

ROBERT MERONKA

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

ZAMARZNAĆ, ABY PRZEŻYĆ STRATEGIA PRZEŻYWANIA ZIMY U NIEKTÓRYCH PŁAZÓW

HIBERNACJA

Najniższa temperatura, w jakiej można zaobserwować aktywne życie zwierząt, to zaledwie kilka stopni poniżej punktu zamarzania wody. W obszarze klimatów umiarkowanych, w okresie zimowym, temperatura powietrza przez długi czas utrzymuje się na znacznie niższym poziomie.

Zwierzęta stałocieplne, dzięki termogenezie, mogą utrzymać temperaturę ciała powyżej temperatury zamarzania płynów ustrojowych. Temperatura ciała płazów nie odbiega znacznie od temperatury otoczenia, dlatego zimą mogą być one narażone na ryzyko zamarznięcia. Większość płazów wybiera na czas zimowania kryjówki, pozwalające uniknąć tego ryzyka. Niektóre z nich zakopują się pod ziemią, wpełzają w szczeliny wokół korzeni drzew lub do opuszczonych nor gryzoni tak, aby znaleźć się poniżej poziomu przemarzania gruntu. Tę strategię wybierają głównie ropuchy. Wiele innych płazów na miejsca zimowania wybiera dno niewielkich zbiorników wodnych: stawów czy wolno płynących strumieni, gdzie woda zazwyczaj nie zamarza (PINDER i współaut. 1992).

Zimowanie w takich miejscach pozwala uniknąć zamarznięcia, ale często oznacza, że zwierzęta zostają uwięzione pod pokrywą lodu (lub zamarzniętego gruntu) na kilka miesięcy. W przypadku zbiorników wodnych pokrywa lodu uniemożliwia fizyczne natlenianie wody, a gdy lód zostaje pokryty warstwą śniegu blokującą dostęp światła, ustaje również fotosynteza u roślin wodnych. W tych warunkach płazy narażone są na znaczne niedotlenienie (PINDER i współaut. 1992).

Aby przetrwać wielomiesięczne (w rejonach północnych do 9 miesięcy) uwięzienie, w miejscach hibernacji, żaby już od połowy lata gromadzą rezerwy pokarmowe, głównie w postaci glikogenu (wątroba) i lipidów (ciała tłuszczowe), które zużywają stopniowo podczas zimowania (BOUTILIER i współaut. 1997).

Płazy zimujące pod wodą wymianę gazową prowadzą tylko przez skórę. W warunkach braku tlenu energia wytwarzana jest na drodze przemian beztlenowych. Powstające w tych procesach duże ilości mleczanów prowadzą do znacznego spadku pH. Dzięki dużej tolerancji na zakwaszenie i obciążenie mleczanami zwierzęta te mogą przeżyć nawet dość długi okres niedoboru lub nawet braku tlenu (BOUTILIER i współaut. 1997). Czynnikiem ułatwiającym przetrwanie okresu niedotlenienia jest niska temperatura. Zaobserwowano, że w warunkach doświadczalnych żaby niedotlenione wybierają niższą temperaturę otoczenia, w porównaniu do zwierząt mających swobodny dostęp do tlenu (TATTERSALL i BOUTILIER 1997).

Istnieją jednak gatunki płazów bezogonowych, które zimę spędzają na powierzchni gruntu, pod pokrywą liści i śniegu. Najdokładniej zbadanym spośród nich gatunkiem jest *Rana sylvatica*. Spędzając zimę w takim miejscu, żaby te często wystawione są na działanie temperatur poniżej 0°C, podczas gdy temperatura zamarzania ich płynów ustrojowych wynosi około -0,5°C (LEE i COSTANZO 1993) (patrz Appendix 1).

Powstające w organizmnie kryształki lodu mogą spowodować wiele rozmaitych uszko-

dzeń, np.: zniszczenie struktur wewnętrznych komórkowych, zmiążdżenie lub rozerwanie komórek, przebicie ścian naczyń włosowatych oraz odwodnienie komórek. Podczas zamarzania wody, substancje, które były w niej rozpuszczone nie są wbudowywane w kryształy lodu, tylko pozostają w nie zamarzniętej części wody. W związku z tym ich stężenie rośnie, co prowadzi do stresu osmotycznego komórek oraz gwał-

townego przepływu wody przez błony komórkowe, prowadząc często do ich uszkodzenia (LAYNE i LEE 1995, STOREY i STOREY 1999). Aby uniknąć zniszczeń spowodowanych zamarzaniem, powstawanie lodu u *Rana sylvatica* jest kontrolowane. Powstaje on przede wszystkim w przestrzeniach zewnątrzkomórkowych i śródtkankowo, tam gdzie ryzyko uszkodzeń jest najmniejsze (LEE i COSTANZO 1998).

