

УДК 597.833:574.23

ЧЕСНОЧНИЦА ПАЛЛАСА (*PELOBATES VESPERTINUS* (PALLAS 1771), AMPHIBIA, PELOBATIDAE) – ВТОРОЙ ВИД АМФИБИЙ, ПЕРЕНОСЯЩИЙ ЭКСТРЕМАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ

© 2023 г. Д. И. Берман^{a, *}, Н. А. Булахова^{a, **}, Е. Н. Мещерякова^{a, b, ***},
А. В. Рогуленко^{c, ***}, К. И. Шишкина^{a, ***}

^aИнститут биологических проблем Севера ДВО РАН, Магадан, 685000 Россия

^bИнститут цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

^cНациональный парк “Узра”, Калуга, 248003 Россия

*e-mail: dber@yandex.ru

**e-mail: sigma44@mail.ru

***e-mail: kameshky@mail.ru

Поступила в редакцию 06.04.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Чесночница Палласа — евразийская амфибия, которая зимует около полугода в грунтах на глубинах до 200 см, всегда ниже уровня промерзания, поскольку не переносит отрицательных температур. Вместе с тем значительная глубина погружения в грунты может предопределять дефицит кислорода. В лабораторных экспериментах выявлены минимальное достаточное для длительного существования *Pelobates vespertinus* и летальное содержание кислорода в воздухе, оценены метаболические пути в условиях нормоксии и гипоксии. Параллельно, в типичном зимовочном биотопе вида (долина р. Оки) определены сезонная динамика температур и концентрации кислорода в супесчаных грунтах на разных глубинах. Установлено, что животные выдерживают десятикратное по сравнению с атмосферным воздухом уменьшение содержания кислорода в грунтах более двух месяцев, пребывая в активном состоянии. При сокращении концентрации в 20 раз (до 1%) наступает состояние комы, которое обратимо, если продолжается не более суток. Это свидетельствует о высокой степени устойчивости вида к стрессу, возникающему в результате реоксигенации и пребывания в среде с переменным уровнем кислорода. Таким образом, *P. vespertinus* — второй по устойчивости к дефициту кислорода в среде вид амфибий после сибирской лягушки (*Rana amurensis*), которая способна длительно (несколько месяцев) переносить полное его отсутствие. Чесночница имеет небольшие (относительно массы тела) размеры запасующих органов (абдоминальных жировых тел и печени) и малое содержание в тканях резервных веществ (липидов и гликогена), которые в условиях нормоксии при 3°C расходуются с низкой скоростью. При гипоксии использование липидов приостанавливается, а потребление гликогена увеличивается, что свидетельствует о переходе от аэробного к преимущественно анаэробному обмену. Совокупный эффект снижения метаболизма из-за низкой температуры (3°C) и активации гликолиза из-за недостатка кислорода обеспечивает высокий уровень устойчивости к гипоксии, выделяющий чесночницу Палласа среди других изученных роющих видов амфибий. Установлено, что по содержанию кислорода грунтовый воздух типичных мест на глубинах зимовки (в песчаных массивах) не отличается от атмосферного. Предполагается, что повсеместный выбор видом для зимовки участков с рыхлыми грунтами связан не с превосходной аэрацией субстратов, а с легкостью рытья. Полученный результат открывает возможность использования изученной чесночницы (возможно, и других видов рода, а также лопатоногов и роющих жаб) в качестве модельных животных для исследования адаптаций к дефициту кислорода в воздухе.

Ключевые слова: роющие амфибии, гипоксия, условия зимовки, резервные вещества

DOI: 10.31857/S0044513423090040, **EDN:** RXNUQG

Адаптации животных к гипоксии — способность переносить недостаток кислорода в среде — привлекают внимание физиологов как путь поиска моделей для разработки методов лечения соответствующих заболеваний человека (Semenza et al.,

1991; Wang et al., 1995; Maxwell et al., 1999; Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Andreyeva et al., 2018; Бородина, Солдатов, 2019). Среди амфибий лишь некоторые виды способны переносить кратковременное (несколько часов или суток) от-

сутствие кислорода в среде (Bickler, Buck, 2007; Tattersall, Ultsch, 2008). Недавние исследования показали, что единственный вид из изученных к настоящему времени обладает уникальной для класса толерантностью к аноксии (полному отсутствию кислорода). Это — сибирская лягушка (*Rana amurensis* Boulenger 1886), способная зимовать в водоемах в анаэробических условиях, используя анаэробный метаболизм (Bergman et al., 2019; Shekhovtsov et al., 2020). Чаще всего амфибии могут столкнуться с гипоксией на зимовке в воде под льдом, где по разным причинам формируется дефицит кислорода (Bradford, 1983; Bickler, Buck, 2007; Tattersall, Ultsch, 2008; Берман и др., 2017; Берман, Булахова, 2019). Вместе с тем, для поиска устойчивых к гипоксии видов перспективна еще одна группа бесхвостых амфибий — так называемые “роющие” виды, уходящие в зимнюю спячку (гибернацию) или летний покой (эстивацию) в грунты, казалось бы, на малодоступные для этих животных глубины — 1.5–2 м (Wells, 2007). В их числе — принадлежащие к разным родам жабы (*Bufo*idae), чесночницы (*Pelobatidae*), лопатоноги (*Scaphiropodidae*) и другие. Значительная глубина, на которую зарываются животные, в ряде случаев предопределяет существенный недостаток кислорода в грунтах. Однако физиология, в т.ч. и дыхание, роющих амфибий во время гибернации или эстивации едва затронута исследованиями (Pörtner et al., 1991; Wang et al., 1994; McAneney et al., 2006 и др.). Полученные в течение последних нескольких десятилетий результаты представляют большой интерес (Armentrout, Rose, 1971; Pinder et al., 1992; Navas, Carvalho, 2010; Rossi et al., 2020).

Условия зимовки в грунтах (газовый состав воздуха, температура, влажность и т.п.) любого широко распространенного вида разнообразны в зависимости от биотопов и в разные годы. Трудоемкость исследования названных параметров велика, поскольку связана с проведением обширных земляных работ, в т.ч., по установке и демонтированию систем трубок с воронками для улавливания воздуха на разных горизонтах грунтов (Взаимодействие..., 1985; Смагин, 2005). Поэтому представляется нереальным исследовать сезонную динамику факторов во многих местах гибернации роющих амфибий разных видов.

Дополнительные трудности изучения условий зимовки в природе связаны со сложным устройством стенок зимовочных полостей в почве (“гибернакул”), функции которых разнообразны. В засушливых регионах важнейшая из этих функций — препятствование потерям воды, для чего некоторые амфибии (например, представители родов *Cyclorana* или *Neobatrachus*) формируют коконы, состоящие из нескольких слоев сброшен-

ной при линьке кожи и почвы, которые скреплены между собой выделяемой лягушками слизью. Животные сохраняют легочное дыхание через ноздри, остающиеся не покрытыми коконом (Withers, Richards, 1995; Withers, Thompson, 2000). Другой вариант гибернакулы — камера с уплотненными стенками, незначительно большего, чем сама амфибия, размера, что минимизирует соприкосновение тела с почвой и, тем самым, уменьшает осмотическую потерю воды из организма (Carvalho et al., 2010). Некоторые виды (например, родов *Scaphiopus* и *Pelobates*) выживают без защитного кокона, находясь в прямом контакте с рыхлым окружающим субстратом, или в камерах, размер которых лишь на несколько миллиметров превышает размер животных (Seymour, 1973; Ермохин и др., 2013). Очевидно, что и уплотненные стенки, и коконы уменьшают потерю воды, но представляют собой барьер для диффузии газов (Feder, Burggren, 1992). Конструкция зимовочных камер, как выяснилось, может “преднамеренно” затруднять газовый обмен для ускорения запуска механизмов метаболической депрессии; как, например, у австралийской роющей лопатницы (*Cyclorana alboguttata* (Günther 1867)) (Rossi et al., 2020). Однако измерить газовый состав воздуха непосредственно в гибернакуле еще сложнее, чем в грунте на глубине расположения животных.

Учитывая сказанное, целесообразный подход, по-видимому, состоит не столько в выяснении всего разнообразия складывающихся условий на зимовке, сколько в экспериментальной оценке предельных возможностей амфибий переносить гипоксию. В качестве удобной модели мы выбрали чесночницу Палласа (*Pelobates vespertinus* (Pallas 1771)) — вид, недавно выделенный из обыкновенной чесночницы (*Pelobates fuscus* (Laurenti 1768)) (Боркин и др., 2001; Литвинчук и др., 2008). Ареал *P. vespertinus* (Litvinchuk et al., 2013; Dufresnes et al., 2019) занимает обширную территорию от бассейнов Дона и Волги на западе до р. Тургай и междуречья Тобола-Ишима — на юго-востоке; северная граница совпадает с северной границей хвойно-широколиственных лесов, южная — с северной окраиной полупустынь. На протяжении всего ареала чесночница зимует в грунтах на глубине от нескольких десятков сантиметров до 2 м (Искакова, 1959; Гаранин, 1983; Дебело, Чибилев, 2013; Ермохин и др., 2013).

Первая и основная цель работы — определить в лабораторном эксперименте минимальное содержание кислорода в воздухе, достаточное для длительного существования *P. vespertinus*, и пороговую концентрацию, непродолжительное пребывание в которой летально для особей вида. Техника экспериментов состояла в описании ре-

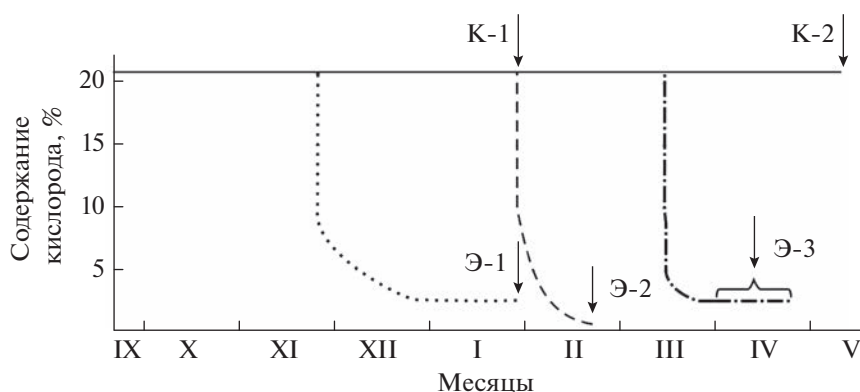


Рис. 1. Схема лабораторных экспериментов по выяснению отношения чесночницы Палласа (*Pelobates vespertinus*) к концентрации кислорода в воздухе при температуре 3°C. Группы: К-1 и К-2 — контрольные, Э-1, Э-2 и Э-3 — экспериментальные. Стрелки — время отбора проб для биохимических исследований.

