



**ANADOLU DAĞ KURBAĞALARININ
KRİYOBİYOLOJİSİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

DOKTORA TEZİ

Taner YOLDAŞ

Danışman

Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

Eylül 2021

Bu tez çalışması 18.FEN.BİL.30 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi BAPK tarafından desteklenmiştir.

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ANADOLU DAĞ KURBAĞALARININ
KRİYOBİYOLOJİSİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Taner YOLDAŞ

Danışman

Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

Eylül 2021

ÖZET

Doktora Tezi

ANADOLU DAĞ KURBAĞALARININ KRİYOBİYOLOJİSİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Taner YOLDAŞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

Bu araştırmada, Anadolu dağ kurbağalarından *R. macrocnemis* ve *R. holtzi*'nin donma sıcaklıklarına maruz kaldıkları kış dönemini hayatta kalarak atlattıklarını sağlayan stratejiler araştırıldı. Bu kapsamda kurbağaların donma, anoksi ve dehidrasyon koşullarına maruz kaldıklarında; önemli bir kriyoprotektan olan glikozun kan, iskelet kası ve karaciğer dokularındaki seviyeleri, kas ve karaciğer dokularındaki su miktarı, vücut ağırlıklarındaki değişiklikler ve amfibilere özgü antifriz proteinlerin (AFP'ler; FR10, Li16 ve Fr47) transkript ekspresyon seviyeleri incelendi.

Donma sırasında *R. macrocnemis* kan glikoz seviyesinde 3,3 kat ($1,35 \pm 0,25$ 'ten $4,45 \pm 0,51 \mu\text{mol mL}^{-1}$ 'ye), *R. holtzi* kan glikozunda da 4,5 kat ($1,90 \pm 0,25$ 'ten $8,67 \pm 2,22 \mu\text{mol mL}^{-1}$ 'ye) olarak artış kaydedilmiştir. Karaciğer dokusu glikoz miktarı; *R. macrocnemis*'de 6,7 kat ($5,66 \pm 0,15$ 'ten $38,27 \pm 8,53 \mu\text{mol g}^{-1}$ 'ye) ve *R. holtzi*'de de yaklaşık 6 kat ($2,25 \pm 0,46$ 'dan $13,36 \pm 1,32 \mu\text{mol g}^{-1}$ 'ye) artış göstermiştir. Karaciğer dokusu glikoz seviyesi anoksi ve dehidrasyon streslerine cevap olarak her iki türde de artış gösterdi. Dehidrasyon koşulları, kas dokusundaki glikoz seviyesini her iki tür için de donma ve anoksi koşullarına göre daha fazla arttırmıştır. Stres ve normalleşme koşullarında bazı AFP'lerin gen ekspresyon seviyelerinde önemli değişiklikler kaydedilmiştir. *R. macrocnemis* karaciğer dokusunda donma stresi *li16* geni transkript seviyesini yaklaşık 3,5 kat, anoksi stresi ise *fr47* ifadesini 2,7 kat artırmıştır. *R. holtzi*

karaciğer dokusunda donma, anoksi ve dehidrasyon koşullarının tamamında *fr10* geni yukarı yönlü regülasyon göstermiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasının sonuçları Anadolu dağ kurbağalarının dondurucu sıcaklıklarda hayatta kalabildiklerini ve donma toleransına sahip olduklarını göstermiştir. Bunun yanında bu süreçteki stratejilerinde önemli kriyoprotektanlardan biri olan glikozu kullandıkları ve kurbağalara özgü AFP'lerin donma ve ilişkili streslerde rol aldığı kaydedilmiştir. AFP'lerin genomik, transkriptomik ve proteomik araştırmalarının biyoinformatiği üzerine yoğunlaşılması, AFP'lerin buz kristallerine bağlanma ve kontrol etme mekanizmalarının aydınlatılmasını sağlayacaktır. Kriyoprotektanlar üzerine daha fazla araştırma yapılması Anadolu dağ kurbağalarının kriyobiolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

2021, xiii + 152 sayfa

Anahtar Kelimeler: Donma toleransı, Kriyobiyoloji, Anadolu dağ kurbağaları, Glikoz, Antifriz proteinler, Biyoinformatik.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INVESTIGATIONS ON CRYOBIOLOGY OF ANATOLIAN MOUNTAIN FROGS

Taner YOLDAŞ

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

This study investigated strategies that enable Anatolian mountain frogs (*R. macrocnemis* and *R. holtzi*) to survive the winter period when they are exposed to freezing temperatures. In this context, frogs were subjected to conditions of freezing, anoxia, and dehydration and examined in terms of the levels of glucose, as an important cryoprotectant, in the blood, skeletal muscle, and liver tissues, the amount of water in muscle and liver tissues, the changes in body weight, and the transcript expression levels of the amphibian-specific antifreeze proteins (AFPs) FR10, Li16, and FR47.

During freezing, the blood glucose level of *R. macrocnemis* increased 3.3-fold ($1.35 \pm 0.25 - 4.45 \pm 0.51 \mu\text{mol mL}^{-1}$) and that of *R. holtzi* 4.5-fold ($1.90 \pm 0.25 - 8.67 \pm 2.22 \mu\text{mol mL}^{-1}$). The liver tissue glucose level increased 6.7-fold ($5.66 \pm 0.15 - 38.27 \pm 8.53 \mu\text{mol g}^{-1}$) in *R. macrocnemis* and about 6-fold ($2.25 \pm 0.46 - 13.36 \pm 1.32 \mu\text{mol g}^{-1}$) in *R. holtzi*. The liver tissue glucose level increased in both species in response to anoxia and dehydration stresses. For both species, the glucose levels in muscle tissue increased more with the dehydration treatment than with the freezing and anoxia treatments. Significant changes were noted in the gene expression levels of some AFPs under stress and normalization conditions. In the liver tissue of *R. macrocnemis*, freezing stress increased the transcript level of the *li16* gene approximately 3.5-fold, and anoxia increased the *fr47* expression by 2.7-fold. The *fr10* gene was upregulated under all conditions (freezing, anoxia, and dehydration) in the liver tissue of *R. holtzi*.

Consequently, the results of this thesis study showed that Anatolian mountain frogs have the ability to survive in freezing temperatures and are freeze tolerant. Moreover, it was noted that in their strategies for this process, they use glucose, one of the important cryoprotectants, and that the frog-specific AFPs play a role in freezing and its associated stresses. Focusing on the bioinformatics of genomic, transcriptomic, and proteomic research on AFPs could provide clarification of the mechanisms by which AFPs bind to and control ice crystals. In addition, further research on cryoprotectants would provide a better understanding of the cryobiology of Anatolian mountain frogs.

2021, xiii + 152 pages

Keywords: Freeze tolerance, Cryobiology, Anatolian mountain frogs, Glucose, Antifreeze proteins, Bioinformatics.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ'e, araştırma ve yazım süresince yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Mustafa SÖZEN ve Prof. Dr. Nurşen ALPAGUT KESKİN'e, her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Tez çalışmama 18.FEN.BİL.30 kodlu proje desteği ile finansal kaynak sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Araştırmanın arazi ve laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteklerini esirgemeyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü lisans üstü öğrencilerine, Düzce Üniversitesi DÜBİT yönetimi ve personeline teşekkür ederim. Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı başta eşim Öğr. Gör. Pınar AĞYAR YOLDAŞ olmak üzere tüm aileme ayrıca teşekkür ederim.

Taner YOLDAŞ
Afyonkarahisar 2021

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ.....	8
2.1 Sıra Dışı Sıcaklıklarda Hayatta Kalma	8
2.1.1 Donmadan Kaçınma Davranışı	9
2.1.2 Donma Toleransı Davranışı	12
4.1.2.1 Donma Toleransı Davranışının Temel İlkeleri	12
2.2 Donma ve Normalleşme Döngüsündeki Stresler ve Mücadele	19
2.2.1 Donma Koşulları	19
2.2.2 Dehidrasyon Koşulları	21
2.2.3 Anoksi Koşulları	23
2.2.4 Metabolit Biriktirme	24
2.3 Donma Toleransı Adaptasyonları	27
2.3.1 Hipometabolizma	27
2.3.1.1 Epigenetik Mekanizmalar	29
2.3.1.2 Mikro RNA'ların (miRNA) Etkisi	30
2.3.1.3 Hücre Sinyal Kontrolü	31
2.3.1.4 Hücre Döngüsü Kontrolü	31
2.3.1.5 Anti Apoptosis	32
2.3.2 Kriyoprotektan Biriktirme	33
2.3.2.1 Glikoz	34
2.3.2.2 Gliserol	38
2.3.2.3 Üre	38
2.3.2.4 Antioksidanlar	39
2.3.3 Antifriz Proteinler	40

2.3.3.1 FR10.....	45
2.3.3.2 Li16	46
2.3.3.3 FR47.....	46
2.3.3.4 FR10, Li16 ve FR47 Proteinlerinin Biyoinformatiği.....	47
2.4 Anadolu Dağ Kurbağaları ve Habitat Koşulları	50
2.4.1 Anadolu Dağ Kurbağalarının Sistematiği.....	52
2.4.2 Anadolu Dağ Kurbağalarının Populasyon Durumu ve Dağılımı.....	53
2.4.3 Anadolu Dağ Kurbağalarının Karşılaştığı Tehditler.....	55
3. MATERYAL ve METOT.....	58
3.1 Arazi Çalışmaları ve Deney Grupları	58
3.2 Deney Koşulları.....	63
3.2.1 Donma ve Çözünme Koşulları.....	64
3.2.2 Anoksi ve Reoksi Koşulları	66
3.2.3 Dehidrasyon ve Rehidrasyon Koşulları	67
3.3 Kurbağalardan Doku Örneklemesi	67
3.4 Vücut Ağırlığı ve Doku Su Miktarı Ölçümleri.....	69
3.5 Glikoz Tayini.....	69
3.6 Antifriz Proteinlerin Gen Ekspresyonu	70
3.6.1 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	70
3.6.2 Ters Transkriptaz PCR Çalışması.....	73
3.7 İstatistiksel Analiz	77
4. BULGULAR.....	78
4.1 Arazi Çalışmaları.....	78
4.2 Donma ve Hayatta Kalma.....	79
4.3 Ağırlık Değişimi ve Dokuların Su Miktarı.....	81
4.4 Glikoz Analizi	86
4.4.1 <i>R. macrocnemis</i> Glikoz Konsantrasyonları	86
4.4.2 <i>R. holtzi</i> Glikoz Konsantrasyonları	89
4.4.3 <i>R. macrocnemis</i> ve <i>R. holtzi</i> Glikoz Konsantrasyon Karşılaştırmaları.....	92
4.5 Gen Ekspresyon Analizi	96
4.5.1 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	96
4.5.2 RT-qPCR Sonuçları	96
4.5.2.1 <i>R. macrocnemis</i> Antifriz Proteinleri	97
4.5.2.2 <i>R. holtzi</i> Antifriz Proteinleri.....	100

