diapauzu nejsou známy, neboť tento proces není u želvušek příliš prostudovaný na rozdíl od kryptobiózy (Guidetti et al. 2011).

##### 3.5.1.1 Zapouzdření

Během tzv. zapouzdření vznikají cysty oválného tvaru s několika silnými vrstvami kutikuly, jejichž počet je specifický pro druh želvušek a typ cysty. Tato struktura je přirovnávána k cibuli nebo matrjošce (Guidetti et al. 2006). Rozeznáváme dva typy cyst. Cysta typu 1 má sklovitý, neprůhledný povrch bílé nebo žluté barvy a je strukturně jednodušší. Skládá se z tří vrstev. Kutikula na povrchu želvušky je dále obalená tzv. „kutikulou sarkofágem“ a na samém povrchu se nachází tzv. „stará kutikula“. Cysta typu 2 má žlutooranžovou, fialovočervenou nebo hnědou barvu a je strukturně složitější, kromě tří vrstev přítomných v typu 1 má ještě navíc jednu vrstvu tzv. „kutikulu mumie“ mezi vnitřní kutikulou a kutikulou sarkofágu (Hansen & Katholm 2002, Guidetti et al. 2006). Před samotným utvořením cysty dojde k pozření velkého množství potravy, které se uloží do zásobních buněk. Takto uložená energie je pak využívána v období neaktivity (Nelson 1991). První krok tohoto procesu je zbavení se sklerifikované části bukálního a hltanového aparátu stejně jako při ekdyzi, avšak bez ztráty kutikuly. Poté dojde k syntéze jednotlivých vrstev kutikuly a k redukci délky těla želvušky. Během tohoto období jsou zachovány menší pohyby. Ty ale postupně ustávají až nakonec dojde k úplné imobilitě. Tělní tekutiny a vnitřní orgány se stávají neprůhlednými a lesklými. Metabolismu je pomalejší než v aktivním stavu, ale rychlejší než při anhydrobióze (Guidetti et al. 2006). Ačkoliv je cysta

komplexnější útvar než soudeček (Bertolani et al. 2004), který vzniká anhydrobióze, zapouzdřený organismus není schopen přečkat sucho ani vysoké teploty, a to proto, že cysta obsahuje vodu. Cysty jsou schopny přežít v přírodě více než rok (Glime 2017).

### 3.5.1.2 Cyklomorfóza

Další formou sezónní změny v morfologii a fyziologii je cyklomorfóza, která se vyskytuje u mořského druhu *Halobiotus crispae* (Kristensen 1982, Møbjerg et al. 2007). V jeho životním cyklu je možné rozeznat tři stádia, a to aktivní stádium, pseudosimplex 1 a pseudosimplex 2. V aktivním stádiu dochází k reprodukci. Pseudosimplex 1 je období diapauzy, při kterém jsou pohlavní žlázy degenerované. Je charakterizován dvojitou kutikulou, která se skládá ze staré kutikuly a z nově syntetizované kutikuly s redukovanými drápy, navíc jsou uzavřené ústa a kloaka. Pseudosimplex 2 odpovídá období sexuální maturity. Podle některých názorů pseudosimplex 1 odpovídá stádiu cysty u ostatních druhů želvušek (Kristensen 1982, Møbjerg et al. 2007).

Jak během zapouzdření, tak během vzniku pseudosimplexu 1 vznikají spolu s novými vrstvami kutikuly také nové, avšak nefunkční bukální – hltanové aparáty (Kristensen 1982, Guidetti et al. 2006, Guidetti et al. 2011). Syntéza kutikuly je totiž vždy spojena se syntézou nového aparátu. Stejný proces nastává také při ekdyzi, proto lze předpokládat, že diapauza má původ v nedokonalé ekdyzi, při které nedošlo k svlečení staré kutikuly, místo toho byla ponechána a použita jako ochranná vrstva. Produkce nových kutikul je energeticky náročný proces, navíc musí želvušky během tohoto období přežít bez potravy a nemůžou se rozmnožovat. Množství potřebné energie je proto redukováno tvořením zjednodušených struktur (Guidetti et al. 2011).

### 3.5.2 Kryptobióza

Kryptobióza je reverzibilní ametabolický stav vyvolaný nepříznivými podmínkami. Tento jev poprvé popsal Anton Van Leeuwenhoek v roce 1702 a samotný termín „kryptobióza“ zavedl David Keilin v roce 1959 (Wright 2001). Může nastat jak u dospělých jedinců, tak u vajíček. Může se opakovat několikrát během života (Bertolani et al. 2004). Proto želvušky lze označit za holokryptobionty, od slova „holos“ neboli celý (Jönsson 2005). Takto je lze odlišit od ostatních živočichů, u kterých dochází ke kryptobióze jen v určitých vývojových stádiích života (Watanabe 2006). V závislosti na spouštěcím stimulu lze rozlišit čtyři druhy kryptobiózy. Osmobióza je indukována vysokou koncentrací solí, anoxybióza nedostatkem kyslíku, kryobióza extrémně nízkými teplotami a anhydrobióza dehydratací (Keilin 1959, Møbjerg et al. 2011).



### 3.5.2.1 Osmobióza

Osmobióza nastává, pokud je vnější koncentrace soli vyšší než koncentrace uvnitř těla. Jako u jiných případů kryptobiózy dochází k tvorbě útvaru zvaného soudeček. Jejich životaschopnost klesá s trvajícím nepříznivými podmínkami. Osmobióza u želvušek není příliš rozšířená, protože želvušky jsou i v aktivním stavu sami o sobě tolerantní vůči vysoké osmolaritě, neboť některé druhy žijí v přílivových zónách na pobřeží (Lindahl & Balsler 1999, Glime 2017).

### 3.5.2.2 Anoxybióza

Anoxybióza je stav, který umožňuje želvuškám přežít období nedostatku kyslíku. Nejedná se o pravou kryptobiózu, neboť při tomto stavu nedochází k vzniku soudečku. Namísto toho dochází k vstřebání vody do těla, což je způsobeno ztrátou kontroly osmoregularity v důsledku nedostatku kyslíku, tělo želvušek se tak stává imobilní, natéká, zůstává zcela natažené a je přesně bilaterálně (Lindahl & Balsler 1999, Glime 2017). Několik suchozemských druhů může v tomto stavu vydržet 3 – 8 dní (Guidetti et al. 2011).

### 3.5.2.3 Kryobióza

Kryobióza umožňuje tolerovat teploty pod bodem mrazu a rychlé střídání zamrzání a tání (Westh et al. 1992, Lindahl & Balsler 1999). Želvušky tak mohou žít v polárních či vysokohorských oblastech, kde velkou část roku tráví v zamrzlém stavu (Bertolani et al. 2004). Kryobióza se liší od ostatních způsobů tolerance chladu. Při tomto stavu dochází k tvorbě soudečku, jedná se tedy o pravou kryptobiózu. K úspěšnému přežití nepříznivých podmínek ale tvorba soudečku nutná není, neboť želvušky jsou mrazu odolné (Wright 2001, Glime 2017). Odolnost k nízkým teplotám je zajištěna buďto tolerancí zamrznutí vody v těle, nebo mechanismy zajišťující snížení bodu mrazu (Wright 2001).

Tolerance zamrznutí je umožněna led tvořícími částicemi (INAs) (Westh et al. 1992). Jedná se o proteiny nebo lipoproteiny o molekulové hmotnosti 74 – 800 kDa (Neven et al. 1989, Ramløv 2000). Tato činidla iniciují heterogenní nukleaci při vyšších teplotách, neboť slouží jako matrice k růstu ledových krystalů. Tím je umožněn kontrolovaný a pomalý růst krystalů, což dává dostatek času buňkám vyrovnat se s osmotickým šokem. Jelikož se nukleační činidla nachází vně buněk, zamrzá extracelulární tekutina. Při růstu krystalů ledu v extracelulárním prostoru se cytoplasma buněk díky ztrátě vody zahušťuje. Vysoká koncentrace látek uvnitř buněk brání zamrznutí a poškození buněk (Westh et al. 1992, Wright 2001).

Druhý způsob ochrany využívá kryoprotektantů, které se nachází jak v extracelulárních, tak i intracelulárních tekutinách. Lze je rozdělit na látky s nízkou molekulovou hmotností, mezi které patří glycerol, sorbitol a disacharidy jako glukóza a trehalóza, a hysterezní proteiny (THF – faktory tepelné hystereze, AFP – antifreeze proteiny). Nízkomolekulární kryoprotektanty mohou být nahromaděny ve velkém množství a fungují jako osmolyty snižující bod tání, zatímco hysterezní proteiny se většinou vyskytují v množství menší než 1 mM a zastavují růst ledových krystalů, tím

že se na ně nabalují. Ačkoliv se kryoprotektanty vyskytují vně i uvnitř buněk, hysterezní proteiny převládají v extracelulárních tekutinách (Wright 2001).

Během kryobiózy přežití ovlivňuje rychlost ochlazování. Čím rychlejší je ochlazování tím nižší je pravděpodobnost přežití. Záleží také na rychlosti opětovného zahřívání. Tepelný šok způsobuje určitá poškození, což dokazuje delší doba, kterou jedinci potřebují k probuzení z kryobiózy. Přesná povaha poškození je však neznámá. Čím vyšší teplota tím více jedinců utrpí toto poškození a tím delší čas potřebují k „obživnutí“ (Rebecchi et al. 2009).

#### 3.5.2.4 Anhydrobióza

Anhydrobióza iniciována suchem je nejstudovanější typ kryptobiózy (Lindahl & Balsler 1999). Smyslem není zabránit vyschnutí, ale kontrolovat jeho rychlost pomocí různých behaviorálních, morfologických a fyziologických adaptací. Výsledkem je tolerance stresu způsobeného ztrátou vody bez závažného efektu na přežití (Jönsson 2005). Želvušky ve vysychajícím prostředí tvoří charakteristický útvar zvaný soudeček, který je nezbytný pro úspěšný vstup do anhydrobiózy a přečkání nepříznivých podmínek (Lindahl & Balsler 1999).

Ve stádiu soudečku mohou želvušky přežít nedostatek vody, vysoké teploty, teploty pod bodem mrazu, radiaci, vysoký tlak, vakuum, extrémní pH, prostředí bez kyslíku a expozici různým toxickým látkám (Møbjerg et al. 2011). Rezistence k vysychání se liší mezi druhy a také v rámci populace jednoho druhu (Jönsson et al. 2001, Horikawa & Higashi 2004, Erdmann & Kaczmarek 2016). Návrat ze soudečku do aktivního stavu většinou trvá několik hodin, záleží na tom, jak dlouho anhydrobióza trvala (Lindahl & Balsler 1999).

Předpokládá se, že předky suchozemských želvušek jsou mořské druhy, a že anhydrobióza hrála významnou roli při kolonizaci souše. Tato strategie se tedy nejspíš vyvinula v litorálních zónách, kde dochází periodicky k změnám hladiny moře a tím vznikají vysychající oblasti (Jönsson 2001).

Anhydrobióza začíná přípravnou fází, při které dochází k řadě metabolických a anatomických změn. Dochází k invaginaci končetin a k tvorbě řady záhybů na povrchu těla, což vede k jeho zkrácení a vzniku soudečku. (Lindahl & Balsler 1999, Erdmann & Kaczmarek 2016). Tvorba soudečku redukuje tělní povrch, což zpomaluje ztrátu vody při vysychání. To, jak moc je povrch těla redukován, přímo souvisí s mírou tolerance vysychání. Tudiž ty druhy želvušek, které jsou schopny složit svoji kutikulu do nejmenších rozměrů, jsou ty nejvíce odolné. Naopak druhy mající různé pláty a výrůstky na kutikule jako *Echiniscus testudo* jsou méně odolné, protože nejsou schopny kutikulu dostatečně poskládat (Erdmann & Kaczmarek 2016, Wright 1989). Kromě redukce povrchu, tvorba soudečku navíc zabraňuje poškození vnějších a vnitřních orgánů (Erdmann & Kaczmarek 2016).

Podmínkou úspěšné anhydrobiózy je pomalé vysychání při vysoké relativní vlhkosti. Podstatné je, aby si želvušky zachovaly vnitřní vodu a tím i fungující metabolismus po dobu aspoň několika hodin. Tento čas se využije na syntézu různých ochranných molekul. Mezi látky, kterým se přisuzuje ochranná funkce patří, glycerol, disacharidy trehalóza a sacharóza a různé proteiny (Wright 1989, Glime 2017). Nutná hodnota relativní vzdušné vlhkosti se pohybuje mezi 70 % a 95 % a závisí na druhu. Jakmile je však dosaženo formy soudečku, může další vysychání

probíhat i při nižší nebo nulové vlhkosti (Wright 1989, Lindahl & Balsler 1999).