акций животных (адекватные, нарушенные, кома) при заданных концентрациях кислорода и поддержании влажности. Таким путем выясняли витальный диапазон содержания кислорода для животных — от безопасного понижения концентрации до экстремально малых значений.

Вторая цель — выяснить биохимические пути, обеспечивающие выживание чесночницы во время гибернации в условиях нормоксии и гипоксии. Известно, что у амфибий, зимующих/эстивирующих в почве при нормальной концентрации кислорода, главным метаболическим резервом служат липиды жировых тел, в то время как у амфибий при дефиците кислорода метаболизм поддерживается за счет запасов гликогена. Количественное соотношение липидов и гликогена, косвенно свидетельствующее об условиях среды в местах зимовки, и их баланс при изменении газового состава до настоящего времени у чесночницы Палласа не были известны.

Третья цель состояла в определении сезонной динамики температур и концентрации кислорода в воздухе грунтов на разной глубине в одном из характерных местообитаний чесночницы, расположенном в нижнем течении р. Оки близ г. Калуга. Таким путем мы надеялись получить первые данные о реально наблюдаемых параметрах среды в естественных местах зимовки вида.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Животные

Pelobates vespertinus ($n = 41$, масса тела $P = 10.7 \pm 0.5$ г, длина тела $L = 41.8 \pm 1.0$ мм) были собраны в середине сентября у села Урицкое (Саратовская обл., 51°25' с.ш., 44°56' в.д.) в долине р. Медведица и перевезены в термостатируемом контейнере с почвой в ИБПС ДВО РАН (г. Магадан) для

экспериментов. В лаборатории животные в нескольких вентилируемых 3-литровых контейнерах с почвой влажностью 35–40% прошли предзимнюю акклимацию — их содержали по двое суток при ступенчато снижающихся температурах 15, 10 и 8°C, затем по две недели — при 5 и 3°C (рис. 1). В этих условиях — в почве при температуре 3°C, характерной для зимовки чесночницы в природе (Ермохин и др., 2013), — содержали контрольные группы К-1 ($n = 10$) до конца января и К-2 ($n = 4$) до середины мая и всех экспериментальных животных до начала работы с ними.

Экспериментальное лабораторное оборудование

Животных акклимировали и содержали до начала экспериментов в термостатах ТСО-1/80 (ОАО Смоленское СКТБ СПУ, Россия, <https://sktb-spu.ru>). Для уменьшения градиентов они были дополнительно теплоизолированы снаружи (пенофол фольгированный, 10 мм), благодаря чему максимальное отклонение средней температуры в термостате составило лишь $\pm 0.5^\circ\text{C}$ (измерения проведены температурными логгерами DS1922L, НТЛ ЭлИн, Россия, <https://elin.ru>).

Для поддержания гипоксических условий в экспериментах были использованы прозрачные склянки (Duran Group, DWK Life Science, Германия, <https://www.dwk.com/laboratory/brands/duran>) объемом 0.8 л. Их герметичные крышки имели четыре отвода, которые были заглушены мягкими силиконовыми пробками и закрыты сверху пластиковыми винтовыми колпачками. В каждую склянку помещали одну чесночницу, укладывали влажную фильтровальную бумагу и, для предотвращения возникновения гиперкапнии, сорбент углекислого газа, образующегося при дыхании животных (натронная известь — Sofnolime 2550, Molecular products Limited, Великобритания, <https://>

www.molecularproducts.com). Во всех экспериментах сосуды с чесночницами находились в вышеописанных термостатах при 3°C.

Содержание кислорода и углекислого газа в склянках с чесночницами измеряли газоанализатором MultiGas OxyPro O₂/CO₂ (НТК Hamburg GmbH, Германия, <https://www.htk-hamburg.com>) с периодичностью один раз в двое суток. Воздух отбирали через прокол в силиконовой пробке-заглушке иглой газоанализатора. Каждая сессия состояла из трех последовательных отборов воздуха объемом 20 мл; концентрацию газов в склянке рассчитывали как среднее значение трех измерений. Перед каждой сессией измерений датчик O₂ калибровали по атмосферному воздуху и чистому азоту (ООО Команда Магаданской кислородной станции, Россия, ГОСТ 9293-74), датчик CO₂ — по чистым азоту и углекислому газу (ЗАО Уралдиоксид, Россия, ГОСТ 8050-85).

Для компенсации разряжения в склянке после изъятия 60 мл воздуха для анализа в нее через силиконовую пробку-заглушку шприцем вводили газовую смесь с необходимой долей кислорода. Точность измерения поверенного газоанализатора составляет ± 0.5% (Свидетельство о поверке ФГУП ВНИИФТРИ, Россия). Использование газоанализатора MultiGas OxyPro O₂/CO₂ обусловлено именно малым объемом забираемой разовой пробы, не создающей значительного разряжения в склянке; однако величина абсолютной погрешности прибора не позволила оценить интенсивность газового обмена чесночниц, а тем самым — и уровень метаболической депрессии.

Предварительные эксперименты

Для сокращения продолжительности основных экспериментов предварительно была оценена способность чесночниц существовать при содержании кислорода вдвое ниже содержания кислорода в атмосферном воздухе (10%). При этом мы ориентировались на данные по роющей лопатнице (*Cyclorana alboguttata*), особи которой в этих условиях не проявляли признаков угнетения (Rossi et al., 2020). Чесночницы ($n = 6$) были перемещены из условий нормоксии в склянки с 10% кислорода и пребывали в этих условиях в течение двух недель; их состояние оценивали по адекватности реакций на освещение, наклон склянки, при необходимости — на прикосновение введенного через силиконовую пробку тонкого шупа.

На следующем этапе для проверки стабильности состояния животных при гипоксии было исследовано вдвое более низкое содержание кислорода (5%), в эти условия перевели четыре особи из шести; продолжительность эксперимента так-

же составила две недели. Концентрации 10 и 5% достигали путем медленной продувки склянок газообразным азотом.

Для оценки окололётальных значений гипоксии двух других чесночниц оставили в условиях постепенного снижения содержания кислорода за счет дыхания до наступления комы (мышцы расслаблены, зрачки не реагируют на свет, буккофарингеальные движения отсутствуют). Описанное состояние наступило при достижении 1.9 и 0.7%. Через 18–20 ч комы животных перевели в условия с нормальной концентрацией кислорода, после чего они ожили. Все шесть тестируемых особей после экспериментов содержались в лаборатории в течение нескольких недель.

Результаты предварительных экспериментов позволили смоделировать схему основных: сократить продолжительность экспериментов, начав не с атмосферного содержания кислорода, а с 10%, и считать минимальной витальной концентрацией примерно 2–3% кислорода (среднее значение между хорошо переносимой концентрацией — 5% и средней около без пробела летальной концентрацией — 1%).

Основные эксперименты

Для выяснения способности *P. vespertinus* длительно переносить пониженное содержание кислорода и уточнения летальных его концентраций были проведены три эксперимента. Результаты некоторых из них были частично опубликованы ранее (Bulakhova et al., 2023).

В первом эксперименте (Э-1) определяли способность чесночниц ($n = 7$) длительное время (не менее месяца) находиться в условиях экстремально низкого (примерно в 10 раз ниже нормы) содержания кислорода (2–3%). С момента отлова животные находились в нормоксии при 3°C в почве, затем их перевели в склянки с содержанием кислорода 10%, которое до 2–3% снижалось за счет дыхания животных и поддерживалось добавкой газовой смеси на этом уровне в течение месяца (до конца января), после чего шесть взрослых самок были отобраны для биохимических анализов (см. рис. 1).

Во втором эксперименте (Э-2) уточняли значения окололётальной концентрации кислорода, при кратковременном пребывании в которой наступала кома. Животные ($n = 8$) находились в нормоксических условиях почти 4.5 месяца после отлова (до конца января), после чего их переводили в склянки с 10% кислорода; в результате дыхания животных содержание кислорода снижалось до окололётальных концентраций (наступления

комы). Три взрослые самки затем были отобраны для биохимических исследований (см. рис. 1).

В третьем эксперименте (Э-3) выясняли, зависит ли устойчивость чесночницы к экстремально низкой витальной гипоксии от времени ее наступления (середина зимовки или конец зимовки). Он был аналогичен первому эксперименту, но начался на три месяца позже (в начале марта) (см. рис. 1). Для ускорения достижения необходимых концентраций время пребывания в интервале 10–8% кислорода было уменьшено до 2–3 сут, после чего его содержание понизили до 5% добавлением азота, и далее оно сокращалось за счет дыхания животных до 2–3%. Эта процедура в среднем сокращала время понижения с 10 до 3% до двух недель. После наступления комы все особи ($n = 6$) были умерщвлены для оценки биохимических изменений в тканях.

Биохимические исследования

Резервные вещества исследованы только у взрослых самок ($n = 27$, $L = 42.4 \pm 0.7$ мм, $P = 11.1 \pm 0.4$ г), поскольку у многих видов амфибий существуют возрастные и половые различия их запаса и расхода (Pasanen, Koskela, 1974; Bulakhova, Shishikina, 2022; Bulakhova et al., 2023). Были исследованы самки в трех вышеописанных экспериментальных выборках и в двух контрольных. В контрольной группе К-1 восемь особей были умерщвлены для биохимических исследований одновременно с животными группы Э-1; в контрольной группе К-2 ($n = 4$) – в середине мая (см. рис. 1). Размеры выборок экспериментальных животных указаны в предыдущем разделе.