UNIKNAĆ ZAMARZNIĘCIA

Jednym ze sposobów uniknięcia zamarznięcia jest stan przechłodzenia, czyli stan, w którym ciecz nie krystalizuje pomimo tego, że jej temperatura jest niższa od temperatury krzepnięcia. Jednak ciecz przechłodzona jest w stanie termodynamicznie nietrwałym. Gdy przechłodzona woda zaczyna zamarzać, kryształy lodu powstają bardzo gwałtownie w całej jej objętości. Im niższa jest temperatura, tym większe jest prawdopodobieństwo gwałtownego zamarznięcia. Eksperymentalnie stwierdzono, że w warunkach laboratoryjnych płazy mogą zostać przechłodzone nawet do temperatury -8°C -12°C ; ryzyko gwałtownego zamarznięcia w takich warunkach jest duże (Costanzo i LEE 1995). W warunkach naturalnych kryształy lodu u tego zwierzęcia zaczynają powstawać zazwyczaj w temperaturze $-1,5^{\circ}\text{C}$ -3°C (COSTANZO i współaut. 1995).

Wiele zwierząt, zwłaszcza niektóre owady, bronią się przed zamarznięciem produkując specjalne białka (ang. anti-freeze proteins, AFP), które zapobiegają wzrostowi kryształów lodu i dzięki temu ich płyny ustrojowe nie zamarzają. Jest to aktywne unikanie zamarznięcia. U *R. sylvatica* nie stwierdzono obecności AFP, stąd wniosek, że zwierzę to nie wykorzystuje tej strategii unikania szkodliwego działania niskich temperatur (WOLANCZYK i współaut. 1990).

Znane są również inne białka, które są ośrodkami krystalizacji wody (ang. ice nucleating proteins, INP) i dzięki ich obecności, wiele owadów kontroluje miejsce i szybkość powstawania lodu w swoich organizmach. INP znaleziono także w osoczu zamarzających *R. sylvatica*. Po dokładnym określeniu ich właściwości fizykochemicznych stwierdzono jednak, że aktywność ośrodków krystalizacji, w roztworze przechłodzonym, wykazują dopiero w temperaturze około -7°C (WOLANCZYK i współaut. 1990). Jest to temperatura znacznie niższa od tej, w której u tych żab zaobserwowano rozpoczęcie powstawania lodu. Dlatego sądzi się, że nie mogą być one odpowiedzialne za kontrolę zama-

rzania u tego gatunku, ale jak dotąd nie udało się wyjaśnić ich funkcji. Wykorzystanie INP do kontroli zamarzania wymagałoby utrzymania stanu przechłodzenia do temperatury -7°C . W takich warunkach u zwierząt o wilgotnej skórze, ryzyko gwałtownego niekontrolowanego zamarzania było by zbyt duże. Dlatego kontrola zamarzania powinna rozpoczynać się w wyższych temperaturach.

Poszukując czynnika, który pozwala w sposób kontrolowany rozpocząć zamarzanie *R. sylvatica* zwrócono uwagę na obecne w ich jelicie bakterie symbiotyczne *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* i *Enterobacter agglomerans*. Po ich przebadaniu stwierdzono, że w temperaturze $-1,6^{\circ}\text{C}$ $-3,0^{\circ}\text{C}$ wykazują aktywność ośrodków krystalizacji w roztworze przechłodzonym. Przypuszcza się, że właśnie one mogą być odpowiedzialne za rozpoczęcie kontrolowanego powstawania lodu (LEE i współaut. 1995). Drugim z czynników uruchamiających ten proces mogą być kryształy lodu w środowisku. Skóra płazów jest bardzo cienka i wilgotna, nie stanowi więc bariery dla lodu. Kontakt kryształu lodu ze skórą powoduje rozpoczęcie krystalizacji wody w skórze w ciągu kilku minut (LAYNE i współaut. 1990).

Fakt istnienia czynników indukujących zamarzanie wyjaśnia tylko jak rozpoczyna się proces zamarzania, nie wystarcza jednak do wyjaśnienia mechanizmu kontroli zamarzania. Indukcja zamarzania ma miejsce w skórze i jelicie. Kontrolowane zamarzanie odbywa się natomiast w całym organizmie, a więc musi istnieć mechanizm chroniący wszystkie komórki. Okazało się, że substancją chroniącą komórki przed zamarznięciem u *R. sylvatica* jest glukoza (COSTANZO i współaut. 1993). Dzięki dużym stężeniom glukozy wewnątrz komórek, lód powstaje pozakomórkowo. Glukoza jako substancja osmotycznie czynna, chroni komórki przed odwodnieniem podczas pozakomórkowego powstawania lodu, a ponadto stanowi doskonałe źródło energii do podtrzymania w nich przemian metabolicznych.

Zimą płazy mają znaczne rezerwy glikogenu wątrobowego (~180 mg/g tkanki). W ciągu kilku minut od pojawienia się kryształów lodu w skórze obserwowany jest gwałtowny wzrost stężenia glukozy we krwi. W tym samym czasie widoczny jest wzrost aktywności fosforylasy α – kluczowego enzymu w szlaku degradacji glikogenu (COSTANZO i współaut. 1995). Normalny poziom glukozy we krwi *R. sylvatica* wynosi od 1 do 5 mmol/l, podczas zamarzania we krwi i narządach osiąga poziom 200–300 mmol/l, a maksymalny jej poziom to 550 mmol/l. Szybkość powstawania glukozy z glikogenu osiąga 20 μmol/g tkanki/h (COSTANZO i współaut. 1995). Uwolniona do krwi glukoza transportowana jest do tkanek, gdzie pobierana jest w dużych ilościach przez komórki, których błony w tym czasie wykazują znaczną przepuszczalność dla tego węglowodanu.

