

PAWEŁ KOWALCZYK, ROBERT MERONKA, EWA LISOWSKA, KONRAD WITEK  
i JOLANTA SOTOWSKA-BROCHOCKA

Zakład Fizjologii Zwierząt Kręgowych  
Instytut Zoologii, Wydział Biologii  
Uniwersytet Warszawski  
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa  
e-mail: kręgowce@biol.uw.edu.pl  
jsot@biol.uw.edu.pl

## HIBERNACJA PŁAZÓW — REGULOWANY PROCES ADAPTACYJNY

Od dawna uważano, że zimą niekorzystne warunki środowiskowe, takie jak brak pokarmu, a zwłaszcza obniżenie temperatury, prowadzą do „zawieszenia” wszelkiej aktywności życiowej zwierząt. Niektórzy do dziś sądzą, że „zimowe lub letnie odrętwienie u ryb i płazów, sen zimowy ssaków” są przykładami anabiozy. Inni dla stanu „przeżywania zimy” przez ektotermy używają terminów takich jak „rest stage” lub „winter stasis”. Wszystkie te zwroty zdają się zakładać całkowitą bierność fizjologiczną zwierząt podczas zimowania.

Celem prezentowanych badań było określenie strategii przeżywania zimy przez kręgowce ektotermiczne, jakimi są płazy. Obiektem naszych badań jest żaba trawna, *Rana temporaria* (Appendix 1). Wydało nam się warte zbadania zagadnienie, jak organizm ten radzi sobie ze sprzecznymi wymaganiami, jakie w zimie stawia mu środowisko. Z jednej bowiem strony, obniżenie temperatury otoczenia wymusza drastyczny spadek aktywności metabolicznej, a z drugiej, koniecznością jest przygotowanie się zwierząt do rozrodu i posthibernacyjnych czynności życiowych.

W pierwszym etapie badań zajęto się określeniem aktywności osi regulacyjnej podwzgórze-przysadka-gonady, gdyż *Rana temporaria* odbywa swoje gody bezpośrednio po zakończeniu hibernacji. Za najlepsze mierniki aktywności osi gonadowej uznaliśmy zawartość gonadotropiny LH w przysadce oraz jej poziom we krwi w różnych okresach hibernacji.

Ponieważ wiosenna migracja płazów do miejsc rozrodu i same gody wymagają intensyfi-

kacji procesów metabolicznych, postawiliśmy hipotezę, że przygotowanie do pory godowej i aktywności posthibernacyjnej zwierząt wymaga również aktywacji układów regulujących metabolizm. Podjęliśmy więc próbę oceny stanu aktywności osi regulujących czynność tarczycy i nadnerczy. Hormony tych gruczołów dokrewnych pełnią bowiem istotne funkcje w regulacji przemiany materii.

Wskaźnikami aktywności tarczycy były poziom jej hormonów w gruczołach i we krwi oraz hormonu uwalniającego tyreotropinę (TRH) w obszarze przedwzrostowym mózgu i w podwzgórze. Zawartość adrenokortykotropiny (ACTH) oznaczano w przysadce i we krwi traktując ją jako wskaźnik aktywności osi podwzgórze-przysadka-nadnercza.

Wiadomo, iż funkcje prolaktyny u *Anura* wiążą się z rozrodem, osmoregulacją i metabolizmem, zwłaszcza z gospodarką tłuszczową, a więc z procesami, które muszą mieć szczególne znaczenie zarówno podczas hibernacji, jak i w czasie godów oraz aktywności pohibernacyjnej. Badano więc także stan funkcjonalny komórek prolaktynowych (PRL) w przysadce mózgowej *R. temporaria*.

Byliśmy ciekawi również, czy i jak zmiany aktywności układów regulacyjnych przekładają się na przebieg procesów fizjologicznych zachodzących na obwodzie. W tym celu badaliśmy aktywność niektórych enzymów mięśniowych podczas hibernacji, w okresie, w którym obserwowaliśmy najwyraźniejsze zmiany w działaniu osi regulacyjnych.

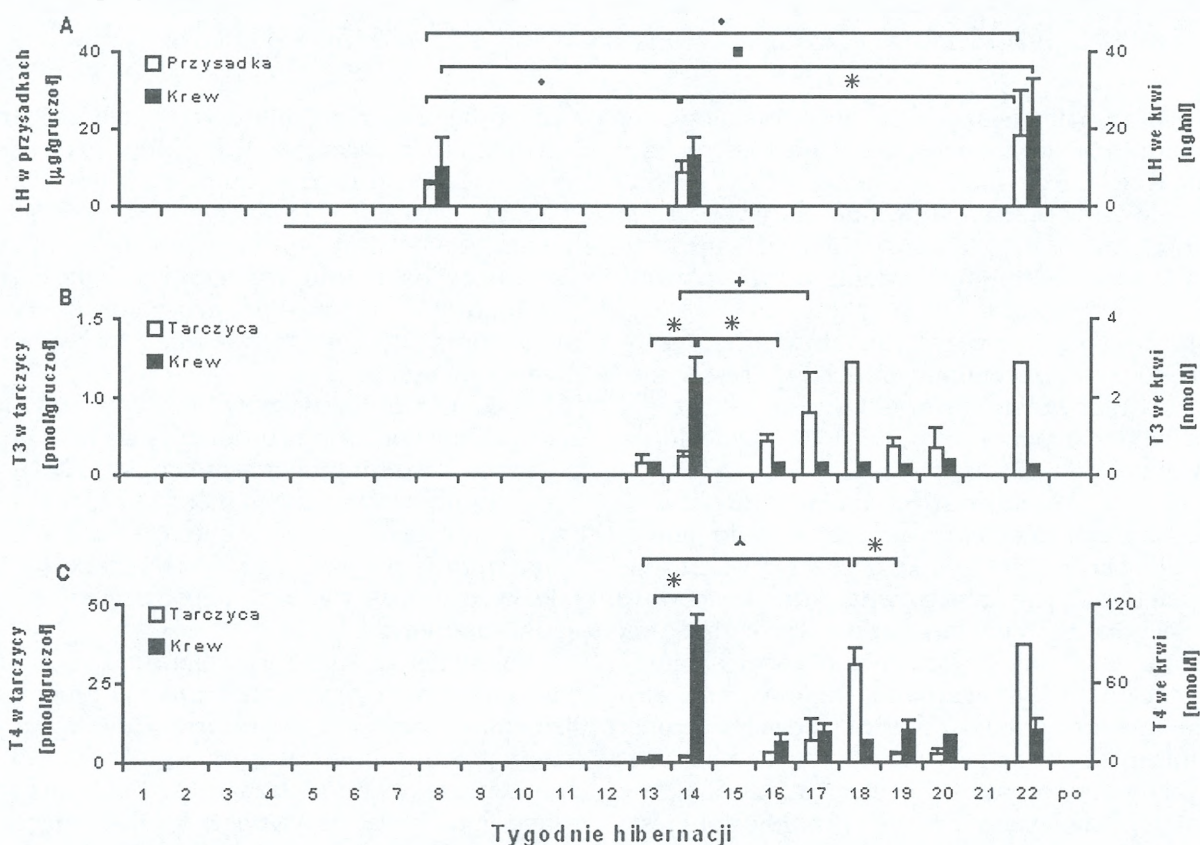
Prowadzenie hibernacji żab trawnych w kontrolowanych stałych warunkach, tj. w pojemnikach z napowietrzaną wodą, w stałej temperaturze 0–4°C (praktycznie 1,5–2,5°C), w ciemności, oddzielnie samic i samców, stało się przydatnym modelem badania procesów fizjologicznych w tym okresie. Taki model badawczy pozwala oceniać zjawiska niezależnie od wpływu czynników zewnętrznych.

Badaniami objęto obie płcie, ale wyniki doświadczeń przedstawione, jako przykład, na rysunkach dotyczą tylko samic.