Исследование содержания воды и резервных веществ (липиды и гликоген) в тканях, а также массы запасующих органов (печень и жировые тела) проведено по методикам, описанным ранее (Pasanen, Koskela, 1974; Bulakhova, Shishikina, 2022). Содержание воды (%) определяли в образцах ткани печени и мышц, которые взвешивали, высушивали в течение 2 сут при 105°C и затем снова взвешивали. Определение концентрации гликогена проводили в образцах печени и мышечной ткани *о*-толуидиновым методом (Tagpoku, Nagy, 1963; Северин, Соловьева, 1989) и рассчитывали по графикам стандартных растворов глюкозы. Липиды из образцов печени и мышц экстрагировали смесью диэтилового эфира и этанола (1 : 3) в течение 48 ч и оценивали методом Canal et al. (1972). Для определения оптической плотности растворов использовали спектрофотометр Ecoview-UV-3100 (Shanghai Mapada Instruments Co., Ltd. Китай, <https://mapadash.en.ec21.com>). Значения концентраций гликогена и липидов приведены в тексте в мг/г сырой ткани. Гепато-

соматический индекс и индекс жировых тел рассчитывали как отношение массы печени и жировых тел к массе тела, выраженное в процентах.

Статистический анализ

Концентрацию гликогена, липидов и содержание воды в тканях в контрольных и экспериментальных группах сравнивали с помощью U-test Манна–Уитни. Значимость определяли при $p \leq 0.05$. Все значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка.

Полевые исследования

Температура и содержание кислорода в грунтах измерены в окрестностях г. Калуга (54°32' с.ш., 36°16' в.д.) в долине р. Оки близ оз. Тишь (рис. 2), в обстановке, аналогичной месту отлова чесночниц для экспериментов (Решетникова и др., 2011; Ермохин и др., 2013). Здесь ранее были проведены учеты амфибий ловчими канавками с цилиндрами (Алексеев и др., 2011), показавшие высокую численность *P. vespertinus*, его доминирование среди отловленных животных и, тем самым, типичность выбранного участка в качестве местообитания вида.

Биотоп представляет собой основание коренного борта долины левого берега р. Оки, сложенного песками (см. рис. 2). В растительном покрове преобладают ксерофильные злаки с участием лесостепных видов “окской флоры” (Решетникова и др., 2011). Локальные доминанты: вейник наземный (*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth), вязель пестрый (*Coronilla varia* L.), осока бледноватая (*Carex pallescens* L.), щавель кислый (*Rumex acetosa* L. s. str.), подмаренник мягкий (*Gallium mollugo* L.).

Концентрацию кислорода в воздухе грунтов определяли на глубинах 160 и 240 см, поскольку многократно показано, что чесночницы зимуют в горизонтах более 1.5 м (Банников, Денисова, 1956; Исакова, 1959; Дебело, Чибилев, 2013; Ермохин и др., 2013). На названные глубины были установлены по две (дублирующие) системы, доставляющие воздух к поверхности почвы (Смагин, 2005). Каждая состояла из воронки (диаметр 10 см, высота 9 см, объем 1.3 л) с направленным вверх соском (диаметр соска 1.8 см), к которому с помощью переходников из силиконовых трубок был присоединен выходящий на поверхность почвы медный капилляр (внутренний диаметр 4 мм) (рис. 3). На кончик капилляра плотно насаживали силиконовую трубку, пережатую на выходе хирургическим корнцангом. Системы стояли с декабря 2019 г. по апрель 2021 г.



Рис. 2. Местообитание чесночницы Палласа (*Pelobates vespertinus*) и расположение экспериментальной площадки (указано стрелкой) (окрестности г. Калуга, долина р. Оки близ оз. Тишь).

Содержание кислорода измеряли один раз в 2 месяца газоанализатором ПКГ-4 (Эксис, Россия, <https://www.eksis.ru>), точность измерения концентрации кислорода $\pm 0.4\%$. Как будет показано ниже, этой точности оказалось достаточно для достижения целей исследования. При отборе проб почвенного воздуха силиконовые трубки ниже корнцангов прокалывали иглой газоанализатора, затем в течение примерно 40 с откачивали воздух из капилляра до получения постоянного значения. В одну сессию на каждой системе концентрацию кислорода в грунтовой воздухе определяли трижды и рассчитывали среднее значение. По окончании измерений силиконовые трубки пережимали корнцангами ниже прокола.

Температуру грунта в шурфе измеряли на горизонтах 5, 80, 160 и 240 см температурными логгерами DS1922L, согласно Смагину и др. (2006), один раз в сутки (в 6 часов утра). Индивидуальная погрешность датчиков при калибровке в 0°C составила от 0.1 до 0.3°C против заявленной в

паспорте $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Все значения температуры в тексте приведены с учетом выявленных индивидуальных отклонений. Логгер на глубине 5 см был установлен на расстоянии 10 м от остальных, с тем, чтобы временное удаление снега с поверхности почвы при отборе проб грунтового воздуха не сказывалось на температуре в указанном горизонте.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Чесночница в условиях экспериментальной гипоксии

В первом эксперименте (Э-1), начавшемся в конце ноября, при концентрации кислорода $10\text{--}3\%$ чесночницы жили в течение $24\text{--}34$ сут, при концентрации $2\text{--}3\%$ шесть из семи особей прожили более 1 мес.; лишь одна погибла раньше (табл. 1). Содержание углекислого газа во время всех экспериментов не превышало 0.03% .

Во втором эксперименте (Э-2) кома у животных наступила по достижению концентраций 0.6–1.8% (в среднем, около 1%), т.е. в 12–21 раз ниже атмосферной (табл. 2). Это состояние оказалось необратимым и приводило к гибели, если животные находились в нем более суток. Чесночницы (см. табл. 2), одномоментно переведенные из кратковременной комы в условия нормоксии, восстановились и жили в лаборатории в течение нескольких месяцев.

В третьем эксперименте (Э-3) у пяти животных из шести кома наступила уже на 3–9-е сут пребывания в условиях с 2–3% кислорода; лишь одна особь выдержала гипоксию дольше — 31 сут (см. табл. 1).

Поведение чесночниц, содержащихся при температуре 3°C как при нормоксии, так и при гипоксии (10, 5 и 2–3%), не различалось: они были вяло-активными, признаков беспокойства не проявляли даже при наклонах склянок или резком их освещении — находились в нормальных позах (сидели или лежали, поджав под себя конечности), иногда неторопливо перемещались; некоторые животные “рыли” влажный фильтр, уложенный на дно склянок, превращали его в комок, под который неторопливо “прятались”, будучи потревожены. При увеличении температуры активность животных повышалась.

При концентрациях кислорода, близких к летальным (менее 2%), поведение чесночниц свидетельствовало о дискомфорте — время от времени они вытягивали задние конечности и оставались в этой характерной позе от нескольких минут до получаса.

Биохимические исследования

Содержание воды в тканях не различалось (U-test, $p > 0.05$) у животных в контрольных или экспериментальных группах (рис. 4), что позволило сравнивать содержание у них гликогена и липидов без пересчета на сухое вещество.

Масса печени у исследованных особей была невелика: максимальное значение лишь 560 мг, минимальное — 180 мг. Относительная масса печени в группах К-1 и Э-2 достигала 2.9%. Хотя в трех других выборках индекс печени был ниже (рис. 5), значимых различий между пятью группами не было (U-test, $p > 0.05$).

Жировые тела имелись не у всех животных: в контрольных группах к концу января (К-1) они сохранились лишь у 50% особей и имели массу 21 ± 6 мг (от 5 до 31 мг), а к середине мая (К-2) их доля сократилась до 25% (1 особь с массой жировых тел 22 мг). В экспериментальной группе Э-1 в конце января доля особей с жировыми телами —



Рис. 3. Общий вид установленных в шурфе систем отбора проб грунтового воздуха (желтые воронки, медные трубки) и измерения температур (белым шпагатом привязаны логгеры для облегчения их поиска при изъятии).

67% и масса жировых тел — 37 ± 9 мг (19–58 мг) были выше, чем в это же время в контрольной группе. В выборке Э-3 жировые тела имелись лишь у 17% особей, а в Э-2 этих органов не было ни у одного животного, что можно объяснить слишком малым объемом последней группы. Относительная масса жировых тел была невелика — в среднем 0.05–0.1% в обеих контрольных группах и 0.24–0.30% в экспериментальных.

Содержание липидов в печени у животных в обеих контрольных группах не различалось и составляло в среднем около 2.6 мг/г. В экспериментальных группах этот показатель был незначительно выше — около 3 мг/г (U-test, $p > 0.05$). В мышцах наблюдалась та же тенденция, что и в печени — содержание липидов в контроле (3.7–6.2 мг/г) было ниже, чем в экспериментах (7.9–10.4 мг/г); однако экспериментальные группы достоверно отличались по этому показателю лишь от контрольной К-1 (U-test, $p \leq 0.05$).

Таблица 1. Длительность пребывания (сут) чесночницы Палласа (*Pelobates vespertinus*) в условиях гипоксии*

№ эксперимента	№ особи	Суток при пониженной концентрации кислорода			Статус
		всего	10–3%	3–2%	
Э-1	1	70	34	36	Жива
	2	63	24	39	Жива
	3	63	24	39	Жива
	4	63	26	37	Жива
	5	63	27	36	Жива
	6	63	31	32	Жива
	7	38	28	10	Кома
Э-3	1	15	10	5	Кома
	2	15	11	4	Кома
	3	15	12	3	Кома
	4	15	11	4	Кома
	5	42	11	31	Кома
	6	18	9	9	Кома

* Примечание. Протоколы экспериментов подробно изложены в разделе “Материал и методы”.

Таблица 2. Окололетальная концентрация кислорода и время ее достижения (сут) в воздухе склянок с чесночницей Палласа (*Pelobates vespertinus*) в группе Э-2

№ особи	Суток при пониженной концентрации кислорода				Окололетальный порог O ₂ , %
	всего	10–3%	3–2%	<2%	
1	34	26	3	5	0.6
2	24	12	6	6	0.9
3	16	9	4	3	0.9
4	21	14	2	5	0.9
5	24	17	4	3	0.9
6	13	10	2	1	1.8
7	18	10	6	2	1.2
8	16	6	5	5	0.9

Содержание гликогена в тканях чесночниц, проводивших в условиях нормоксии около 4 месяцев (группа К-1), было невысоко (в печени 35.4 ± 5.1 мг/г, в мышцах 4.1 ± 1.0 мг/г) и спустя 2.5 месяца (К-2) уменьшилось еще более существенно (до 2.1 и 0.2 мг/г, соответственно). В экспериментальной группе Э-1 в печени этот показатель оказался вдвое, а в мышцах – почти в 4 раза ниже, чем у контрольных животных в это же время (рис. 6). Во втором и третьем экспериментах содержание гликогена снизилось еще значительно (в печени до 4.8 ± 2.5 и 3.1 ± 0.3 мг/г, в мышцах до 1.6 ± 0.6 и 0.7 ± 0.3 мг/г).