5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	103
5.1 Dokulardaki Su Miktarı ve Vücut Ağırlığı.....	105
5.2 Kriyoprotektan Olarak Glikozun Durumu.....	107
5.2.1 Kan Glikoz Seviyesi	107
5.2.2 Kas ve Karaciğer Dokularında Glikoz Seviyesi	108
5.3 Antifriz Proteinlerin Durumu	112
5.3.1 <i>fr47</i> Gen Ekspresyonu	112
5.3.2 <i>li16</i> Gen Ekspresyonu	113
5.3.3 <i>fr10</i> Gen Ekspresyonu	115
5.4 Sonuç	117
6. KAYNAKLAR.....	121
ÖZGEÇMİŞ.....	149

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µg	mikrogram
µl	mikrolitre
µmol	mikromolar
°C	Santigrat derece
ΔC _t	Ct değerleri arasındaki fark
ΔΔC _t	Delta Ct değerleri arasındaki fark
ddH ₂ O	Bidistile su
dH ₂ O	Distile su
dk.	dakika
g	gram
kDa	kilodalton
mL	mililitre
ng	nanogram
sn.	saniye
w/v	Ağırlık / hacim

Kısaltmalar

ACC	Asetil Co-A karboksilaz
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl	B-hücreli lenfoma protein ailesi
cAMP	Siklik adenozin mono fosfat
Cdk	siklin-bağı-kinaazlar
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CR	Kritik derecede nesli tükenmekte olan
DNA	Deoksiribonükleik asit
GP	glikojen fosforilaz
HSP	Sıcaklık şoku proteini
IBP	Buz bağlayıcı protein
INP	Buz çekirdekleyici protein
IUCN	Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği
KOH	Potasyum hidroksit
LC	Asgari Endişe
LC MS	Sıvı kromatografisi Kütle Spektrometre
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MS/MS	Tandem kütle spektrometresi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PhK	Glikojen fosforilaz kinaz
PKA	Protein kinaz A
RNA	Ribonükleik asit
RT-qPCR	Ters transkriptas kantitatif PCR
SVL	Snout-vent length
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 <i>R. sylvatica</i> 'nın 4 ile -2,5°C arasındaki donma ve çözünme döngüsünün şematik gösterimi.	21
Şekil 2.2 Donma stresine karşı korunan ve korunmayan hücrelerin durumu.....	26
Şekil 2.3 Omurgalı canlılardaki metabolizma özeti.	35
Şekil 2.4 Karaciğer ve kas ve kan dokusunda glikoz döngüsü ve taşınımı.	36
Şekil 2.5 Glikojenoliz süreci, hücrelerin glikojenden glikoz elde etme prosesi.....	37
Şekil 2.6 AFP lerin buz kristali yüzeyine bağlanması.....	43
Şekil 2.7 FR10, Li16 ve FR47 proteinlerinin 3B yapıları ve hücre zarı ile etkileşim modelleri.....	48
Şekil 2.8 Türkiye 5 cm ortalama toprak sıcaklığı dağılım haritası.....	51
Şekil 3.1 Anadolu dağ kurbağalarının toplanıldığı arazi bölgeleri.....	58
Şekil 3.2 <i>R. macrocnemis</i> arazi çalışmasında kullanılan rotayı gösteren GPS izlek görüntüsü.	59
Şekil 3.3 <i>R. holtzi</i> arazi çalışmasında kullanılan rotayı gösteren GPS izlek görüntüsü.	60
Şekil 3.4 <i>R. tavasensis</i> arazi çalışmasında kullanılan rotayı gösteren GPS izlek görüntüsü.	62
Şekil 4.1 Donma esnasında kaydedilen datalogger verilerine ait bir örnek.	81
Şekil 4.2 <i>R. macrocnemis</i> ve <i>R. holtzi</i> türlerine ait stres koşulları öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarındaki değişim.....	82
Şekil 4.3 <i>R. macrocnemis</i> türünde iskelet kası ve karaciğer dokusu su miktarı.	83
Şekil 4.4 <i>R. holtzi</i> türü iskelet kası ve karaciğer dokusu su miktarı.	84
Şekil 4. 5 <i>R. macrocnemis</i> 'in stres koşulları altında kan glikoz seviyesi.	87
Şekil 4.6 <i>R. macrocnemis</i> 'in stres koşulları altında karaciğer dokusu glikoz seviyesi. .	88
Şekil 4.7 <i>R. macrocnemis</i> 'in stres koşulları altında iskelet kası dokusu glikoz seviyesi.	89
Şekil 4.8 <i>R. holtzi</i> 'nin stres koşulları altında kan glikoz seviyesi.	90
Şekil 4.9 <i>R. holtzi</i> 'nin stres koşulları altında karaciğer dokusu glikoz seviyesi.....	91
Şekil 4.10 <i>R. holtzi</i> 'nin stres koşulları altında iskelet kası dokusu glikoz seviyesi.....	92
Şekil 4.11 <i>R. macrocnemis</i> ve <i>R. holtzi</i> türlerine ait deney koşullarına bağlı kan glikoz konsantrasyonları.....	93
Şekil 4.12 <i>R. macrocnemis</i> ve <i>R. holtzi</i> 'nin stres koşullarında kontrole göre kan glikoz seviyesi değişim katsayıları.....	93
Şekil 4.13 <i>R. macrocnemis</i> ve <i>R. holtzi</i> türlerine ait deney koşullarına bağlı karaciğer glikoz konsantrasyonları.....	94

Şekil 4.14 <i>R. macrocnemis</i> ve <i>R. holtzi</i> 'nin stres koşullarında kontrole göre karaciğer glikoz seviyesi değişim katsayıları.....	94
Şekil 4.15 <i>R. macrocnemis</i> ve <i>R. holtzi</i> türlerine ait deney koşullarına bağlı iskelet kası glikoz konsantrasyonları.....	95
Şekil 4.16 <i>R. macrocnemis</i> ve <i>R. holtzi</i> 'nin stres koşullarında kontrole göre iskelet kası glikoz seviyesi değişim katsayıları.....	95
Şekil 4.17 <i>R. macrocnemis</i> karaciğer dokusunda AFP'lerin deney koşullarına karşı cevabı.....	98
Şekil 4.18 <i>R. macrocnemis</i> iskelet kası dokusunda AFP'lerin deney koşullarına karşı cevabı.....	99
Şekil 4.19 <i>R. holtzi</i> karaciğer dokusunda AFP'lerin deney koşullarına karşı cevabı...	101
Şekil 4.20 <i>R. holtzi</i> iskelet kası dokusunda AFP'lerin deney koşullarına karşı cevabı.	102
Şekil 5.1 <i>R. macrocnemis</i> kan, karaciğer ve kas dokularında glikoz konsantrasyonları grafiği.	110
Şekil 5.2 <i>R. holtzi</i> kan, karaciğer ve kas dokularında glikoz konsantrasyonları grafiği.	111

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Literatüre kaydedilmiş donma toleranslı amfibiler.	16
Çizelge 3. 1 <i>R. macrocnemis</i> ve <i>R. holtzi</i> türleri için kullanılan maruziyet grupları çizelgesi.	63
Çizelge 3.2 RT-qPCR reaksiyon karışım oranları ve real time PCR döngü koşulları....	75
Çizelge 3.3 <i>α-tubulin</i> , <i>fr47</i> , <i>li16</i> ve <i>fr10</i> gen bölgelerine ait primerler.	76
Çizelge 4.1 Arazi çalışmaları fiziksel koşullar.	78
Çizelge 4.2 <i>R. macrocnemis</i> ve <i>R. holtzi</i> 'nin karaciğer ve kas dokularındaki su içerikleri ve vücut ağırlıkları.....	85
Çizelge 4.3 <i>R. macrocnemis</i> plazma glikoz seviyesi.....	86
Çizelge 4.4 <i>R. macrocnemis</i> karaciğer dokusu glikoz seviyesi.....	87
Çizelge 4.5 <i>R. macrocnemis</i> iskelet kas dokusu glikoz seviyesi.	88
Çizelge 4.6 <i>R. holtzi</i> plazma glikoz seviyesi.	89
Çizelge 4.7 <i>R. holtzi</i> karaciğer dokusu glikoz seviyesi.	90
Çizelge 4.8 <i>R. holtzi</i> iskelet kas dokusu glikoz seviyesi.	91
Çizelge 4.9 <i>R. macrocnemis</i> karaciğer dokusunda kontrol, donma ve çözünme koşullarındaki <i>li16</i> geninin ekspresyon seviyesinin hesaplanma örneği.....	97
Çizelge 4.10 <i>R. macrocnemis</i> karaciğer dokusu AFP'ler gen ekspresyon seviyeleri özet tablosu.	98
Çizelge 4.11 <i>R. macrocnemis</i> kas dokusu AFP'ler gen ekspresyon seviyeleri özet tablosu.	99
Çizelge 4.12 <i>R. holtzi</i> karaciğer dokusu AFP'ler gen ekspresyon seviyeleri özet tablosu.	101
Çizelge 4.13 <i>R. holtzi</i> kas dokusu AFP'ler gen ekspresyon seviyeleri özet tablosu. ...	102

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 3.1 <i>R. macrocnemis</i> türüne ait örnek fotoğraflar.....	59
Resim 3.2 <i>R. macrocnemis</i> arazisine ait örnek fotoğraflar.....	60
Resim 3.3 <i>R. holtzi</i> 'nin doğal habitatından örnek görüntüler.....	61
Resim 3.4 <i>R. holtzi</i> arazisinden Karagöl'ün genel görünüm fotoğrafları.....	61
Resim 3.5 <i>R. tavasensis</i> türüne ait örnek fotoğraflar.....	62
Resim 3.6 <i>R. tavasensis</i> arazisi yapılan Çakıroluk lokalitesine ait genel görünüş.....	62
Resim 3.7 Hayvanların deney koşullarına maruz bırakılmadan önce SVL ölçümlerinin gerçekleştirilmesi.....	64
Resim 3.8 Kontrol koşullarının sağlandığı kabin ve kontrol grubu.	64
Resim 3.9 Donma koşulları ve donma deneyinin başlatılması.....	65
Resim 3.10 Anoksi ve reoksi deneyinin başlatılması ve inkübasyon koşulları.....	66
Resim 3.11 Rehidrasyon koşullarının oluşturulması ve inkübasyon ortamı.	67
Resim 3.12 Kan ve doku örnekleme. Sıvı azot tankı ve etiketli tüplere aktarım.....	68
Resim 3.13 Kan, karaciğer ve kas dokularında glikoz ölçümü.	70
Resim 3.14 PureZol ile RNA ekstraksiyonuna ait resimler.....	71
Resim 3.15 Nanodrop cihazı ve nanodrop cihazında nükleik asit ölçüm resimleri.	72
Resim 3.16 cDNA eldesi ve nanodrop ölçümleri.	73
Resim 3.17 PCR çalışmaları için ön hazırlıklar, primerlerin konsantrasyon ayarlanması ve kullanılan kit.	74
Resim 3.18 PCR reaksiyonlarının hazırlanması, 96 well plate yüklenmesi ve cihaza konulması.	75
Resim 4.1 Donma sonrası kurbağaların genel görünüşü.	80

1. GİRİŞ

Canlılar yaşamlarını sürdürebilmek için birçok çevresel koşula uyum sağlarlar. Bu koşullar canlıların beslenmeleri, gelişimleri, morfolojileri ve üremeleri gibi birçok faktör üzerinde etkilidir. Özellikle ortam sıcaklığı değişimleri soğukkanlı organizmalar için hayatta kalma konusunda belirleyici bir faktördür. Buna rağmen birçok omurgasız ve bazı soğukkanlı omurgalılar sıra dışı sıcak ya da soğuk koşullarda hayatta kalmayı başarırlar. Bu canlılar kendilerini aşırı sıcak ya da soğğun zararlarından koruyabilmek için bazı stratejilere sahiptirler. Geliştirilen stratejik değişimler organizmanın davranış ve fizyolojilerinde birtakım değişimler meydana getirir ve evrimsel süreçte hayatta kalma şanslarını artırır.