Typicky dochází k vysychání při 80% relativní vzdušné vlhkosti (Glime 2017). Když vysychání probíhá za těchto podmínek dochází k tzv. propadu permeability (permeability slump). Vysychání probíhá během prvních několika minut rychle, potom ale zpomaluje, protože dochází k náhlé redukci transpirace. Její míra dále exponenciálně klesá. To během vysychání umožňuje zachovat uvnitř těla značné množství vody. Propad permeability není metabolický proces, neboť ho můžeme pozorovat nejen v živých ale i mrtvých jedincích (Wright 1989). Želvušky vysychající při nízké relativní vlhkosti nebo v bezkyslíkatém prostředí netvoří soudeček, ale jejich tělo zkolabuje do nepravidelného plochého útvaru, ze kterého už neobživnou (Wright 1989).

V důsledku ztráty vody fosfolipidové membrány mění svou strukturu fluidní mozaiky na gelovou strukturu. Pokud by membrána byla v této formě rehydratována, došlo by k jejímu protečení (Wright 1989, Watanabe 2006). Jedním z mechanismů protekce organismů odolných k vysychání je produkce neredukujícího sacharidu trehalózy, která vzniká štěpením glykogenu v zásobních buňkách (Glime 2017). Jedná se o vysoce rozpustnou látku s nízkou reaktivitou a malou tendencí ke krystalizaci. Má také velmi vysokou schopnost nahrazovat vazebnou vodu a zesklivatět (vitřifikovat), což z ní dělá vysoce účinnou ochrannou molekulu (Crowe et al. 1987 a 1998, Watanabe 2006). Vazba mezi hydroxylovými skupinami trehalózy a fosfátovými skupinami membránových fosfolipidů umožňuje stabilizaci membrány a brání vzniku nežádoucí gelové struktury (Crowe et al. 1987, Wright 1989, Watanabe 2006). Obdobně působí také sacharóza a glycerol (Wright 1989, Rebecchi 2007). Vitřifikovaná trehalóza vyplňuje prázdné prostory ve vysychajících tkáních, což umožňuje udržet buněčné komponenty na svém místě. Zabraňuje se tak poškození vnitřních struktur a agregaci makromolekul. Vysoká viskozita sklovitého stavu navíc zpomaluje nežádoucí chemické reakce (Watanabe 2006). Trehalóza je také schopna stabilizovat proteiny. Pravděpodobně dochází k vzniku vodíkové vazby mezi hydroxylovými skupinami cukru a polárními zbytky proteinu (Carpenter & Crowe 1989, Watanabe 2006). Další funkcí je inhibice škodlivé oxidace proteinů a nenasycených mastných kyselin v suchém stavu (Benaroudj et al. 2001, Watanabe 2006).

Zda tyto mechanismy hrají roli v anhydrobióze želvušek není jasné, protože želvušky hromadí trehalózu v poměrně malém množství v porovnání s jinými anhydrobiotickými organismy a u některých druhů nebyla pozorována vůbec (Hengherr et al. 2008, Jönsson & Persson 2010, Møbjerg et al. 2011). Nejvyšší pozorovaná koncentrace se pohybuje od 2,3 % sušiny u *Richtersius coronifer* a *Macrobotus krynauwi* až po 2,9 % sušiny u *Macrobotus islandicus* (Jönsson & Persson 2010, Møbjerg et al. 2011). U *Milnesium tardigradum* nebyla nejdříve zaznamenána vůbec, později bylo nalezeno velmi malé množství. U žádných druhů patřící do třídy Heterotardigrada nebyly zatím pozorovány změny v jejím množství během vysychání (Hengherr et al. 2008, Jönsson & Persson 2010, Møbjerg et al. 2011).

Další ochranné molekuly, které potenciálně hrají roli v protekci želvušek, jsou proteiny teplotního šoku (HSP), proteiny hojné při pozdní embryogenezi (LEA), teplem rozpustné proteiny hojné v cytoplazmě (CAHS) a teplem rozpustné proteiny hojné v sekretech (SAHS) (Erdmann & Kaczmarek 2016).

Proteiny patřící do skupiny HSP fungují jako chaperony, které asistují při

skládání proteinů a chrání je tak před denaturací a shlukováním vyvolaném stresem. Mohou se také uplatnit při renaturaci (Møbjerg et al. 2011). Schill et al. (2004) porovnávali expresi tří izoform hsp70 u druhu *M. tardigradum* během aktivního stádia, stádia anhydrobiózy a během vstupu a výstupu z anhydrobiózy. Isoformy 1 a 3 nemají žádnou protektivní funkci, neboť jejich exprese byla snížena během klidového stádia a stejně tak během přechodné fáze. Pouze v případě izoformy 2 došlo k expresi při přechodu z aktivního stádia do klidového. Studie na *P. richtersi* naopak neukázala žádnou změnu v expresi HSP mezi hydratovaným a dehydratovaným stavem (Rizzo et al. 2010). Tento druh byl také poslán do vesmíru a po porovnání těchto jedinců s kontrolou na Zemi nebyly taktéž nalezeny žádné změny v expresi HSP (Rebecchi et al. 2009). Zdá se, že role HSP v protekci stresu je druhově specifická. Je také možné, že se HSP uplatňují spíše při opravách po přečkání sucha nežli během něho. Je také možné, že mají synergický účinek v kombinaci s dalšími ochrannými molekulami (Goyal et al. 2005, Møbjerg et al. 2011).

Druhý typ proteinů jsou LEA proteiny, které chrání ostatní proteiny před agregací způsobenou vysycháním a to tak, že působí jako molekulární štíty, které zabraňují asociaci poškozených proteinů (Yamaguchi et al. 2012). Dále mohou fungovat jako „vycpávka“ a zabránit kolapsu buňky v důsledku ztráty vody. Mohou také chránit buněčné struktury prostřednictvím renaturace rozložených proteinů. Jejich ochranné funkce nejspíše umožňuje skutečnost, že v hydratovaném stavu postrádají z velké části sekundární strukturu, a naopak v dehydratovaném stavu dochází k jejich skládání (Tunnacliffe & Wise 2007). Stejně jako u HSP byl i u LEA proteinů pozorován synergický efekt, a to s trehalózou (Goyal et al. 2005). Tento typ proteinů byl detekován u želvušky druhu *M. tardigradum* (Schokraie et al. 2010, Møbjerg et al. 2011).

Další typ proteinů jsou CAHS a SAHS proteiny. Stejně jako LEA proteiny mají funkci molekulárních štítů zabraňující agregaci, neboť v dehydrovaném dochází ke skládání jejich struktury do  $\alpha$ -helixů. Nejsou homologické s LEA proteiny. Jejich název je odvozen z jejich lokalizace. Proteiny CAHS se nacházejí uvnitř buněk, a proto nejspíš přispívají k ochraně cytoplasmy a jádra. SAHS se vyskytují vně buněk a nejspíše ochraňují extracelulární komponenty. Navzájem se od sebe liší strukturou. Proteiny CAHS postrádají v hydratovaném stavu vnitřní strukturu, zatímco SAHS proteiny jsou bohaté na  $\beta$ -strukturu. Obě proteinové rodiny jsou u želvušek konzervované a u jiných kmenů se nevyskytují (Yamaguchi et al. 2012).

Při anhydrobióze se také v menší míře uplatňují aquaporiny, které snižují permeabilitu membrány, a enzymy působící proti reaktivním kyslíkovým formám, které zabraňují poškození. (Rizzo et al. 2010, Rebecchi 2013, Grohme et al. 2013, Erdmann & Kaczmarek 2016.). Zdá se, že většina organismů schopných anhydrobiózy jsou zároveň také schopny kryobiózy, což naznačuje, že existuje podobnost mezi jejich biochemickými mechanismy zajišťující ochranu (Wright 2001).

### 3.5.3 Dormance ve vajíčkách

Obě formy dormance, tedy kviescence i diapauza, mohou nastat také ve vajíčkách, neboť ty umožňují dlouhodobí únik před nepříznivými podmínkám. Všechny suchozemské želvušky jsou schopny svá vajíčka uvést do stavu kviescence jako odpověď na sucho a vstoupit do anhydrobiózy. V tomto stavu mohou vajíčka vydržet minimálně devět let. Nejspíše jsou schopna snášet nepříznivé podmínky déle než dospělci (Guidetti & Jönsson 2002, Guidetti et al. 2011). Stejně tak jsou schopna přečkat teploty pod bodem mrazu vstoupením do kryobiózy. Vejce ve stavu kviescence (či kryptobiózy) mohou stejně jako dospělci také odolat chemickým a fyzikálním vlivům (Guidetti et al. 2011).

U některých druhů želvušek byly zaznamenány dva typy vajíček, tenkostěnné a tlustostěnné, přičemž ty se tvořily v nepříznivých podmínkách a jsou považovány za dormantní (Pennak 1989, Guidetti et al. 2011).

Diapauzující vajíčka neboli „odpočívající“ vajíčka byla pozorována u druhu *P. richtersi*. Ačkoliv byla vajíčka v laboratoři ponechána ve stejných podmínkách, délka vývoje a líhnutí se v populaci lišila. Vajíčka, která se nevylíhla do 90 dnů se z velké části nevylíhla vůbec, ale malá část se vylíhla po vnějším stimulu (dehydratace a rehydratace). Tato diapauzující vajíčka se od ostatních vajíček neliší vzhledem, odlišuje je pouze potřeba onoho stimulu před vylíhnutím (Altiero et al. 2010, Guidetti et al. 2011).

Podobný fenomén byl také zaznamenán u druhu *Macrobotus richtersi*. Stejně jako u *P. richtersi* se lišila doba líhnutí vajec, která byla uchovaná ve stejných podmínkách. Většina vajíček (90 %) se vylíhla mezi 30 až 62 dny. Vajíčka, která se nevylíhla do 90 dnů byla ponechána v suchu po 21 dnů a poté rehydratována. Část se potom vylíhla, což značí přítomnost diapauzujících vajíček (Bertolani et al. 2004).

Diapauzující vajíčka byla také pozorována u *Amphibolus nebulosus*, kde je jejich výskyt spjat s jejich životním cyklem. Tento druh žije v arktickém a vysokohorském prostředí, které je charakteristické dlouhými obdobími mrazu a krátkými obdobími aktivního života. Tyto podmínky vyžadují rozdělení životního cyklu a rozmnožování až v okamžiku, kdy nastanou vhodné podmínky, což vyžaduje rychlý reprodukční cyklus. Vyskytují se dva typy vajíček označované jako „zimní“, což jsou diapauzující vajíčka, a „letní“, což jsou normální vajíčka. Za normálních podmínek *A. nebulosus* využívá veškerý svůj čas pro hledání potravy a hromadí energii potřebnou pro reprodukci. Při nashromáždění dostatku energie dojde k tvorbě cysty typu 1. Uvnitř cysty se zásoby energie využijí k zrychlení vývoje letních vajíček. Po ukončení vývoje jedinec opustí cystu a tyto vajíčka naklade. V zimě je pak vývoj vajíček pozastaven a jedinci ji přečkají ve formě cysty typu 1. Kromě toho, že je tento typ cyst nezbytný k dozrání letních vajíček je to zároveň také hibernační stádium. Pokud dojde k zhoršení vnějších podmínek, vytvoří se cysta typu 2 se silným a odolným obalem. Tato cysta poskytuje potřebnou ochranu, zatímco dochází k produkci jediného diapauzujícího (zimního) vajíčka a zároveň poskytuje čas k jeho vývoji. Po ukončení vývoje jedinec opustí cystu a umírá. Vajíčko zůstává v diapauze, dokud se podmínky nezlepší. Není jisté, jak dlouho jsou v tomto stavu schopna vydržet, ale zimní vajíčka s vyvíjejícími se embryi byla zaznamenána v období od května do července (Hansen & Katholm 2002).

### 3.5.4 Přežití klidových stádií

Želvušky jsou schopny přežít ve formě soudečku řadu let. Maximum se zdá být deset let (Jönsson & Bertolani 2001). Pokud zemřou, jejich smrt není způsobena věkem, protože vysychání samo osobě nemá vliv na dlouhověkost a stárnutí. Během kryptobiózy se však hromadí poškození biomolekul, organel, buněk, tkání a orgánů. Toto poškození je potom v důsledku zodpovědné za smrt jedince (Rebecchi et al. 2009, Guidetti et al. 2011, Erdmann & Kaczmarek 2016).

Hromadění poškození s časem také vysvětluje, proč se s prodlužováním času stráveného v kryptobióze také prodlužuje čas potřebný k návratu do aktivního stavu. Dlouhá doba strávená ve formě soudečku znamená řadu chyb, které je třeba opravit, tyto opravné procesy prodlužují proces „probuzení“ (Møbjerg et al. 2011). Dlouhodobé přežití v soudečku ovlivňuje řada faktorů jako je vlhkost, prostředí, aktivita antioxidantního enzymatického systému, počet prodělaných anhydrobióz a zásoba energie (Bertolani et al. 2004).