W trakcie zimowania stężenie glukozy we krwi oraz aktywność fosforylasy glikogenu, pozostają na niskim poziomie. Aktywacja procesów prowadzących do wzrostu poziomu tego cukru ma miejsce dopiero po pojawieniu się pierwszych kryształów lodu na obwodzie (COSTANZO i współaut. 1995). Uwalnianie jej w wątrobie z glikogenu pobudzane jest przez adrenalinę działającą poprzez receptory β-adrenergiczne. W wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału uczestniczy cAMP i kinaza białkowa A (PKA). Zaktywowana PKA fosforyluje i aktywuje kinazę fosforylasy glikogenowej, która z kolei aktywuje fosforylazę glikogenową. Jest to klasyczny szlak mobilizacji rezerw glikogenowych (STOREY 2000).

Poziom glukozy we krwi ssaków jest bardzo precyzyjnie regulowany przez dwa hormony: insulinę i glukagon. W odpowiedzi na wzrost poziomu glukozy następuje sekrecja insuliny, która powoduje obniżenie poziomu tego cukru, między innymi hamując aktywność fosforylasy glikogenowej. U człowieka rzadko zdarza się, aby poziom glukozy we krwi przekraczał 10 mmol/l, u płazów jednak podczas zamarzania stężenie tego cukru we krwi może przekraczać

tę wartość nawet kilkudziesięciokrotnie. Dlatego zastanawiające jest, dlaczego pomimo obecności układu glukagon/insulina nie obserwuje się podczas zamarzania aktywności tego drugiego hormonu.

Pierwszą nasuwającą się odpowiedzią byłoby fizyczne zablokowanie sekrecji insuliny przez tworzący się lód. Wydaje się to jednak mało prawdopodobne, ponieważ trzustka jest narządem, który zamarza jako jeden z ostatnich. Przypuszczano również, że ten sam sygnał, który pobudza produkcję glukozy może hamować wydzielanie insuliny, albo jej działanie na komórki wątroby (STOREY 2000).

Obecnie wydaje się jednak, że sekwencja aminokwasowa insuliny płazów, przynajmniej częściowo wyjaśnia obserwowane zjawisko. Insulina *R. sylvatica* w porównaniu z sekwencją tego hormonu u człowieka na N-końcu łańcucha A ma dwa dodatkowe aminokwasy (lizyna i prolina). Na ogół sekwencje aminokwasowe łańcuchów A i B insuliny są bardzo silnie konserwowane ewolucyjnie. W pozycji A21 gdzie u człowieka występuje asparagina, u płazów w pozycji analogicznej (A23) występuje seryna; u niemalże wszystkich kręgowców w pozycji B13 obecny jest kwas glutaminowy, podczas gdy u płazów kwas asparaginowy i jest to jedyna znana taka substytucja w tym miejscu. Aminokwas w pozycji A21 bierze udział w tworzeniu aktywnej biologicznie konformacji, a aminokwas w pozycji B13 jest zaangażowany w łączenie się insuliny z receptorem. Wymienione modyfikacje są charakterystyczne dla wszystkich płazów bezogonowych i tylko u nich obecne (STOREY 2000).

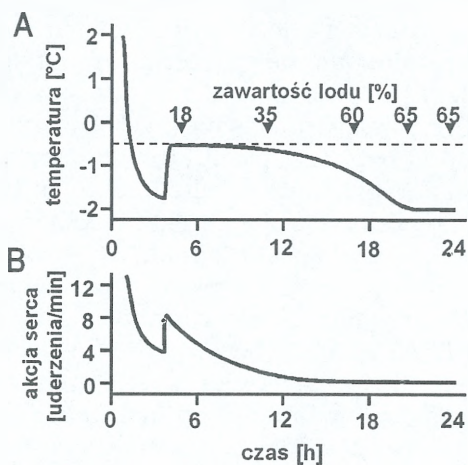
Sądzi się, że taka budowa insuliny w normalnych warunkach powoduje nieznaczne różnice w jej aktywności i powinowactwie do receptora. W ekstremalnych jednak warunkach, jakimi są dla tych zwierząt temperatury bliskie zamarzania, różnice te mogą się okazać na tyle istotne, że pozwalają utrzymać obserwowane niezwykle wysokie stężenia glukozy.