Ilıman iklimlerde kışın oluşan donma sıcaklıkları birçok hayvan türü için sorun teşkil etmektedir. Doğada memeliler ve kuşlar gibi endotermik hayvanlar kış mevsiminin dondurucu etkilerine karşı kısmi adaptasyon mekanizmalarına sahiptirler. Çünkü yüksek metabolik hızları ve homeotermik yapıları, genellikle yeterince bulamadıkları fazla miktarda yiyecek gerektirir. Bu nedenden dolayı ya daha ılıman ve yiyecek olanağı bol olan bölgelere göç etme davranışını sergilerler ya da metabolik hızlarını düşürerek kış uykusu gibi fizyolojik adaptasyon mekanizmaları ile hayatta kalabilirler (Green 2017).

Uzun süreli soğuk koşullar, ektotermik hayvanlarda endotermik hayvanlara göre daha tehlikeli olmaktadır. Bazı balık türleri hariç çoğu soğukkanlı organizma göç ve uygun aktivite seçenekleri olmadığından hayatta kalabilmek için kış uykusu, donmadan kaçınma veya donma toleransı arasında seçim yapmaları gerekir. Karasal ektotermik hayvanlardan kurbağalar da ortam sıcaklığına göre düşüş gösteren vücut sıcaklıklarını artıramadıkları için metabolik hızlarını düşürmek zorunda kalırlar (Pincheira-Donoso vd. 2013, Green 2017). Metabolik hızın düşürülmesi ile tetiklenen ekofizyolojik adaptasyon mekanizmaları aktifleşir ve donma sıcaklıklarında hayatta kalma şanslarını arttırırlar. Soğuk kış koşullarında hayatta kalabilen türler ya tamamen donmaktan kaçınırlar ya da vücut sıvılarının büyük bir kısmının donmasına tolerans gösterebilirler. Bu türlerde, donmanın zararlarından koruyucu ve buz formunun oluşmasını durdurucu ya da geciktirici olarak düşük molekül ağırlıklı karbonhidratlar ya da glikanlar kriyoprotektan olarak biriktirilir (Ultsch 2006, Green 2017).

Donma koşullarından kaçınma adaptasyon mekanizması genellikle tuzlu sularda gelgitlerin sık olduğu bölgelerdeki canlılarda, karada yaşayan eklembacaklılarda, omurgasızlarda ve yüzeydeki buzun sağladığı yalıtım nedeniyle neredeyse hiç donmayan göllerin dibinde kış dönemini geçiren hayvanlarda görülür. Birçok su kurbağası ve su kaplumbağası türleri arasında da kış soğuklarında yaygın olarak kullanılan korunma stratejisidir (Tattersall ve Ultsch 2008). Kış dönemini karada geçiren bazı türlerin yuva yapmaları, sürüngenlerin soğuktan yer altı sığınaklarına çekilmesi gibi davranışlar donmayı önlemelerinde yardımcı olur. Bazı böcek türleri de gliserol gibi kriyoprotektan biriktirmeleri sayesinde sıfırın altındaki çok düşük sıcaklıklarda bile donmayı tamamen önleyebilirler. Vücutlarında biriktirdikleri antifriz metabolitler ve proteinler organizmanın donma noktasını ortam sıcaklığının altına indirmesine izin verir (Kelleher vd. 1987, Green 2017). Donma koşullarından kaçınamayan omurgalı ektotermik bazı türler de vücut sıvısının büyük bir kısmının donmasını tolere edebilecek bir adaptasyon mekanizmasına sahiptirler. Doğada donma toleransı denilince vücut suyunun %50-65 oranlarında hücre dışı buz olarak birikmesi anlaşılır ki, buradaki amaç hücre içindeki sıvı formu korumak için suyun büyük bir kısmının hücre dışı buz kristali olmasını tolere edebilmektir. Donma toleransı birçok böcek, bazı gelgit bölgesi deniz yumuşakçaları, karada kış uykusuna yatan bazı amfibi ve sürüngenler için geçerli özel bir ekofizyolojik adaptasyon stratejisidir (Steiner vd. 2000, Green 2017, Storey ve Storey 2017).

Donma toleransı adaptasyon mekanizması beraberinde çok sayıda stresle birlikte gelir. Bu stresler (i) buz kristali oluşumunun hassas dokulara fiziksel zararı, (ii) hücrelerden hücre dışı buz kütlelerine su çıkışının neden olduğu dehidrasyon, (iii) oksijen ve besin maddelerini taşıyan kan akışının durmasına bağlı iskemi oluşumu, (iv) akciğer, kalp ve kan plazmasının donmasının neden olduğu anoksi fazı ve (v) nöronal sinyal iletiminin durmasına bağlı hayati süreçlerin durdurulması. Donma toleranslı hayvanlar çözünme (feedback) süreçlerinde de ortaya çıkan bazı sorunlarla baş etmek zorundadır. (vi) Oksijenli kanın ani reperfüzyonu nedeniyle oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) ve (vii) hücreler arası buzların çözünmesiyle suyun hücre içine girmeye çalışması sonucunda ortaya çıkan ozmotik basınç ile başa çıkılması gerekmektedir (McNally vd. 2003, Sullivan 2011). Tüm bu faktörler göz önünde bulundurularak yapılan çalışmalar göstermiştir ki, donma toleranslı organizmalar hücrelerini donmanın olumsuz etkilerine

karşı koruyan ve çözüldükten sonra normal fonksiyonlarını geri kazanmasını sağlayan birden fazla adaptasyona sahiptir. Bu adaptasyonlar canlıların değişen ekosistemlerde yaşam döngülerini sürdürmenin yanı sıra göç, üreme ve beslenme davranışını kolaylaştırır.

Donma toleranslı organizmalar kriyoprotektanlar, antifriz proteinler (AFP) ve antioksidan enzimler sayesinde kendilerini donmanın olumsuz etkilerinden koruyabilirler. Mevsimsel sıcaklık düşmeye başladığında donma olayı beklentisi ile vücutlarında yüksek miktarlarda kriyoprotektan biriktirirler. Yüksek konsantrasyonda kriyoprotektan maddenin vücut sıvılarında birikmesi donma yaralanmalarına karşı organizmayı koruyan en önemli faktördür. Bu metabolik ajanların (kriyoprotektanlar) vücut sıvılarındaki çözünen konsantrasyonunun artması, donma sıcaklığının ortam sıcaklığından daha aşağıya inmesini sağlar. Bunun dışında hücre içi buz kristali oluşumunu engeller ya da geciktirir (Storey ve Storey 2009, Sullivan 2011). Bilinen etkili kriyoprotektanlar glikoz, gliserol ve üredir. Glikoz gibi düşük molekül ağırlığa sahip diğer karbonhidratlar da kriyoprotektan olarak kullanılabilir. Bu düşük moleküler ağırlıklı kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonu, hücre hacminde zararlı bir azalmaya karşı kolligatif direnç sağlar ve hücre içi buz oluşumunu önlemek için makromolekülleri stabilize eder. Deri ve iskelet kası gibi periferik bölgelerin donmasıyla oluşan buz, iç organlara doğru hareket eder. Karaciğerde üretilen ve kan yoluyla dağılan kriyoprotektanların birikmesi, oluşan buz miktarını azaltır. Buz oluşumu ve kan dolaşımının durması periferik dokulara kriyoprotektan iletimini kesintiye uğratır. Bu yüzden sıcaklık düşmeye başladığında glikoz seviyesi hızla yükselir ve tüm organlara dağılır (Storey ve Storey 2005).

Glikanlar ve üre gibi kriyoprotektanların yanında AFP'ler de birçok organizmayı donma etkisine karşı koruyan biyokimyasal adaptasyon mekanizmalarından biridir. Günümüzde tıp, gıda ve endüstri alanlarında etkin biçimde kullanılan AFP'ler ilk kez Antarktik sularda bulunan Notothenioid'lerde tespit edilmiştir. Bu proteinler balıklarda olduğu gibi bazı bakteri, bitki ve böcek türlerinde de bulunan yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar içerisinde yer almaktadırlar. AFP'ler buz kristallerinin büyümesini önlerler ve canlıya donma olayının zararlarına karşı direnç sağlarlar. AFP'lerin milimolar

hatta nanomolar konsantrasyonları bile vücut sıvılarının donma noktalarını aşağı çekmek ve buz kristallerinin yeniden oluşması ya da büyümesini engellemek için yeterli olur. AFP'ler küçük buz kristallerinden büyük buz kristalleri oluşumunu engelledikleri için bazı kaynaklarda Buz Şekillendirici Protein (ISP, Ice Structuring Protein) olarak da isimlendirilir (Bektaş ve Altıntaş 2007).

Günümüzde küresel olarak gıda, endüstri ve tıp alanlarında sıklıkla kullanılan AFP'ler mikroorganizmalar, bitkiler, sürüngenler, balıklar ve amfibilerden temin edilmektedir. Antifriz proteinler adsorbsiyon-inhibisyon mekanizmaları ile termal histerisis (erime noktası düşmeden, donma noktasının düşürülmesi) etkilidirler. Bu özellikleriyle AFP'ler organ naklinde, trombositlerin korunmasında, habis tümörlerin yok edilmesinde, kriyocerrahide, hipotermi tedavisinde, bazı bitkilerin donma noktasını düşürerek kış etkilerinden korunmasında, sıcak su balıklarının daha serin sularda yetiştirilmesinde ve donmuş gıda endüstrisi gibi alanlarda kullanılmaktadırlar (Griffith ve Ewart 1995, Duman 2015, Tejo vd. 2020). Balıklar, AFP çalışmalarında en fazla çalışılan taksondur ve AFP'leri Tip 1 AFP, Tip 2 AFP, Tip 3 AFP ve Tip 4 AFP ve Antifriz glikoprotein (AFGP) biçiminde sınıflandırılmıştır (Yıldırım 2008). Balıklar gibi amfibilerde de donma esnasında birçok gen ve protein düzenlenmesi gerçekleşirken *fr10*, *fr47* ve *li16* genlerinin sadece amfibilere özgü donma toleransı ile ilişkili genler olduğu bilinmektedir (Storey ve Storey 2013). Bu genler donma, anoksi ve dehidrasyon koşullarında organizmanın doku ve hücrelerini korumada aktif rol oynamaktadır.