Содержание кислорода и температура в грунтах

Содержание кислорода в грунтовой атмосфере в зимовочном биотопе чесночницы (см. рис. 3) на глубинах 160 и 240 см за полтора года наблюдений не опускалось ниже 19%. Между горизонтами оно не различалось и почти всегда было немногим ниже, чем в атмосферном воздухе. Концентрация кислорода начинала уменьшаться весной и достигала наименьших значений к середине августа (19.3%). Максимальные показатели (21.3%) отмечены в феврале 2022 г. (рис. 7).

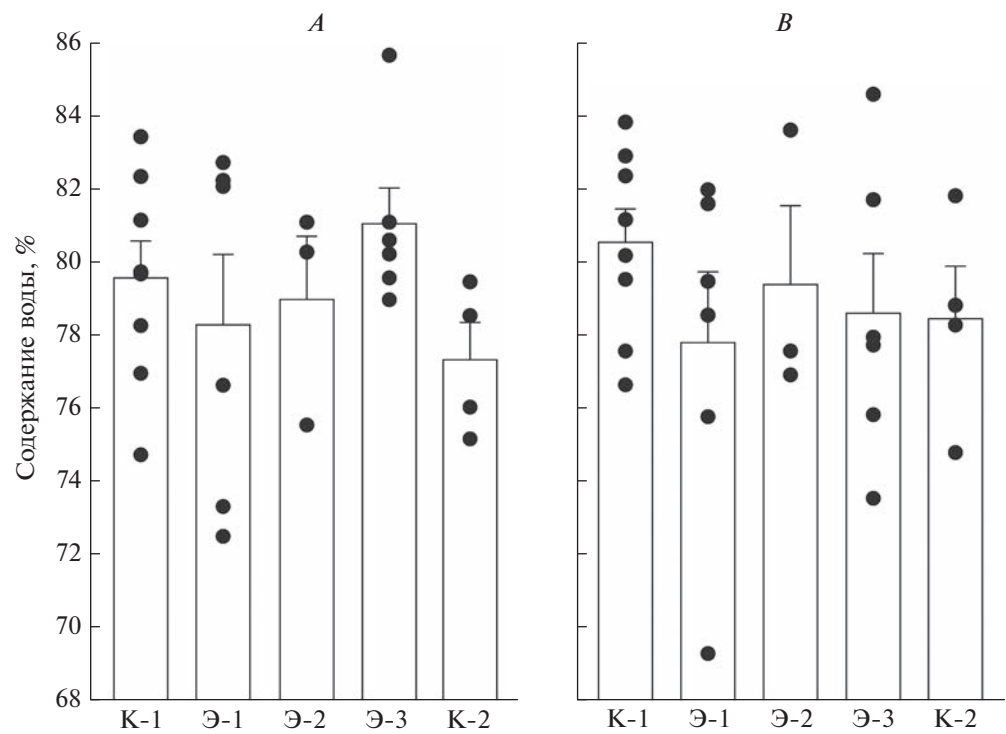


Рис. 4. Содержание воды (%) в печени (А) и мышцах (В) чесночницы Палласа (*Pelobates vespertinus*) в двух контрольных и трех экспериментальных группах. Здесь и на рис. 5 и 6: среднее значение ± стандартная ошибка, точки – индивидуальные значения.

Температуры зимой в грунтах, как известно, зависят, главным образом, от температур воздуха и высоты снежного покрова. Суточные минимумы температуры воздуха в значительной степени различались по годам. В теплую зиму 2019–2020 гг. температура только однажды опускалась ниже -10°C (с 7 по 9 февраля, минимальная -14.3°C).

Зима 2020–2021 гг. была много суровее, минимумы достигали -26°C (https://rp5.ru/Архив_погоды_в_Калуге).

Сплошной снежный покров зимой 2019–2020 гг. установился в начале декабря, наибольшая его мощность (13–15 см) отмечена в начале–середине января. Зимой 2020–2021 гг. постоянный по-

Таблица 3. Минимальные за декаду значения температуры ($^{\circ}\text{C}$) атмосферного воздуха, температуры грунтов и мощности снега зимой 2019–2020 гг. (перед чертой) и 2020–2021 гг. (после черты)

Дата	Снег, см	Атмосферный воздух	Почва и грунты на глубине, см			
			5	80	160	240
20.12	0.4/11	$-2.6/-11.9$	2.1/–1.2	3.3/1.0	4.6/3.8	6.0/6.1
31.12	3/16	$-5.1/-10.9$	1.3/0.0	3.8/1.2	5.4/3.4	6.5/5.5
10.01	13/27	$-4.6/-8.4$	0.9/0.1	2.9/1.4	4.7/3.3	6.0/5.2
20.01	15/35	$-6.7/-24.3$	1.1/0.0	2.8/1.6	4.2/3.3	5.5/5.0
31.01	14/35	$-5.3/-19.1$	0.8/0.0	2.5/1.5	3.9/3.1	5.2/4.8
10.02	2/46	$-14.3/-18.4$	0.3/–0.1	2.2/1.5	3.7/3.0	4.9/4.6
20.02	1/73	$-3.7/-26.1$	0.3/–0.1	1.9/1.4	3.2/2.9	4.5/4.5
28.02	1/65	$-3.1/-23.3$	0.7/–0.1	2.0/1.2	3.2/2.8	4.4/4.4
10.03	1/42	$-2.1/-22.3$	1.2/0.0	2.4/0.9	3.3/2.4	4.4/4.0
20.03	0.4/42	$-7.0/-17.2$	2.4/–0.2	4.4/0.4	4.1/2.2	4.5/3.8
31.03	4/28	$-6.4/-5.8$	1.6/0.0	4.0/0.6	4.6/2.2	5.0/3.7

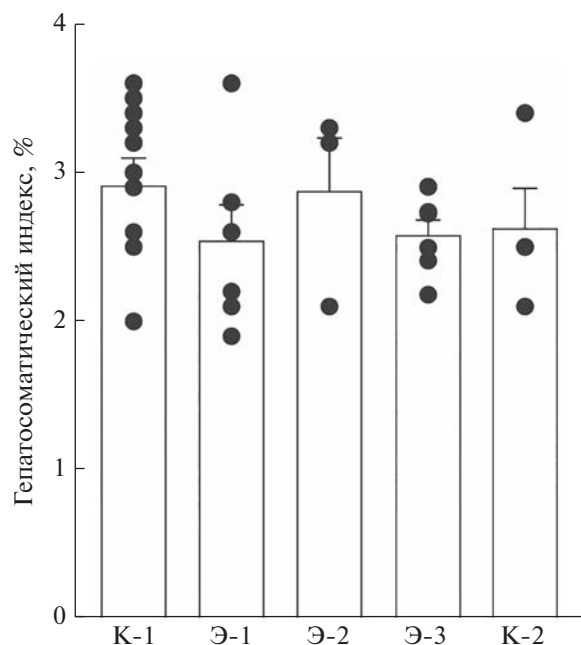


Рис. 5. Относительная масса печени у чесночницы Палласа (*Pelobates vespertinus*) в двух контрольных и трех экспериментальных группах.

кров установился также в начале декабря, но высота его была значительно больше, чем в предыдущую зиму, и достигла максимума (70 см) в

середине февраля (https://rp5.ru/Архив_погоды_в_Калуге) (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Отношение к гипоксии

Чесночница Палласа, как и другие виды чесночниц и экологически близкие к ним представители бесхвостых амфибий — лопатоноги и некоторые виды жаб, например монгольская (*Strauchbufo raddei* (Strauch 1876)), — зимуют на суше, зарывшись глубоко в предпочитаемые ими неплотные грунты — супеси, пашню и т.д. (Брем, 1895; Savage, 1942; Емельянов, 2018). Все они именно закапываются (как бы “погружаясь” в землю), оставляя после себя лишь разрыхленный грунт, а не норы.

Зимовка глубоко в грунте — вынужденная стратегия чесночницы Палласа, отражающая отношение этой амфибии к отрицательным температурам: она непродолжительно (не более 3 суток) переносит охлаждение лишь до -1°C и по этому показателю относится к наименее холодоустойчивым бореальным амфибиям (Vertman et al., 2019a).

Вместе с тем, уходя от отрицательных температур в почву и грунты ниже уровня их промерзания, чесночница рискует столкнуться с дефицитом кислорода. Он может возникнуть в том слу-

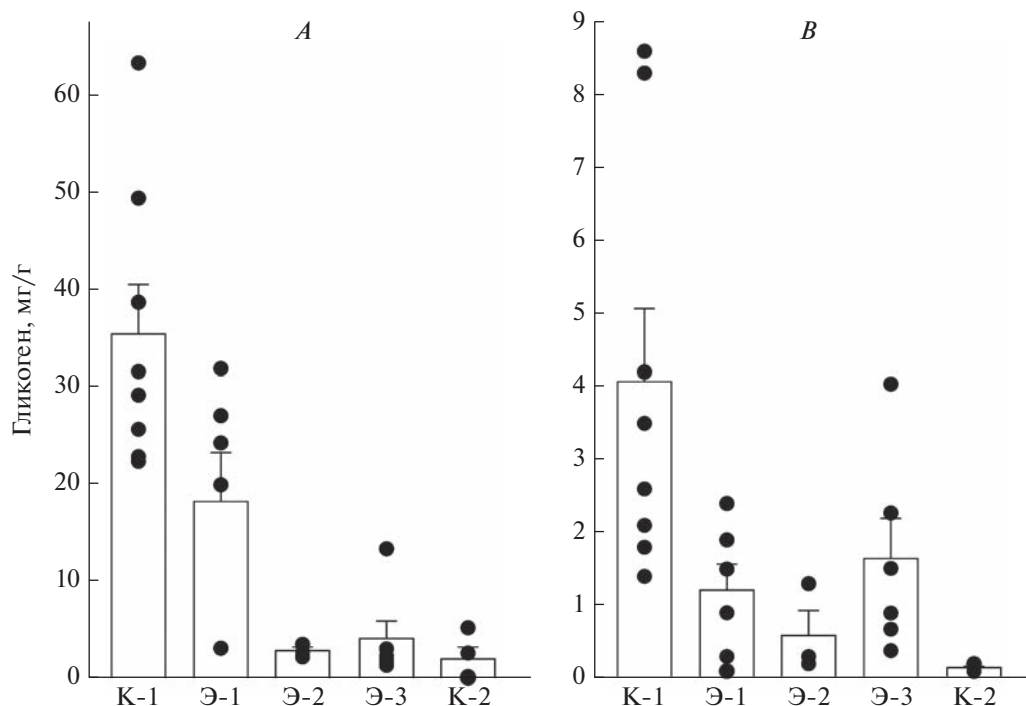


Рис. 6. Содержание гликогена (мг/г сырой ткани) в печени (А) и мышцах (В) чесночницы Палласа (*Pelobates vespertinus*) в двух контрольных и трех экспериментальных группах.