ZAMARZANIE

Gdy temperatura otoczenia spada, temperatura ciała *Rana sylvatica* ulega obniżeniu, następuje przechłodzenie płynów ustrojowych zwierzęcia. W temperaturze około -2°C następuje indukcja powstawania kryształów lodu. W tym momencie temperatura ciała zwierzęcia wzrasta, związane jest to z wydzielaniem tzw. ciepła krystalizacji (jest to typowy efekt zamarzania cieczy przechłodzonych) (Ryc. 1). W kilka

minut po pojawieniu się pierwszych kryształów lodu wzrasta aktywność fosforylasy glikogenowej w wątrobie i następuje gwałtowny wzrost stężenia glukozy we krwi (COSTANZO i LEE 1995). Wzrasta też akcja serca i przyspieszeniu ulega krążenie. U zwierzęcia będącego w stanie przechłodzenia, w temperaturze około -1,5°C -2°C, akcja serca utrzymuje się na poziomie około 4 uderzeń na minutę. Gdy jednak zaczynają się

tworzyć pierwsze kryształy lodu zwiększa się ona około dwukrotnie, dochodząc do 8 uderzeń na minutę (LAYNE i współaut. 1989) (Ryc. 1). Dzięki temu glukoza masowo uwalniana z wątroby do krwi jest rozprowadzana po całym organizmie.



Ryc. 1. Zmiany temperatury ciała, zawartości lodu i akcji serca podczas kontrolowanego zamrażania *Rana sylvatica*.

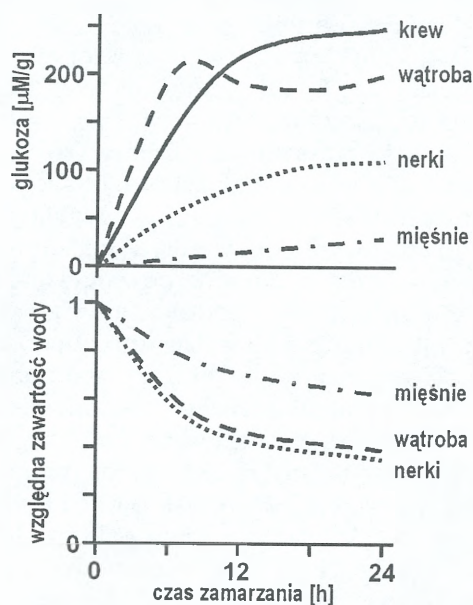
Rozmieszczenie glukozy w organizmie zamrażającego zwierzęcia nie jest równomierne. Największe stężenie tego węglowodanu jest oczywiście we krwi (≈ 250 mmol/l) i w wątrobie (≈ 200 mol/g). Poza tym znaczne stężenie osiąga ona w sercu (≈ 150 mol/g) i nerkach (≈ 100 mol/g), a niskie w mięśniach (≈ 30 mol/g) (PINDER i współaut. 1992) (Ryc. 2). Różnice w rozmieszczeniu glukozy, która jest dla komórek krioprotektantem, pociągają za sobą różne rozmieszczenie lodu (Ryc. 2). Tkanki istotne dla prawidłowego późniejszego funkcjonowania organizmu są chronione przez glukozę, tkanki bardziej odporne na uszkodzenia (np. mięśnie) zawierają mniej glukozy i w nich właśnie powstają w znacznych ilościach kryształy lodu.

Lód powstający pozakomórkowo, podobnie jak glukoza, nie jest rozmieszczony równomiernie w całym organizmie. Woda w ciele zamrażającego płaza jest transportowana przez krew do przestrzeni, w których pojawienie się dużych ilości lodu nie będzie szkodliwe. Najwięcej lodu powstaje w obszernych workach limfatycznych, znajdujących się bezpośrednio pod skórą zwierzęcia, lód tworzy się również w jamie ciała i w mięśniach (LEE i COSTANZO 1998).

Pojawiający się lód powoduje wzrost stężenia substancji rozpuszczonych w przestrzeni pozakomórkowej, powoduje to „wyciąganie” wody z komórek i stopniowe odwadnianie tkanek (COSTANZO i współaut. 1995). Z jednej strony jest to korzystne, ponieważ mniejsza zawartość

wody w komórkach wiąże się z mniejszym prawdopodobieństwem powstania wewnątrzkomórkowego lodu. Z drugiej strony, powstaje ryzyko nadmiernego odwodnienia komórek i powstania szoku osmotycznego. Temu właśnie zapobiega glukoza w dużych ilościach gromadzona przez komórki.

Wraz z upływem czasu temperatura ciała płaza spada. Pomimo powstających kryształów lodu utrzymuje się akcja serca i krew krąży rozprowadzając powstającą w wątrobie glukozę. Powoli zwiększa się stężenie glukozy w tkankach. Następuje dalsze odwodnienie komórek (COSTANZO i współaut. 1995).



Ryc. 2. Różnice zawartości glukozy i odwodnienia narządów podczas kontrolowanego zamrażania *Rana sylvatica*.

Po około 22–24 godzinach zamrażania ustala się równowaga pomiędzy wodą w postaci lodu a niezamrażniętą wodą zawierającą różne substancje rozpuszczone; lód stanowi wówczas w organizmie około 65% (COSTANZO i współaut. 1995). Zawartość glukozy jest około 200-krotnie zwiększona, a komórki są odwodnione o około 20–60% (COSTANZO i współaut. 1995). Serce nie kurczy się, brak jest krążenia — naczynia są wypełnione lodem (COSTANZO i współaut. 1995). Tkanka nerwowa nie wykazuje aktywności elektrycznej (COSTANZO i współaut. 1995). Skóra zwierzęcia pokryta jest lodem, oczy są zmętniałe z powodu lodu powstałego w ciele szklistym. W takim stanie *Rana sylvatica* jest w stanie przetrwać od 2 do 4 tygodni w temperaturze obniżonej do -8°C (COSTANZO i współaut. 1995).