Birçok sürüngen türü yalnızca çok düşük olmayan sıcaklıklardaki kısa periyotlu donmaya dayanabilirken, bazı kaplumbağa ve kertenkele türlerinin düşük sıcaklıklardaki donmaya uzun süre maruziyete karşı güçlü donma toleransına sahip olduğu bilinmektedir (Ultsch 2006, Storey ve Storey 2017). Amfibilerde güçlü donma toleransı karasal hibernatör olan, kışı yaprak katmanları arasında ya da yüzeye yakın toprak altında geçiren türlerde görülür. Örneğin, *Rana sylvatica* ve *Pseudacris crucifer* gibi bazı türler vücutlarının %65 oranda tamamen buzlanmasını tolere edebilirler (Storey vd. 1992). Semenderlerdeki donma toleransının yaygın olmadığı düşünülmesine rağmen ayrıntılı araştırılmamıştır. Sibirya semenderi (*Salamandrella keyserlingii*) ve Schrenck semenderi'nin (*Salamandrella schrenckii*) -30 °C gibi sıra dışı dondurucu sıcaklıklarda hayatta

kaldıkları bilinmektedir (Berman vd. 1984, 2010, Berman ve Meshcheryakova 2012).

Donmanın iki ana sonucu hücresel dehidrasyon, iskemi ve / veya anoksidir. Donma altında uzun süreli karasal kış uykusu, çevresel suya erişimi kısıtlar ve bu da dehidrasyon oluşmasında bir faktördür. Ayrıca kış hazırlığı döneminde, hücre içi suyun hücre dışına atılması ile ozmolitlerin daha konsantre hale gelmesini sağlayan kısmi dehidrasyon oluşur ve bu durum donma esnasında suyun hücre dışı boşluklarda birikmesini ve zararsız bir buz biçimine dönüştürülmesini sağlar. Bu süreçte oluşan buz kristalleri, dokulardaki suyu uzaklaştırarak organların küçülmesine neden olur. Donma esnasında maruz kalınan kısmi dehidrasyon ya da suya erişimin kısıtlandığı durumlarda bazı amfibiler glikoz, gliserol ve üre gibi moleküllerin konsantrasyonunu hızla arttırarak bu streslerin doku ve organlarına verecekleri zararlardan korunurlar. Donma toleransının diğer bileşeni olan anoksi toleransı, özellikle kurbağaların donmanın neden olduğu anoksik ve / veya iskemik koşullarda hayatta kalmasına yardımcı olur. Hücreler, asidoz oluşumunu en aza indirerek ve anoksiye özgü gen / protein düzenlemesini aktive eder. Anoksi süreciyle başa çıkabilmek için adenozin trifosfat (ATP) üretimi anaerobik optimizasyon ile sağlanır. Bu nedenle donmaya toleranslı kurbağaların glikoz ve laktat seviyeleri hipoksi ve / veya anoksi koşulları altında artar. Hücreler, anaerobik enerji üretimi için endojen yakıtlara ihtiyaç duyar, bu yakıt ihtiyacını da kriyoprotektan moleküllerden temin ederler (Storey ve Storey 2004).

Birçok canlı türüne ev sahipliği yapan Türkiye subtropikal iklim yapısına sahip olmasına rağmen, yeryüzü şekilleri nedeniyle 4 mevsimin de görüldüğü bir coğrafyaya sahiptir. Özellikle sonbahar ve kış aylarında ülkemizin birçok bölgesi donma noktasının altındaki sıcaklıklara sahip olmaktadır. Anadolu'nun sert kış koşullarında bile birçok omurgasız ve soğukkanlı omurgalı hayvanlar hayatta kalmayı başarabilmektedirler. Bu canlı gruplarından birisi de amfibilerdir. Kış şartlarında su altında, toprak altında ya da taş veya kaya parçaları altında geçiren amfibilerin hayatta kalmalarını sağlayan etmenler vücutlarında buz kristallerinin oluşmasını ve büyümesini kontrol eden kriyoprotektan maddeler olmalıdır. Amfibilerdeki kriyoprotektanlar dünyanın birçok noktasında çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmesine rağmen, Türkiye amfibi türlerinde daha önce bu konuda yapılan bir araştırma bulunmamaktadır.

Rana macrocnemis (Boulenger 1885), *R. camerani* (Boulenger 1885), *R. holtzi* (Werner 1898) ve *R. tavasensis* (Baran ve Atatür 1986) Anadolu dağ kurbağa türleri genellikle 1000 m'den yüksek rakımlı bölgelerde dağılış gösterirler. Son yapılan moleküler çalışmalar Anadolu dağ kurbağalarını ülkemizde iki tür (*R. macrocnemis* ve *R. tavasensis*) olarak sınıflandırmıştır (Ergül Kalaycı vd. 2017). Bu tez kapsamında Uludağ kurbağası (*R. macrocnemis*) ve endemik Toros kurbağası (*R. holtzi*) çalışmalarda kullanılmıştır. Diğer bir endemik dağ kurbağası türü olan Tavas kurbağası (*R. tavasensis*), dar bir habitata sahip olup popülasyondaki hayvan sayısının tehlikeli düzeyde azalışta olmasından dolayı bu çalışma kapsamından çıkarılmıştır (Çapar 2015, Çapar ve Başkale 2016).

Anadolu dağ kurbağaları için aktif dönem genellikle Mayıs ayında başlar ve Ekim ayına kadar devam eder. Uludağ kurbağası olarak da bilinen *R. macrocnemis*, Kafkasya'nın orman ve subalpin kuşağında, Türkiye ve İran'daki bazı bölgelerde yaygın olarak bulunur. Uludağ kurbağası, Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği (International Union for Conservation of Nature, IUCN) kırmızı listesinde asgari endişe (LC) kategorisine dahil edilmiştir (Başoğlu ve Özeti 1973, Tarkhishvili ve Gokhleshvili 1999, Veith vd. 2002, Kuzmin vd. 2009, Çiçek 2011, Gidiş ve Başkale 2020). Anadolu dağ kurbağalarından ilki *R. macrocnemis*'tir ve Boulenger (1885) tarafından Bursa Uludağ'dan tanımlanmıştır. *R. macrocnemis* Güney, Batı ve Kuzey Kafkasya'ya kadar, Ülkemizde ise Batı, Kuzey ve Güney ve Doğu Anadolu Bölgeleri'nde dağılış gösterir (Najibzadeh vd. 2017a, Pesarakloo vd. 2020). Anadolu dağ kurbağa türlerinden diğer tür ise Toros kurbağası (*Rana holtzi*), Türkiye'nin güneyindeki Toros sıradağlarında bulunan Bolkar Dağları'na (> 2500 m yükselti) endemik olan kahverengi bir kurbağa türüdür (Kaya vd. 2005, Miaud vd. 2007, Guarino ve Erismis 2008) ve IUCN kırmızı listesinde kritik derecede nesli tükenmekte (CR) kategorisine alınmıştır (Kurtuluş vd. 2009).

Bu iki Anadolu dağ kurbağasının dağılım alanları birbirinden farklı ve birbirinden uzakta bulunsun da ikisi de kış uykusu döneminde donma sıcaklıklarına maruz kalmaktadır. İklim verileri göz önüne alındığında, bu türlerin habitatlarında dondurucu kış koşullarına maruz

kalmaktadırlar. Bu koşullara rağmen hayatta kalabilmeleri için donmaya tepki olarak iyi bir hayatta kalma stratejisine sahip olmaları gerekir. Şimdiye kadar bu türler ile ilgili sistematik durumları, populasyon büyüklüğü, beslenmeleri, patolojileri, serolojik, morfometrik, eritrometrik durumları gibi çalışmalar yapılmış olup, ancak donma ve ilişkili streslerine karşı hayatta kalma stratejilerine dair ekofizyolojik, biyokimyasal adaptasyon mekanizmaları hakkında bilgi bulunmamaktadır.

Bu bilgiler ışığında *Rana macrocnemis* ve *R. holtzi* türleri donma, dehidrasyon ve anoksi gibi ekstrem koşullarda ekofizyolojik, biyokimyasal ve davranış adaptasyon mekanizmaları ile hayatta kalma stratejileri araştırılmıştır. Bu bağlamda, Anadolu dağ kurbağalarının (*R. macrocnemis* ve *R. holtzi*) karaciğer, iskelet kası ve kanındaki glikoz seviyelerindeki değişiklikler araştırılmış, stres öncesi ve sonrası vücut kilo değişimleri takip edilmiş, kas ve karaciğer dokularındaki su kaybı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Her iki türün AFP'lerinin (FR10, FR47 ve Li16) donma, anoksi, dehidrasyon ve stres sonrası normalleşme gruplarındaki değişimleri mRNA trasnkript düzeyinde RT-qPCR tekniği ile incelenmiştir.

Türkiye amfibi türlerinin kriyobiyojisi üzerine yapılan ilk çalışma ile iki anur (*R. macrocnemis* ve *R. holtzi*) türünün yüksek donma toleranslı türler gibi glikozu kriyoprotektan olarak kullanıp kullanmadığı ve amfibilere özgü AFP'lerindeki gen ifade (ekspresyon) seviyelerindeki değişikliklerin incelenerek dondurucu kış koşullarındaki hayatta kalma stratejilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Sıra Dışı Sıcaklıklarda Hayatta Kalma

Yeryüzündeki birçok organizma değişken çevre koşullarında yaşamlarını idame ettirebilmek için bazı başarılı adaptasyonlara sahiptir. Göç, üreme, beslenme davranışları gibi adaptasyonlar farklı ekosistemlerde organizmaların yaşam döngülerine devam etmesine olanak sağlar. Aşırı sıcak ve kurak koşullar gibi ekstrem koşullarda bazı organizmalar, suya ve oksijene erişimin kısıtladığı için ozmoregülasyon mekanizmalarını düzenlenme ve / veya morfolojik yapılarında değişimler geçirmek suretiyle hayatta kalabilirler. Yaz uykusu da denilen estivasyon döneminde metabolik hızın düşürülmesi, sıcak şoku proteinleri (HSP, heat shock proteins), antioksidanların kullanımı gibi birçok metabolik adaptasyonlar rol alır. Sıcaklık ve kuraklığa karşı adaptasyonların aksine aşırı soğuklarda da organizmalar hayatta kalabilmek için özel stratejiler geliştirmişlerdir (Hermes-Lima ve Zenteno-Savín 2002, Robert 2003, Kontaş Aşkar vd. 2007, Storey ve Storey 2011, Hermes-Lima vd. 2015, Liu vd. 2018, Wu vd. 2018).

Ilıman iklimlerde kış mevsiminde oluşan donma sıcaklıkları hayvanlar için ölümlerle sonuçlanabilecek durumları beraberinde getirir. Homeotermik yapıları ve yüksek metabolik hızları nedeniyle birçok memeli ve kuş türü soğğun dondurucu etkilerinden korunmak için göç etme ya da metabolik hızlarını düşürerek kış uykusuna yatma gibi fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal adaptasyon mekanizmalarına sahiptirler (Willits ve Peet 1998, Saltveit 2001, Geiser 2004, Green 2017). Pek çok küçük endotermik memeli ve bazı kuş türleri (*Phalaenoptilus nuttallii*) besine erişimin kısıtlı olduğu dönemlerde göç ederken mesafe ve enerji kullanımları açısından dezavantajlı oldukları için hibernasyon davranışını kullanırlar. Bu süreçte fizyolojik ve metabolik faaliyetlerin azaltıldığı torpor halinde olurlar ve torporda vücut sıcaklıkları da düştüğü için sabit bir vücut sıcaklıkları olmaz bu sebeple kısmi heterotermik özellik gösterirler (Gür ve Gür 2010, Kart Gür vd. 2014, Woods vd. 2019, Geiser 2020).