Wykazano (Ryc. 1 A), że w pierwszym okresie hibernacji (od jej 5. do 11. tygodnia, koniec grudnia) zawartość gonadotropiny LH w przysadce i we krwi samic żaby trawnej jest bardzo niska; w przysadce wzrasta ona od połowy sty-

te wstępne badania doprowadziły nas do następujących wniosków:

- mimo stałych warunków, niskiej temp. (0–4) i ciemności w pewnym momencie hibernacji (u samic *R. temporaria* ma to miejsce około 2/3 tego okresu) występuje spontaniczna aktywacja osi podwzgórze-przysadka-gonady;
- pomimo niskiej temperatury w podwzgórzu zachodzą najprawdopodobniej procesy syntezy, transportu aksonalnego, a następnie uwalniania GnRH — neurohormonu odpowiedzialnego za syntezę i uwalnianie gonadotropin przysadkowych, a ich sekrecja prowadzi do owulacji;
- aktywacja osi podwzgórze-przysadka-gonady podczas hibernacji stanowi ważny element przygotowania się żab do pory godowej i prawdopodobnie przyczynia się do synchronizacji



Ryc. 1. A–C. Spontaniczne zmiany aktywności różnych układów regulacyjnych u samic żaby trawnej (*Rana temporaria* L.), podczas hibernacji.

A) Zawartość gonadotropiny LH w przysadce i w osoczu hibernujących żab bardzo niska, od 5. do 11. tygodnia, między 13. a 15. tygodniem w gruczole istotnie wzrosła ( $5,3 \pm 1,0$  vs  $8,9 \pm 2,9$  µg/gruczoł,  $p < 0,0001$ ); pod koniec hibernacji, w 22. tygodniu, zawartość hormonu w przysadce i we krwi wzrosła 3 i 2-krotnie w stosunku do poziomu wyjściowego ( $p < 0,006$ ). B) W 14. tygodniu (98 dzień) hibernacji widoczny jest przejściowy 10-krotny wzrost stężenia  $T_3$  w surowicy ( $3,0$  nmol/l), a po nim wyższa niż przed „wyrzutem” zawartość wolnej formy hormonu w gruczole, aż do końca hibernacji; C) Podobnie kształtują się zmiany poziomu  $T_4$  we krwi (maksimum  $100,5 \pm 9,6$  nmol/l,  $p < 0,01$ ) i w gruczole.

cznia (13 tydzień), a obserwacje przeprowadzone w pierwszych dniach marca (19 tydzień) i w 22. tygodniu, pod koniec hibernacji, wykazały wzrost stężenia tej gonadotropiny także we krwi (SOTOWSKA-BROCHOCA i współaut. 1992). Już

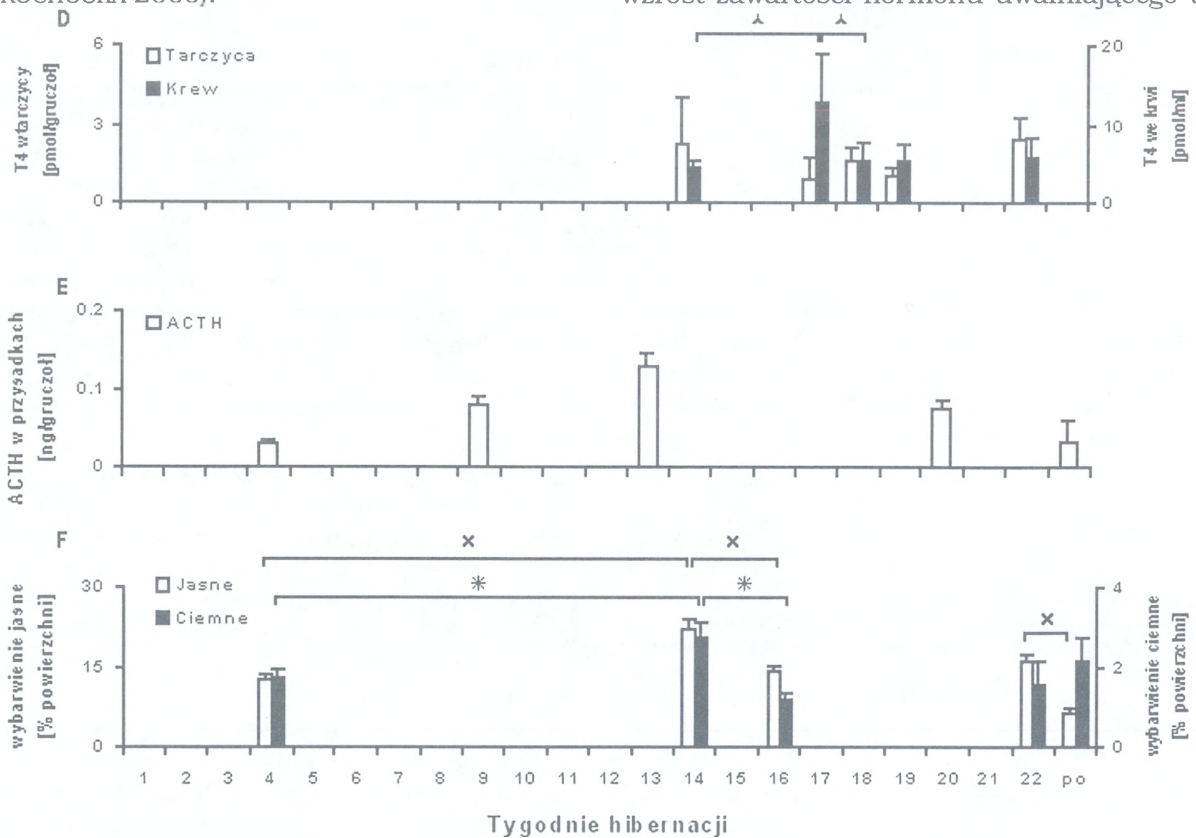
rozrodu u obu płci i stosunkowo krótkiego okresu godów, jaki obserwuje się u tego gatunku; zjawisko to ma więc dla żab istotne znaczenie adaptacyjne.

Hibernacyjną aktywację osi gonadowej w warunkach naturalnych niedawno zaobserwowano również u innego przedstawiciela rodzaju *Ranidae*, *R. dybowskii* (KIM i współaut. 1998).

Jak wspomniano postanowiliśmy określić także, czy aktywacji podlega oś regulująca czynność tarczycy. Doświadczenia przeprowadzone zostały w takich samych stałych warunkach, jak poprzednio. Materiał do oznaczeń hormonów pobierano w dwu kolejnych sezonach hibernacyjnych. W pierwszym sezonie co 1–2 tygodnie, a w następnym, aby określić dokładniej dynamikę zaobserwowanego zjawiska, co 2 dni (Ryc. 1B, C, 2B, C) (KOWALCZYK i SOTOWSKA-BROCHOCHA 2000).

w 98 dniu hibernacji. Tak u samic, jak i u samców żaby trawnej zjawisko to potwierdzono też w następnym sezonie hibernacyjnym. Stwierdzono, że wzrost poziomu hormonów trwał około 4–5 dni i, chociaż był nieco niższy niż obserwowany poprzednio, wystąpił w tym samym czasie (Ryc. 2A, B). Podobny, chociaż mniej wyraźny wzrost poziomu hormonów tarczycy zaobserwowano również we krwi samic *R. ridibunda*, przy czym był on opóźniony w stosunku do występującego u *R. temporaria* o około 3 tygodnie (Ryc. 1D).

Wyrzut hormonów tarczycy obserwowany u żaby trawnej jest o kilka dni poprzedzony przez wzrost zawartości hormonu uwalniającego ty-



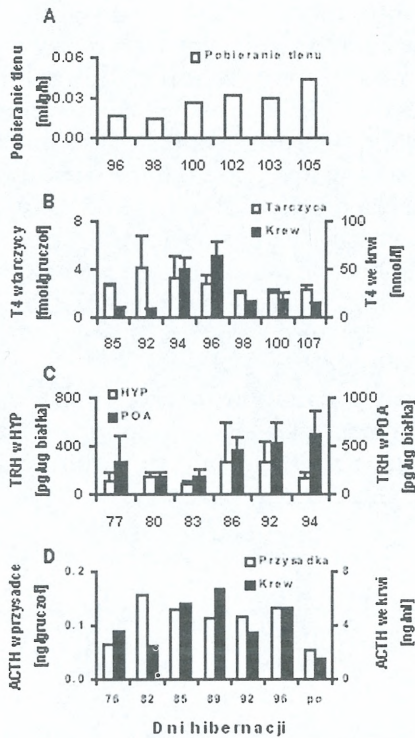
Ryc. 1. D–F. Spontaniczne zmiany aktywności różnych układów regulacyjnych u samic żaby trawnej (*Rana temporaria* L.), podczas hibernacji.