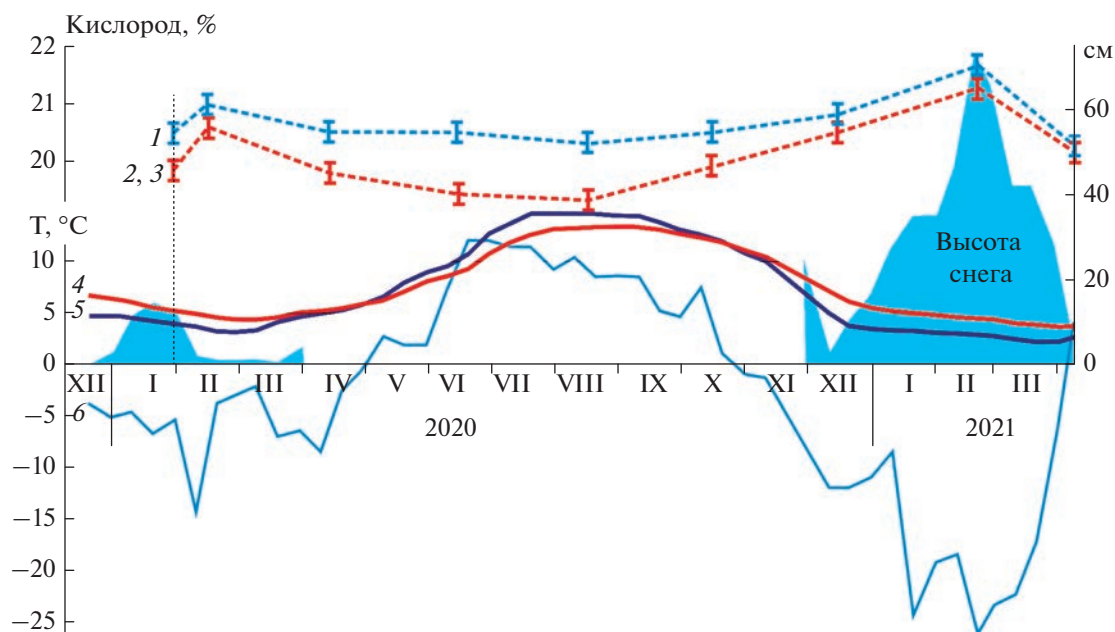


Рис. 7. Сезонная динамика температуры, содержания кислорода в воздухе грунтов и в атмосфере на экспериментальном участке у оз. Тишь, а также высота снежного покрова и минимальные за декаду температуры воздуха на метеостанции “Калуга” (https://rp5.ru/Архив_погоды_в_Калуге). Содержание кислорода: 1 – в атмосферном воздухе, 2 – в грунте на глубине 240 см, 3 – в грунте на глубине 160 см (кривые 2 и 3 совпадают); минимальная за декаду температура почвы: 4 – на глубине 240 см, 5 – на глубине 160 см; 6 – минимальная за декаду температура воздуха.

чае, когда диффузии газов препятствуют слои более плотных материалов (например, суглинков), промерзание почв сверху, достигающее в холодных регионах глубины более 1.5 м, или поверхностное затопление (Withers, 1978; Ultsch, Anderson, 1986; Lavelle, Spain, 2001; Берман и др., 2020; Bulakhova et al., 2020).

Проведенные эксперименты свидетельствуют между тем, что даже значительный дефицит кислорода в грунтовой атмосфере не опасен для этого вида. Концентрацию кислорода в 2–10 раз ниже атмосферной нормы на уровне моря чесночницы без видимого ущерба могут выдерживать долго. Они сохраняют при этом некоторый уровень активности (“вяло-активны”), не проявляя признаков беспокойства. При концентрациях ниже 2% кислорода чесночницы впадали в кому. Обращает на себя внимание способность чесночницы переносить моментальную реоксигенацию – один из ключевых стрессовых факторов для подвергшихся гипоксии животных (Bickler, Buck, 2007), нередко приводящий к гибели. Эта способность чесночницы свидетельствует о высокой степени адаптации вида к пребыванию в атмосфере с переменным уровнем кислорода.

Точность использованного оксиметра ($\pm 0.5\%$) не позволяет твердо назвать нижний порог концентрации кислорода, при котором чесночница Палласа может длительно существовать, но полу-

ченные данные надежно указывают, что он лежит около 2%.

Мы не ставили перед собой задачу выяснить максимальную продолжительность выживания *P. vespertinus* в условиях дефицита кислорода. Эксперимент (Э-1) был прекращен по прошествии примерно двух месяцев, причем половину срока животные находились в экстремальной гипоксии (2–3% кислорода). Этот результат позволяет предполагать, что при достаточном запасе резервных веществ чесночница может находиться в гипоксии без ущерба более продолжительное время.

Способность чесночницы Палласа переносить столь значительную – экстремальную – гипоксию в воздушной среде пока уникальна для класса амфибий. В принципиально более мягких условиях – при концентрациях кислорода около 9% – длительно может жить выше упомянутая *Cyclorana alboguttata* (Rossi et al., 2020). Некоторые другие виды амфибии в экспериментах показали толерантность к более жесткой гипоксии, но лишь кратковременно. Например, жаба-ага (*Rhinella marina* (L. 1758)) успешно вынесла пребывание при концентрациях кислорода 7–10% в течение суток, а 5% – в течение часа (Wood, Malvin, 1991; Gamperl et al., 1999); жаба-рококо (*Rhinella schneideri* (Werner 1894)) при содержании кислорода 5% может прожить несколько минут (Kruhöffer et al., 1987), европейский протей (*Prote-*

us anguinus Laurenti 1768) — 12 ч в условиях аноксии, пиренейский тритон (*Calotriton asper* (Dugès 1852)) — лишь 1.5 ч (Issartel et al., 2009).

Вместе с тем полного отсутствия кислорода (аноксию) чесночница Палласа не переносит, в отличие от наиболее устойчивого к гипоксии вида амфибий — сибирской лягушки (*Rana amurensis*) (Berman et al., 2019).

Способность чесночницы Палласа переносить дефицит кислорода понижается по мере увеличения длительности пребывания животных в лаборатории до начала экспериментов. В исследованиях, начавшихся в конце ноября, 6 особей из 7 успешно прожили 32–39 сут при концентрации 2–3% кислорода. Те же условия весной (в марте) длительно выдержала лишь одна особь из 6 (см. табл. 1). Очевидно, что причиной этого может быть величина запаса резервных веществ, обеспечивающая выживание в период зимовки.

Липиды и гликоген в зимнем метаболизме чесночницы Палласа

У зарывающихся амфибий во время эстивации/гибернации основное метаболическое “топливо” — липиды, что подтверждается данными о сезонных изменениях их запасов в организме и респираторными коэффициентами (см. обзор Feder, Burggren, 1992). Липиды у таких амфибий запасаются в тканях (печень, мышцы) и в виде подкожных отложений, однако основные депо липидов — абдоминальные жировые тела, которые достигают у зарывающихся видов выдающихся размеров по сравнению с таковыми у зимующих в воде или вблизи поверхности амфибий. Например, у жабы Фаулера (*Anaxyrus fowleri* (Hinckley 1882)) жировые тела достигают в среднем 3% от массы тела (Bush, 1963), у лопатоногов *Scaphiopus* — 3–5% (Seymour, 1973), а у плоскоголовой лопатницы (*Cyclorana platycephala* (Günther 1873)) — до 10–24% (van Beurden, 1980). Запас липидов в жировых телах такого размера достаточен для удовлетворения всех энергетических потребностей указанных видов во время 7–10-месячной или даже двухлетней эстивации, а у части особей обитающего в пустынных районах Австралии *C. platycephala* при отсутствии необходимого количества осадков — до 5–6 лет покоя (Bush, 1963; McClanahan, 1967; Gehlbach et al., 1973; Seymour, 1973; van Beurden, 1980).

В нашем исследовании уже через 4 мес. (в конце января) лишь у половины исследованных чесночниц сохранились жировые тела, а к концу зимовки доля особей с жировыми телами сократилась до четверти. Это свидетельствует о том, что при нормальном содержании кислорода в воздухе у чесночниц, как у многих других видов амфибий,

жировые тела, очевидно, используются в процессе аэробного метаболизма и расходуются даже при низких температурах среды (около 3°C). Однако поразительно малая масса жировых тел (до 0.1% от массы тела в контрольных группах и до 0.3% — в экспериментальных) и значительная доля животных без них уже в середине зимовки, низкое содержание липидов в печени и мышцах свидетельствуют либо о низкой скорости расхода этого резервного вещества, либо об использовании других энергетических ресурсов для обеспечения успешной зимовки.

Использование липидов в качестве основного энергетического ресурса дополнительно выгодно из-за метаболической воды, образующейся в процессе окисления (Pinder et al., 1992). Очевидно, что этот путь, наряду со способностью поглощать влагу из окружающей почвы через кожу (Ruibal et al., 1969; Tracy et al., 2007), актуален для видов, зимующих/эстивирующих в засушливых районах или при относительно высоких температурах. Вероятно, это может быть одной из причин столь больших различий относительных масс жировых тел между указанными выше видами жаб, квакш и лопатоногов, с одной стороны, и исследованной нами чесночницы — с другой.

Получение энергии путем окисления липидов возможно лишь при доступе кислорода (Pinder et al., 1992), но прекращается при гипоксии. Чесночницы, проводившие 38–70 сут при пониженном содержании кислорода, имели большую массу жировых тел, чем пребывавшие в течение 4 месяцев в нормоксии. Доля животных, полностью израсходовавших жировые тела, в этих двух группах так же различалась (33 и 50%, соответственно). Очевидно, что гипоксия в течение почти половины срока сказала на вовлечении липидов в обмен — низкие уровни кислорода ограничили возможность окислять липиды, и животным пришлось переходить на не липидный обмен.