Přežití záleží na vnějších podmínkách, za jakých klidové stádium vzniklo, jak je diskutováno v částech věnovaných kryobióze a anhydrobióze. Důležité jsou také vnitřní parametry ovlivňující přežití. Rozdíly v přežití jsou způsobené genetickými rozdíly a/nebo faktory jako výživa, množství ochranných molekul, životní historie, věk, reprodukční stádium a fenotypická plasticita.

Asi nejlépe je vliv vnitřních parametrů na přežití prostudován v souvislosti s anhydrobiózou. U želvůšek byl zaznamenán negativní i pozitivní vztah mezi velikostí těla, která souvisí s věkem, a délkou přežití v anhydrobióze (Jönsson & Rebecchi 2002, Rebecchi et al. 2007). V případě druhu *R. coronifer* přežití stoupá s rostoucí velikostí těla, nicméně u hodně velkých jedinců drasticky klesá pravděpodobně kvůli senescenci. U druhu *Ramazzottius oberhaeuseri* naopak přežití s rostoucí velikostí klesá (Jönsson et al. 2001, Rebecchi et al. 2007). Pravděpodobnost přežití dále klesá s počtem prodělaných anhydrobióz. Podle studie Czernekové a Jönssona (2016) mohou želvušky přežít šest cyklů anhydrobiózy. Navíc během pátého a šestého cyklu klesala schopnost zaujmout řádně formaci soudečku. Podle autorů je tento limit je nejspíš způsoben nedostatkem energie, neboť v souvislosti s vysycháním a anhydrobiózou se spotřebovává velké množství energie (Jönsson & Rebecchi 2002, Rebecchi et al. 2007). Tato energie nemůže být doplněna krměním a po jejím vyčerpání nelze úspěšně dosáhnout formace soudečku. Zásoby energie tedy představují potenciální omezení toho, kolikrát může v jedinci nastat anhydrobióza (Czernekova & Jönsson 2016). Jönsson a Rebecchi (2002) určili tzv. „energetickou cenu“ anhydrobiózy podle velikosti zásobních buněk, které shromažďují cukry a lipidy. Při sledování jejich velikosti lze vidět, že se po proděláním anhydrobiózy se zmenšovaly (Jönsson & Rebecchi 2002, Rebecchi et al. 2007). Naproti tomu Czernekova a Jönsson (2016) při svých experimentech zaznamenali zmenšování celkového počtu zásobních buněk po pátém cyklu anhydrobiózy, což bylo vysvětleno jako jejich strávení ve snaze získat tak potřebnou energii.

Energie potřebná pro anhydrobiotické procesy je odebírána ze zásob energie určených pro růst a reprodukci (Jönsson & Rebecchi 2002, Rebecchi et al. 2007), proto jsou anhydrobiotické organismy slabí konkurenti a v příznivých podmínkách jsou vytlačováni neanhydrobiotickými organismy, které rychleji rostou a rychleji se rozmnožují. I když neexistuje přímý důkaz kompromisu mezi anhydrobiózou a fitness organismu, toto vytlačování anhydrobiontů tomu nasvědčuje (Alpert 2006).

### 3.6 Rezistence k abiotickému stresu

Obecně lze pojem stres definovat jako působení jakýkoliv škodlivého faktoru (stresor), který vyvolává změny na buněčné úrovni nebo narušuje homeostázu celého organismu. Lze rozlišit dva základní typy stresu: biotický a abiotický. Biotický stres zahrnuje parazitické interakce, symbiotické interakce nebo interakce predátor – kořist. Abiotický stres je způsoben fyzikálně – chemickými faktory jako pH, teplota, osmotický tlak, záření, anorganické a organické látky, sucho nebo nedostatek kyslíku (Slaveykova et al. 2016).

#### 3.6.1 Teplota

Želvušky jsou odolné jak vůči vysokým, tak vůči nízkým teplotám. Jedinci druhu *Macrobiotus hufelandi* přežili expozici teplotám 120 °C až 125 °C po dobu několika minut (Rebecchi et al. 2007). Zaznamenáno bylo také přežití v teplotách 110 °C až 151 °C po dobu 30 minut (Ramløv & Westh 2001).

Jedinci druhu *R. coronifer* ve stavu anhydrobiózy v přirozeném prostředí mechového polštáře byli vystaveny vysokým teplotám po dobu 1 hodiny. Při teplotách nepřekračující 70 °C přežilo 80 % jedinců, ale při zvýšení teploty přežití prudce kleslo na 20 % a teplotu 100 °C už nepřežili žádní jedinci. Průměrná smrtelná teplota (LT50) byla stanovena na 76 °C (Ramløv & Westh 2001).

Hengherr et al. (2009) vystavili několik druhů želvušek z tříd Heterotardigrada a Eutardigrada (*M. tardigradum*, *P. richtersi*, *Macrobiotus tonollii*, *Macrobiotus sapiens*, *Echiniscus granulatus*, *E. testudo*) ve stavu anhydrobiózy teplotám v rozmezí od 60 °C do 110 °C po dobu jedné hodiny. Přežití klesalo jen mírně až do 80 °C. Po překročení této teploty přežití prudce klesalo a žádní jedinci nepřežili teplotu 100 °C. Výjimkou byl druh *M. tardigradum*, který vykazoval přežití vyšší než 90 % ještě při expozici teplotě 100 °C. Při vyšších teplotách začala mortalita prudce růst.

Co se týče nízkých teplot, vysoká odolnost byla pozorována u želvušek žijící v Antarktidě. *Echiniscus jenningsi*, *Macrobiotus furciger* a *Diphyscon chilense* v anhydrobióze přežily v teplotě -22 °C po dobu 8 let a v hydratovaném stavu pak přibližně 1,5 roku. Všechny tři druhy byly schopny v anhydrobióze přežít dokonce expozici teplotě -180 °C ale jen po dobu 14 dnů. Když byli hydratovaní jedinci druhu *E. jenningsi* vystaveni teplotě -80 °C, jejich mortalita rostla s délkou expozice. K poklesu viability ale došlo až od sedmého dne. Životaschopní jedinci byli pozorováni ještě po 150 dnech. Mortalita *M. furciger* a *D. chilense* se za těchto podmínek nezměnila. V hydratovaném stavu žádní jedinci těchto tří druhů nepřežili v -180 °C (Sømme & Meyer 1995). V jiné studii bylo pozorováno přežití v teplotách do -80 °C po dobu 6 let a 2 měsíců (Newsham et al. 2006).

Vysoká odolnost k chladu ale byla pozorována i u pevninských želvušek mírného pásu. Například druhy *R. coronifer* a *Richtersius oberhaeuseri* v anhydrobióze mohou být za těchto podmínek snadno uchovány v laboratoři. Při skladování za teploty -80 °C bylo jejich přežití po 3 a 6 letech velmi vysoké (kolem 95 %) (Sømme & Meyer 1995, Rebecchi et al. 2007).

Anhydrobiotická stádia jsou daleko odolnější než jedinci v hydratovaném stavu, kteří jsou schopni nízké teploty (-9 °C, -22 °C, -80 °C) přežít pouze po omezenou dobu a jejich přežití se snižuje s prodlužující se dobou expozice (Sømme &

Meier, 1995, Rebecchi et al. 2007). Druh *R. coronifer* přežil ještě nižší teplotu, a to -196 °C pouze však po dobu 15 minut. Přežití se snižovalo s rostoucí rychlostí ochlazování (Ramløv & Westh 1992). Anhydrobiotické želvušky několika druhů přežily teploty -190 °C a -200 °C v kapalném vzduchu po dobu 21 měsíců, -253 °C v tekutém dusíku po dobu 26 hodin a -272 °C v tekutém heliu po dobu 8 hodin (Rebecchi et al. 2007).

### 3.6.2 Hydrostatický tlak

Vysoký hydrostatický tlak poškozuje buněčné membrány, proteiny a DNA. Pro většinu bakterií a mnohobuněčných organismů je smrtelný hydrostatický tlak o hodnotě 0,3 GPa (Seki & Toyoshima 1998). Ono et al. (2008) vystavili *M. tardigradum* ve stavu soudečku hydrostatickému tlaku 7,5 GPa, což odpovídá hodnotě tlaku 180 km pod povrchem Země. V prvním pokusu expozice trvala 20 minut, což nemělo významný vliv na jejich mortalitu, neboť přežilo osmnáct jedinců z dvaceti. V druhém pokusu byly želvušky tlaku 7,5 GPa vystaveny 3 hodiny. Všichni jedinci přežili, ale při následné kultivaci po 20 dní umírali rychleji než jedinci v kontrolní skupině. Ve třetím pokusu byl sledován vliv tlaku 7,5 GPa po 6 hodin. Opět všichni jedinci přežili, ale nemohli se hýbat a do 6 dnů všichni zemřeli. Ve čtvrtém pokusu byl použit tlaku 7,5 GPa 12 hodin. Pouze 5 jedinců přežilo tyto podmínky, přičemž 3 zemřeli za 2 dny a zbývající 2 přežili 7 dní. Žádní jedinci nepřežili expozici po dobu 24 hodin. Limitní hodnota přežití byla stanovena na 13 hodin.

### 3.6.3 Osmotický stres

Jakožto vodní druhy se musí želvušky umět vyrovnat s osmotickým stresem. Koncentrace solí v jejich tělesných tekutinách je mnohem vyšší než koncentrace v okolním prostředí. Některé druhy žijí v přílivových zónách, kde musí čelit změnám v salinitě okolního prostředí. Suchozemské druhy se zase musí přizpůsobit vysychání, při kterém dochází k zahuštění okolí. Želvušky jsou proto velmi osmotolerantní, a to nejen ve formě soudečku, ale také v aktivním hydratovaném stavu (Lindahl & Balsler 1999).

Mořské želvušky se s osmotickým stresem vyrovnávají pomocí změn objemu těla. Jedinci druhu *Halobiotus crispae* z třídy Eutardigrada žijící v přílivových oblastech byly vystaveni destilované vodě a roztoku chloridu sodného s osmolalitou až 2000 mOsm/kg. *H. crispae* v aktivním stádiu po vystavení hypotonickému prostředí nejdříve zvětšilo svůj tělesný objem o 60 % (hyporegulace) a poté došlo k opětovnému zmenšení na hodnoty srovnatelné s původním stavem. Naopak v hypertonickému prostředí došlo k smrštění (hyperregulace) a následnému k návratu do původní velikosti. Při hyperregulaci želvušky vylučují do okolí hypoosmotickou tekutinu nejspíše pomocí Malpighických trubic a trávicího systému. Při vystavení roztokům o salinitě od 62 mOsm/kg do 1245 mOsm/kg došlo ve všech případech k hyperregulaci. Je možné, že jde o typickou reakci minimálně u třídy Eutardigrada, neboť se vyskytuje i u druhu *R. coronifer*. Tento druh je však méně tolerantní vůči vysoké koncentraci chloridu sodného nejspíše proto, že je suchozemský. Když je takovýmto podmínkám



vystaven po určité době zemře. Letální hodnota se pohybuje kolem 500 mOsm/kg (Halberg et al. 2009, Møbjerg et al. 2011).

### 3.6.4 Oxidační stres

Oxidační stres vzniká jako důsledek nerovnováhy mezi nadbytečnou produkcí reaktivních druhů kyslíku (ROS) a antioxidační ochranou (Rebecchi 2013). K tomu může docházet i během běžného fungování organismu a vy zvýšené míře během tvorby některých klidových stádií želvušek v důsledku narušení koncentrace vnitřního prostředí. Reaktivní druhy kyslíku mohou degradovat nebo zničit buněčné a molekulární struktury včetně DNA (Wehnic 2011). Oxidační stres může být indukován také zářením, jak je popsáno níže.

Existují dvě hlavní strategie ochrany před oxidačním stresem, ochrana pomocí antioxidantů a metabolická kontrola procesů produkujících energii i spotřebovávajících energii. Tyto mechanismy musí pracovat v souladu s ostatními biochemickými mechanismy (Rebecchi 2013). Antioxidanty působí jak intracelulárně, tak extracelulárně a jejich mechanismus účinku lze rozdělit na primární a sekundární. Molekuly s primárním mechanismem předcházejí oxidačnímu poškození přímým zachycením ROS a k poškození tak vůbec nedojde. Naproti tomu molekuly se sekundárním mechanismem účinku jsou reprezentovány opravnými enzymy a působí tedy až potom, co dojde k poškození (Rebecchi 2013). Přímé studium odolnosti želušek k oxidantům zatím nebylo publikováno. Ale k dispozici jsou studie protektivních mechanismů.