D) Zmiany stężenia T<sub>4</sub> we krwi i zawartości tego hormonu w gruczole występujące w 17. tygodniu u samic *R. ridibunda* ( $p < 0,05$ ) (być może „wyrzut” miał miejsce między 14. a 17. tygodniem hibernacji). E) W 13. tygodniu poziom ACTH w przysadce jest ponad 3 razy wyższy niż na początku hibernacji (0.129 ng/gruczoł); F) W 14 tygodniu hibernacji zarówno słabo, jak i silnie wypełnione hormonem komórki PRL zajmują największy procent powierzchni środkowych skrawków przysadki (odpowiednio, ponad 22 i ponad 2%) w porównaniu z początkowym okresem hibernacji; powierzchnia jaką zajmują obie te kategorie komórek rośnie istotnie w porównaniu z poprzednim okresem ( $p < 0,001$  i  $p < 0,01$ ). Świadczy to zarówno o uwalnianiu, jak i o syntezie prolaktyny w tym okresie.

Wyniki badania aktywności tarczycy żaby trawnej, a także żaby śmieszki (*R. ridibunda*) przedstawiono na kolejnych wykresach (Ryc. 1 B, C, D). Wskazują one na znaczny, przejściowy (o charakterze „wyrzutu”) wzrost stężenia we krwi obu hormonów tarczycy (HT: T<sub>3</sub> — trój-jodotyroniny i T<sub>4</sub> — tyroksyny) w 14 tygodniu,

reotropinę (TRH) w obszarze przedwzrokowym i w podwzgórze żab trawnych obu płci (Ryc. 2C). Stymulacja tarczycy jest zatem wynikiem aktywacji układu neuronów TRH w podwzgórze (Ryc. 2A) (KOWALCZYK 2000).

Wzrostowi stężenia hormonów tarczycy we krwi towarzyszył spadek ich zawartości w gru-



Ryc. 2. A–D. Zmiany stężenia we krwi i zawartości hormonów oraz zużycia tlenu u samic żaby trawnej, *R. temporaria* w okresie, gdy obserwowano aktywację osi tarczycowej oraz nadnerczowej. Badania prowadzono w kolejnym sezonie, a materiał pobierano co 2 dni.

A) Zużycie tlenu u żab w 14/15 tygodniu hibernacji (doświadczenie pilotowe, każdy punkt średnia z 2 pomiarów). Pomiarów dokonywano w chłodni, tlenomierzem w przepływającej wodzie. B) Poziom tyroksyny we krwi i w gruczole (forma wolna) u żaby trawnej w okresie od 13. do 16. tygodnia hibernacji. C) Zawartość TRH w obszarze przedwzrokowym i w podwzgórzu w okresie od 11. do 14. tygodnia hibernacji. D) Zawartość ACTH w przysadce i we krwi w okresie od 11. do 14. tygodnia hibernacji.

czole. Stwierdzono także, iż zawartość formy wolnej hormonów tarczycy w gruczole jest znacznie wyższa po ich wyrzuceniu niż przed nim i z pewnymi wahaniami utrzymuje się na bardzo wysokim poziomie do końca hibernacji, nawet w przypadku jej przedłużenia. Po hibernacji obserwuje się znaczny spadek zawartości hormonów zmagazynowanych w tarczycy, co świadczy o ich uwalnianiu do krwi.

Mimo, iż nie wiemy czy wyrzut hormonów tarczycy jest jeden, czy takich wzrostów ich stężenia we krwi jest więcej (badania powyższe objęły okres od około połowy sezonu hibernacyjnego a materiał nie mógł być pobierany zbyt często) obserwacje powyższe potwierdziły naszą hipotezę o hibernacyjnej aktywacji układów regulujących metabolizm. Wskazują one na spontaniczną aktywację wszystkich elementów osi tarczycowej w stałej niskiej temperaturze i w

ciemności występującą równoległe z aktywacją osi gonadowej w okresie około 2/3 sezonu hibernacyjnego oraz syntezę i gromadzenie w gruczole gotowych do uwolnienia hormonów.

U zmiennocieplnych kręgowców strefy umiarkowanej (płazy, gady) wielokrotnie wykazywano sezonową zmienność aktywności tarczycy. Zmiany dotyczyły poziomu HT w osoczu (płazy, TASAKI i współaut. 1986; gady, SELLERS i współaut. 1982), parametrów morfologicznych nabłonka tarczycy (*R. temporaria*; ZYŚK 1987), zawartości hormonów w gruczole i występowania zmienności dobowej ich poziomów w osoczu i w tarczycy (KÜHN i współaut. 1983, 1985a; GANCEDO i współaut. 1995, 1996). Mimo, iż okres zimy przyjęto określać jako stan całkowitej stagnacji życiowej ektotermów (ang. winter stasis, rest stage) w piśmiennictwie spotyka się wzmianki świadczące o przebiegu procesów regulujących aktywność tarczycy u tych zwierząt podczas hibernacji. Wydaje się, że wzmiankom tym, jak dotąd, nie poświęcono dostatecznej uwagi. Wskazują one jednak, że u różnych gatunków zwierząt ektotermicznych, u *Anura*, a także np. u jaszczurek (KÜHN i współaut. 1983, 1985; GANCEDO i współaut. 1995, 1996), aktywacja tarczycy ma miejsce w różnych okresach zimowania, ale na ogół przed końcem hibernacji. I tak na przykład:

— u *Bufo japonicus* stężenie hormonów tarczycy wzrasta w ciągu zimy i osiąga najwyższe wartości (5-krotny wzrost u samców i 17-krotny u samic) w okresie wędrówek rozrodczych. U tego gatunku zjawiska powyższe mają miejsce w „przerwie”, jaką sobie robią te ropuchy na gody podczas hibernacji (TASAKI i współaut. 1986);

— u *R. ridibunda* zawartość T<sub>4</sub> stwierdzana w tarczycy we wrześniu, spada do 1/3 tego poziomu w październiku, a do stycznia obniża się jeszcze o połowę. Jednocześnie w styczniu obserwuje się istotny wzrost poziomu T<sub>4</sub> w osoczu (o 348% w porównaniu do wartości z października) (KÜHN i współaut. 1983); w innych doświadczeniach poziom T<sub>4</sub> we krwi był niski w grudniu (241±82 pg/ml), ale zaczął wzrastać przed końcem hibernacji osiągając maksimum w marcu (1036±185 pg/ml). W tej samej pracy można odczytać z wykresu, że od stycznia do marca w tarczycy *R. ridibunda* znacznie wzrasta zawartość T<sub>4</sub> (KÜHN i współaut. 1985a);

— u *R. perezii* poziom osoczowy TH rośnie od października do stycznia, czemu towarzyszy spadek zawartości zarówno formy wolnej, jak i związanej T<sub>4</sub> w gruczole (GANCEDO i współaut. 1995). Autorzy piszą: „Względnie wysoki poziom T<sub>4</sub> (w osoczu) występuje u samców *R. perezii* oraz

wysoki poziom T<sub>3</sub> u obu płci przed końcem hibernacji”;

— u hibernujących w warunkach naturalnych żab trawnych między trzecią dekadą października a trzecią dekadą stycznia wysokość komórek nabłonka tarczycy wzrasta o 9% i o 39%, a objętość ich jąder komórkowych o 2 i o 4% odpowiednio u samic i u samców; wzrost tych parametrów między III dekadą stycznia, a III dekadą marca ulega przyspieszeniu. Wysokość komórek epitelialnych wzrasta wówczas o 16% u samic i o 31% u samców, zaś objętość jąder komórkowych u samic o 23% i o 55% u samców (ZYSK 1987).