У чесночницы в нормоксии наряду с сокращением размеров жировых тел происходит уменьшение содержания гликогена в тканях — его количество во второй половине зимовки (между концом января и серединой мая) за 3.5 месяца уменьшилось в среднем на 33 мг/г в печени и почти на 4 мг/г в мышцах. Эта скорость не высока по сравнению со скоростями, отмеченными у других видов (Koskela, Pasanen, 1975).

В середине зимовки (конец января) у чесночниц содержание гликогена в печени (35.4 мг/г) и мышцах (около 4 мг/г) оказалось в несколько раз меньше такового у зимующих при таких же температурах (3–4°C) в умеренных широтах в воде лягушек (Kato, 1910; Smith, 1950; Hong et al., 1968; Pasanen, Koskella, 1974; наши неопубликованные

Таблица 4. Суммарная численность амфибий за август–октябрь 2010 г. на участке в основании супесчаного борта долины р. Ока с ксерофитным злаковым лугом у оз. Тишь (по: Алексеев и др., 2011)

Вид	Количество особей на 10 м канавки	Общее количество особей
<i>Pelobates fuscus</i>	1.93	511
<i>Bombina bombina</i> (L. 1791)	0.69	184
<i>Bufo bufo</i> (L. 1758)	0.04	1

данные). Таким образом, *P. vespertinus* (как минимум, взрослые особи вида) перед зимовкой, возможно, имеют наименьший запас гликогена по сравнению с другими амфибиями. Косвенное подтверждение этого предположения — крайне низкая холодоустойчивость чесночницы Палласа (Berman et al., 2019a), поскольку выживание и предельные переносимые температуры при замораживании у амфибий обусловлены синтезом криопротекторов, который зависит от количества гликогена в печени (Costanzo, Lee, 1993). Очевидно, что уменьшение времени выживания в условиях гипоксии во второй половине зимовки (группа Э-3) связано с постепенным сокращением изначально небольшого запаса резервных веществ (гликогена и липидов), которое наблюдается даже при нормоксии.

Пребывавшие в течение 2 месяцев при гипоксии чесночницы израсходовали вдвое больше гликогена, чем контрольные, но сохранили большую массу жировых тел. Очевидно, что это вызвано условиями эксперимента — недостатком кислорода. Хотя мы не определяли уровень глюкозы и лактата в тканях, иного варианта, как прекращение аэробного обмена и переход на гликолиз, предположить нельзя.

Скорость расхода гликогена в экспериментальных группах была хотя и выше, чем в контрольных, однако существенно ниже таковой у видов, не толерантных к гипоксии. Так, например, у умеренно устойчивой к дефициту кислорода травяной лягушки (*Rana temporaria* L. 1758) запасы гликогена в печени истощались в течение первой недели гипоксического воздействия, при содержании кислорода в воде около 40% от нормального (Boutilier, 2001), а у не переносящей гипоксию жабы Великих равнин (*Anaxyrus cognatus* (Say 1822)) концентрация печеночного гликогена уменьшилась вдвое всего лишь через 40 мин пребывания в аноксии (Armentrout, Rose, 1971).

Распространенная реакция на неблагоприятные условия окружающей среды у животных (включая амфибий), лежащая в основе спячки, торпора, диапаузы, анаэробноза, ангидробноза и эстивации, — метаболическая депрессия (Nochachka, Guppy, 1987; Pinder et al., 1992). Способность чесночницы переносить в течение длитель-

ного времени гипоксию обусловлена, очевидно, активацией гликолиза в сочетании с подавлением метаболизма. Пониженная температура снижает активность животных и скорость метаболизма, а физиологическая и метаболическая пластичность обеспечивает экономию энергетических затрат; совокупный эффект этих факторов направлен на поддержание метаболизма на минимальном уровне, обеспечивающем выживание (Boutilier et al., 1997). Исходя из малых размеров “депо” (печени и жировых тел) и невысокого содержания запасенных ресурсов (липидов и гликогена), можно предположить, что роль подавления метаболизма для выживания при длительной зимовке у чесночницы должна быть очень высока.

Условия зимовки в природе

Основание супесчаного шлейфа, где расположена площадка (см. рис. 2) для сезонного мониторинга температур и содержания кислорода в грунтовой среде, служит местом зимовки чесночниц, размножающихся поблизости в пойменных озерах. Отловы канавками с цилиндрами (Алексеев и др., 2011) показали высокую численность чесночницы и ее доминирование среди отловленных животных на ксерофитных злаковых лугах (табл. 4). В четырех других биотопах (пойменный ивовый лес, пойменные гигрофитный и разнотравный остепненный луга и нагорная дубрава на склонах) в течение августа–ноября пойманы единичные особи (Алексеев и др., 2011).

В песчаном грунте экспериментальной площадки обе зимы концентрация кислорода по всей глубине профиля, даже на глубине 240 см, была близка к атмосферной.

Как свидетельствуют исследования по сезонной динамике газового обмена в легких грунтах (Смагин, 2005), описанная нами ситуация ординарна: на предельно исследованной глубине в 240 см концентрация кислорода мало отличается от аналогичного показателя в атмосферном воздухе.

Подчеркнем, что гумусовый горизонт под указанной площадкой мониторинга тонок, выражен фрагментарно из-за небольшого проективного покрытия растительности (50–60%), оползания песка по склону и ветрового сноса. Только в пре-

делах первого метра было заметно неравномерное окрашивание гумусовыми потеками. В разрезе грунта до глубины почти 300 см супесь была однородна — без прослоев инородного материала. Таким образом, условия аэрации были равномерны по всему профилю.

Можно ожидать замедление аэрации грунтов в случае промерзания верхнего горизонта почвы. Но в течение двух зимних периодов наблюдений промерзания не было. Для автоморфных почв легкого гранулометрического состава с невысокой полевой влагоемкостью (3–6%) аэрация мало меняется по сезонам и остается высокой по всему профилю (Взаимодействие ..., 1985; Гаель, Смирнова, 1999). И лишь в тяжелых (в крайнем варианте — глинистых) грунтах газообмен затруднен, поэтому в устроенных здесь животными норах могут создаваться гипоксические условия (Chew et al., 2004).

Супеси и другие рыхлые субстраты, очевидно, важны для роющих амфибий, т.к. их легче рыть. Но служит ли содержание кислорода в грунтах, мало отличимое от атмосферного на уровне земли, привлекательным фактором для чесночницы Палласа, не очевидно. Некоторые роющие виды амфибий выбирают микробиотопы с гипоксическими условиями для того, чтобы замедлить метаболизм и, тем самым, снизить энергетические затраты и замедлить накопление токсичных метаболитов. Так, возвращаясь к *Cyclorana alboguttata*, напомним, что при выборе условий гибернации она предпочитает нормоксии гипоксию (9%), не жесткую, но ускоряющую наступление метаболической депрессии (Rossi et al., 2020). В природе этот вид достигает подобного эффекта путем зарывания в глинистый грунт и создания кокона из сброшенной кожи и слизи. Некоторые виды рыб, например, мангровый ривулус (*Kryptolebias marmoratus* (Poeu 1880)), при отсутствии воды так же выбирают микробиотопы с гипоксическими условиями (Rossi, Wright, 2020).

Чесночница Палласа проводит на зимовке более полугод, и экономия энергетических резервов путем замедления метаболизма, по-видимому, актуальна для нее. Зимовочные камеры в песчаном грунте представляют собой не более чем полости с едва уплотненными стенками; никто из исследователей не отмечает использования слизи, шкурок от линьки и т.д. Остается предположить, что уменьшение энергетических затрат достигается действием пониженной температуры.

Температуры грунтов на экспериментальной площадке в долине р. Оки в смежные зимы (теплую и малоснежную 2019–2020 гг. и суровую, но многоснежную 2020–2021 гг.) различались незначительно (см. табл. 3) благодаря сочетанию тем-

ператур воздуха и мощности снежного покрова. В 2019–2020 гг. значения температуры на всех глубинах были положительны, но и зимой 2020–2021 гг. они понизились лишь до $-1...-2^{\circ}\text{C}$ только в горизонте 5 см (при температурах воздуха -12°C и снежном покрове 2 см). В конце марта в год с холодной, но снежной зимой в слое грунта на глубине 80 см температура опускалась до 0.4°C . Тогда же на глубинах 160 и 240 см она понизилась до 2.2 и 3.7°C , соответственно (см. табл. 3).

Между тем для чесночницы температура 3°C на глубине зимовки (примерно 1.5 м) рассматривается как благоприятная (Ермохин и др., 2013). В нашей лаборатории животные при 3°C благополучно зимовали в течение 4–7 месяцев. В природе продолжительность зимовки может быть, вероятно, и большей. Таким образом, даже в снежные зимы минимальные температуры грунта на глубине 160 см оказываются ниже (как считалось) благоприятных. Нетрудно допустить, что здесь в грунтах в холодные и малоснежные зимы может быть еще холоднее даже на большей глубине. Отсюда следует, что либо чесночницы зарываются глубже 160 см, либо зимуют при меньших, чем 3°C (но не отрицательных) температурах. Именно поэтому восточная граница ареала чесночницы Палласа в Зауралье связана с нулевой изотермой, которая проходит в грунтах на глубине 160 см (Берман и др., 2020).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная работа показала, что чесночница Палласа — вид, способный длительно (более месяца) без видимого ущерба находиться при концентрации кислорода в 10 раз ниже атмосферной нормы. Более того, в гипоксии она пребывает в активном, хотя и заторможенном, состоянии.

В типичных же местах зимовки чесночницы Палласа — в песчаных массивах, слагающих борт долины реки, и на характерной глубине, вероятно, более 160 см — воздух в грунтах по содержанию кислорода лишь незначительно отличается от атмосферного. Таким образом, хотя чесночница может переносить глубокую гипоксию, в исследованном (типичном для нее) месте зимует, не испытывая дефицита кислорода. Выявленная ситуация позволяет полагать, что выбор рыхлых грунтов связан не с их превосходной аэрацией, а с легкостью рытья.