U želvušek druhu *Ramazzottius varieornatus* byl nalezen gen (Dsup) jehož produktem je vysoce nabitý nestrukturovaný protein, který je schopný ochránit DNA před poškozením oxidačním stresem tím, že se na ni naváže. Podobné proteiny byly také identifikovány také u dalších druhů (Hashimoto et al. 2016, Chavez et al. 2019). Pro posouzení jeho vlastnosti byla vytvořena lidská buněčná linie, (HEK293) která stabilně exprimovala gen Dsup a linie bez tohoto genu. Obě linie byly vystaveny peroxidu vodíku o koncentraci 100  $\mu\text{M}$  po 30 minut při 4 °C. Následně byl s buňkami proveden tzv. kometový test, který je založen na principu elektroforézy. Pokud došlo vlivem ROS k fragmentaci DNA, tyto krátké fragmenty pak putovaly gelem z jádra buněk ke katodě, čímž vznikl „ocas“ komety. Délka ocasu pak posloužila k posouzení poškození DNA. V případě buněk bez genu Dsup došlo k masivnímu poškození, jelikož byl ocas komety tvořen 71 % jaderné DNA. V případě buněk obsahujících tento gen byl ocas tvořen pouhými 18 % jaderné DNA (Hashimoto 2016).

Rizzo et al. 2010 zaznamenali zvýšenou aktivitu antioxidačního enzymatického systému u želvušek v anhydrobióze ve formě zvýšené koncentrace enzymů superoxid dismutázy a peroxidázy a tripeptidu glutathionu. Nastávají také změny ve složení mastných kyselin. Ve vysušených jedincích jsou více zastoupeny polynenasycené mastné kyseliny. Enzymatické antioxidační reakce mohou probíhat pouze v přítomnosti dostatečného množství vody, tedy během vstupu do anhydrobiózy nebo během výstupu (Rebecchi 2013).

### 3.6.5 Ionizující záření

Želvušky patří mezi mnohobuněčné organismy nejvíce rezistentní k ionizujícímu záření, alespoň pokud jde o krátkodobé přežití (Jönsson et al. 2005). Ionizující záření je souhrnné označení pro záření s dostatečnou energií pro ionizaci molekul či atomů. Ionizace může přímo postihnout a poškodit biologické molekuly. V případě DNA může způsobit mutace. Nebo může dojít vlivem záření k vzniku reaktivních kyslíkových radikálů z vody a ty pak mohou dále poškozovat biologické molekuly. Ionizující záření rozdělujeme na záření alfa – proud alfa částic (jádra atomů hélia), záření beta – proud elektronů nebo pozitronů, gama záření a rentgenové záření – druh elektromagnetického záření (proud fotonů) a neutronové záření – proud neutronů. Tato záření vznikají při radioaktivním rozpadu, jsou součástí kosmického záření nebo je lze vytvořit uměle.

Jönsson et al. (2005) studovali vliv gama záření na *R. coronifer*. Jedinci ve stavu anhydrobiózy byli vystaveni dávce gama záření v rozmezí 1 – 9 kGy a jedinci v aktivním hydratovaném stavu dávce 0,5 – 5 kGy. Obě skupiny byly rezistentní k nejnižším dávkám – 1 kGy respektive 0,5 kGy. Při překročení těchto dávek přežití prudce klesalo. Po ozáření 4 kGy a 5 kGy jen velmi málo jedinců jevílo známky života, a to pouze v podobě drobných pohybů končetin. Jedinci v anhydrobióze i v aktivním stavu byli přibližně stejně rezistentní. Obě skupiny byly schopny po ozáření naklást vajíčka (jedinci v anhydrobióze do dávky 2 kGy a jedinci v aktivním stavu do dávky 5 kGy), žádné z těchto vajíček se však nevylíhlo. Při ozáření dávkami většími než 1 kGy došlo k zkrácení životního cyklu (Jönsson et al. 2005).

Tolerance k ionizujícímu záření byla také studována u druhu *M. tardigradum* (Horikawa et al. 2006). Jedinci v hydratovaném stavu i ve stavu anhydrobiózy byli vystaveni gama záření o dávce v rozmezí 1 kGy – 7 kGy. Při sledování dlouhodobého přežití bylo zjištěno, že všichni jedinci vystaveni dávce mezi 2 kGy a 4 kGy zemřeli do 31 dnů. Několik málo jedinců žilo po dobu 31 dní po ozáření menší dávkou 1 kGy. Kontrolní skupiny žily po dobu 31 dnů. Míra přežití skupiny v anhydrobióze (2,3 %) i v hydratovaném stavu (2,2 %) se výrazně lišila od kontrolních skupin (13 % a 37,8 %) a průměrná délka života byla v obou skupinách zkrácena v závislosti na dávce. Jedinci žádné ze těchto skupin nebyli schopni po ozáření naklást vajíčka (s jednou výjimkou, ale tato vajíčka se nevylíhla). Co se týče krátkodobého přežití, průměrné přežití 2 hodiny po ozáření bylo stejné v obou skupinách, zatímco průměrné přežití 24 hodin a 48 hodin po ozáření 4 kGy a 5 kGy bylo větší u skupiny v hydratovaném stavu. Podobné výsledky byly získány také v experimentech s druhem *R. coronifer* (Jönsson et al. 2005).

Souhrnně tyto studie ukazují, že aktivní želvušky jsou vůči záření stejně odolné jako jedinci v anhydrobióze, možná i více. To může být způsobeno tím, že tolerance k ionizujícímu záření není založena na ochranných molekulách, které se uplatňují v anhydrobióze, ale spíše na opravných mechanismech DNA (Jönsson et al. 2005, Horikawa et al. 2006, Møbjerg et al. 2011).

Další studie byla provedena na dospělých v aktivním stavu a na vajíčkách druhu *Hypsibius dujardini* (Beltrán-Pardo et al. 2015). Dospělí jedinci byli vystaveni gama záření od 0,1 kGy do 5 kGy. Expozice do 3 kGy přežití nijak neovlivnila, až po překročení této dávky se viabilita začala značně lišit od kontroly. Průměrná smrtelná dávka byla určena na 4,2 kGy. Dávky vyšší než 0,1 kGy drasticky snížily plodnost jedinců. Vajíčka byla vystavena dávce gama záření od 50 Gy do 500 Gy. Pokud byly

vystaveny záření v brzkém stádiu vývoje snížila se pravděpodobnost jejich vylíhnutí, naproti tomu ozáření v pozdním stádiu vývoje nemělo tento účinek. Tento rozdíl je nejspíše způsoben tím, že mitoticky aktivní buňky jsou citlivější k radiaci a brzké stádium vývoje se vyznačuje vysokou mitotickou aktivitou na rozdíl od pozdního stádia. Dávka 500 Gy ovlivnila přežití mladých jedinců vylíhlých z ozářených vajíček (jak v brzkém, tak v pozdním stádiu vývoje). Jedinci vylíhlí z vajíček ozářených dávkou 50 Gy a 200 Gy dospěli a vyprodukovali potomstvo, ale jejich plodnost byla nižší v porovnání s kontrolou.

### 3.6.6 UVC záření

Želvušky jsou kromě ionizujícího záření také vysoce odolné vůči ultrafialovému záření, což je elektromagnetické záření s kratší vlnovou délkou než viditelné světlo a delší než rentgenové záření. Jeho přirozeným zdrojem je Slunce, jedná se tedy o stresor, se kterým se organismy potýkají denně. Účinky na organismus závisí na vlnové délce záření. Krátkovlnné záření UVC a část UVB přímo poškozují DNA za tvorby příčných spojů, zatímco dlouhovlnné záření UVA a část UVB způsobuje vznik reaktivních kyslíkových radikálů, které pak dále poškozují nejen DNA, ale i proteiny a další molekuly.

Suchozemský druh *R. varieornatus* ve stavu anhydrobiózy a v aktivním hydratovaném stavu byl vystaven vysokým dávkám UVC záření o hodnotách 2,5 - 20 kJ/m<sup>2</sup>. Jako kontrola byl použit sladkovodní druh *H. dujardini* v aktivním stavu. Jedinci druhu *R. varieornatus* v aktivním stavu vykazovali vysokou míru přežití (80 %) 5 dní po expozici dávkou 2,5 kJ/m<sup>2</sup>, zatímco žádní jedinci druhu *H. dujardini* tuto dávku nepřežili. Žádní jedinci *R. varieornatus* nepřežili dávku 10 kJ/m<sup>2</sup>. Skupina v anhydrobióze pak vykazovala ještě vyšší míru přežití. Po expozici nejvyšší dávkou 20 kJ/m<sup>2</sup> přežilo 80 % jedinců 13 dnů. U jedinců v anhydrobióze vůbec nedošlo k poškození DNA tvorbou thyminových dimerů a u jedinců v hydratovaném aktivním stavu sice došlo k poškození, ale to následně bylo opraveno. Konkrétně dimery způsobené dávkou UVC záření 2,5 kJ/m<sup>2</sup> byly opraveny 18 hodin po expozici. Druh *R. varieornatus* byl v anhydrobióze odolnější než v aktivním stavu (Horikawa et al. 2013).

## **4 Materiály a metody**

### **4.1 Biologický materiál**

Želvušky druhu *Hypsibius dujardini* (Sciento, Manchester, Velká Británie)

Řasa *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (Institut rostlinné fyziologie, Ruská akademie věd)

### **4.2 Laboratorní materiál**

Peroxid vodíku (Sigma)

Minerální voda Volvic (Volvic)

Kultivační láhve T300 (TPP)

384 jamkové desky pro mikroskopii Cell Carrier Ultra (Perkin Elmer)

96 jamkové desky (TPP)

Mikrozkumavky 1,5 ml, PCR zkumavky ve stripech, 15 a 50 ml polypropylenové zkumavky (Schoeller)

Filtry o velikosti pórů 40 uM (Biologix)

### **4.3 Přístroje**

Rentgen RS Research Cabinet - RS225 system (Xstrahl)

Laboratorní termostat Qcell 240/40 basic+ (Pol Lab)

Termoblok vyhříváný (Major science)

Mikroskop inverzní s fázovým kontrastem Olympus IX70 (Olympus)

UVC crosslinker CL-1000 (UVP)

Automatický mikroskop CV7000 (Yokogawa)

Termocyklér C1000 Touch s nástavbou CFX96 Real-Time systém (Biorad)

#### 4.4 Kultivace *H. dujardini*

Želvušky byly kultivovány v minerální vodě Volvic při 17 °C v plastových kultivačních lahvích pro tkáňové kultury o ploše 300 cm<sup>2</sup> a objemu 1000 ml. Vnitřní spodní povrch láhve byl zdrsňen pomocí smirkového papíru. Vzniklé rýhy vytváří vhodný povrch pro pohyb želvušek a zároveň usnadňují výměnu média jednoduchým slitím starého média, neboť se jich želvušky přichytí. Ke krmení byla použita řasa *Chlorella vulgaris* IPPAS C – 1. Krmení bylo prováděno obvykle i s výměnou média jednou za 14 dní.

#### 4.5 Odebírání želvušek na experimenty

Pro odebrání jedinců na experiment se s kultivační lahví několik minut silně třese, čímž se do rozvířeného média dostane vše ze dna lahve. Také se uvolní želvušky z plovoucích shluků řas. Následně se médium nechá pár minut stát. V tomto čase se většina živých jedinců přichytí k zdrsňenému povrchu lahve. Svlečky s vajíčky, popřípadě i mrtví jedinci, zůstanou volně v médiu s řasami. Toto médium se slije do kádinky a láhev s přichycenými želvuškami se vypláchne čistou minerální vodou Volvic, která se slijeme do druhé kádinky. Původní médium se pak vrátí do kultivační láhve a postup se několikrát opakuje, čímž se získá větší počet želvušek. Stejným způsobem je možné zbavit populaci želvušek zbytku řas. Výsledkem je populace živých a aktivních jedinců. Počet a koncentrace získaných jedinců se zjistí spočítáním v malém vzorku, obvykle 30-100 µl. Počítají se tři vzorky a výsledek se průměruje.

#### 4.6 Hodnocení odpovědi na stres

Odpověď na stres byla hodnocena jednak u želvušek kultivovaných, jak je uvedeno výše, jednak u želvušek předem vystavených stresu. Expozice stresu byla provedena na menší populaci o 5-10 tisících jedinců v 10 ml na Petriho miskách s povrchem zdrsňeným smirkovým papírem. Tento experiment byl proveden ve dvou variantách. V první variantě byly želvušky 4 dny kultivovány za zvýšené teploty (20, 23, 27 a 30 °C). V druhé variantě byly želvušky vystaveny jednorázovému, nebo opakovanému stresu. Před každou expozicí byly z kultury odstraněny řasy pomocí filtru s velikostí oka 40 µm a po expozici byla doplněna čerstvá řasa. Testované stresové režimy: teplota 35 °C/1h, peroxid vodíku 2,5 mM/1h, peroxid vodíku 0,25 mM/1h, UVC 100 mJ/cm<sup>2</sup> a UVC 500 mJ/cm<sup>2</sup> a to jednorázově, nebo čtyři dny po sobě. Expozice zvýšené teplotě byla provedena v inkubátoru, expozice UVC v přístroji CL-1000. Na následné experimenty byly želvušky použity druhý den po poslední expozici.