W naturalnych warunkach proces zamrażania trwa stosunkowo długo. Dlatego badacze

Tabela 1 Wpływ szybkości zamarzania na przeżywalność i czas regeneracji *Rana sylvatica*.

	szybkość chłodzenia (°C/h)	czas zamarzania	1. żywych/ 1. testowanych	czas regeneracji
mała	-0,16±0,01	24,9±0,1	4/4	12
umiarkowanie mała	-0,18±0,02	19,0±0,1	5/5	12
średnia	-0,30±0,02	13,0±0,1	4/5	24
umiarkowanie szybka	-1,03±0,06	6,2±0,2	3/5	43
szybka	-1,17±0,24	4,1±0,3	0/5	-

zaczęli zastanawiać się jak tempo zamarzania wpływa na efektywność tego zjawiska. Wyniki przedstawione w Tabeli 1 wskazują jednoznacznie, że szybkie zamarzanie jest zdecydowanie niekorzystne (COSTANZO i współaut. 1991). Gdy proces ten przebiega szybko brak jest czasu na mobilizację rezerw glukozy, jej dystrybucję oraz

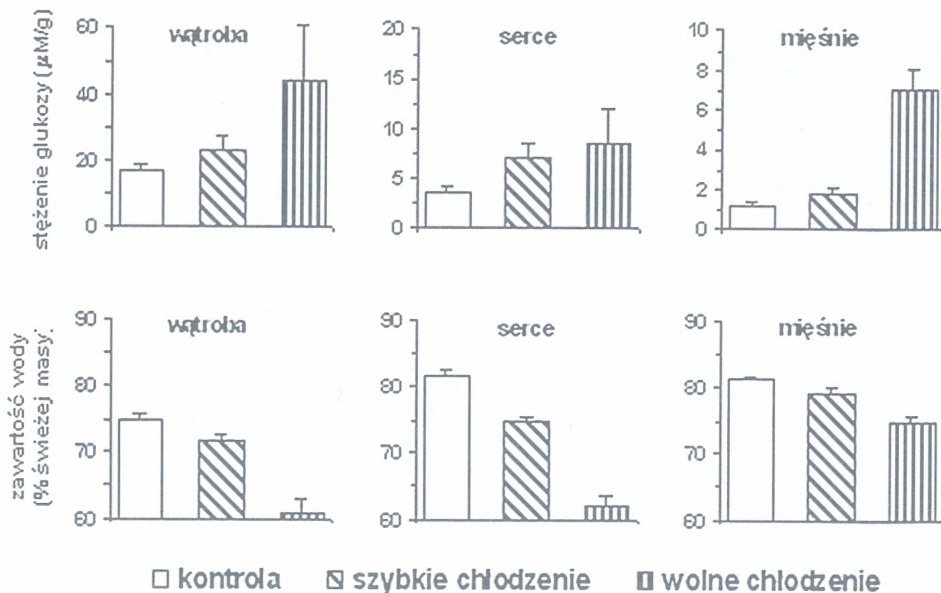
kontrolowane odwodnienie tkanek (Ryc. 3). W wyniku tego lód powstaje często wewnątrzkomórkowo prowadząc do znacznych uszkodzeń tkanek. Jest to wyraźnie widoczne w obrazie krwi. U zwierząt zamrażanych w szybkim tempie, znaczna część erytrocytów ulega uszkodzeniu i obserwuje się silną hemolizę.

ROZMARZANIE

Gdy temperatura otoczenia, a więc i ciała zwierzęcia, zacznie wzrastać, pierwszym widocznym przejawem powrotu do życia jest pojawienie się skurczów serca (COSTANZO i współaut. 1995). Krew w tym momencie nie może

wane jest pojawianie się odruchów utrzymujących podstawę (COSTANZO i współaut. 1995).

Podczas rozmarzania woda przemieszcza się z powrotem do narządów i komórek. Glukoza transportowana jest na powrót do wątroby,



Ryc. 3. Różnice zawartości glukozy i odwodnienia w tkankach *Rana sylvatica* poddanych szybkiemu i wolnemu zamarzaniu.

jeszcze krążyć z powodu dużych ilości lodu w naczyniach. Kolejnymi etapami rozmarzania są następujące w krótkim czasie po sobie: powrót krążenia w naczyniach, rozpoczęcie oddychania płucnego, pojawienie się pobudliwości nerwów i po około 12 godzinach jako ostatnie obserwo-

gdzie przekształcana jest w glikogen. Rozpoczyna się naprawa powstałych uszkodzeń. W czasie, gdy brak było krążenia, metabolizm komórkowy utrzymywał się na niskim poziomie, ale podczas rozmarzania powstałe produkty przemian metabolicznych muszą zostać usunięte.