Чесночница Палласа проводит в зимовке более полугод, имея малые размеры запасующих органов, низкое содержание жиров и гликогена в них. Исходя из этого, можно предположить, что для обеспечения выживания чесночнице необходимо иметь небольшую скорость расхода резервных веществ (существенное подавление метабо-

лизма), что и наблюдалось у взрослых самок в лаборатории даже при нормальном содержании кислорода. Важную роль в инициации метаболической депрессии, вероятно, играют низкие положительные температуры в местах гибернации. Контрольные животные провели в условиях лабораторной зимовки более полугода при температуре 3°C, которая считается оптимальной для вида зимой (Ермохин и др., 2013). Между тем в окрестностях г. Калуги в холодные и даже с обильным снегом зимы температуры в грунтах на глубине 160 см падают до 2.2°C; следовательно, в морозные и бесснежные зимы грунты на названной глубине могут охлаждаться еще сильнее. Если чесночницы зимуют не при 3°C, а при более низких (1–2°C) температурах, метаболическая депрессия, весьма вероятно, может быть еще глубже, а расход энергетических ресурсов, соответственно, — ниже. Таким образом, за успешность зимовки в песчаных грунтах ответственна низкая температура, но не гипоксия.

В классе амфибий известен единственный вид (сибирская лягушка), который переносит полную аноксию на зимовке в воде. По результатам настоящей работы чесночницу Палласа ныне можно рассматривать как наиболее устойчивый к гипоксии вид, зимующий в необводненных грунтах (т.е. в воздушной среде) при положительных температурах.

Полученный результат открывает возможность использования чесночницы Палласа (как и других видов рода, а также, вероятно, лопатоногов и роющих жаб) в качестве модельных животных для экспериментальных целей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность профессору А.В. Смагину за неоценимые консультации и замечания к тексту рукописи, С.К. Алексею и В.А. Корзинову — за помощь в выборе экспериментальной площадки, В.Г. Табачишину — за предоставление чесночниц для исследований, С.М. Голубцову и Е.А. Андрияновой за транспортировку животных в Магадан.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (РНФ) [грант № 21-74-20050].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальные протоколы были одобрены Комитетом по биоэтике Института биологических проблем Севера ДВО РАН (Разрешение № 001/021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексеев С.К., Рогуленко А.В., Корзинов В.А., 2011. Результаты учетов земноводных в районе озера Тишь в 2010 году // Природа и история Поугорья. Вып. 6. Калуга: Ноосфера. С. 121–124.
- Банников А.Г., Денисова М.Н., 1956. Очерки по биологии земноводных. М.: Учпедгиз. 168 с.
- Берман Д.И., Алфимов А.В., Булахова Н.А., 2020. Игра в карты, или почему чесночница Палласа не идет на восток // Природа. № 11. С. 22–36.
- Берман Д.И., Булахова Н.А., 2019. Граница на за море, или что не пускает травяную лягушку из Европы в Азию // Природа. № 7. С. 12–26.
- Берман Д.И., Булахова Н.А., Балан И.В., 2017. Самая си-бирская лягушка // Природа. № 8. С. 3–14.
- Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Мильто К.Д., Розанов Ю.М., Халтурин М.Д., 2001. Криптическое видообразование у *Pelobates fuscus* (Amphibia, Pelobatidae): цитометрические и биохимические доказательства // Доклады РАН. Т. 376. № 5. С. 707–709.
- Бородин А.В., Солдатов А.А., 2019. Влияние аноксии на содержание и состав каротиноидов в тканях двусторчатого моллюска-вселенца *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // Российский журнал биологических инвазий. Т. 12. № 3. С. 2–12.
- Брем А.Э., 1895. Жизнь животных. Т. 7. Пресмыкающиеся. Земноводные. С.-Петербург: Издательство высочайше утвержденного товарищества “Общественная польза” и К^о. 835 с.
- Взаимодействие почвенного и атмосферного воздуха, 1985. М.: Изд-во Моск. ун-та. 107 с.
- Гаель А.Г., Смирнова Л.Ф., 1999. Пески и песчаные почвы. М.: ГЕОС. 252 с.
- Гаранин В.И., 1983. Земноводные и пресмыкающиеся Волжско-Камского края. М.: Наука. 175 с.
- Дебело П.В., Чибилев А.А., 2013. Амфибии и рептилии Урало-Каспийского региона. Серия: Природное разнообразие Урало-Каспийского региона. Т. III. Екатеринбург: УрО РАН. 400 с.
- Емельянов А.А., 2018. Амфибии и рептилии Советского Дальнего Востока. Владивосток: Дальнаука. 416 с.
- Ермохин М.В., Табачишин В.Г., Иванов Г.А., Богословский Д.С., 2013. Особенности размещения чесночницы обыкновенной (*Pelobates fuscus*) в почвенном профиле в начале зимовки в долине р. Медведица // Современная герпетология. Т. 13. Вып. 1/2. С. 22–26.
- Искакова К., 1959. Земноводные Казахстана. Алма-Ата: Изд-во Акад. наук Каз. ССР. 92 с.
- Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Боркин Л.Я., Скорин Д.В., 2008. Молекулярно-биохимические и цитогенетические аспекты микроэволюции у бесхвостых амфибий фауны России и сопредельных стран // Вопросы герпетологии. Материалы Третьего съезда Герпетологического общества им. А.М. Никольского 9–13 октября 2006 г. Пушино-на-Оке. Санкт-Петербург. С. 247–257.
- Решетникова Н.М., Шмытов А.А., Крылов А.В., 2011. Уникальный природный комплекс “Толстова гора” и озеро Тишь // Природа и история Поугорья. Вып. 6. Калуга: Ноосфера. С. 27–39.

- Северин С.Е., Соловьева Г.А., 1989. Практикум по биохимии. М.: Изд-во МГУ. 509 с.
- Смагин А.В., 2005. Газовая фаза почв. М.: Изд-во Моск. ун-та. 301 с.
- Смагин А.В., Садовникова Н.Б., Глаголев М.В., Кириченко А.В., 2006. Новые инструментальные методы и портативные электронные средства контроля экологического состояния почв и сопредельных сред // Экологический вестник Северного Кавказа. Т. 2. № 1. С. 5–16.
- Andreyeva A.Y., Soldatov A.A., Skverchinskaya E.A., Gambaryan S., Mindukshv I.V., 2018. Hypoxia inhibits the regulatory volume decrease in red blood cells of common frog (*Rana temporaria*) // Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology. Т. 219–220. С. 44–47.
- Armentrout D., Rose F.L., 1971. Some physiological responses to anoxia in the Great Plains toad, *Bufo cognatus* // Comparative Biochemistry and Physiology. V. 39. № 3. P. 447–455.
- Berman D.I., Bulakhova N.A., Meshcheryakova E.N., 2019. The Siberian wood frog survives for months underwater without oxygen // Scientific Reports. V. 9. 13594.
- Berman D.I., Bulakhova N.A., Meshcheryakova E.N., Yermokhin M.V., Tabachishin V.G., 2019a. Cold-hardiness of the common spadefoot *Pelobates fuscus* (Pelobatidae, Anura, Amphibia) // Cryo Letters. V. 40. № 5. P. 284–290.
- Bickler P.E., Buck L.T., 2007. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability // Annual Review of Physiology. V. 69. P. 145–170.
- Boutillier R.G., 2001. Mechanisms of metabolic defense against hypoxia in hibernating frogs // Respiration Physiology. V. 128. P. 365–377.
- Boutillier R.G., Donohoe P.H., Tattersall G.J., West T.G., 1997. Hypometabolic homeostasis in overwintering aquatic amphibians // Journal of Experimental Biology. V. 200. P. 387–400.
- Bradford D.F., 1983. Winterkill oxygen relations and energy metabolism of a submerged dormant amphibian, *Rana muscosa* // Ecology. V. 64. P. 1171–1183.
- Bulakhova N.A., Alfimov A.V., Berman D.I., 2020. The eastern boundary of the geographic range of the Pallas' spadefoot *Pelobates vespertinus* (Anura, Amphibia) is limited by overwintering temperatures // Herpetozoa. V. 33. P. 171–175.
- Bulakhova N.A., Meshcheryakova E.N., Berman D.I., 2023. Pallas' spadefoot *Pelobates vespertinus* (Pelobatidae, Amphibia) tolerates extreme hypoxia // The European Zoological Journal. V. 90. № 1. P. 431–442.
- Bulakhova N., Shishikina K., 2022. Pre-hibernation energy reserves and their consumption during freezing in the moor frog *Rana arvalis* in Siberia // European Zoological Journal. V. 89. № 1. P. 556–567.
- Bush F.M., 1963. Effects of light and temperature on the gross composition of the toad, *Bufo fowleri* // Journal of Experimental Zoology. V. 153. № 1. P. 1–13.
- Canal J., Delattre J., Girard M.L., 1972. Acquisitions nouvelles dans le dosage des lipides totaux du serum: description d'une methode nephelemetrique. Part 1. Technique manuelle // Annales de Biologie Clinique. V. 30. P. 325–332.
- Carvalho J.E., Navas C.A., Pereira I.C., 2010. Energy and water in aestivating amphibians // Aestivation. V. 49. P. 141–169.
- Chew S.F., Chan N.K., Loong A.M., Hiong K.C., Tam W.L., Ip Y.K., 2004. Nitrogen metabolism in the African lungfish (*Protopterus dolloi*) aestivating in a mucus cocoon on land // Journal of Experimental Biology. V. 207. P. 777–786.
- Costanzo J.P., Lee R.E.Jr., 1993. Cryoprotectant production capacity of the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica* // Canadian Journal of Zoology. V. 71. P. 71–75.
- Dufresnes C., Strachinis I., Tzoras E., Litvinchuk S.N., Denoël M., 2019. Call a spade a spade: taxonomy and distribution of *Pelobates*, with description of a new Balkan endemic // ZooKeys. V. 859. P. 131–158.
- Feder M.E., Burggren W.W., 1992. Environmental physiology of the amphibians. Chicago: University of Chicago Press. 646 p.
- Gamperl A.K., Milsom W.K., Farrell A.P., Wang T., 1999. Cardiorespiratory responses of the toad (*Bufo marinus*) to hypoxia at two different temperatures // Journal of Experimental Biology. V. 202. P. 3647–3658.
- Gehlbach F.R., Gordon R., Jordan J.B., 1973. Aestivation of the salamander, *Siren intermedia* // American Midland Naturalist. V. 89. P. 455–463.
- Hochachka P.W., Guppy M., 1987. Metabolic arrest and the control of biological time. Cambridge: Harvard University Press.
- Hong S.K., Park C.S., Park Y.S., Kim I.K., 1968. Seasonal changes of antiuretic hormone action on sodium transport across frog skin // American Journal of Physiology. V. 215. P. 439–443.
- Issartel J., Hervant F. de Fraipont M., Clobert J., Voituren Y., 2009. High anoxia tolerance in the subterranean salamander *Proteus anguinus* without oxidative stress nor activation of antioxidant defenses during reoxygenation // Journal of Comparative Physiology B. V. 179. P. 543–551.
- Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S., Kaelin Jr. W.G., 2001. HIF1a targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing // Science. V. 292. P. 464–468.
- Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.-M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., von Kriegsheim A., Heberstreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., 2001. Targeting of HIF-1α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation // Science. V. 292. P. 468–472.
- Kato K., 1910. Über das verhalten des glykogenes im eierstocke der frosche zu den verschiedenen jahreszeiten // Pflügers Archiv European Journal of Physiology. V. 132. P. 545–579.
- Koskela P., Pasanen S., 1975. Effect of thermal acclimation on seasonal liver and muscle glycogen content in the common frog, *Rana temporaria* L // Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology. V. 50A. P. 723–727.
- Kruhoffer M., Glass M.L., Abe A.S., Johansen K., 1987. Control of breathing in an amphibian, *Bufo paracnemius*: ef-