V experimentech s cílem zjistit dávkové křivky (stresor samostatně, stresor po předešlé expozici, jak je popsáno výše) byly použity menší populace, ideálně alespoň 20 jedinců na podmínku.

Želvušky (60 µl kultury) byly vystaveny gradientu zvýšené teploty v termocykléru (Termocyklér C1000 Touch s nastavbou CFX96 Real-Time systém). Teplotní gradient byl v pilotním experimentu 30-45 °C a následně byly použity užší teplotní rozmezí mezi 36 a 40 °C. Expozice trvala 30, 60 a 90 minut, po ní byly želvušky přeneseny do 384 jamkové desky pro mikroskopii. Stripy byly vypláchnuty

40  $\mu$ l Volvicu a tento podíl byl přidán do příslušných jamek v desce.

Při expozici UVC zářením byly želvušky přemístěny do 96 jamkové desky (60  $\mu$ l kultury) a ta byla umístěna do přístroje Ultraviolet crosslinker CL-1000 tak, že řada s želvuškami se nacházela pod jednou z výbojek (ve všech experimentech byla volena stejná výbojka). V pilotním experimentu byl testován vliv dávek 50-12000  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  a následně bylo použito rozmezí od 50 do 2500 nebo 3500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ . Ozářené želvušky byly pak přeneseny do 384 jamkové desky. Jamky byly vypláchnuty 40  $\mu$ l Volvicu a tento podíl byl přidán do příslušných jamek v desce.

Rentgenovému záření byly želvušky vystaveny v Petriho misce v 5 ml média. Ozářené želvušky byly přeneseny do 384 jamkové desky pro mikroskopii. Finální objem v jamce byl 100  $\mu$ l. Doby odběru vzorku odpovídající dávkám 50-1500 Gy byly vypočteny z kalibrační křivky.

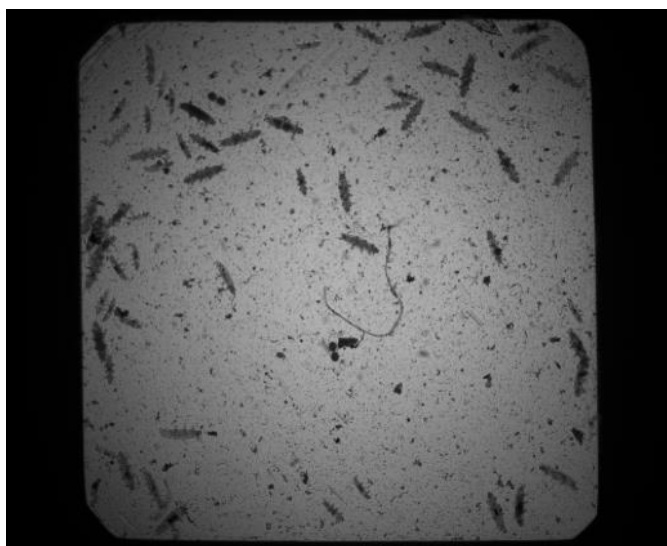
Citlivost k peroxidu vodíku o různých koncentracích byla hodnocena přímo v 384 jamkových deskách (objem 60  $\mu$ l kultury, 40  $\mu$ l roztok peroxidu vodíku ve Volvicu). Byly použity tyto koncentrační řady, každá o osmi jamkách (finální koncentrace): 5 mM maximum a ředění 2x, 5 mM maximum a ředění 3x, 2mM maximum a následující koncentrace o 200  $\mu$ l nižší.

Počet živých a mrtvých jedinců v jednotlivých jamkách byl po 24 hodinách spočten buď přímo ve světelném mikroskopu, nebo z fotografií pořízených pomocí automatické mikroskopie (Yokogawa CV7000, objektiv 4x umožňuje zobrazit celou jamku 384 jamkové desky). Jedinci byli považováni za mrtvé, pokud nebylo viditelné napětí těla. V pilotním experimentu bylo ověřeno, že podíl mrtvých jedinců se mezi 24 a 72 hodinami nemění. Dávkové křivky byly vypočteny v programu v programovacím jazyce R využívajícím knihovnu drc.

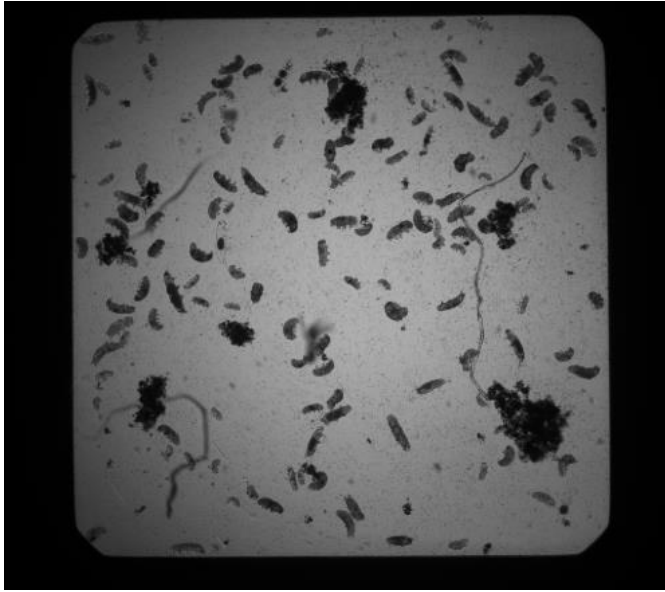
## 5 Výsledky

### 5.1 Hodnocení citlivosti k jednorázovému působení stresoru

Jedinci *H. dujardini* byli v 384 jamkových deskách vystaveni působení čtyř abiotických faktorů – záření UVC, rentgenovému záření, zvýšené teplotě a peroxidu vodíku. Počet živých a mrtvých jedinců v jednotlivých jamkách byl po 24 hodinách spočten buď přímo ve světelném mikroskopu, nebo z fotografií pořízených pomocí automatické mikroskopie. Jedinci byli považováni za mrtvé, pokud nebylo viditelné napětí těla (Obr. 2 a 3). Stejný způsob hodnocení byl použit i v následných experimentech popsanych níže. V tomto případě byla pozorovaná závislost přežití na dávce stresoru vyjádřena jako intenzita, při které umírá 50 % jedinců. Ta byla vypočtena z dávkových křivek. Těto hodnoty bylo dosaženo pro všechny stresory s výjimkou rentgenového záření, kde nebylo možné dávku dále zvyšovat vzhledem k parametrům zdroje záření. Ani maximální aplikovaná dávka 1500 Gy neměla negativní vliv na viabilitu během 10 následujících dní (hodnocení proběhlo po 1, 5 a 10 dnech). Ozářené želvušky se ale na rozdíl od kontrol dále nemnožily. Získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1.



Obrázek 2. Reprezentativní snímek populaci mrtvých jedinců v 384 jamkové desce



Obrázek 3. Reprezentativní snímek ukazující ukazuje populaci živých jedinců v 384 jamkové desce

Tabulka 1. Efektivní dávky abiotických stresorů

<b>Stresor</b>	<b>Veličina</b>	<b>Jednotka</b>	<b>Hodnoty</b>	<b>Průměr</b>	<b>Směrodatná odchylka</b>
UVC	LD50	mJ/cm <sup>2</sup>	2202; 1930; 2404	2178,70	237,90
Rentgenové záření	LD50	Gy	>1000; >1500	-	-
Zvýšená teplota – 30 min	LT50	°C	38,8; 38,1; 38,9; 38,5	38,58	0,36
Zvýšená teplota – 60 min	LT50	°C	38,4; 38,4; 38,7; 38,6	38,52	0,15
Zvýšená teplota – 90 min	LT50	°C	38,0; 38,5; 38,3; 38,2	38,25	0,21
Peroxid vodíku – 24 hod	LD50	mM	1,05; 1,68; 1,99	1,58	0,48



## 5.2 Hodnocení citlivosti k opakovanému působení stresoru

Pro vybrané intenzity stresorů, které samostatně neměly vliv na mortalitu, byla hodnocena mortalita po opakované expozici. Stresor byl aplikován 4 po sobě jdoucí dny. Pátý den byla hodnocena mortalita. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2. Patrná je vysoká citlivost želvušek k opakované expozici UVC.

Tabulka 2. Citlivost k opakované dávce subletálního stimulu

Stresor	Dávka	Mortalita
UVC	500 mJ/cm <sup>2</sup>	100,0 % ; 100,0 %
	100 mJ/cm <sup>2</sup>	94,8 %; 91,8 %
Teplota 35 °C	1 h	0,0 %; 0,0%
	4 h	0,0 %; 0,0 %
Peroxid vodíku	2,5 mM po 1 h	4,6 %; 1,2 %
	0,25 mM po 1 h	0,0 %; 0,2 %

## 5.3 Stanovení citlivosti k vyšší kultivační teplotě

Želvušky druhu *H. dujardini* se v laboratoři kultivují při 17 °C, což je teplota optimální pro růst jejich populace. Testován byl vliv na chování jedinců při kultivaci za vyšších teplot po dobu 4 dnů. Srovnávané teploty byly 17, 20, 23, 27 a 30 °C. Teploty 20 a 23 °C neměly zjevný negativní vliv na aktivitu želvušek, neboť byla srovnatelná s kontrolou (>90 % populace konzumovalo řasy). Při 27 °C byl zaznamenán zjevný pokles aktivity (více jak 50 % jedinců inaktivních). V 30 °C želvušky již byly neaktivní, po přesunu do teploty 17 °C se však aktivita vrátila.

## 5.4 Hodnocení schopnosti předešlé expozice stresu chránit proti jednorázovému a opakovanému působení stresoru

Na základě předešlých experimentů byly vytipovány režimy stresování želvušek, které samy o sobě nemají výrazný negativní vliv na viabilitu. V následujících experimentech jim byly želvušky vystaveny před jednorázovou aplikací dalšího stresoru. První stresor byl aplikován jednorázově, nebo opakovaně čtyři dny po sobě. Druhý stresor byl pak aplikován po 24 hodinách po poslední expozici prvnímu stresoru. Cílem bylo ukázat možnou interakci těchto podmínek a v ideálním případě schopnost předcházející aplikace stresoru chránit proti akutnímu stresu.

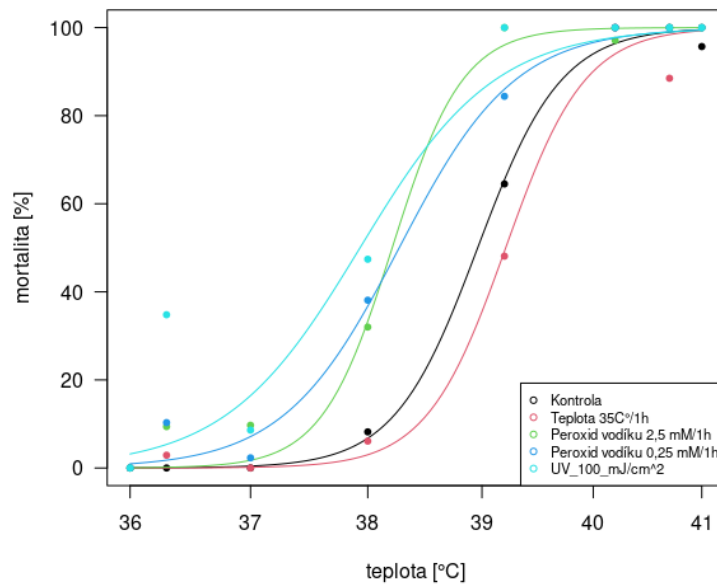
Celkem byly provedeny 3 experimenty. Zde je ale prezentován pouze ten, kde bylo na podmínku přítomných alespoň 20 želvušek (rozmezí 20 až 117). V ostatních

experimentech filtrační kroky předcházející expozici stresoru vedly ke ztrátě želvušek, menším výsledným populacím a problémům s proložením dávkové křivky. Výsledky jsou prezentovány v grafech a tabulkách (Tab. 3-5, Obr. 4-11) tak, aby bylo možné porovnat protekci různých stresorů na odolnost k jednomu následnému stresoru.