Kış uykusu olarak da bilinen hibernasyon terimi sadece kışın meydana gelen mevsimsel bir davranış olarak kalmayıp bazı türlerde yılın büyük bölümünde görülebilir. Bayağı yediuyur olarak bilinen *Glis glis*'in üreme davranışı göstermediği sezonlarda 11 aya kadar

hibernasyonda kaldığı ve laboratuvar ortamında 7°C’de 12 aydan fazla hibernasyonda kalabildiği bildirilmiştir (Geiser 2007, Hoelzl vd. 2015). Bu tür gibi *Cercartetus nanus*, *Nyctophilus geoffroyi*, *Eliomys quercinus* memeli türleri de yıl boyu hibernasyon davranışı gösteren türler olarak sınıflandırılmıştır (Daan vd. 1991, Geiser 2007, Turbill ve Geiser 2008). Yaz ile ilkbahar arası hibernasyon davranışı gösteren türlere Anadolu yer sincabı (*Spermophilus xanthoprymnus*) ve *Marmota monax*; sonbahardan yaza kadar olan dönemdeki hibernatörlere *Myotis lucifugus*, *Myotis brandtii* ve *Zapus princeps*; sonbahardan ilkbahara hibernasyon davranışı gösterenlere *Cheirogaleus crossley*, *Erinaceus europaeus*, *Cricetus cricetus*, *Ursos arctos*, *Dryomys laniger*; kıştan ilkbahara hibernasyonda kalanlara *Tadarida teniotis*, *Jaculus orientalis*; kış döneminde hibernatör türler için *Meles meles*, *Phalaenoptilus nuttallii* türleri örnek olarak verilebilir (Kart Gür vd. 2009, 2014, Geiser 2013, 2020).

Bu sorun aynı zamanda kurbağalar gibi ektotermik hayvanlar için de mevcuttur, ancak vücut sıcaklığını yükseltemedikleri için, sadece metabolik hızlarını düşürmekle kalmayıp aynı zamanda donma sıcaklıklarında hayatta kalmanın yollarını bulmaları gerekir. Dondurucu kış koşullarına sahip habitatlarda soğukkanlı omurgalıların biyolojik çeşitliliği, sıcakkanlı omurgalılara göre nispeten daha düşüktür. Çünkü donma koşullardaki abiyotik faktörlerin yetersizliği nedeniyle bu koşullara uyum sağlayabilen hayvan türleri, vücut sıcaklığı ve metabolik hızı düşürmeleri yeterli gelmeyip, hayatta kalabilmek için farklı adaptasyon mekanizmaları gelişmek zorunda kalmışlardır (Pincheira-Donoso vd. 2013, Green 2017, García vd. 2018). Termal olarak korunaklı yuvaları olmayan ve 0 °C’nin altındaki sıcaklıklardan kaçınamayan türler hayatta kalmak için donmadan kaçınma (“freeze avoidance”) davranışı ya da donma toleransı (freeze tolerance) stratejilerini kullanabilir. *C. picta* ve *L. vivipara* gibi bazı omurgalı türlerin her iki stratejiyi de kullanabilmesi çok geniş coğrafi aralıklarda dağılışlarını genişletmelerine izin vermiştir (Storey ve Storey 2005, Storey 2006, Costanzo ve Lee 2013).

2.1.1 Donmadan Kaçınma Davranışı

Kış döneminin dondurucu çevre şartlarında hayatta kalabilmek için bazı hayvanlar donma seviyesinin üstündeki sıcaklıklarda konumlanırlar. Bu konuda bal arıları (*Apis mellifera*) kovanı sıcak tutmak için termoregülasyonu ayarlar, çeşitli kelebek ve yusufçuk türlerinin

kışı donmayan sularda larva olarak ve birçok böcek türü de toprağın derin bölümlerinde yuva yaparak geçirir (Storey ve Storey 2010, 2017, Duman ve Newton 2020). Donma koşullarına maruz kalmayan, donma koşullarından fiziksel olarak kaçınan *Rana pipiens*, *R. catesbeiana* ve *R. ridibundus* gibi birçok sucul kurbağa türü ve *Trachemys scripta elegans* gibi sucul kaplumbağalar epipalejik zon bu buz ile kaplı göllerin bentik zonunda saklanıp fiziksel olarak donma sıcaklıklarından kaçınıp hayatta kalırlar (Voituron vd. 2005, Tattersall ve Ultsch 2008, Costanzo ve Lee 2013, Wijenayake ve Storey 2016, Lung 2019). Birçok memeli ve kuş türü gibi *Catharus ustulatus*, *Phylloscopus trochilus* ve *Danaus plexippus* gibi bazı böcekler de daha ılıman bölgelere göç ederek donma sıcaklıklardan kaçınırlar (Lung 2019, Merlin ve Liedvogel 2019).

Dondurucu çevresel sıcaklıklardan kaçınamayan türler ise ya çok yüksek miktarda antifriz özellikli metabolitler biriktirerek vücut sıvılarının donma noktasını çevresel sıcaklığın altına indirerek (donmadan kaçınma davranışı) ya da vücut sıvılarının bir kısmının (%50-65) buzlanmasına izin vererek (donma toleransı) hayatta kalabilir.

Donmadan kaçınma davranışı, vücut sıvılarının donma sıcaklığını, çevresel sıcaklığın altına indirildiği mekanizmaların kullanıldığı bir adaptasyon davranışıdır. Normal koşullardaki teleost balıkların kanları -0,5 °C de donarken, soğuk sularda yaşayan deniz balıklarının (Notothenioidei) antifriz özellikli kriyoprotektan maddeler ile vücut sıvılarının donma noktalarını düşürerek -1,9 °C'deki çevre koşullarında yaşayabildikleri bildirilmiştir (Costanzo vd. 1995b). Pek çok böcek ve diğer eklembacaklılar bu stratejiyi kullanarak -40 °C gibi aşırı soğuk koşullarda bile vücut sıvılarını donmadan koruyabilmektedir. Ayrıca odunsu bitkilerin tomurcuk ve ksilem dokularının primordium dokularında da donma gerçekleşmeden aşırı soğuma özelliği görülebilir (Storey ve Storey 1988, 2005, Duman vd. 1991a).

Donmadan kaçınma davranışı sulu çözeltilerin iki fiziksel özelliği üzerine inşa edilir. Bu özelliklerin ilki solüsyonların kolligatif özelliği, içerisinde çözünen madde miktarının artması ile donma noktasının aşağıya çekilmesidir. Donmadan kaçınma davranışı sergileyen hayvanlarda birçok polihidrik alkol ve şekerin antifriz özellikli maddeler olarak kullanıldığı bilinmektedir fakat bunlardan en yaygını gliseroldür. İkinci özellik ise

süper soğuma fenomeni (supercooling)'dir. Bu özellik sulu çözeltilerin donma gerçekleşmeden suyun donma noktasının altındaki sıcaklıklara soğuyabilmesidir. Vücuttaki suyun donması için gerekli sıcaklık noktasına süper soğuma noktası (SCP, “supercooling point”) adı verilir (Kelleher vd. 1987, Storey ve Storey 1988, 2005, 2012, Duman vd. 1991a, Costanzo vd. 1995a, Duman 2015, Lung 2019).

Donmadan kaçınma (süper soğuma) adaptasyonu gösteren türler donma sıcaklıklarındaki çevre koşullarına rağmen vücut sıvılarının donmasını engelleyerek donma etkilerinden korunurlar (Ultsch 2006, Costanzo vd. 2008, 2015, Costanzo 2019). Bu durumu kullanan su kaplumbağalarından *Chrysemys picta*'nın -20 °C'ye kadar, *Graptemys geographica* ise -14,8 °C'ye kadar SCP noktası göstererek donmadan kaçınarak hayatta kalabildikleri rapor edilmiştir (Baker vd. 2003, Costanzo vd. 2008, Costanzo ve Lee 2013). Donmadan kaçınma davranışında oldukça başarılı olan bir diğer ektotermik tür *Lacerta vivipara*'nın vücut glisemik seviyesini dört kat arttırarak -3,5 °C de 3 haftaya kadar vücut sıvıları donmadan hayatta kalabildiği rapor edilmiştir (Costanzo vd. 1995a, Voituron vd. 2002b, 2004). *Podarcis muralis* ve *P. sicula* duvar kertenkeleleri gibi *Thamnophis sirtalis* de ve *Vipera berus* yılan türlerinin de düşük donma toleranslı olup daha çok donmadan kaçınma davranışı sergilediği bildirilmiştir (Costanzo vd. 1988, Claussen vd. 1990, Andersson ve Johansson 2001, Burke vd. 2002, Packard ve Packard 2004, Storey 2006).

Donma sıcaklıklarına dayanımda yaygın olarak iki stratejiyi de (donmadan kaçınma ve donma toleransı) kullanabilen böcekler bazı durumlarda kriyoprotektif dehidrasyon ve vitrifikasyon (*Cucujus clavipes puniceus* larvalarının -100 °C'de hayatta kalabilmesi) gibi ek stratejiler de kullanabilir (Sformo vd. 2010, Storey ve Storey 2012). Bazı böcek türlerinin (*Pieris rapae* kelebeği ve *Nyctemera annulata* güvesi) gelişim evreleri, populasyon ve iklim şartlarına bağlı olarak donmadan kaçınma ya da donma toleransını tercih edebilecekleri ortaya konulmuştur (Hawes ve Wharton 2010, Li vd. 2020).

Coleoptera, Diptera, Hymenoptera ve Lepidoptera üyeleri gibi birçok böcek donma koşullarında başarı ile hayatta kalabilirler ve bu süreçte çoğunlukla gliserol ve sorbitolü kullanarak SCP'lerini kolaylıkla -10 °C altına indirebilirler. Birçok böcek türü genellikle -30 °C'ye kadar sıcaklıklarda donmadan kaçınarak hayatta kalabilir, hatta letal sıcaklığın

Arktik bölge böceklerinde (*Pytho deplanatus*) -55 °C'ye kadar inebildiği gösterilmiştir (Ring 1981, Miller 1982, Storey ve Storey 1988). Donmadan kaçınma davranışında böcekler sıklıkla gliserolü kullansa da ribitol, eritrol, teraloz ve sükroz gibi alkol ve şekerlerin de antifriz amaçlı kullanıldığı tespit edilmiştir (Kelleher vd. 1987, Storey ve Storey 1988, 2012, 2013, Duman vd. 1991a, McNally 2002, Wharton vd. 2009, Green 2017, Cubillos vd. 2018, Niu vd. 2018, Al-attar 2020).