W zimowaniu zwierzę może kilkakrotnie zostać wystawione na działanie temperatury poniżej punktu zamarzania i poddane cyklowi zamarzanie-rozmarzanie. Powstaje pytanie: jak wiele takich cykli może ono przetrwać? Okazuje się, że czynnikiem limitującym jest tu wielkość rezerw glikogenu. Podczas rozmarzania, co prawda glukoza powraca do wątroby, gdzie jest magazynowana w postaci glikogenu. Jednak część glukozy zużywana jest do podtrzymania metabolizmu komórkowego w czasie, gdy zwie-

rzę jest zamarznięte; część zostaje zużyta podczas rozmarzania jako substrat do produkcji energii niezbędnej do naprawy uszkodzeń powstałych podczas zamarzania; część wreszcie zostaje po prostu wydalona wraz z moczem. Płazy nie dysponują bowiem mechanizmem pozwalającym na efektywne zatrzymanie tak ogromnych ilości glukozy krążącej we krwi dlatego „wycieka” ona przez nerki. Po jednym cyklu zamarzanie-rozmarzanie żaba ta traci około $1/4$ rezerw glikogenu (LEE i COSTANZO 1993).

POCHODZENIE I KORZYŚCI Z KONTROLI ZAMARZANIA

Aby zrozumieć skąd wzięła się zdolność do kontrolowanego zamarzania i tolerancja powstawania lodu w tkankach u płazów, należy zastanowić się jakie mechanizmy pozwoliły im na to. Są to: gromadzenie znacznych zapasów glikogenu na okres zimowania, tolerancja na ogromne obciążenie glukozą, tolerancja na znaczne odwodnienie tkanek i komórek, tolerancja braku tlenu i zdolność prowadzenia przez dłuższy czas metabolizmu beztlenowego, oraz tolerancja na zakwaszenie organizmu.

Niezwykle interesujące jest to, że takie zdolności i przystosowania wykazują właściwie wszystkie płazy bezogonowe strefy klimatów umiarkowanych. Wydaje się, że podstawową adaptacją właściwą *Rana sylvatica* było wykształcenie odpowiedzi na powstający lód na obwodzie organizmu w postaci wzmożonej degradacji glikogenu i doprowadzenia glukozy do tkanek. Mechanizm tej odpowiedzi przypomina klasyczną reakcję stresową w odpowiedzi na czynnik uszkadzający (LAYNE i LEE 1995). Dlatego uzyskanie tolerancji na powstawanie lodu w tkankach nie wiązało się z wykształceniem zupełnie nowych zdolności, a raczej objęło adaptację już istniejących mechanizmów obronnych organizmu, wykorzystanie ich w nowy sposób, w nowej sytuacji.

Umiejętność przetrwania w stanie przechłodzenia, w pewnym zakresie temperatur poniżej temperatury zamarzania płynów ustrojowych, pozwala tym zwierzętom przetrwać krótkie

okresy obniżonej temperatury. Nie angażują one w tym momencie kosztownych mechanizmów prowadzących do kontrolowanego zamarznięcia. Jednak gdy temperatura ulega dalszemu obniżeniu, ryzyko dalszego trwania w przechłodzeniu jest zbyt duże. W tym momencie zmienia się strategia przetrwania. Następuje indukcja krystalizacji wody i jest ona sygnałem do rozpoczęcia procesów kontrolujących przebieg zamarzania.

Dzięki zdolności do kontrolowanego zamarzania te północne żaby uzyskały możliwość zimowania na powierzchni ziemi. W warunkach klimatycznych Kanady którą zamieszkują, posiadane adaptacje pozwalają im do przeżyć zimę. Wiosną mogą być aktywne na długo przedtem zanim rozmarznie pokrywa lodowa zbiorników wodnych oraz wierzchnia warstwa gruntu i zostaną „uwolnione z okowów” inne gatunki płazów, które wybrały takie właśnie miejsca zimowania. Dzięki wcześniejszemu opuszczeniu miejsc zimowania gatunek ten mógł zasiedlić tereny, na których sezon ciepły jest stosunkowo krótki. Mają więc wystarczająco dużo czasu na rozród, a ich kijanki na rozwój i mogą zgromadzić zapasy energetyczne konieczne do przetrwania następnego sezonu zimowego. Pomimo dużego ryzyka związanego z, kontrolowanym co prawda, zamarzaniem, korzyści z opanowania nowych środowisk i terytoriów wydają się być znaczące.

FREEZE TO SURVIVE. OVERWINTERING STRATEGIES OF SOME AMPHIBIAN SPECIES

Summary

During the winter a large number of frog species escape from frost by hiding themselves below the frost line or under water. Some Canadian species, for example, wood frog (*Rana sylvatica*) are overwintering beneath a leaf and snow cover. This species does not avoid freezing: the frogs use the strategy of winter survival called “freeze tolerance”. A large portion of their body water can be converted into ice without damaging effects of the ice on cells and tissues. This is possible due to cryopreservation and controlled ice for-

mation. Although these frogs can live in supercooled state over a range of temperatures below the freezing point the risk of their death because of rapid freezing is high. The mechanism of ice nucleation, which starts at about -2.5°C , enables frogs to survive under these very difficult conditions in spite of their giving no vital signs. It is highly concentrated glucose which plays the cryoprotective role under conditions of supercooling, protecting cells from freezing and leading to the ice nucleation in extracellular space. This

strategy allowed this species to occupy far north habitats and early termination of wintering. It is possible that frost tolerance evolved as a natural response to various environ-

mental threats, which is typical of a wide range of amphibian species.