Z powyższego przeglądu wynika, że u *B. japonicus*, *R. ridibunda*, *R. perezi* i *R. temporaria* pod koniec hibernacji następuje aktywacja nabłonka pęcherzykowego tarczycy oraz wzrost uwalniania T<sub>4</sub>, czemu u *R. ridibunda* w tym czasie towarzyszy również wzrost zawartości T<sub>4</sub> w gruczole.

Przejęciowy wzrost stężenia HT w surowicy w drugiej połowie stycznia oraz następujące po nim zwiększenie się ich zawartości w tarczycy udowodnione w naszych badaniach mogą świadczyć o zmianie sposobu regulacji tarczycy u żab podczas hibernacji. Na podstawie naszych (KOWALCZYK i SOTOWSKA-BROCHOCKA 2000) i powyżej cytowanych badań wydaje się, że można wyróżnić dwa poziomy aktywności tarczycy: pierwszy, występujący w początkowym okresie hibernacji, gdy podtrzymywane jest podstawowe uwalnianie uprzednio nagromadzonych w gruczole hormonów i drugi, ujawniający się pod koniec tego sezonu, wyższy, który wymaga pobudzenia komórek nabłonkowych do wzmożonej syntezy i uwalniania tych hormonów.

U ssaków znane jest zjawisko autoregulacji tarczycy. Polega ono na stymulacji wychwytu i koncentracji jodu w gruczole wtedy, gdy spada w nim jego zawartość. Mechanizm ten utrzymuje się, choć na niższym poziomie, również po usunięciu przysadki i uważa się go za istotny czynnik dostosowujący tempo transportu jodu do gruczołu do jego dostępności dla procesów syntezy hormonów w gruczole (STERLING i LAZARUS 1977). Autorzy ci piszą: „Autoregulacja zatem jest raczej reakcją powolną, która wskazuje, być może, na dwa poziomy kontroli tarczycy [...] szybką reakcją na TSH modulującą powolniejszą autoregulacyjną kontrolę wewnętrzną”. Należy sądzić, że czynność tarczycy zwierząt ektotermicznych w warunkach hibernacji podlega właśnie regulacji tego typu.

W piśmiennictwie spotyka się również informacje sugerujące zmienną sezonowo wrażliwość tarczycy na tyreotropinę (TSH) i/lub zmie-

niającą się zdolność komórek nabłonkowych do syntezy hormonów u płazów (KÜHN i współaut. 1985a). U hibernujących *R. temporaria* w grudniu komórki pęcherzykowe wyraźnie nie osiągały jeszcze zdolności do syntezy hormonów, gdyż nie występuje wówczas wbudowywanie J<sup>125</sup> w gruczole. Być może są to symptomy tych właśnie różnic regulacyjnych, o których wspomniano powyżej.

Wyniki uzyskane obecnie dokumentują wzrost poziomu hormonów tarczycy, a więc aktywację gruczołu u „zimowych” żab przebywających od 13-tu do 22-ch tygodni w chłodzie (praktycznie w temperaturze 1,5–2,5°C). Reakcja tarczycy płazów jest zatem podobna do reakcji obserwowanej u ssaków, u których chłód wzmacnia wydzielanie hormonów tarczycy. Do podobnych wyników prowadzą niedocenione w literaturze doświadczenia LAGERSPETZA i współaut. (1974). Już dawno wykazali oni, że u zimowych żab trawnych aklimowanych do 5 i 10°C nabłonek pęcherzykowy na preparatach tarczycy stanowi około trzykrotnie wyższy procent niż u zwierząt aklimowanych do 24 lub 25°C, a w mięśniach szkieletowych i w sercu wzrasta aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. W odróżnieniu od żab „letnich”, także mięśnie żab zimowych aklimowanych do temperatury 10°C zużywały istotnie więcej tlenu, niż przeniesione na 7–15 dni do 15, 25 i 35°C.

W kolejnych sezonach hibernacyjnych poziom badanych przez nas hormonów tarczycy podczas „wyrzutu” był różny (por. Ryc. 1B, C i 2B). Być może stanowi to wskazówkę, że na amplitudę tego zjawiska wpływają zmienne czynniki środowiskowe występujące przed przystąpieniem zwierząt do hibernacji. Procesy regulacyjne są być może zależne np. od poprzedzających hibernację warunków klimatycznych, pokarmowych i/lub wielkości puli jodu w organizmie, albo też od ilości hormonów tarczycy nagromadzonych w gruczole, które jak się wydaje, są niezbędne podczas hibernacji. Jak wykazaliśmy, procesy te przebiegają, mimo niepokarmienia przez zwierzęta, czynnika, który u ssaków hamuje aktywność tarczycy (ale np. pobudza ją u kijanek *R. catesbeiana*).

Wstępne badania przeprowadzone przez nas wskazują, że z pewnym (okołotrzytygodniowym) opóźnieniem w stosunku do żaby trawnej, również u żaby śmieszki obserwuje się przejściowy wzrost stężenia HT w osoczu (LISOWSKA 1998). Czy jest to powszechne zjawisko u hibernujących płazów i występuje także u innych gatunków ciepłolubnych, pozostaje do zbadania. *R. temporaria* charakteryzuje się najbardziej wysuniętym na północ zasięgiem występowania w Europie (por. Appendix 1), a jej rozród

jest bardzo wczesny. Pora godowa występuje bowiem bezpośrednio po wyjściu żab z zimowisk, przebiega przy niskiej temperaturze wody, trwa krótko a zwierzęta godują masowo, co świadczy o stosunkowo dobrej ich synchronizacji rozrodczej. Zarówno preferencje temperaturowe obu gatunków (*R. ridibunda* ma zasięg występowania znacznie bardziej południowy), jak i różnice w rozrodzie mogą prowadzić do pewnych odmienności regulacyjnych między żabą śmieszką i innymi gatunkami ciepłolubnymi, a żabą trawną (np. różne poziomy hormonów w osoczu i w gruczołach, różny czas rozpoczęcia i tempo syntez itp.).

Chociaż regulacja funkcji neuroendokrynowych, w tym funkcji tyreotropowej, u płazów zawiera jeszcze wiele niejasności istnieją liczne przesłanki wskazujące, że u żab TRH wzmacnia zarówno sekrecję  $T_4$ , jak i uwalnianie tyreotropiny — TSH (*in vitro*, *R. pipiens*; DENVER 1988). Wykazano również, że  $T_3$  hamuje stymulowaną przez TRH sekrecję TSH z przysadki. Ten ostatni fakt świadczy o istnieniu zależności typu: sprzężenie zwrotne ujemne pomiędzy aktywnością tarczycy a innymi (przysadka, podwzgórze) poziomami regulacyjnymi osi tarczycowej u płazów.

Z drugiej strony wykazano, iż hormon uwalniający gonadotropiny (GnRH) pobudza *in vitro* uwalnianie TSH (*R. pipiens*; DENVER 1988), a wpływ ten także jest hamowany przez  $T_3$ . Z naszych badań również wynika, iż immunoneutralizacja GnRH powoduje spadek poziomu  $T_4$  w surowicy hibernujących żab trawnych nie wywierając wpływu na stężenie  $T_3$  (NORMANTOWICZ 1994). Są również doniesienia wskazujące, że obok TSH, również gonadotropiny mogą bezpośrednio pobudzać sekrecję  $T_4$  z tarczycy *in vitro* (np. u kijanek *R. catesbeiana*).

Przedstawione dane sugerują ściśle funkcjonalne powiązanie osi regulacyjnych — gonadowej i tarczycowej u płazów. Zaobserwowany w naszych badaniach wyrzut hormonów tarczycy przypada na okres, gdy u hibernujących żab trawnych uwalniany jest GnRH (o czym świadczy wzrost zawartości LH w przysadce), a następnie z pewnym opóźnieniem wzrasta poziom tej gonadotropiny we krwi (por. Ryc. 1A, B, C) (SOTOWSKA-BROCHOCKA i współaut. 1992, KOWALCZYK i SOTOWSKA-BROCHOCKA 2000). Pozwala to sądzić, że GnRH i TRH dzięki jednoczesnemu działaniu na przysadkę koordynują uwalnianie gonadotropin i tyreotropiny. Z drugiej strony, neurohormon GnRH może wpływać na sekrecję hormonów tarczycy zarówno bezpośrednio pobudzając uwalnianie TSH, jak również działając pośrednio poprzez stymulację gonadotropin. W ten sposób GnRH mógłby pełnić

funkcje synchronizatora procesów rozrodczych i metabolicznych w przebiegających podczas hibernacji procesach przygotowywania zwierząt do aktywnego życia po jej zakończeniu.