2.1.2 Donma Toleransı Davranışı

Donmadan kaçınma davranışı sergilemeyen bazı türler ise donma toleransı davranışına adaptasyon sağlamışlardır. Vücut sularının %65'ine kadar donmasını tolere edebilen bu canlılar donma “toleranslı olarak” adlandırılırlar. Uzun süreli kış koşullarında donma toleransı, genellikle toplam vücut suyunun %50-65'inin hücre dışı buz olarak birikmesi ile sonuçlanır. Bu koşullar altında solunum ve dolaşım gibi temel hayati faaliyetleri duran canlılar ortam koşulları normalleşmeye başladığında ise tekrar hayati fonksiyonlarını kazanarak donmanın ölümcül etkileri ile başa çıkabilirler (Layne Jr. ve Lee Jr. 1987, McNally 2002, Storey ve Storey 2004, 2012, Biggar vd. 2013, 2015, Lung 2019, Duman ve Newton 2020). Donma toleransı davranışı iç organların dehidrasyonu, hücre içi buz oluşumunu engellemek için metabolit birikmesi ve dokuların zarar görmemesi için buz oluşumunun yeri ve mekanizmasının kontrolü gibi birkaç stratejiyi bünyesinde barındırır (Storey ve Storey 1988, 2005, 2017, Packard ve Packard 2004, Costanzo ve Lee 2013, Roy ve Goswami 2019). Günümüzde donma toleransının böcekler, eklembacaklılar ve karından bacaklılar gibi invertebratlar, amfibi ve sürüngenler gibi vertebratlar ve birçok bitki ve bakteri türünde (Sandve vd. 2011, Strimbeck vd. 2015) mevcut olduğu rapor edilmiştir (Storey ve Storey 1988, 1992, 2012, 2013, Costanzo vd. 2008, 2013, Denlinger ve Lee 2010, Holmstrup 2014).

4.1.2.1 Donma Toleransı Davranışının Temel İlkeleri

Donma toleransı davranışı *anoksi toleransı*, *dehidrasyon toleransı* ve *soğuğa dayanıklılığı* kapsar; organizmanın enerji taleplerini azaltan ve böylece mevcut enerji rezervleri ile yaşanabilirliği uzatan metabolik hızın baskılanması temeline dayanır (Storey ve Storey 2017). Donma toleransı hemen hemen her zaman hücre dışı buzlanmayı

ifade eder. Ancak istisnai olarak bazı türlerde ya da hücre tiplerinde (Arktik nematodlar ve bazı böceklerin yağ hücreleri gibi) hücre içi donma durumunda hayatta kalabilme rapor edilmiştir (Wharton ve Ferns 1995, Sinclair ve Renault 2010, Ali ve Wharton 2014). Bitkiler için bile ölümcül olan hücre içi donmada hayatta kalma buz kristallerinin boyutu ve hücre içi dağılımı ile ilişkili (IBP, AFP ve INP proteinleri bu şekillenmede rol oynar) olmakla birlikte yalnızca omurgasızlarda tespit edilmiştir, donma toleranslı omurgalılar arasında hücre içi donma koşulunda hayatta kalmaya dair herhangi bir kayıt yoktur (Raymond ve Wharton 2016, Storey ve Storey 2017, Duman ve Newton 2020).

Donma toleranslı hayvanlar tipik olarak vücut sıvılarının donma noktasının biraz altındaki sıcaklıklarda buz oluşumunu başlatırlar. Donma noktasının 2-3 °C altında bir “*süper soğuma noktası*” meydana gelir (Storey ve Storey 1988, Layne ve Lee 1991, Zachariassen ve Kristiansen 2000, Duman 2015, Cubillos vd. 2018, Berman vd. 2020). Donma noktasına yakın buz çekirdeklenmesi, hayvanların hayatta kalmalarına yardımcı olan gerekli düzenlemeleri yapmaları için gereken zamanı elde etmelerini sağlayan yavaş süreli bir donma hızını sağlar. Ayrıca donma noktasına yakın olarak donmanın başlatılması, aşırı soğuk ortamda donma başladığında meydana gelen ani buz dalgalanmasını (suyun anında buza dönüşmesi) en aza indirir. Buz oluşumu; vücut sıvılarının bir epitel tabaka boyunca (cilt yüzeyinden) çevresel buz ile teması, spesifik olmayan çekirdekleyicilerin epitel ile teması (genellikle deri ya da bağırsak bakterileri) ve hayvanın kendisi tarafından sentezlenen özel “*buz çekirdekleyici proteinler*” (INP) tarafından üç yolla tetiklenir (Steiner vd. 2000, Storey 2006, Storey ve Storey 2017).

Uzun süreli donmada, belirli “*buz bağlayıcı proteinler*” (Ice Binding Proteins, IBP ya da Antifreeze Proteins, AFP) küçük buz kristallerinin dokulara zarar verebilecek daha büyük buz kristallerine yeniden kristalleşmesini önlemek veya en aza indirmek için direnç sağlar (Fletcher vd. 2001, Sullivan ve Storey 2012, Davies 2014, Duman 2015, Storey ve Storey 2017). Bu oluşum sayesinde, bunlar kılcal damarların lümeni içindeki buz genişlemesi ile dokulara verilen zararı sınırlayabilir. Saf su kristali olan hücre dışı boşluklarda buz oluşumu, çözünen maddeleri matrisinden çıkarır ve böylece donmadan kalan hücre dışı sıvının ozmolalitesini yükseltir. Bu ozmoz yoluyla hücrelerden suyun çekilmesi sağlanır. Geriye kalan hücre içi sıvıların donma noktası, vücut sıcaklığına eşit olana dek vücut

sıvılarının ozmolalitesi yükselir. Böylece hücre içi sıvı artık aşırı soğutulamadığından dolayı hücre içi çekirdeklenme riski en aza indirgenmiş olur (Duman vd. 1991a, 1991, Storey 1999, Zachariassen ve Kristiansen 2000, Sullivan ve Storey 2012, Storey ve Storey 2013, 2020, Hadj-Moussa ve Storey 2018, Al-attar 2020). Çevresel sıcaklığa bağlı olarak pasif şekilde değişse de buz ve su arasındaki denge donma süreci boyunca devam eder (Duman 2015, Storey ve Storey 2017).

Çeşitli araştırmacılar tarafından kışın uzun süreli donma sürecinde kaplumbağaların (Örneğin; *Chrysemys picta marginata*, *C. picta bellii*, *Emydoidea blandingii*, *Malaclemys terrapin*, *Terrapene ornata*, *T. carolina*) toplam vücut suyunun en az %50'sinin, amfibilerin (Örneğin; *Rana sylvatica*, *Rana arvalis*, *Pseudacris crucifer*, *P. triseriata*, *Hyla versicolor*) ise %65-70 oranına hücre dışı buza dönüşmesine dayanabildiği belirtilmiştir (Amaral 2014, Storey ve Storey 2017, 2020, Storey vd. 2021). Hücrelerden çekilen sudan oluşan buz kristalleri sebebi ile oluşan dehidrasyon stresinin yanı sıra yüksek ozmolalite ve geri kalan hücre içi sıvı iyon dengesini ayarlamak için hücre hacmini azaltır, böylece doku küçülmüş olur. Bu küçülme kritik eşik değer altına inerse aşırı sıkışmaya ve plazma membranının çift katlı yapısının zarar görmesine sebep olur. Tekrar çözündüğünde (normalleşme) işlevini kaybetmiş olarak hücre iskeletinde hasarlar meydana gelir (McNally 2002, Du 2005, Storey ve Storey 2017).

Suyun fizikokimyasal özelliğini bertaraf etmek için donma toleranslı hayvanlar, hücre hacminin azalmasına direnç sağlayan fazla miktarlarda kolligatif kriyoprotektanlar üreterek hem biyokimyasal hem de ekofizyolojik adaptasyon mekanizmaları ile karşı koyarlar. Donma solunum, dolaşım, kas hareketleri gibi yaşamsal faaliyetleri sekteye uğrattığı için hücreler anoksi ve iskemiye maruz kalırlar, bu sebeple oksijenli solunum ile enerji üretilmeyeceği için donuk kaldıkları süre boyunca organizma kendi rezervlerini ve stratejilerini kullanarak hayatta kalmalıdır. Bu hayatta kalma iyi gelişmiş bir glikolitik kapasite ve anaerobik yollarla uzun vadeli ATP sentezi için yeterli glikan (karbonhidrat) rezervi gerektirir. Çeşitli araştırmacılar tarafından yukarıda sözü edilen koşullarda glikoz, gliserol ve bazı durumlarda ürenin de donmaya toleranslı amfibiler tarafından kullanılan başlıca kriyoprotektanlar olduğu ve hayvanların hayatta kalmasına önemli katkı sağladıkları ve ayrıca bunun yanında enerji metabolizma enzimlerinin düzenleyici

modifikasyonları, donukken ATP tüketimini azaltmak için metabolizma baskılanması, gelişmiş antioksidan savunma mekanizmaları, şaperon proteinler ve apoptoz kontrollerini içeren birçok strateji donma toleransının arka planında kusursuzca rol oynadıklarını belirtmişlerdir (Steiner vd. 2000, Storey 2006, Voituron vd. 2006, Valbona 2013, Storey ve Storey 2017, Costanzo 2019).

Sürüngenlerdeki güçlü donma toleransı çoğunlukla birkaç kaplumbağa ve kertenkele türü ile sınırlıdır. Örneğin *Zootoca vivipara* (*Lacerta vivipara*), *Terrapene Carolina*, *T. ornata*, *Chrysemys picta* türleri bilinen yüksek donma toleranslı sürüngenlerdendir. Birçok sürüngen yüksek donma sıcaklıklarında kısa süreli hayatta kalabildikleri için çoğunlukla donmadan kaçınma metodu ile kışı atlatmayı tercih eder (Costanzo vd. 1995a, Voituron vd. 2002a, 2004, 2005, Baker vd. 2003, Storey 2006, Ultsch 2006, Rey vd. 2008, Green 2017, Storey ve Storey 2017).

Anur türlerinden *Rana sylvatica*, *Pseudacris crucifer*, *Pseudacris triseriata*, *Dryophytes versicolor* (*Hyla versicolor*), *D. chrysoscelis* orman zemininde yüzeye yakın bölgelerde kışı geçiren donma koşulları ile başa çıkabilen güçlü donma toleranslı karasal hibernatör türlerdir (Storey ve Storey 1988, 2004, 2013, Storey vd. 1992, Costanzo vd. 1993a, Costanzo ve Lee 2008). Bunun yanında hibernasyonunu çoğunlukla su altında geçiren *R. ridibunda*, *R. temporaria*, *R. lessonae*, *R. esculenta* ve *R. dalmatina* gibi türlerin donma toleransları test edildiğinde zayıf donma toleransı adaptasyonuna sahip oldukları rapor edilmiştir (Schmid 1982, Storey ve Storey 1986a, Costanzo vd. 1993b, Voituron vd. 2003, 2005, 2009). Günümüzde donma toleranslı amfibi türlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda ciddi artış vardır ve donma toleranslı amfibi türlerinin sayısının daha da arttığı bilinmektedir. Şimdiye kadar donma toleranslı olarak belirlenmiş amfibiler ve hayatta kalma koşulları Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1 Literatüre kaydedilmiş donma toleranslı amfibiler.