APPENDIX 1

PLĄZY TOLERUJĄCE POWSTAWANIE LODU W TKANKACH

Dotychczas poznano pięć gatunków płazów bezogonowych, które są w stanie przeżyć zamarznięcie. Wszystkie występują na terenie Ameryki Północnej. Dlatego poza łacińskimi nazwami gatunkowymi podano tylko angielskie, gdyż nie ma oficjalnych nazw polskich tych gatunków.

RANA SYLVATICA — ANG. WOOD FROG (RYC. 1)

Jest to zwierzę średniej wielkości — 3,5 do 7 cm długości. Zazwyczaj ubarwiona jest brązowo, ale często są spotykane różne odcienie od oliwkowo zielonego do niemal czarnego. Często obserwowane są zmiany ubarwienia u tego samego osobnika. Charakterystyczną cechą jest czarna „maska” ciągnąca się od czubka pyska do jamy bębenkowej. Czasami widoczna jest jasna prega ciągnąca się wzdłuż całego grzbietu.

Jest to najlepiej zbadany z gatunków płazów bezogonowych, znanych z tolerancji na powstawanie lodu w tkankach.

PSEUDACIRIS TRISERIATA — ANG. CHORUS FROG (RYC. 2)

Jeden z mniejszych gatunków, o maksymalnej długości ciała około 4 cm, charakteryzuje się bardzo donośnym głosem. Istnieje kilka podgatunków: zachodni (*P. t. triseriata*), północny (*P. t. maculata*), wyżynny (*P. t. feriarum*) i New Jersey (*P. t. kalamii*).

Podgatunek północny charakteryzuje się wyraźnie krótszą kością udową niż u pozostałych podgatunków.

Ubarwienie jest bardzo zmienne, waha się od bledo szarego do brązowego. Bywają też osobniki czerwone lub jaskrawo zielone. Na grzbiecie są często widoczne trzy ciemne pasy.

Jest jednym z najwcześniej pojawiających się wiosną gatunków. Żaby te zazwyczaj opuszczają miejsca zimowania jeszcze zanim całkowicie roztopi się śnieg. Często można spotkać na śniegu wytopiony zarys o kształcie tej żaby, w miejscu gdzie spędziła pewien czas.

PSEUDACIRIS CRUCIFER — ANG. SPRING PEEPER (RYC. 3)

Niewielkie zwierzę, osiągające maksymalnie długość niewiele ponad 2,5 cm. Charakterystyczną cechą jest układ plam na grzbiecie przypominający znak „X”. Ubarwienie jest najczęściej kombinacją brązu i szarego lub zieleni.

Istnieją dwa podgatunki; północny (*P. c. crucifer*) i południowy (*P. c. bartramiana*).

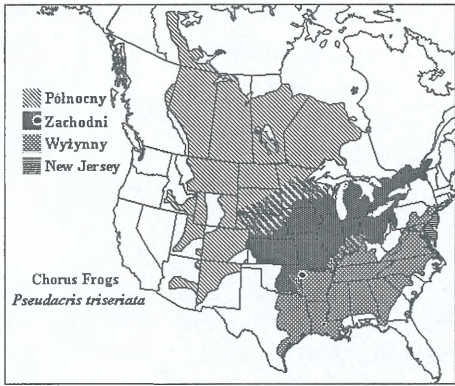
HYLA VERSICOLOR I *HYLA CHRYSOSCELIS* — ANG. GRAY TREEFROG I COPE'S GRAY TREEFROG (RYC. 4).

Niegdyś sądzono, że jest to jeden gatunek. Zewnętrznie nie różnią się między sobą. Można je rozróżnić jedynie po wydawanych odgłosach oraz badając liczbę chromosomów. *Hyla versicolor* jest tetraploidem, a *Hyla chrysoscelis* diploidem.

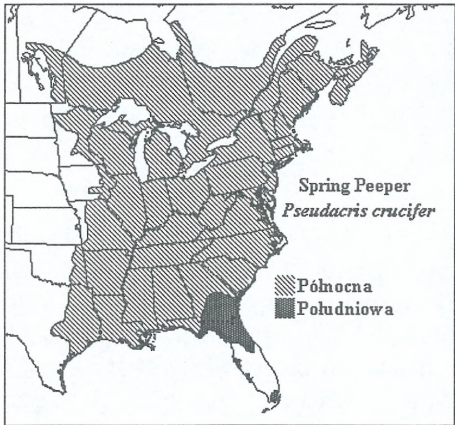
Są to zwierzęta średniej długości — około 5 cm, o ubarwieniu szarym lub brązowym. Ich kolor zazwyczaj zależy od koloru otoczenia w