- fects of temperature and hypoxia // *Respiration Physiology*. V. 69. P. 267–275.
- Lavelle P., Spain A.V., 2001. Soil ecology. New York-Boston-Dordrecht-London-Moscow: Kluwer Academic Publishers. 654 p.
- Litvinchuk S.N., Crottini A., Federici S., De Pous P., Donaire D., Andersone F., Kalezić M.L., Džukić G., Lada G.A., Borokin L.J., Rosanov J.M., 2013. Phylogeographic patterns of genetic diversity in the common spadefoot toad, *Pelobates fuscus* (Anura: Pelobatidae), reveals evolutionary history, postglacial range expansion and secondary contact // *Organisms Diversity and Evolution*. V. 13. P. 433–451.
- Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.-W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R., Ratcliffe P.J., 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis // *Nature*. V. 399. P. 271–275.
- McAnaney J., Gheshmy A., Uthayalingam S., Reid S.G., 2006. Chronic hypoxia modulates NMDA-mediated regulation of the hypoxic ventilatory response in an amphibian, *Bufo marinus* // *Respiratory Physiology & Neurobiology*. V. 153. № 1. P. 23–38.
- McClanahan L.Jr., 1967. Adaptations of the spadefoot toad, *Scaphiopus couchi*, to desert environments // *Comparative Biochemistry and Physiology*. V. 20. P. 73–99.
- Navas C.A., Carvalho J.E., 2010. Aestivation. Molecular and Physiological Aspects. London-New York: Springer. 268 p.
- Pasanen S., Koskela P., 1974. Seasonal and age variation in the metabolism of the common frog, *Rana temporaria* L., in northern Finland // *Comparative Biochemistry and Physiology* A. V. 47A. P. 635–654.
- Pinder A.W., Storey K.B., Ultsch G.R., 1992. Estivation and hibernation // *Environmental Physiology of the Amphibians*. Feder M.E., Burggren W.W. (Eds). Illinois: University of Chicago Press. P. 250–274.
- Pörtner H.O., MacLatchy L.M., Toews D.P., 1991. Metabolic responses of the toad *Bufo marinus* to environmental hypoxia: An analysis of the critical PO_2 // *Physiological Zoology*. V. 64. № 2. P. 836–849.
- Rossi G.S., Cramp R.L., Wright P.A., Franklin C.E., 2020. Frogs seek hypoxic microhabitats that accentuate metabolic depression during dormancy // *Journal of Experimental Biology*. V. 223. jeb218743.
- Rossi G.S., Wright P.A., 2020. Hypoxia-seeking behaviour, metabolic depression, and skeletal muscle function in an amphibious fish out of water // *Journal of Experimental Biology*. V. 223. jeb213355.
- Ruibal R., Tevis L.J., Roig V., 1969. The terrestrial ecology of the spadefoot toad *Scaphiopus hammondi* // *Copeia*. V. 3. P. 571–584.
- Savage R.M., 1942. The Burrowing and Emergence of the Spade-Foot Toad, *Pelobates fuscus fuscus* Wagler // *Journal of Zoology*. V. A 112. P. 21–35.
- Semenza G.L., Neifelt M.K., Chi S.M., Antonarakis S.E., 1991. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. V. 88. P. 5680–5684.
- Seymour R.S., 1973. Energy metabolism of dormant spadefoot toads (*Scaphiopus*) // *Copeia*. V. 1973. № 3. P. 435–445.
- Shekhovtsov S.V., Bulakhova N.A., Tsentalovich Y.P., Zelentsova E.A., Yanshole L.V., Meshcheryakova E.N., Berman D.I., 2020. Metabolic response of the Siberian wood frog *Rana amurensis* to extreme hypoxia // *Scientific Reports*. V. 10, 14604.
- Smith C.L., 1950. Seasonal changes in blood sugar, fat bodies, liver glycogen and gonads in the common frog (*Rana temporaria*) // *Journal of Experimental Biology*. V. 26. № 4. P. 412–429.
- Tarnoky K., Nagy S. 1963. Spectrophotometric determination of glycogen with o-toluidine // *Clinica Chimica Acta*. V. 8. P. 627–628.
- Tracy C.R., Reynolds S.J., McArthur L., Christian K.A., 2007. Ecology of aestivation in a cococonforming frog, *Cyclorana australis* (Hylidae) // *Copeia*. V. 4. P. 901–912.
- Tattersall G.J., Ultsch G.R., 2008. Physiological ecology of aquatic overwintering in ranid frogs // *Biological Reviews*. V. 83. P. 119–140.
- Ultsch G.R., Anderson J.F., 1986. The Respiratory microenvironment within the burrows of gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*) // *Copeia*. V. 1986. № 3. P. 787–795.
- van Beurden E.K., 1980. Energy metabolism of dormant Australian water-holding frogs (*Cyclorana platycephalus*) // *Copeia*. V. 1980. P. 787–799.
- Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L., 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O_2 tension // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. V. 92. № 12. P. 5510–5514.
- Wang T., Luiz G.S., Branco and Mogens L. Glass., 1994. Ventilatory responses to hypoxia in the toad *bufo paracnemis* before and after a decrease in haemoglobin oxygen-carrying capacity // *Journal of Experimental Biology*. V. 186.
- Wells K.D., 2007. The ecology and behavior of amphibians. Chicago: University of Chicago Press. 1400 p.
- Withers P.C., 1978. Models of diffusion-mediated gas exchange in animal burrows // *American Naturalist*. V. 112. № 988. P. 1101–1112.
- Withers P.C., Richards S.J., 1995. Cocoon formation by the tree frog *Litoria alboguttata* (Amphibia: Hylodae). A water-proof taxonomic tool // *Journal of the Royal Society of Western Australia Royal Society of Western Australia*. V. 78. P. 103–106.
- Withers P.C., Thompson G.G., 2000. Cocoon formation and metabolic depression by the aestivating hylid frogs *Cyclorana australis* and *Cyclorana cultripes* (Amphibia: Hylidae) // *Journal of the Royal Society of Western Australia Royal Society of Western Australia*. V. 83. P. 39–40.
- Wood S., Malvin G. 1991. Physiological significance of behavioral hypothermia in hypoxic toads (*Bufo marinus*) // *Journal of Experimental Biology*. V. 159. P. 203–215.

**PALLAS' SPADEFOOT, *PELOBATES VESPERTINUS* (PALLAS 1771)
(AMPHIBIA, PELOBATIDAE), THE SECOND AMPHIBIAN SPECIES
TO TOLERATE EXTREME HYPOXIA**

D. I. Berman^{1, *}, N. A. Bulakhova^{1, **}, E. N. Meshcheryakova^{1, 2, *},
A. V. Rogulenko^{3, ***}, K. I. Shishikina^{1, ***}**

¹*Institute of Biological Problems of the North, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia*

²*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

³*Ugra National Park, Kaluga, 248003 Russia*

**e-mail: dber@yandex.ru*

***e-mail: sigma44@mail.ru*

****e-mail: kameshky@mail.ru*

Pallas' spadefoot is a Eurasian species of amphibian that winters for about half a year at a depth to 200 cm, always below the level of freezing, since it does not survive negative temperatures. However, significantly digging into the soil can cause oxygen deficiency. The minimum sufficient for a long-term existence of *Pelobates vespertinus* and the lethal oxygen content in the air were revealed, as well as metabolic pathways were evaluated under the conditions of normoxia and hypoxia in laboratory experiments. Beside this, the seasonal dynamics of temperatures and oxygen concentrations in sandy loam soils at different depths were determined in a typical wintering biotope of the species (the Oka River valley). Animals have been found to be capable of withstanding a tenfold decrease in oxygen content in soils compared to atmospheric oxygen for more than two months, thereby remaining quite active. When the concentration is decrease 20 times (up to 1%), a state of coma occurs, which is reversible if it lasts not more than a day. This shows a high degree of resistance of the species to stress resulting from reoxygenation and staying in an environment with variable oxygen levels. Thus, *P. vespertinus* is the second amphibian species following the Siberian frog (*Rana amurensis*), which can tolerate its complete absence for a long time (several months). Compared to body weight, the spadefoot has small storage organs (fat bodies and liver) and a low content of reserve substances (lipids and glycogen) in tissues, which are usually consumed at a low rate in normoxia at 3°C. During hypoxia, lipid utilisation is suspended and glycogen consumption is increased, indicating a shift from aerobic to predominantly anaerobic metabolism. The cumulative effect of reduced metabolism due to low temperature (3°C) and the activation of glycolysis due to the lack of oxygen provides a high level of resistance to hypoxia, distinguishing Pallas' spadefoot from other swarming amphibian species studied. The oxygen content in the ground air of typical places at wintering depths (in sandy massifs) is shown to coincide with the atmospheric oxygen. The ubiquitous choice by the species of wintering areas with loose soils is assumed to be associated not with their excellent aeration, but rather with the ease of digging. The results obtained seem to be promising for using the study spadefoot (and possibly other species of the spadefoot genus, as well as burrowing toads) as model for exploring the adaptations to air oxygen deficiency.

Keywords: burrowing amphibians, hypoxia, overwintering conditions, reserve substances