Aby odpowiedzieć na pytanie czy hibernacyjna stymulacja dotyczy także innych osi neuroendokrynowych, podjęto badania, poziomu hormonu kortykotropowego (ACTH) w przysadce i we krwi oraz komórek prolaktynowych (PRL) w przysadce. Ich wyniki zamieszczono na Ryc. 1E, F i 2D). Wykazują one wzrost zawartości ACTH w przysadce mózgowej, który rozpoczyna się w 9 tygodniu (dzień 63) i między 12. a 14. tygodniem hibernacji osiąga poziom około 4-krotnie wyższy niż w początkowym jej okresie. Podwyższona zawartość ACTH w przysadce utrzymuje się także w końcowym okresie tego sezonu. Zmianom przysadkowego poziomu ACTH podczas hibernacji towarzyszą wahania stężenia tego hormonu we krwi (MERONKA i SOTOWSKA-BROCHOCKA 1999).

Powyższe wyniki sugerują, że od 12 tygodnia w przysadce ma miejsce synteza i gromadzenie, a następnie uwalnianie hormonu kortykotropowego do krwi (dzieje się to prawdopodobnie za sprawą aktywacji CRH, czyli podwzgórzowego hormonu uwalniającego hormon kortykotropowy) oraz że wzrost aktywności układu nadnerczowego wyprzedza nieco (o około 2 tygodnie) aktywację osi podwzgórze-przysadka-tarczyca.

W tym samym czasie, tj. w 14. tygodniu hibernacji, wyraźnej zmianie ulega obraz komórek PRL przysadki, badanych wysoce swoistą metodą immunohistochemiczną (IHC). Wyniki przedstawiające powierzchnię jaką zajmują komórki silnie i słabo wypełnione materiałem immunoreaktywnym (w % powierzchni przekroju przysadki, Ryc. 1F) wskazują na istotny wzrost obu tych kategorii komórek w 98 dniu hibernacji. Analiza preparatów pochodzących z tego okresu sugeruje podjęcie syntezy hormonu, jak również jego intensywne uwalnianie (WITEK 2000). Procesy te następują więc po wzroście poziomu TRH w podwzgórze (Ryc. 2C), który to neurohormon uważany jest u kręgowców (także u płazów) (KÜHN i współaut. 1985b) za jeden z głównych czynników uwalniających PRL.

U kilku gatunków zwierząt poikilotermicznych wykazano wyraźny cykl zmian sezonowych wydzielania prolaktyny, o których można sądzić zarówno na podstawie obrazu komórek w przysadce (gady: *Natrix natrix* i *Vipera berus*; SOTOWSKA-BROCHOCKA 1976, 1977), jak i poziomu hormonu we krwi (płazy: *R. esculenta*, *Triturus carnifex*; MOSCONI i współaut. 1994). Badania wskazują, że poziom PRL we krwi tych zwierząt, odwrotnie niż u ssaków, wzrasta pod

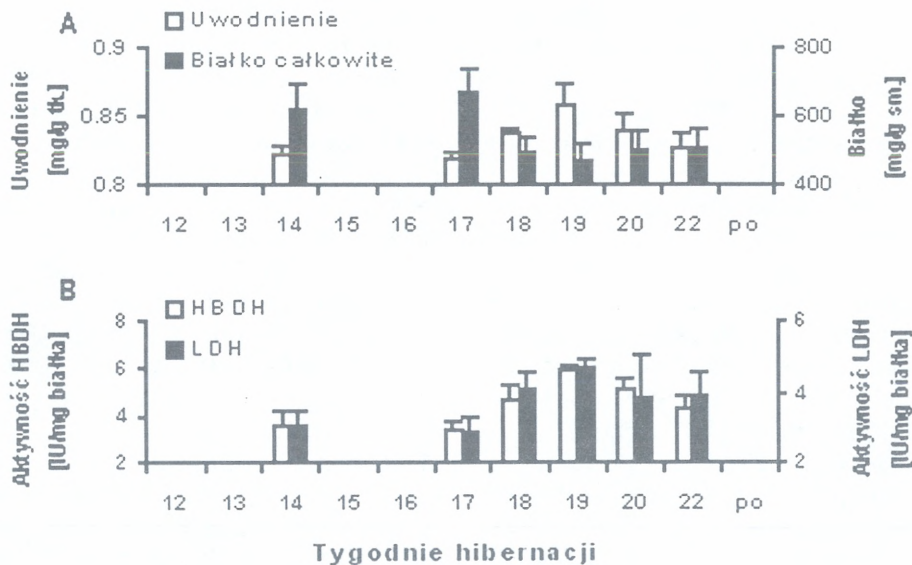
koniec lata i jest wysoki jesienią i zimą. Wykazano również, że u samic *R. esculenta*, jesienią, egzogenna PRL wpływa na spadek masy i zawartości tłuszczów zarówno w wątrobie, jak i w ciałach tłuszczowych z jednoczesnym znacznym wzrostem ich poziomu we krwi. Świadczy to o wzmożonym wykorzystywaniu tłuszczów jako źródła energii. Co ważne, jednocześnie utrzymuje się lub nawet lekko wzrasta zawartość lipidów w jajnikach (SOTOWSKA-BROCHOCKA i JAKLEWICZ 1984). Być może taką funkcję oszczędzającą jajniki pełni prolaktyna również podczas hibernacji.

Tak więc na przełomie 13. i 14. tygodnia eksperymentalnej hibernacji prowadzonej w stałych warunkach obserwuje się ogólną, spontaniczną aktywację układów neuroendokrynowych. Oznaki pobudzenia stwierdzono w osiach regulacyjnych: podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej, jak również tarczycowej i nadner-

getycznych (SCHLAGHECKE i BLUM 1977, 1978) i wiąże się ze zmianami aktywności enzymów uczestniczących w tych procesach. O przebiegu procesów metabolicznych u płazów podczas hibernacji wiadomo jednak niewiele.

Celem kolejnych naszych doświadczeń były zatem próby określenia, czy u zimujących żab w czasie aktywacji hormonalnej zmienia się zużycie tlenu, a także czy „przygotowanie do działania” narządów obejmuje również zmiany aktywności enzymów mięśniowych.

W pilotowym doświadczeniu (przeprowadzonym narazie na niewielkiej liczbie zwierząt) oznaczono zużycie tlenu u hibernujących w wodzie żab (Ryc. 2A). Eksperyment przeprowadzono w tym samym okresie, kiedy we krwi zwierząt spodziewano się wzrostu stężenia hormonów tarczycy, tj. na przełomie 14. i 15. tygodnia hibernacji. Wykazał on znaczny wzrost zużycia tlenu (o 179%) w ciągu kilku dni, mię-



Ryc. 3. Stan uwodnienia mięśni oraz zawartość w nich białka i aktywność dehydrogenazy maślanowej (HBDH) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w mięśniach hibernujących żab *R. temporaria* (17–19 tydzień hibernacji).

czowej. Ponadto stwierdzono stymulację komórek prolaktynowych w przysadce mózgowej. Fakty te świadczą o uogólnionym „resetowaniu” układu neuroendokrynowego podczas hibernacji. Występuje ono po okresie znacznie ograniczonej aktywności układów regulacyjnych.

Powstało pytanie, czy i w jaki sposób zmiany zaobserwowane w układach regulacyjnych znajdują odzwierciedlenie w procesach metabolicznych zachodzących na obwodzie?

U płazów strefy umiarkowanej występuje wyraźny sezonowy cykl zmian aktywności metabolicznej. Objawia się on m.in. zmianami w magazynowaniu i zużywaniu materiałów ener-

dzy 18 a 27 stycznia, co sugeruje, że to hormony tarczycy wzmagają pobieranie tlenu i wpływają na intensyfikację procesów metabolicznych podczas hibernacji (MERONKA 1997).