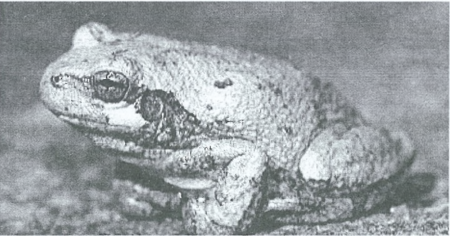
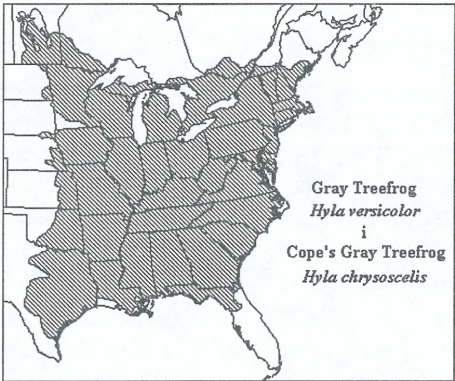
Rys. 1 *Rana sylvatica*



Rys. 2 *Pseudaciris triseriata*



Rys. 3. *Pseudaciris crucifer*



Rys. 4. *Hyla varsicolor* i *Hyla chrysoscelis*

którym się znajdują, ale najczęściej widziane są dwie wymienione barwy. Charakterystyczną cechą są zakończenia palców w kształcie dysków pozwalające im przylegać do gładkiej kory drzew.

Hyla versicolor jest jedynym gatunkiem wykorzystującym poza glukozą glicerol w celu krioprotekcji.

LITERATURA

BOUTILIER R. G., DONOHOE P. H., TATTERSALL G. J., WEST T. G., 1997. Hypometabolic homeostasis in overwintering aquatic amphibians. J. Exp. Biol. 200, 387-400.

COSTANZO J. P., LEE R. E., 1995. Supercooling and ice nucleation in vertebrate ectotherms. [W:] Biological ice nucleation and its applications. LEE Jr. R. E., WARREN, G. J., GUSTA L. V. (red.). APS Press, St. Paul, Minnesota, 221-237.

COSTANZO J. P., LEE R. E., DeVRIES A. L., WANG T., LAYNE J. R., 1995. Survival mechanisms of vertebrate ectotherms

- at subfreezing temperatures: applications in cryomedicine. *FASEB J.* 9, 351–358.
- COSTANZO J. P., LEE R. E., LORTZ P. H., 1993. Glucose concentration regulates freeze tolerance in the wood frog *Rana sylvatica*. *J. Exp. Biol.* 181, 245–255.
- COSTANZO J. P., LEE R. E., WRIGHT M. F., 1991. Effect of cooling rate on survival of frozen frogs, *Rana sylvatica*. *J. Comp. Physiol. [B]* 161, 225–229.
- LAYNE J. R., LEE R. E., 1995. Adaptations of frogs to survive freezing. *Clim. Res.* 5, 53–59.
- LAYNE J. R., LEE R. E., HEIL T. L., 1989. Freezing-induced changes in the heart rate of wood frogs (*Rana sylvatica*). *Am. J. Physiol.* 257, R1046–R1049.
- LAYNE J. R., LEE R. E., HUANG J. L., 1990. Inoculation triggers freezing at high subzero temperatures in freeze-tolerant frog (*Rana sylvatica*) and insect (*Eurosta solidaginis*). *Can. J. Zool.* 68, 506–510.
- LEE M. R., LEE R. E., STRONG-GUNDERSON J. M., MINGES S. R., 1995. Isolation of ice-nucleating active bacteria from the freeze-tolerant frog, *Rana sylvatica*. *Cryobiology*. 32, 358–365.
- LEE R. E., COSTANZO J. P., 1993. Integrated physiological responses promoting anuran freeze tolerance. [W:] *Life in the cold*. CAREY C., FLORANT G. L., WUNDER B. A., HORWITZ B. (red.). Westview Press, Oxford, 501–510.
- LEE R. E., COSTANZO J. P., 1998. Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals. *Ann. Rev. Physiol.* 60, 55–72.
- PINDER A. W., STOREY K. B., ULSTCH G. R., 1992. Estivation and hibernation. [W:] *Environmental physiology of the amphibians*. FEDER M. E., BURGGREN W. W. (red.) University of Chicago Press, Chicago, 250–274.
- STOREY J. M., STOREY K. B., 1999. Frozen alive: animal secrets of freezing survival and their implications for cryomedicine. *Pharmaceutical News* 6, 9–14.
- STOREY, K.B., 2000. Vertebrate freeze tolerance: molecular studies of signal transduction and gene expression. [W:] *Life in the Cold*. G. HELDMAIER, M. KLINGENSPOR (red.). Springer-Verlag, Heidelberg, 527–539.
- TATTERSAL G. J., BOUTILIER R. G., 1997. Balancing hypoxia and hypothermia in cold-submerged frogs. *J. Exp. Biol.* 200, 1031–1038.
- WOLANCZYK J. P., STOREY K. B., BAUST J. G., 1990. Ice nucleating activity in the blood of the freeze-tolerant frog, *Rana sylvatica*. *Cryobiology*. 27, 328–335.