Tür Adı	Deneysel olarak hayatta kalma koşulları	Referans(lar)
<i>Kurbağalar (Semenderlerler)</i>		
<i>Salamandrella keyserlingi</i>	-35 °C'ye kadar, -10 °C ile +5 °C arası döngüde 130 günün üzerinde	(Berman vd. 1984, Berman ve Meshcheryakova 2012)
<i>Salamandrella schrenckii</i>	-20 °C'de 40 günün üzerinde; -30 °C'de %67 oranda hayatta kalma (hk)	(Berman vd. 2010)
<i>Güçlü Donma Toleransına Sahip Kurbağalar (Anurlar)</i>		
<i>Rana sylvatica</i>		
Sonbahar hayvanı	-2,5 ile -3,0 °C'de 3-13 gün hayatta kalma	(Storey ve Storey 1986a, 1986b)
Sonbahar juvenilleri	-4,0 °C'de 2 gün; -6,0 °C'de 11 günde %50 hk	(Storey ve Storey 1984)
İlkbahar, Ottawa	-2,5 °C'de 7 gün %73-100 oranlarda hk	(Storey ve Storey 1987)
İlkbahar, Ohio	-2,5 ile -3,0 °C'de 48 saatte %95 hk	(Layne Jr. ve Lee Jr. 1987)
Kış, Alaska	-16 °C'de 14 günün üzerinde, -4 °C'de 2 ayda, Doğada -6,3°C'de 6 ay, %50 hk	(Costanzo vd. 2013) (Larson vd. 2014)
İlkbahar, Alaska	-2,5 °C'de 2 gün, -5,0 °C'de 2 gün %0 hk	(Costanzo vd. 2014)
<i>Rana arvalis</i>	-2,5 °C'de 2 gün, -3,5 °C'de 3 günde %50 hk	(Voituron vd. 2009b)
<i>Pseudacris crucifer</i>		
Sonbahar hayvanı	-3,0 °C'de 3 gün, -6,0 °C'de 5 gün	(Storey ve Storey 1986b)
İlkbahar hayvanı	-2,5 °C'de 4 gün	(Schmid 1982)

Çizelge 2.1 (Devam) Literatüre kaydedilmiş donma toleranslı amfibiler.

<i>Pseudacris triseriata</i>		(Swanson vd. 1996)
Sonbahar hayvanı	-3,0 °C'de 3 gün	(Storey ve Storey 1986b)
İlkbahar hayvanı	-2,5 °C'de 4 gün	(Storey ve Storey 1987)
<i>Pseudacris maculata</i>	-2,5 °C 24 saatte %27 hk	(Higgins ve Swanson 2013)
<i>Dryophytes versicolor</i>		
Sonbahar yetişkin	-6,0 °C'de 6 gün; -2,5 °C'de 3-14 gün	(Schmid 1982, Storey ve Storey 1985)
Sonbahar juvenil	-2,0 °C 5 günde %83 hk	(Storey ve Storey 1985)
Kış	-3,0 °C'de 48 saat	(Layne ve Lee 1989)
İlkbahar	-2,5 °C'de 3 gün	(Storey ve Storey 1985, Irwin ve Lee 2003)
Yaz	-3,0 °C'de 9 saat	(Layne ve Lee 1989)
<i>Dryophytes chrysoscelis</i>	-2,5 °C ile -2,9 °C'de 20-40 saat, -2,5 °C'de 42 saat; -5,5 °C'de birkaç günde %50 hk	(Costanzo vd. 1995b, Irwin ve Lee 2003) (Irwin ve Lee 2003)
<i>Kısa Süreli Donmada Hayatta Kalabilen Kurbağalar (Anurlar)</i>		
<i>Hyla regilla</i>	-6,0 °C'de 6 saat; 12 saat sonra %80 hk	(Croes ve Thomas 2000)
<i>Hyla japonica</i>	-4,0 °C 6'de saatte %80 hk	(Hirota vd. 2015)
<i>Acris crepitans</i>	-1,2 ile -2,0 °C'de 1-2 gün sonunda %13 hk	(Irwin vd. 1999)
<i>Acris c. blanchardi</i>	-1,5 ile -2,5 °C'de 6 saatte %80 hk	(Swanson ve Burdick 2010)
<i>Pseudacris streckeri</i>	-1,2 ile -1,6 °C'de 24 saat %0 hk	(Packard vd. 1998)
<i>Litoria ewingii</i>	-1,0 °C'de 6-12 saat	(Bazin vd. 2007)
<i>Rana ridibunda</i>	-2,0 ile -3,0 °C'de 8-36 saat	(Voituron vd. 2003)
<i>Rana lessonae</i>	-2,5 °C'de 9 saat	(Voituron vd. 2005)

Çizelge 2.1 (Devam) Literatüre kaydedilmiş donma toleranslı amfibiler.

<i>Rana esculenta</i>	-2,5 °C'de 13 saat	(Voituron vd. 2005)
<i>Rana dalmatina</i>	-2,0 °C'de 8 saatte %50 hk	(Voituron vd. 2009a)
<i>Rana temporaria</i>	-2,0 °C'de 8 saatte %50 hk	(Voituron vd. 2009a)
<i>Rana pipiens</i>	-1,5 °C'de 24 saat; -6,0 °C 6 gün %0 hk	(Schmid 1982, Costanzo vd. 1993b)
<i>Rana septentrionalis</i>	-6,0 °C 6 gün %0 hk	(Schmid 1982)
<i>Rana catesbeiana</i>	-1,2 ile -1,3 °C'de %0-50 hk	(Lovich vd. 2014)
<i>Rana amurensis</i>	-2,5 °C'de 3 gün; -1,5 °C'de 10 gün	(Berman vd. 2017)
<i>Pelobates fuscus</i>	-1 °C'de 3 gün %20 hk	(Berman vd. 2019)
<i>Rana macrocnemis</i>	-1 °C'de 5 gün %5 hk	(Bulakhova vd. 2020)

Deneyssel olarak hayatta kalma koşulları sütunundaki her virgül farklı kaynaklardan, noktalı virgül ise aynı kaynaktan elde edilen sonuçları ayırmak için kullanılmıştır (Tablo Storey ve Storey (2017)'den modifiye edilmiş ve güncelleme yapılmıştır.) Hayatta kalma oranı ayrıca belirtilmedikçe %100 hayatta kalma oranı olduğunu gösterir. hk: hayatta kalma oranı.

Çizelge 2.1'den anlaşılabacağı üzere, semenderlerde donma toleransı ile ilgili çalışmalar azdır. Ancak Sibirya semenderi (*Salamandrella keyserlingii*) ve Schrenck semenderinin (*S. schrenckii*) -30 °C gibi çok düşük sıcaklıklarda hayatta kalabildikleri gösterilmiştir (Berman vd. 1984, 2010, Berman ve Meshcheryakova 2012).

Göç, kış uykusu, donmadan kaçınma, donma toleransı kışa dayanıklılıkta temel hayatta kalma stratejileridir. Bunlardan donma toleransı davranışı gösteren türlerin; buz kristallerinin hassas dokulara fiziksel zarar vermesi, hücrelerden hücre dışı buz kütlesine su çıkışının neden olduğu fizyolojik dehidrasyon, kan plazmasının donmasından dolayı oksijen, besin, atıkların ve kan yolu ile sinyallerin taşınamaması, akciğerlerin, kalbin ve kan plazmasının donmasından kaynaklı iskemi ve anoksi, nöronal sinyallerin iletilmemesi ve hayati süreçlerin durması, ayrıca stres koşullarının ortadan kalkması ile oluşan oksijenli kanın ani perfüzyonu, reaktif oksijen türleri (ROS) ve hücreler arası eriyen suyun hızlıca hücrelere geri dönme isteği sırasındaki ozmotik basınç gibi sorunlarla karşı karşıya kalması ve çözündükten sonra normal hücre fonksiyonlarının geri kazanabilmesi için, biyokimyasal ve ekofizyolojik adaptasyonlar gibi birden fazla adaptasyon mekanizmasına sahip olması gerekir. Donma toleransı bu olumsuz yönleri nedeniyle en az tercih edilen davranış modelidir. Birçok hayvan türü vücut sıvılarının donmasını tolere edemeyeceği için farklı adaptasyon stratejileri kullanır (Storey ve Storey 2005, 2017, Sullivan 2011).

2.2 Donma ve Normalleşme Döngüsündeki Stresler ve Mücadele

2.2.1 Donma Koşulları

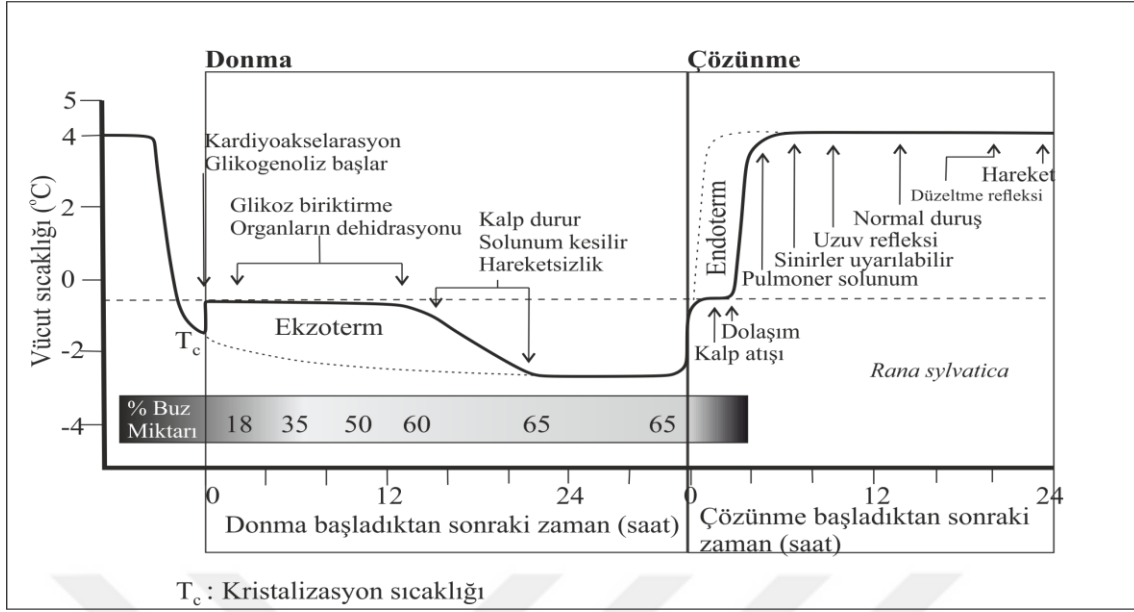
Dokuların donması esnasında meydana gelebilecek en önemli patofizyolojik problemlerden biri hücre içi suyun kristalleşmesidir. Hücre içi buz oluşumu hücre içi yapılara ve mikrokompartmentlara zarar verir ve hücre için çoğu zaman ölümcüldür. Çok nadir olarak bazı türler hücre içi buzlanmadan sağ kurtulabilir. Nematod türlerinden biri olan *Panagrolaimus davidi* hücre içi buz oluşumundaki donmadan kurtulma kapasitesine sahip olduğu rapor edilmiş ve organizmaların büyük çoğunluğunun donma toleransının, hücre içi buz büyümesini engelleyen mekanizmalarla birlikte yalnızca hücre dışı bölümlerde buz oluşumuna ve bunun mekanik hasarlarına dayanabilmesi çeşitli

araştırmalarla ortaya konmuştur (Wharton ve Ferns 1995, McNally 2002, Wharton vd. 2009).

Tüm vücutun donma-çözünme döngüsünde karşılaşılan streslerden en bilineni buzun sebep olduğu mekanik hasardır. Sağlam dokular dondurulduğunda, hücre dışı ve vasküler boşluklarda buz oluşumu nedeniyle fiziksel hasar görebilirler (Pegg 1987).