Począwszy od 14. tygodnia do końca hibernacji w odstępach 1–2 tygodniowych izolowano również mięśnie brzuchate łydki żab trawnych i oznaczano w nich suchą masę i poziom białka oraz aktywność dwóch enzymów zaangażowanych w metabolizm mięśniowy. Aktywność dehydrogenazy maślanowej (HBDH) posłużyła nam, jako wskaźnik przemian tlenowych i wykorzystania źródła energii w postaci tłuszczu, a aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH)

traktowano, jako wskazówkę nasilenia metabolizmu beztlenowego.

Uzyskane wyniki dotyczące samic przedstawiono na Ryc. 3A i B. Między 17. a 19. tygodniem hibernacji (127–141 dzień) przejściowo rośnie w mięśniach aktywność obu badanych enzymów. Następnie, w końcowym okresie hibernacji utrzymuje się ona na nieco wyższym poziomie, niż przed zaobserwowanym wzrostem. Ponadto, jak wykazał MERONKA (1997) w mięśniach ma miejsce w tym okresie 30 % wzrost zawartości wody w porównaniu z okresem poprzednim, któremu towarzyszy istotny spadek zawartości białka całkowitego (przeliczonego na suchą masę) utrzymujący się do końca hibernacji. Obserwowany przejściowy wzrost aktywności enzymatycznej badanych enzymów jest opóźniony w porównaniu z aktywacją układów regulacyjnych.

Wzrost aktywności obu badanych enzymów mięśniowych świadczy o ogólnej aktywacji metabolizmu. Natomiast, zwracające uwagę obniżenie się poziomu białka całkowitego w mięśniach w końcowym okresie hibernacji jest, być może, związane z wykorzystaniem białek jako substratów energetycznych w sytuacji wyczerpania się innych zapasów. Czy jest to u żab skutkiem aktywacji nadnerczy pozostaje do zbadania. Szereg doniesień dotyczących ssaków (niehibernujących) wskazuje bowiem, że ten kataboliczny efekt może być wywołany przez glukokortykoidy. Istnieją, na przykład, poważne przesłanki świadczące nie tylko o hamowaniu syntezy, lecz również o ich wpływie na proteolizę białek mięśniowych u szczurów (UMPLEBY i RUSSELL-JONES 1996).

Odkrycie mechanizmów regulacyjnych działających podczas hibernacji w warunkach stałego chłodu pozwala sądzić, że mają one dla przeżycia zwierząt istotne znaczenie adaptacyjne. Przygotowują one czynnościowo narządy do działania w porze godowej i w okresie pohibernacyjnej aktywności.

Pora godowa płazów jest związana ze znacznym wysiłkiem fizycznym, nie tylko z wędrówkami w poszukiwaniu odpowiedniego do rozrodu zbiornika wodnego, lecz również ze stresogennymi sytuacjami międzyosobniczymi (np. konkurencja samców o samice itp.). Badania jednoznacznie wskazują, że aktywność zwierząt, procesy metaboliczne i działanie układów regulacyjnych osiągają wówczas szczytowe nasilenie.

W przypadku żaby, *R. temporaria* hibernacja jest prawdopodobnie okresem, w którym dokonuje się synchronizacja rozrodcza zwierząt, będąca pochodną „uruchomienia” układów neuroendokrynowych w ściśle określonym

czasie. Synchronizacja ta ma istotne znaczenie dla cyklu życiowego żab tego gatunku, zwłaszcza w ich najbardziej północnych siedliskach, gdzie okres hibernacji wydłuża się do bez mała 9 miesięcy w roku. Dzięki synchronizacji, skróceniu ulegają gody i więcej czasu pozostaje na zależny od temperatury rozwój larwalny. Dorosłe samice zyskują również dzięki temu czas umożliwiający przeprowadzenie witellogenezy w jak najkrótszym czasie.

Zaobserwowane przez nas przejściowe wzrosty stężenia hormonów tarczycy i ACTH w osoczu oraz ich zawartości w gruczołach występują u żab trawnych w kolejnych sezonach hibernacyjnych z zadziwiającą regularnością — zawsze w III. dekadzie stycznia. Różnice jakie stwierdziliśmy, to przesunięcia w kolejnych sezonach zaledwie o kilka dni. Fakt ten wskazuje na istnienie u *R. temporaria* endogennego „kalendarza” precyzyjnie mierzącego czas. Jego mechanizm jest nieznany. Z naszych badań wynika jedynie, że działa on w stałym chłdzie (temp. 0–4°C) oraz w ciemności.

U ssaków istotnym elementem umożliwiającym synchronizację procesów wewnętrznych z warunkami środowiska zewnętrznego jest hormon szyszynki, melatonina (Mel). Dzięki temu, że wydzielana jest ona tylko w ciemności, jej zależna od długości fotoperiodu krótsza lub dłuższa obecność w płynach ustrojowych niesie organizmowi informację o porze roku.

Wstępne wyniki (LIPNIAČKA 1994), jakie uzyskaliśmy wskazują, że zawartość Mel w szyszynce i we krwi żab trawnych w 10–13 tygodniu hibernacji jest bardzo niska. Z drugiej strony, mimo iż stężenie białka błonowego (mg/g świeżej tkanki mózgu) w styczniu jest niższe niż na początku i po hibernacji, wiązanie maksymalne znakowanej  $J^{125}$  Mel ( $B_{max}$ ), a więc ilość receptorów jest wówczas 2–3-krotnie wyższa (zarówno w przeliczeniu na gram świeżej tkanki, jak i mg białka; FILIP 2000) w porównaniu z wymienionymi okresami. W styczniu również istotnie wyższe jest powinowactwo receptorów do melatoniny. Czy niski poziom Mel jest sygnałem aktywującym układ neuroendokrynowy, czy też ilość receptorów i ich powinowactwo do melatoniny kompensuje jej niskie stężenie podczas hibernacji i ma ona znaczenie jako nośnik sygnału, pozostaje do zbadania.

Nasze badania wskazują, że hibernacja płazów jest regulowanym stanem adaptacyjnym, w którym, mimo zimna i ciemności, od pewnego momentu uruchamiane są mechanizmy umożliwiające dalsze życie w zmienionych warunkach środowiskowych. Określenia takie jak „rest stage” lub „winter stasis” używane często dla scharakteryzowania stanu przeżywania zi-



my przez zwierzęta ektotermiczne są zatem nieodpowiednie, nie służą bowiem dobremu opisowi rzeczywistości.

Wzrost zużycia tlenu (który towarzyszył opisaniu przez nas zjawisku spontanicznej aktywacji układu podwzgórze-przysadka-tarczyca u żab) podczas hibernacji jest podobny do obserwowanego podczas epizodów hibernacyjnego wybudzenia się ssaków (arousal) (np. u świstaków; ARMITAGE i współaut. 2000). Z kolei, u hibernujących susłów, *Spermophilus decemlineatus* (TOMASI i STRIBLING 1996), obserwowano we krwi wyższe poziomy hormonów tarczycy w okresie wybudzeń niż przed hibernacją. I wreszcie u australijskiego warana, *Varanus rosen-*

*bergi* (RISMILLER i McKELVEY 2000), stwierdzono podczas hibernacji występowanie okresów wybudzeń, którym towarzyszył kilku/kilkunastopniowy wzrost temperatury ciała.

Narzucają się pytania: (i) czy obserwowane przez nas zjawisko aktywacji układu neuroendokrynowego u żab jest odpowiednikiem epizodu wybudzenia u warana lub ssaków; czyli (ii) czy wzrostowi pobierania tlenu przez żaby towarzyszy produkcja ciepła i/lub behawioralne symptomy termoregulacji? Odpowiedzi na powyższe pytania mogą stanowić istotną przesłankę w dyskusji o ewolucji homeotermii i hibernacji.