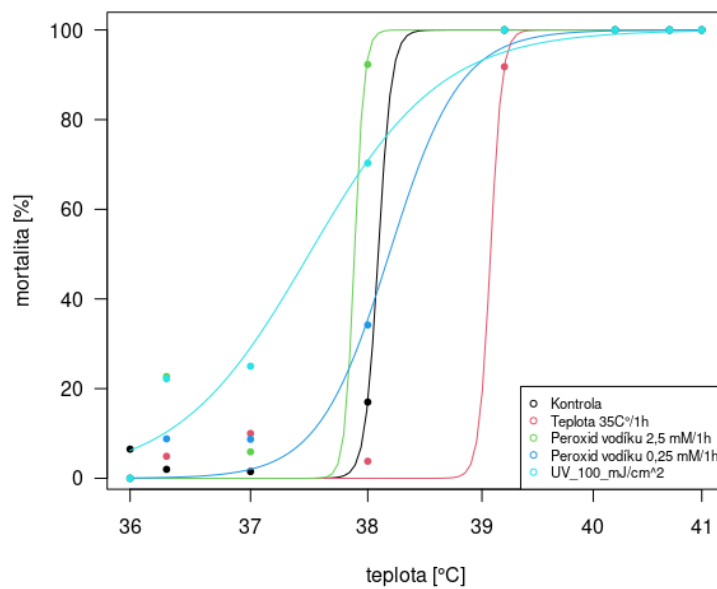
Tento pilotní experiment naznačuje, že expozice vyšší teplotě může poskytovat určitou ochranu proti teplotnímu stresu. Efekt byl viditelný při jednorázové i opakované expozici teplotnímu stresu. A to v při následné expozici vyšší teplotě po dobu 60 a 90 minut (Obr. 4-7). V jednom případě byla pozorována i protektivní aktivita expozice peroxidu vodíku (Obr. 6). Zdá se ale, že ve většině případech předcházející expozice ochranný efekt nemá, a naopak může mít efekt opačný.

Tabulka 3. Efekt expozice subletálnímu stimulu na citlivost ke zvýšené teplotě.

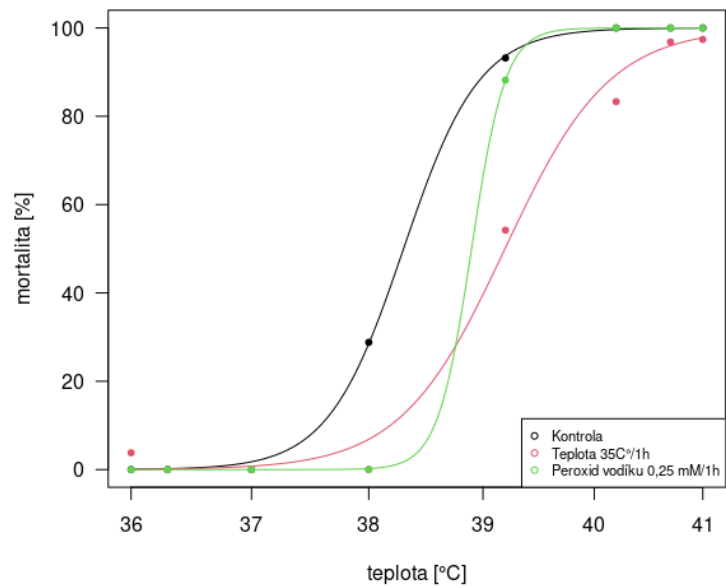
<b>Stresor</b>	<b>Počet opakování</b>	<b>Doba expozice zvýšené teplotě [min]</b>	<b>LT50 [°C]</b>
Kontrola	1	60	38,96
Teplota 35 C°/1h	1	60	39,21
Peroxid vodíku 2,5 mM/1h	1	60	38,21
Peroxid vodíku 0,25 mM/1h	1	60	38,27
UVC 100 mJ/cm <sup>2</sup>	1	60	37,93
Kontrola	4	60	38,30
Teplota 35 C°/1h	4	60	39,20
Peroxid vodíku 0,25 mM/1h	4	60	38,90
Kontrola	1	90	38,09
Teplota 35 C°/1h	1	90	39,08
Peroxid vodíku 2,5 mM/1h	1	90	37,89
Peroxid vodíku 0,25 mM/1h	1	90	38,19
UVC 100 mJ/cm <sup>2</sup>	1	90	37,50
Kontrola	4	90	37,98
Teplota 35 C°/1h	4	90	38,93
Peroxid vodíku 0,25 mM/1h	4	90	37,69



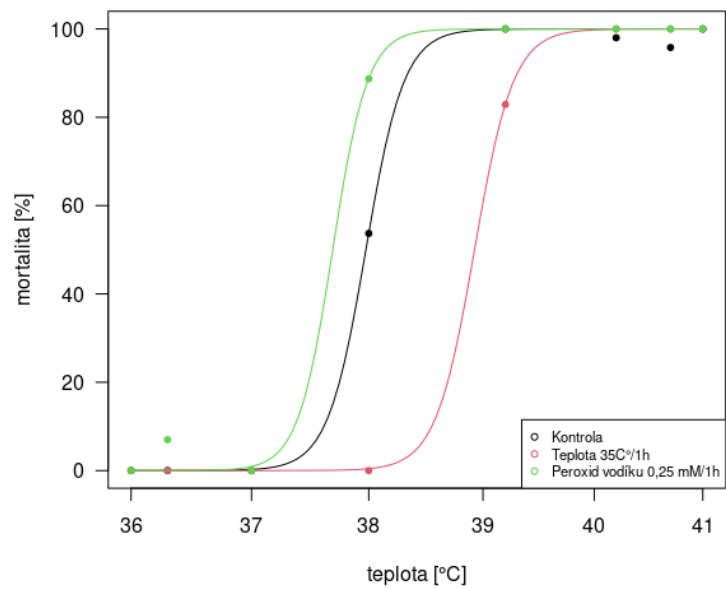
Obrázek 4. Vliv jednorázové aplikace stresorů na odolnost k teplotě (doba inkubace 60 min).



Obrázek 5. Vliv jednorázové aplikace stresorů na odolnost k teplotě (doba inkubace 90 min).



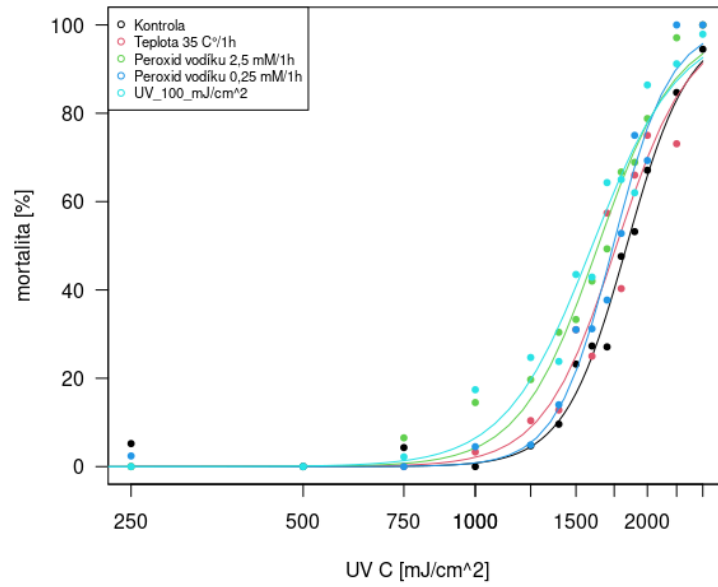
Obrázek 6. Vliv opakované aplikace stresorů na odolnost k teplotě (doba inkubace 60 min).



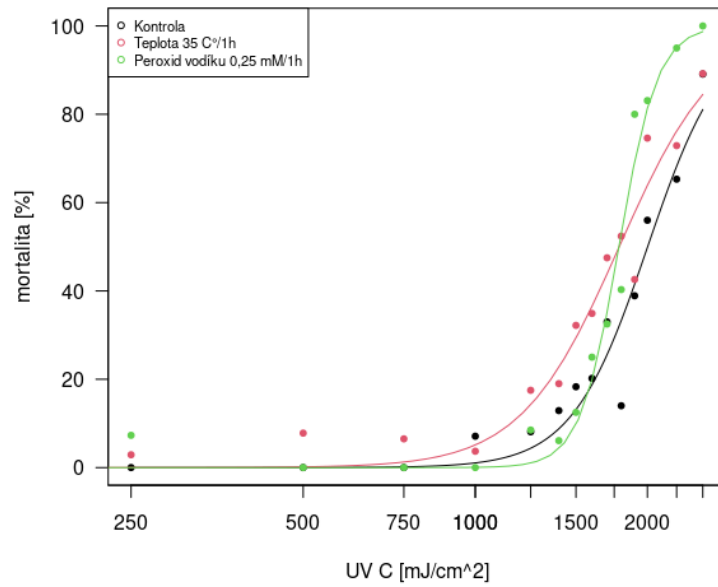
Obrázek 7. Vliv opakované aplikace stresorů na odolnost k teplotě (doba inkubace 90 min).

Tabulka 4. Efekt expozice subletálnímu stimulu na citlivost k UVC.

<b>Stresor</b>	<b>Počet opakování</b>	<b>LD50 [mJ/cm<sup>2</sup>]</b>
Kontrola	1	1840,3
Teplota 35 C°/1h	1	1765,4
Peroxid vodíku 2,5 mM/1h	1	1640,3
Peroxid vodíku 0,25 mM/1h	1	1742,5
UVC 100 mJ/cm <sup>2</sup>	1	1601,6
Kontrola	4	2002,0
Teplota 35 C°/1h	4	1785,6
Peroxid vodíku 0,25 mM/1h	4	1783,3



Obrázek 8. Vliv jednorázové aplikace stresorů na odolnost k UVC.

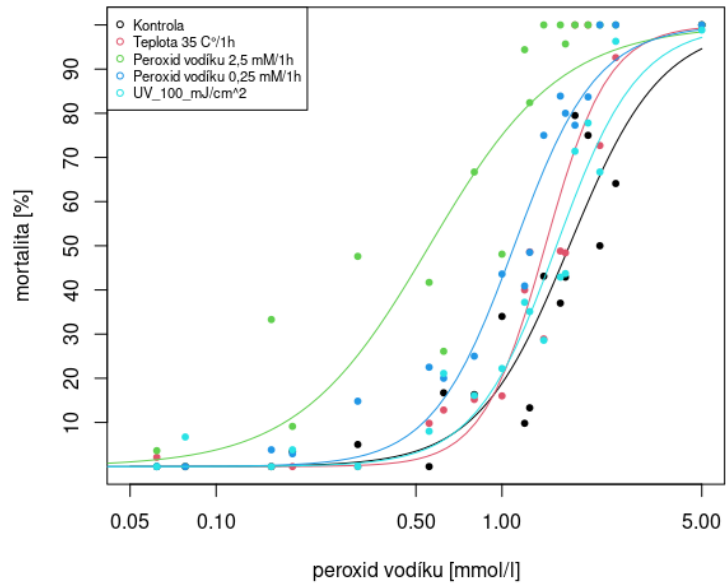


Obrázek 9. Vliv opakované aplikace stresorů na odolnost k UVC.

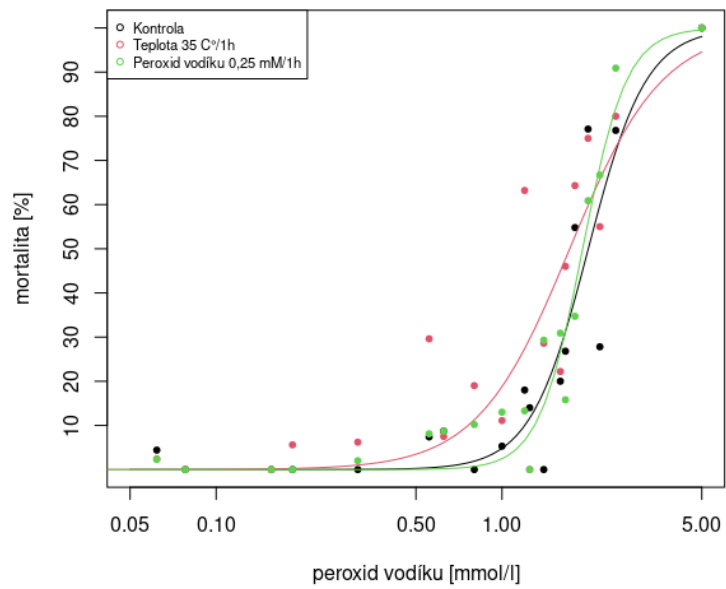
Tabulka 5. Efekt expozice subletálnímu stimulu na citlivost k peroxidu vodíku

<b>Stresor</b>	<b>Počet opakování</b>	<b>LD50 [mmol/l]</b>
Kontrola	1	1,72
Teplota 35 C°/1h	1	1,42
Peroxid vodíku 0,25 mM/1h	1	1,10
Peroxid vodíku 2,5 mM/1h	1	0,56
UVC 100 mJ/cm <sup>2</sup>	1	1,55
Kontrola	4	2,00
Teplota 35 C°/1h	4	1,73
Peroxid vodíku 0,25 mM/1h	4	1,92





Obrázek 10. Vliv jednorázové aplikace stresorů na odolnost k peroxidu vodíku.