## HIBERNATION OF AMPHIBIA AS REGULATED ADAPTATIVE PROCESS

### Summary

The hypothesis that during hibernation in *Rana temporaria* the spontaneous activation of regulatory processes takes place preparing the frogs for breeding and posthibernatory activity was tested. The pituitary content and plasma concentration of gonadotropin (LH) and corticotropin (ACTH) were determined in different periods of experimental hibernation (constant temperature 0–4°C and darkness). The image analysis and estimation of prolactin (PRL) cell functional state in pituitaries were done as well. In addition, the content of thyrotropin releasing hormone (TRH) in preoptic area and hypothalamus and thyroid hormones (THs) in both the glands (free and bound forms) and in serum (total) were investigated. It was found: — the pituitary level of LH increased progressively starting at about Week 13 in second third of hibernation (middle of January); — plasma LH concentration showed similar but delayed changes; — between the day 92 and 98 of hibernation (Week 13/14) serum triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) increased significantly as well; — the peak of THs in the blood was accompanied by a slow decrease of free forms of THs, and the bound forms of both hormones dropped rapidly over this period; — the low level of serum THs but higher than before the peak was maintained to the end of hibernation; — thyroid content of free THs rose significantly after their "surge" into the blood, reached maximal values in the middle of February, and remained at this level to the end of

hibernation (last week of March); — simultaneously with the peak of blood THs in hypothalamus the high content of TRH was observed; — the results were confirmed during the second season when the material in the period of expected elevation of serum THs was collected every other day; — the elevation of pituitary ACTH content was starting as early as Week 9 (day 63) of hibernation and between Weeks 12 and 14, its level was 4-fold higher than in beginning of wintering; — the elevated pituitary content of ACTH remained to the end of hibernation and its plasma level changed significantly during this time; — immunohistochemical image of pituitaries pointed out intense release of PRL starting at the day 98 of hibernation. Our preliminary results showed also an enhanced oxygen consumption and increase in activity of some muscle enzymes (lactic acid dehydrogenase, LDH and butyric acid dehydrogenase, HBDH) during Week 15 of frog hibernation. The presented results suggest the spontaneous activation of the neuroendocrinal regulatory axes under constant conditions of experimental hibernation. Thus, hibernation of amphibians seems to be not only a temperature-dependent winter resting stage but also a regulated adaptative state allowing them to survive under hard ambient conditions and to prepare (i.e. to synchronize breeding and metabolic processes) for posthibernatory activity.

### APPENDIX 1

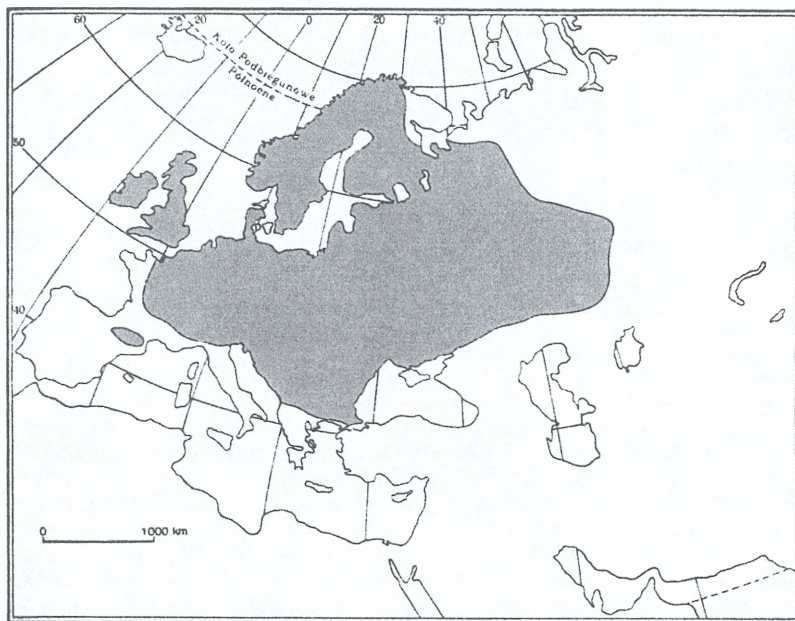
#### BIOLOGIA ŻABY TRAWNEJ, *RANA TEMPORARIA* L.

*Rana temporaria* L., jest gatunkiem żaby o najbardziej północnym zasięgu występowania w Europie. Zamieszkuje tereny od Wysp Brytyjskich na zachodzie po Wołgę na wschodzie. Na północy sięga najdalszych zakątków Półwyspu Skandynawskiego, daleko poza Koło Podbiegunowe (Ryc. 1). Na południu spotyka się ją w Pirenejach, w Północnych Włoszech, w Alpach i na Półwyspie Bałkańskim (poza Grecją).

Występuje głównie na nizinach, ale w górach dociera aż do krainy wiecznych śniegów (3000 m npm). Zimą przeżywa zagrzebana w mule lub piasku w strumieniach lub zakolach rzek o spokojnym prądzie. Czas trwania hibernacji żaby trawnej zależy od szerokości geograficznej, a właściwie od klimatu. Długość okresów hibernacji i pory godowej przedstawiono w Tabeli 1. Wędrówki do miejsc zimowania, które często mają masowy charakter, żaby trawne rozpoczynają od drugiej dekady września. W warunkach klimatycznych Polski kończą się

one około 15 października; większość żab znajduje się wtedy już w zimowiskach. U obu płci przed hibernacją masa wątroby i ciała tłuszczowych osiąga maksimum, a samice mają ukończoną witellogenezę. Spośród wszystkich krajowych *Anura*, jeszcze tylko ropuchy szare kończą witellogenezę przed hibernacją. Podczas hiber-

ściej między 20. marca a pierwszymi dniami kwietnia. Składanie skrzeku zazwyczaj rozpoczyna się przy temperaturze wody 5–8°C. Tempo rozwoju kijanek jest zależne od charakteru zbiornika wodnego oraz od warunków klimatycznych, zwłaszcza temperatury. Rozwój larwalny trwa od 50 do 180 dni. Czasami kijanki nie



Ryc. 1. Rozmieszczenie żaby trawnej (*Rana temporaria* L.) (wg JUSZCZYKA 1987).

nacji, nawet w temperaturze 1,5–2,5°C, żaby zachowują ruchliwość i tego ich stanu nie można nazwać odrętwieniem.

Bezpośrednio po wyjściu z zimowisk żaby przystępują do godów. Odbывают się one najczę-

Tabela 1. Czas trwania hibernacji i pory godowej żaby trawnej, *Rana temporaria* L. w zależności od warunków klimatycznych

	Czas trwania (dni)	
	hibernacji	pory godowej
Kraipe (Szwecja) 66°N, 16°E, 800m npm.	275	7
Ammarnäs (Szwecja) 66°N, 16°E, 400m npm.	245	9
Umeå (Szwecja) 64°N, 20°E, 10m npm.	215	~20
Archangielsk (Rosja) 65°N, 41°E	230	-
Sörmland (Szwecja) 59°N, 18°E, <150 m npm.	~195	21
Warszawa (Polska) 52°N, 21°E	157	~20
Cambridge (W.Brytania) 51°N, 0°E, 2m npm.	95	~16
Kraków (Polska) 50°N, 20°E	150	-
Kijów (Ukraina) 50°N, 30°E	130	-

(wg JUSZCZYKA 1987 i ELMBERGA 1990).

zakończywszy rozwoju muszą zimować.

Dojrzałość płciową żaby trawne uzyskują zazwyczaj w 3. roku życia, po osiągnięciu długości ciała 41–50 mm i masy ok. 15 g przez samce oraz długości 47–58 mm i masy ok. 20 g, przez samice. Dojrzałe osobniki prowadzą ściśle lądowy tryb życia. Spotyka się je z dala od zbiorników wodnych na polach uprawnych, w sadach i w lasach, zwłaszcza liściastych. Żaby te są jednak bardzo wrażliwe na wysychanie, we dnie chowają się w wilgotnych miejscach, a aktywność wykazują głównie o zmierzchu i nocą. Najintensywniej żerują od maja do sierpnia; we wrześniu przestają pobierać pokarm (choć owady, którymi się żywią są jeszcze dostępne) i nic nie jedzą aż do wiosny.