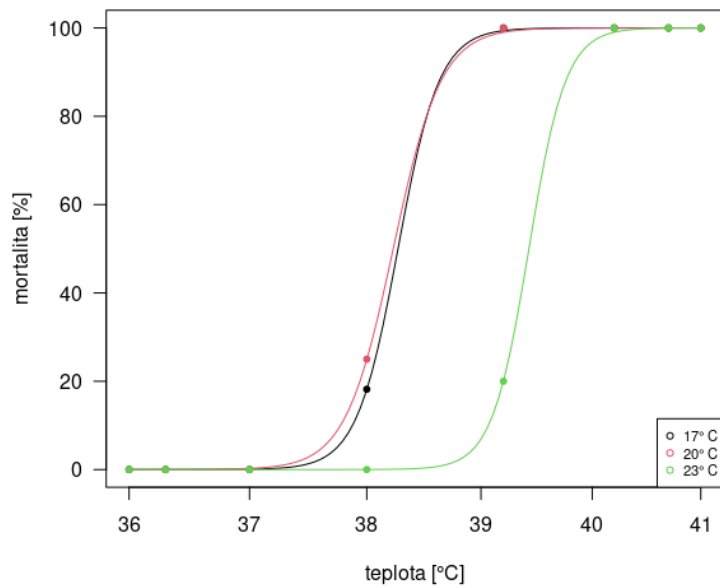
Obrázek 11. Vliv opakované aplikace stresorů na odolnost k peroxidu vodíku.

## 5.5 Vliv kultivační teploty na rezistenci ke zvýšené teplotě

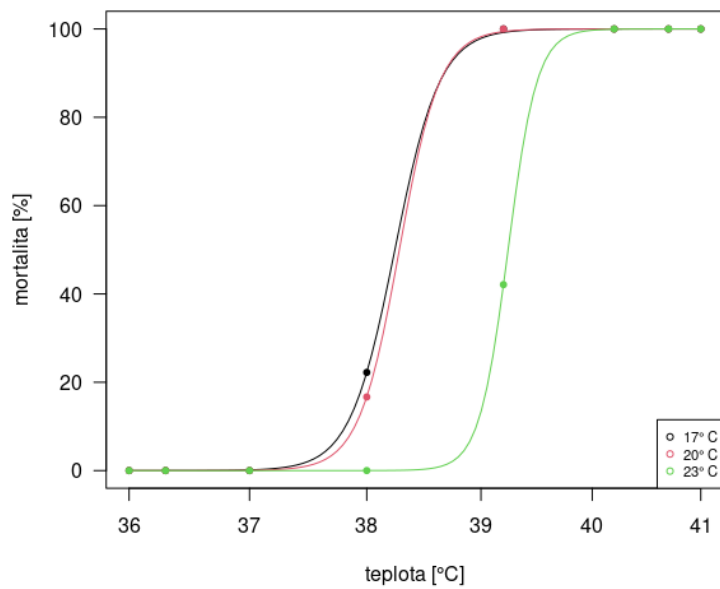
Protože předešlé experimenty ukazovaly na to, že expozice zvýšené teplotě může mít protektivní efekt proti tepelnému šoku, byla testována hypotéza, zda tento efekt nemá inkubace ve vyšší teplotě. Vzhledem k časovému omezení byl sledován vliv čtyř denní kultivace. Výsledky shrnuje tabulka 6 a obrázky 12 a 13. Tento pilotní experiment naznačuje, že několikedenní zvýšení kultivační teploty z 17 na 23 °C má protektivní efekt.

Tabulka 6. Vliv kultivační teploty na rezistenci k teplotnímu šoku.

Kultivační teplota [°C]	Doba expozice [min]	LT50 [°C]
17	60	38,27
20	60	38,22
23	60	39,43
17	90	38,24
20	90	38,28
23	90	39,24



Obrázek 12. Vliv kultivační teploty na odolnost ke zvýšené teplotě (inkubace 60 min).



Obrázek 13. Vliv kultivační teploty na odolnost ke zvýšené teplotě (inkubace 90 min).

## 6 Diskuze a závěr

Želvušky jsou extremotolerantní organismy schopné přežít vysychání, vysoké dávky radiace (UV, ionizující záření) a extrémní teploty (Møbjerg et al. 2011). Tato schopnost není vázána jen na specializovaná stádia, odolnost k některým formám stresu vykazují i aktivní jedinci (Jönsson et al. 2005, Horikawa et al. 2006). Rezistence k jednotlivým stresům je do značné míry druhově specifická (Hengherr et al. 2009, Sømme & Meyer 1995). Předpokládá se, že terestrické druhy, které se musí vyrovnat s vysycháním prostředí, jsou obecně odolnější než druhy vodní (Horikawa et al. 2013). Je možné, že „širokospektrá“ rezistence želvušek ke stresu, včetně stresu, kterému by nemohly být želvušky vystaveny v přirozeném prostředí (vysoké dávky ionizující radiace, mikrogravitace), je vedlejším produktem schopnosti přežít vysychání (Beltrán-Pardo et al. 2015).

Cílem této práce bylo otestovat hypotézu, že rezistenci želvušek lze indukovat předešlou expozicí stresu téhož či jiného typu. Vybrány byly čtyři abiotické stresory – záření UVC, rentgenové záření, zvýšená teplota a peroxid vodíku jako zdroj reaktivních kyslíkových forem. Kromě otázky, jestli je rezistence indukovatelná, nebo jde o stabilní stav neovlivnitelný vnějšími podmínkami, by takovéto experimenty mohly také ukázat, jestli je odpověď želvušek na stres obecná, nebo jestli existuje několik nezávisle regulovaných mechanismů rezistence.

U jiných modelových organismů je známo, že mají pro různé formy stresu do určité míry specializované mechanismy. Mezi nejznámější patří evolučně konzervované dráhy odpovídající na oxidativní stres (lidský Nrf2 a jeho homology u dalších organismů) (Bellezza et al. 2018, Ma 2013) a tepelný stres (proteiny teplotního šoku) (Rea et al. 2005). Oba dva systémy jsou studovány v souvislosti s fenoménem zvaným hormeze, což je jev kdy subletální dávka stresoru, který je jinak ve vyšších dávkách škodlivý, indukuje pozdější rezistenci vůči stresoru stejné i jiné povahy (Bujarrabal & Schumacher 2016). Příklady zkřížené rezistence byly pozorovány v řadě experimentálních systémů. U bakterie *Escherichia coli* způsobuje kalorická restrikce rezistenci vůči vysoké teplotě a peroxidu vodíku (Jenkins et al. 1998) a u bakterie *Lactococcus lactis subsp. Lactis* zase rezistenci vůči vysoké teplotě, ethanolu, osmotickému a oxidačnímu stresu (Hartke et al. 1994). Působení nízkých teplot na *D. melanogaster* zpomaluje stárnutí a indukuje rezistenci k vysokým teplotám a k infekci (Le Bourg 2011). Zvýšená teplota prodlužuje život *C. elegans* (Lithgow et al. 1995). Expozice peroxidu vodíku *Saccharomyces cerevisiae* zpomaluje stárnutí zvyšuje rezistenci vůči vysokým teplotám a infekci (Semchyshyn 2014). Zkříženou rezistenci lze také pozorovat v kulturách lidských buněk. V lidských epitelových buňkách byla pozorována rezistence k toxickým dávkám nanočástic stříbra a akrylaldehydu po vystavení nanočásticím stříbra v nižších dávkách (Sthijns et al. 2017).

Prezentované experimenty byly prováděny na vodní želvušce druhu *Hypsibius dujardini*, kterou je možné kultivovat v laboratoři v minerální vodě. Je třeba zmínit, že tato želvuška nepatří k nejodolnějším, není například schopna přežít vysychání (Horikawa et al. 2013). Nejprve jsem zjistila dávky stresorů, které vyvolávají smrt 50 % procent populace (LD50, LT50). Hodnocení bylo provedeno 24 hodin po

expozici. V pilotních experimentech jsem nepozorovala rozdíly v mortalitě, pokud byla hodnocena po 24 a 72 hodinách. Průměrné hodnoty byly následující: LD50 pro záření UVC 2178,7 mJ/cm<sup>2</sup>, LT50 pro zvýšenou teplotu působící po 30 minut 38,58 °C, pro zvýšenou teplotu působící po 60 minut 38,52 °C, pro zvýšenou teplotu působící po 90 minut 38,25 °C a LD50 pro peroxid vodíku působící 24 hodin 1,583 mM. Pro rentgenové záření parametry přístroje neumožnily dosáhnout letálních dávek. Ani aplikace 1500 Gy nevedla ke zvýšení mortality. Ozářené želvušky se ale dále nemnožily, což je v souladu s literaturou (Horikawa et al. 2006).

Dále jsem testovala nakolik budou želvušky schopny odolat opakované expozici subletální dávce stresoru. Ukázalo se, že na rozdíl od jiných stresorů jsou vysoce citlivé k opakované expozici UVC záření.

Také jsem zkusila želvušky kultivovat 4 dny v teplotách, které nejsou optimální pro růst populace, tedy v teplotách vyšších než 17 °C (20, 23, 27 a 30 °C). Ukázalo se, že ještě v teplotě 23 °C si želvušky udržují aktivitu, která je srovnatelná s optimální kultivační teplotou. Při vyšší testované teplotě (27 °C) se jejich aktivita dramaticky snížila, většina se přestala pohybovat a v populaci se objevili mrtví jedinci. Při teplotě 30 °C aktivita zcela ustala, ale byla obnovena při návratu do optimální teploty. Narozdíl od experimentů s krátkou expozicí stresoru byly po celou dobu v kultivačním médiu přítomny řasy, kterými se želvušky živí.

Získané informace byly použity pro navržení experimentů, kdy želvušky byly vystaveny nejprve subletálnímu stresu (jednorázově, opakovaně, a v případě teploty i kontinuálně) a následně širokému rozmezí intenzit dalších zkoumaných stresorů. V experimentu byly použity i kontrolní želvušky bez předešlé expozice. Vzhledem k omezeným možnostem práce v laboratoři kvůli epidemiologické situaci byly provedeny jen pilotní experimenty a výsledky je třeba považovat za předběžné. Na jejich základě se zdá, že jednorázová i opakovaná expozice zvýšené teplotě (35 °C) i kultivace ve vyšší teplotě (23 °C) zvyšují odolnost vůči následnému teplotnímu šoku. V jiných případech jsem pozorovala, že předcházející stres může odolnost vůči následnému šoku naopak snižovat. Zdá se tedy, že alespoň *H. dujardini* má podobně jako jiné modelové organismy indukovatelnou specializovanou odpověď na zvýšenou teplotu. Bude zajímavé provést podobná srovnání i pro odolnost k nízkým teplotám. Otázkou zůstává nakolik jsou tato pozorování relevantní pro jiné druhy želvušek, zejména těch terestrických, které jsou obecně odolnější ke stresu.

Seznam použité literatury:

- Aguinaldo A.M.A., Turbeville J.M., Linford L.S., Rivera M.C., Garey J.R., Raff R.A. & Lake J.A. (1997) Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387, 489–493
- Alpert P. (2006) Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or so rare? *J. Exp. Biol.* 209, 1575–1584
- Altiero T., Bertolani R., Rebecchi L. (2010) Hatching phenology and resting eggs in tardigrades. *Journal of Zoology* 280, 290–296
- Benaroudj N., Lee D. H., Goldberg L. A. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 276, 24261–24267
- Bertolani R., Guidetti R., Jönsson K. I., Altiero T., Boschini D., and Rebecchi L. (2004) Experiences on dormancy in tardigrades. *J. Limnol.* 63, 16–25
- Beltrán-Pardo E., Jönsson K. I., Harms-Ringdahl M., Haghdoost S., Wojcik A. (2015) Tolerance to gamma radiation in the Tardigrade *Hypsibius dujardini* from embryo to adult correlate inversely with cellular proliferation. *PLoS ONE* 10 (7): e0133658
- Bellezza I., Giambanco I., Minelli A., Donato R. (2018) Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1865(5), 721–733
- Bujarrabal A., Schumacher B. (2016) Hormesis running hot and cold. *Cell Cycle.* 15(24), 3335–3336
- Carpenter J. F., Crowe J. H. (1989) Infrared spectroscopic studies of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* 28, 3916–3922
- Chavez C., Cruz-Becerra G., Fei J., Kassavetis G. A., Kadonaga J. T. (2019) The tardigrade damage suppressor protein binds to nucleosomes and protects DNA from hydroxyl radicals. *eLife* 8, article e47682
- Crowe J. H., Crowe L. M., Carpenter J. F., Wistrom C. A. (1987) Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* 242, 1–10
- Crowe J. H., Carpenter J. F., Crowe L. M. (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 73–103
- Czerneková M. (2011) „Pomalé“ želvušky a jejich rozmnožování. *Živa* 6, 285
- Czernekova M., Jönsson K. I. (2016) Experimentally Induced Repeated Anhydrobiosis in the Eutardigrade *Richtersius coronifer*. *PLoS ONE* 11(11), e01640
- Degma P., Bertolani R., Guidetti R. (2009–2019) Actual checklist of Tardigrada species. 2009–2019, Ver. 35, 31– 07–2019