Cykl zjawisk sezonowych w życiu żaby trawnej, *R. temporaria* L. przedstawia Ryc. 2.



Ryc. 2. Cykl roczny *Rana temporaria* L.

## LITERATURA

- ARMITAGE K. B., WOODS B. C., SALSURY C. M. 2000. *Energetics of hibernation in Woodchucks (Marmota monax)*. [W:] *Life in the cold*, Eleventh International Hibernation Symposium, HELDMAIER G., KLINGENSPOR M. (red.). Springer, 73–80.
- DENVER R. J., 1988. *Several hypothalamic peptides stimulate in vitro thyrotropin secretion by pituitaries of anuran amphibians*. Gen. Comp. Endocrinol. 72, 383–393.
- ELMBERG J., 1990. *Long-term survival, length of breeding season, and operational sex ratio in a boreal population of common frogs, Rana temporaria L.* Can. J. Zool. 68, 121–127.
- FILIP A., 2000. *Miejsca wiążące melatoninę w ośrodkowym układzie nerwowym żab trawnych (Rana temporaria L.) podczas hibernacji*. Praca magisterska, U.W.
- GANCEDO B., ALONSO-GOMEZ A. L., DE PEDRO N., CORPAS I., DELGADO M., J., ALONSO-BEDATE M., 1995. *Seasonal changes in thyroid activity in male and female frog, Rana perezi*. Gen. Comp. Endocrinol. 97, 66–75.
- GANCEDO B., ALONSO-GOMEZ A. L., DE PEDRO N., DELGADO M. J., ALONSO-BEDATE M., 1996. *Daily changes in thyroid activity in the frog, Rana perezi: variation with season*. Comp. Biochem. Physiol. 114C, 79–87.
- JUSZCZYK W., 1987. *Płazy i gady krajowe*. PWN, Warszawa.
- KIM J. W., IM, W. B., CHOI H. H., ISHII S., KWON H. B., 1998. *Seasonal fluctuations in pituitary gland and plasma levels of gonadotropic hormones in Rana*. Gen. Comp. Endocrinol. 109, 13–23.
- KOWALCZYK P., 2000. *Ośrodkowa regulacja funkcji tarczycy u żaby trawnej, Rana temporaria L. podczas hibernacji*. Praca doktorska, U.W.
- KOWALCZYK P., SOTOWSKA-BROCHOCKA J., 2000. *Changes in thyroid hormones in the serum and the thyroid gland of hibernating frogs, Rana temporaria L.* Gen. Comp. Endocrinol. 119, 172–180.
- KÜHN E. R., DELMOTTE N. M. J., DARRAS V. M., 1983. *Persistence of a circadian rhythmicity for thyroid hormones in plasma and thyroid of hibernating male Rana ridibunda*. Gen. Comp. Endocrinol. 50, 383–394.
- KÜHN E. R., DARRAS V. M., VERLINDEN T. M., 1985a. *Annual variations of thyroid reactivity following thyrotropin stimulation and circulating levels of thyroid hormones in the frog Rana ridibunda*. Gen. Comp. Endocrinol. 57, 266–273.
- KÜHN E. R., KIKUYAMA S., YAMAMOTO K., DARRAS V. M., 1985b. *In vivo release of prolactin in Rana ridibunda following an intravenous injection of thyrotropin-releasing hormone*. Gen. Comp. Endocrinol. 60, 86–89.
- LAGERSPETZ K. Y. H., HARRI M. N. E., OKSLAHTI R., 1974. *The role of the thyroid in the temperature acclimation of the oxidative metabolism in the frog Rana temporaria*. Gen. Comp. Endocrinol. 22, 169–176.
- LIPNIACKA A., 1994. *Wstępne badania nad rolą melatoniny u hibernujących żab, Rana temporaria*. Praca magisterska, U.W.
- LISOWSKA E., 1998. *Zmiany poziomu hormonów tarczycy u żaby śmieszki (Rana ridibunda L.) w okresie hibernacji*. Praca magisterska, U.W.
- MERONKA R., 1997. *Zmiany w metabolizmie mięśniowym u żaby trawnej (Rana temporaria L.) podczas hibernacji*. Praca magisterska, U.W.
- MERONKA R., SOTOWSKA-BROCHOCKA J., 1999. *Changes in the blood and pituitary ACTH level during hibernation of Rana temporaria L.* Materials of 8<sup>th</sup> International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PAS, Kraków, 240–241.
- MOSCONI G., YAMAMOTO K., CARNEVALI O., NABISSI M., POLZONETTI-MAGNI A., KIKUYAMA S., 1994. *Seasonal changes in plasma growth hormone and prolactin concentrations of the frog Rana esculenta*. Gen. Comp. Endocrinol. 93, 380–387.
- NORMANTOWICZ U., 1994. *Rola podwzgórzowego peptydu uwalniającego gonadotropiny (GnRH) w regulacji osi przysadka-tarczyca u żab (Rana temporaria) podczas hibernacji*. Praca magisterska U.W.
- RISMILLER P. D., MCKELVEY M. W., 2000. *Spontaneous arousal in reptiles? Body temperature ecology of Rosenberg's goanna, Varanus rosenbergi*. [W:] *Life in the cold*, HELDMAIER G., KLINGENSPOR M. (red.). Eleventh International Hibernation Symposium, Springer, 57–64.
- SCHLAGHECKE R., BLUM V., 1977. *Seasonal variations in liver metabolism of the green frog Rana esculenta (L.)*. Experimentia 34, 456–457.
- SCHLAGHECKE R., BLUM V., 1978. *Seasonal variations in fat body metabolism of the green frog Rana esculenta (L.)*. Experimentia 34, 1019–1020.
- SELLERS J. C., WIT L. C., GANJAM V. K., ETHERIDE A., RAGLAND J. M., 1982. *Seasonal plasma T4 titers in the hibernating lizards Cnemidophorus sexlineatus*. Gen. Comp. Endocrinol. 1982, 46, 24–28.
- SOTOWSKA-BROCHOCKA J., 1976. *Identification of prolactin cells in the pituitary gland of grass snake, Natrix natrix (L.) using immunofluorescence technique*. Bul. Acad. Pol. Sci., Series Sci. Biol. 24, 107–112.
- SOTOWSKA-BROCHOCKA J., 1977. *Seasonal changes of the structure and function of prolactin cells in the pituitary gland of Vipera berus (L.)*. Acta Physiol. Pol. 28, 337–352.
- SOTOWSKA-BROCHOCKA J., JAKLEWICZ S., 1984. *Effects of prolactin and experimental handling on liver, fat body and ovary lipid contents and their daily variations in Rana esculenta (L.)*. Acta Physiol. Pol. 35, 1–13.
- SOTOWSKA-BROCHOCKA J., MARTYŃSKA LICHT P., 1992. *Changes of LH level in the pituitary gland and plasma in hibernating frogs, Rana temporaria*. Gen. Comp. Endocrinol. 87, 286–291.
- STERLING K., LAZARUS J. H., 1977. *The thyroid and its control*. Ann. Rev. Physiol. 39, 349–371.
- TASAKI Y., INOUE M., ISHII S., 1986. *Annual cycle of plasma thyroid hormone levels in the toad, Bufo japonicus*. Gen. Comp. Endocrinol. 62, 404–410.
- TOMASI T. E., STRIBLING A. M., 1996. *Thyroid function in the 13-lined ground squirrel*. [W:] *Adaptations to the cold*, GEISER F., HULBERT S. C., NICOL S. C. (red.). Tenth International Hibernation Symposium, University of New England Press, 263–269.
- UMPLEBY A. M., RUSSELL-JONES D. L., 1996. *The hormonal control of protein metabolism*. Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism 10, 551–570.
- WITEK K., 2000. *Zmiany u immunoreaktywności komórek prolaktynowych przysadki żaby trawnej, Rana temporaria L., podczas hibernacji*. Praca magisterska U.W.
- ZYŚK A., 1987. *Aktywność tarczycy żaby trawnej, Rana temporaria (L.) w cyklu rocznym*. Rocznik naukowo-dydaktyczny WSP w Krakowie, zeszyt 111, prace zoolog., V, 91–103.