Dunn C. W., Hejnol A., Matus D. Q., Pang K., Browne W. E., Smith S. A., Seaver E., Rouse G. W., Obst M., Edgecombe G. D. et al. (2008) Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452, 745–750

Edgecombe G. D. (2010) Arthropod phylogeny: an overview from the perspective of morphology, molecular data and the fossil record. *Arthropod Struct Dev* 39, 74–87

Erdmann W., Kaczmarek L. (2016) Tardigrades in Space Research - Past and Future. *Orig Life Evol Biosph* 47, 545–553

Goyal K., Walton L. J. & Tunnacliffe A. (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J* 388, 151–157

Grohme M. A., Mali B., Welnicz W., Michel S., Schill R. O., Frohme M. (2013) The aquaporin channel repertoire of the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *Bioinform Biol Insights* 7, 153–165

Guidetti R., Jönsson K.I. (2002) Long-term anhydrobiotic survival in semi-terrestrial micrometazoans. *Journal of Zoology* 257, 181–187

Guidetti R., Boschini D., Rebecchi L., Bertolani R. (2006) Encystment processes and the “Matrioshka-like stage” in a moss-dwelling and in a limnic species of eutardigrades (Tardigrada). *Hydrobiologia* 558, 9–21

Guidetti R., Altiero T., Rebecchi L. (2011) On dormancy strategies in tardigrades. *Journal of Insect Physiology* 57, 567–576

Glime J. M. (2017) Tardigrade Reproduction and Food. Chapt. 5-2. In: Glime, J. M. *Bryophyte Ecology. Volume 2. Bryological 5-2-1 Interaction*. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. Last updated 21 April 2017 and available at <http://digitalcommons.mtu.edu/bryophyte-ecology2/>

Halberg K. A., Persson D., Ramløv H., Westh P., Kristensen R. M., Møbjerg, N. (2009) Cyclomorphosis in Tardigrada: adaptation to environmental constraints. *J Exp Biol* 212, 2803–2811

Hansen J. G., Katholm A. K. (2002) A study of the genus *Amphibolus* from Disko Island with special attention on the life cycle of *Amphibolus nebulosus* (Eutardigrada: Eohypsibiidae). In Hansen J. G. (ed.), *Arctic Biology Field Course Quqertarsuaq*. Zoological Museum University of Copenhagen H.C.Ø. TRYK Copenhagen: 129–163

Hartke A., Bouche S., Gansel X., Boutibonnes P., Auffray Y. (1994) Starvation-Induced stress resistance in *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3474–3478

Hashimoto T., Horikawa D. D., Saito Y., Kuwahara H., Kozuka-Hata H., Shin-I T., Minakuchi Y., Ohishi K., Motoyama A., Aizu T., Enomoto A., Kondo K., Tanaka S.,

- Hara Y., Koshikawa S., Sagara H., Miura T., Yokobori S. I., Miyagawa K., Suzuki Y., Kubo T., Oyama M., Kohara Y., Fujiyama A., Arakawa K., Katayama T., Toyoda A., Kunieda T. (2016) Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nature Communications* 7, 12808
- Hengherr S., Heyer A.G., Köhler H.R. & Schill R.O. (2008) Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades – evidence for divergence in response to dehydration. *FEBS* 275, 281–288
- Hengherr S., Worland M. R., Reuner A., Brümmer F., Schill R. O. (2009) High-Temperature Tolerance in Anhydrobiotic Tardigrades Is Limited by Glass Transition. *Physiological and Biochemical Zoology*, Vol. 82, No. 6, 749-755
- Horikawa D. D., Higashi S. (2004) Desiccation tolerance of the tardigrade *Milnesium tardigradum* collected in Sapporo, Japan and Bogor, Indonesia. *Zool Sci* 21, 813–816
- Horikawa D. D., Cumbers J., Sakakibara I., Rogoff D., Leuko S., Harnoto R., Arakawa K., Katayama T., Kunieda T., Toyoda A., Fujiyama A., Rothschild L. J. (2013) Analysis of DNA repair and protection in the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* and *Hypsibius dujardini* after exposure to UVC radiation. *PloS ONE*. 8, e64793
- Jenkins D. E., Schultz J. E., Matin A. (1988) Starvation-Induced cross protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 3910–3914
- Jönsson K. I. (2001) The Nature of Selection on Anhydrobiotic Capacity in Tardigrades. *Zool. Anz.* 240, 409–417
- Jönsson K. I., Borsari S., Rebecchi L. (2001) Anhydrobiotic survival in populations of the tardigrades *Richtersius coronifer* and *Ramazzottius oberhaeuseri* from Italy and Sweden. *Zool. Anz.* 240, 419-423
- Jönsson K. I., Bertolani R. (2001) Facts and fiction about long-term survival in tardigrades. *J. Zool., Lond.* 255, 121-123
- Jönsson, K. I., Rebecchi L. (2002) Experimentally induced anhydrobiosis in the tardigrade *Richtersius coronifer*: phenotypic factors affecting survival. *J. Exp. Zool.* 293, 57858
- Jönsson K. I. (2005) The evolution of life histories in holo-anhydrobiotic animals: a first approach. *Integrative and Comparative Biology* 45, 764–770
- Jönsson K. I. & Persson O. (2010) Trehalose in three species of desiccation tolerant tardigrades. *Open Zool J* 3, 1–5
- Keilin D. (1959) The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc. R. Soc. Lond., B* 150, 149–191
- Kristensen R. M. (1982) The first record of cyclomorphosis in Tardigrada based on a new genus and species from Arctic meiobenthos. *Z Zool Syst Evol Forsch* 20, 249–270



- Le Bourg E. (2011) A cold stress applied at various ages can increase resistance to heat and fungal infection in aged *Drosophila melanogaster* flies. *Biogerontology* 12, 185–193
- Lindahl, Karen and Balsler, Susie. (1999) Tardigrade Facts. Illinois Wesleyan University. Accessed on 26. 3. 2020 at <[http://www.iwu.edu/~tardisdp/tardigrade\\_facts.html](http://www.iwu.edu/~tardisdp/tardigrade_facts.html)>
- Lithgow G. J., White T. M., Melov S., Johnson T. E. (1995) Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7540–7544
- Ma Q. (2013) Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 53, 401-426
- Møbjerg N., Jørgensen A., Eibye-Jacobsen J., Halberg K. A., Persson D., Kristensen R. M. (2007) New records on cyclomorphosis in the marine eutardigrade *Halobiotus crispae* (Eutardigrada: Hypsibiidae). *Journal of Limnology* 66 (Suppl. 1), 132–140
- Møbjerg N., Halberg K. A., Jørgensen A., Persson D., Bjørn M., Ramløv H., Kristensen R. M. (2011) Survival in extreme environments – on the current knowledge of adaptations in tardigrades. *Acta Physiol* 202, 409–420
- Nelson D. R. (1991) Tardigrada. Chapt. 15. In: Thorp J. H. and Covich A. P. *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. Academic Press, New York, 501-521.
- Nelson D. R. (2002) Current Status of the Tardigrada: Evolution and Ecology. *INTEG. AND COMP. BIOL.*, 42, 652–659
- Nelson D. R., Guidetti R., Rebecchi L. (2015) Phylum Tardigrada. In: Thorp JH; Rogers DC (ed) *Thorp and Covich's freshwater invertebrates*, 4th edn. *Ecology And General Biology*, vol 1, 347–380
- Neven L. G., Duman J. G. & Low M. G. (1989) Purification and characterization of an insect haemolymph lipoprotein ice nucleator: evidence for the importance of phosphatidylinositol and apolipoprotein in the ice nucleator activity. *J. comp. Biochem. Physiol.* 159, 71–82
- Newsham K. K., Maslen N. R., McInnes S. J. (2006) Survival of Antarctic soil metazoans at -80°C for six years. *CryoLetters* 27, 269-280
- Persson D. K., Halberg K. A., Jørgensen A., Møbjerg N., Reinhardt M. Kristensen (2012) Neuroanatomy of *Halobiotus crispae* (Eutardigrada: Hypsibiidae): Tardigrade Brain Structure Supports the Clade Panarthropoda. *Journal of morphology* 273, 1227–1245
- Ramløv H. (2000) Aspects of cold tolerance in ectothermic animals. *Human Reproduction* 15, 26–46

- Ramløv H., Westh P. (1992) Survival of the cryptobiotic eutardigrade *Adorybiotus coronifer* during cooling to  $-196^{\circ}\text{C}$ : effect to cooling rate, trehalose level, and short-term acclimation. *Cryobiology* 29, 125-130
- Ramløv H., Westh P. (2001) Cryptobiosis in the eutardigrade *Adorybiotus* (*Richtersius*) *coronifer*: tolerance to alcohols, temperature and de novo protein synthesis. *Zool. Anz.* 240, 517-523
- Rahm G. (1937) A new ordo of tardigrados from the hot springs of Japan (Furu-yu section, Unzen). *Annot Zool Japon* 16, 345–35
- Rea S. L., Wu D., Cypser J. R., Vaupel J. W., Johnson T.E. (2005) A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet.* 37(8), 894-8
- Rebecchi L., Altiero T. & Guidetti R. (2007) Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance. *Invertebr Survival J* 4, 65–81
- Rebecchi L. (2013) Dry up and survive: the role of antioxidant defences in anhydrobiotic organism. *J Limnol* 72(s1), 62–72
- Rebecchi L., Altiero T., Guidetti R., Cesari M., Bertolani R., Negroni M. & Rizzo A.M. (2009) Tardigrade resistance to space effects: first results of experiments on the LIFE-TARSE mission on FOTON-M3 (September 2007). *Astrobiology* 6, 581–591
- Rebecchi L., Cesari M., Altiero T., Frigieri A., Guidetti R. (2009) Survival and DNA degradation in anhydrobiotic tardigrades. *J Exp Biol* 212, 4033–4039
- Rizzo A. M., Negroni M., Altiero T., Montorfano G., Corsetto P., Berselli P., Berra B., Guidetti R., Rebecchi L. (2010) Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*. *Comp Biochem Physiol B* 156, 115–121
- Robert W. Pennak (1989) Fresh – water invertebrates of the United States. Protozoa to Mollusca. 3th edition. A Wiley – Interscience Publication, 254 -268
- Seki K., Toyoshima M. (1998) Preserving tardigrades under pressure. *Nature* 395, 853-854
- Semchyshyn H. M. (2014) Hormetic concentrations of hydrogen peroxide but not ethanol induce cross-adaptation to different stresses in budding yeast. *International Journal of Microbiology* 2014
- Schill R. O., Steinbrück G. H. B., Köhler H. R. (2004) Stress gene (hsp 70) and quantitative expression in *Milnesium tardigradum* (Tardigrada) during active and cryptobiotic stages. *J Exp Biol* 207, 1607–1613
- Schokraie E., Hotz-Wagenblatt A., Warnken U., Mali B., Frohme M., Förster F., Dandekar T., Hengherr S., Schill R.O. & Schnölzer M. (2010) Proteomic analysis of tardigrades: towards a better understanding of molecular mechanisms by anhydrobiotic organisms. *PLoS One* 5, e9502

- Slaveykova V., Sonntag B., Gutiérrez J. C. (2016) Stress and Protists: No life without stress. *Eur J Protistol* 55(Pt A), 39–49
- Sømme L., Meier T. (1995) Cold tolerance in Tardigrada from Dronning Maud Land, Antarctica. *Polar Biol.* 15, 221-224
- Sthijns M. M., Thongkam W., Albrecht C., Hellack B., Bast A., Haenen G. R., Schins R. P. (2017) Silver nanoparticles induce hormesis in A549 human epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 40, 223-233
- Tunnacliffe A., Wise M. J. (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* 94, 791–812
- Watanabe M. (2006) Anhydrobiosis in invertebrates. *Appl. Entomol. Zool.* 41, 15-31
- Węlnicz W., Grohme M. A., Kaczmarek Ł., Schill R. O., Frohme M. (2011) Anhydrobiosis in tardigrades - the last decade. *J Insect Physiol* 57(5), 577–583
- William R. Miller. (1997) Tardigrades: Bears of the moss. EMPORIA STATE UNIVERSITY, vol 43
- Wright J. C. (1989) Desiccation tolerance and water-retentive mechanisms in tardigrades. *J. exp. Biol.* 142, 267-292
- Wright J. C. (2001) Cryptobiosis 300 years on from van Leuwenhoek: what have we learned about tardigrades? *Zool Anz* 240, 563–582.