Rubinsky ve Pegg (1988), Rubinsky vd. (1990) tarafından yapılan araştırmalarda hücre dışı buz oluşum sürecinde genişlemiş vasküler boşluklarda su birikip buz oluşurken kan damarlarının lümeninde de buz oluşum eğilimi tespit edilmiş, bu vasküler genişleme kontrol edilmezse kan damarlarının duvarlarında parçalanma ve yapısal bütünlüğün bozulması ile donma sonrası çözünme esnasında çözünen kanın damarlardan dışa akarak büyük iç kanamalara sebep olup organizma için ölümlle sonuçlandığını ortaya koymuşlardır. Bu nedenle, donma toleranslı organizmaların hem buzlanmanın neden olduğu mekanik hasarı en aza indiren hem de normalleşme sırasında hasar onarımını sağlayan adaptasyonlara sahip olmaları gerektiği ifade edilmiştir (McNally 2002).

Storey ve Storey (1984) ve Costanzo ve Lee (2013) *R. sylvatica* türüne ait bireylerde yapmış oldukları araştırmada, donma gerçekleştiğinde uzuvların hareketinin, reflekslerin, nefes alma, kan akışı ve kalp atışı gibi normal fiziksel ve fizyolojik süreçlerin belirgin şekilde kesintiye uğradığını tespit etmişlerdir (Şekil 2.1). Solunum, kalp atışı ve kan akışının durması, iskemiye sebep olur ve hayatta kalabilmesi için uygun adaptasyonlara ve biyokimyasal mekanizmaların mevcut olmasını gerektirir. Donma toleranslı bir kurbağa donduktan sonra disekte edilirse hücre dışı bölümlerde, deri altında, karın boşluğu gibi kısımların buz dolu olduğu görülebilir (Kelleher vd. 1987, Storey ve Storey 1988, 1992, 2004, 2013, Bouffard 2007, Degree ve Mutyam 2013, Sullivan vd. 2015a, Hawkins ve Storey 2018). Bu buz hem önceden var olan hücre dışı sudan hem de ozmotik kuvvet tarafından hücreden dışarı çıkarılan hücre içi sudan oluşur. Bu nedenle donmuş kurbağanın organlarının belirgin şekilde küçüldüğü görülür. Bunlara ek olarak organların bazı bölümlerinde buzun sebep olduğu fiziksel hasarlar gözlemlenebilir.



Şekil 2.1 *R. sylvatica*'nın 4 ile -2,5°C arasındaki donma ve çözünme döngüsünün şematik gösterimi (Costanzo ve Lee (2013)'den modifiye edilmiştir).

Çözünen kurbağaların bacak kaslarında da hematoma oluşumu gözlemlenebilir. Ayrıca donmuş bir kurbağada iç buzlanmanın fiziki göstergeleri olarak koyulaşmış deri, sertleşmiş uzuvlar, hareketsizlik ve opak görünümlü gözler tespit edilebilir. Dondurucu koşullar altında, organizmalar donma stresine ve donmanın ortaya çıkardığı diğer iki ana strese de maruz kalırlar: oksijen eksikliği (anoksi) ve dehidrasyon (Layne Jr. ve Lee Jr. 1987, Storey ve Storey 2001, McNally 2002).

2.2.2 Dehidrasyon Koşulları

Donmayı önlemek için geliştirilen bir diğer strateji de donacak olan suyun hücre ve dokulardan uzaklaştırılmasıdır. Ölümcül sonuçlara sebep olacak olan hücre içi buzlanmanın önlenmesi için hücre içi su hücre dışına çıkarılır, bunun sonucu olarak hücre içi metabolit konsantrasyonu artar ve donma noktası aşağı düşer. Ancak hücre bütünlüğünün bozulmaması, dehidrasyon stresi ve ani rehidrasyon ile başa çıkabilmek için de birçok fizyolojik adaptasyon birlikte çalışmalıdır.

Donmaya karşı geliştirilen donmadan kaçınma ve donma toleransı davranışlarının yanında üçüncü bir adaptasyon stratejisi olarak da kabul edilen kriyoprotektif dehidrasyon taktiği, aşırı dehidrasyonda (neredeyse donabilecek tüm suyun

kaybedilmesi) çok fazla kriyoprotektanın birikmesi ile makromoleküllerin stabilize edilebilmesini ifade eder (Wharton vd. 2003, Holmstrup 2014, Storey ve Storey 2017). Vücut içindeki suda çözünen madde miktarı fazla olmadığı için içerdeki buhar basıncı dışarıdaki buz ile temas halindeki havanın buhar basıncından daha yüksek olur ve dış ortam sıcaklığı azaldıkça bu fark artar. Donmadan kaçınan böcekler buharlaşma ve solunum yolu ile hemolenfini dış ortama verirler (Zachariassen ve Kristiansen 2000, Duman ve Newton 2020). Bu strateji bazı omurgasızlar tarafından kullanılır. En iyi bilinen örnekleri bazı toprak solucanı kokonları (Holmstrup ve Westh 1994, Holmstrup ve Zachariassen 1996), *Panagrolaimus davidii* gibi toprak nematotları (Wharton vd. 2003), Arktik Enchytraeidae üyeleri (Pedersen ve Holmstrup 2003) ve Kutup Collembola türleri (Worland ve Block 2003)'dir (Duman 2015, Duman ve Newton 2020). Mumsu tabaka (vax) ile kaplı kütikula tabakalarından dolayı böceklerde çok da yaygın olmayan bu stratejiyi kullanan bazı böcek türleri (Antartik *Belgica antarctica* larvaları) olduğu da bilinmektedir (Elnitsky vd. 2008). Bazı amfibiler tarafından kullanılabileceği öngörülse de henüz omurgalılarda bu adaptasyonun kullanımı bilinmemektedir (Costanzo ve Lee 2013, Green 2017).

Fizyolojik dehidrasyon, iskemi ve/veya anoksi donmanın iki ana sonucudur (Zhenhong 2004, Storey ve Storey 2013, Lung 2019). Ancak, donma koşullarında uzun süreli karasal kış uykusu, çevresel suya erişimi de kısıtlar ve bu da ek bir dehidrasyona neden olur. Kış hazırlığı döneminde donma toleranslı türler, biriktirilecek ozmolitlerin daha konsantre hale gelmesine izin veren kısmi dehidrasyona uğrar (Costanzo vd. 2015). Bu fizyolojik dehidrasyon aynı zamanda suyun hücre dışı boşluklarda birikmesini ve zararsız bir buz biçimine dönüştürülmesini sağlar (Storey ve Storey 2004, Costanzo ve Lee 2008, 2013, Costanzo vd. 2015, Niu vd. 2021). Bu buz oluşumu dokulardaki suyu uzaklaştırarak organların küçülmesine neden olur. Hücre ve dokulardan uzaklaştırılan su belirli oranda buza dönüşse de organizma bunu tolere edebilir ve hayatta kalır (Costanzo vd. 1993b, Storey ve Storey 2017, Al-attar 2020).

Donma toleranslı organizmalarda donmaya karşı gösterilen hiperglisemik cevap dehidrasyon ya da anoksiye karşı da gösterilmektedir. Örneğin donma toleranslı türlerden *Rana pipiens* dehidrasyona yanıt olarak karaciğer glikoz seviyesini 24 kat artırmıştır

(Churchill ve Storey 1993, 1995). *R. sylvatica* ve *P. crucifer* türleri ile yapılan 5 °C'deki uygulamada, dehidrasyon sırasında toplam vücut suyunun %50-60'ının kaybedildiği ve hayvanların karaciğer, kalp ve iskelet kası gibi bazı organlarında glikoz seviyesi neredeyse donma koşullarına maruz kaldıklarındaki kadar yüksek olduğu gösterilmiştir (Churchill ve Storey 1993, Layne ve Jones 2001, Storey 2004, Costanzo ve Lee 2013, Storey ve Storey 2017, Amaral vd. 2018).

2.2.3 Anoksi Koşulları

Donma stresinin diğer bir bileşeni de anoksidir. İyi geliştirilmiş bir anoksi toleransı, karasal hibernatör kurbağaların donma sırasında dolaşımın durmasından kaynaklı anoksik ve/veya iskemik koşullarda hayatta kalmasına yardımcı olur. Uzun süreli anoksik koşullarda kan hiperkalemik (kalp sağlığı açısından olumsuz olan yüksek oranda potasyum birikmesi), oksijen yoksunu ve asidik hale gelir (Sullivan 2011, Sullivan vd. 2015b, Lung 2019, Al-attar 2020). Sullivan ve Storey (2012), Storey ve Storey (2017) tarafından yapılan araştırmalarda anoksik koşulların üstesinden gelebilmek için hücreler, asidoz oluşumunu en aza indirgenmesi ve anoksi koşullarına özgü gen/protein regülasyonunu aktive ederek anaerobik adenozin trifosfat (ATP) üretimini en uygun hale getirir. Böylece donmaya toleranslı kurbağaların dokularında glikoz ve laktat seviyeleri hipoksi ve/veya anoksi koşullarında yükseldiğini tespit etmişlerdir. Tüm bu işlemler için hücreler, enerji ihtiyacını anaerobik yolla enerji üretimi için endojen yakıt olan glikojenin dönüştürülmesi ile sağlar.

Donma toleranslı organizmalar diğer streslerin getirdiği etkilerin yanı sıra anoksi ve iskemi kaynaklı hasarları da önlemek ya da tersine çevirmek için bazı mekanizmalara ihtiyaç duyarlar. Özellikle uzun süreli donma ile birlikte dolaşımın durmasıyla oksijensiz kalan hücrelerin besin ve oksijenden mahrum kalması ve atıkların uzaklaştırılamaması, bunun yanı sıra hormonların ve diğer sinyallerin iletilememesi organizma içindeki iletişimin durması anlamına gelir (Storey vd. 1992, Rubinsky vd. 1994a, 1994b, Storey ve Storey 2017).

Diğer taraftan donma sonrası normalleşme esnasında oksijenin sisteme hızla girmesi ile reaktif oksijen türlerinin (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri gibi ROS'lar)

saldırısına maruz kalınır. ROS'lar hücrel lipit tabakalarında, proteinlerde ve DNA'da ciddi zararlara sebep olur (Hermes-Lima vd. 2001, 2015, Storey ve Storey 2004, Lung 2019). Yüksek donma toleranslı *R. sylvatica*'nın bu sorunlarla başa çıkmak için iki antioksidan savunma mekanizması geliştirmiştir (Hermes-Lima vd. 2001, Storey ve Storey 2004). İlki, organlardaki antioksidan enzimlerin yüksek yapıcı aktivitelerinin korunmasıdır ki yapılan çalışmalarda antioksidan savunmada rol alan ana antioksidan enzimlerin glutatyon S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve süperoksit dismutaz olduğu belirtilmiştir (Joanisse ve Storey 1996, Hermes-Lima ve Zenteno-Savín 2002, Storey ve Storey 2004, 2017). Antioksidan savunma mekanizmasının ikinci prensibi ise spesifik enzim miktarının artırılması olup, donmaya doğrudan tepki olarak bazı enzimlerin aktivitelerinde yapılan seçici değişkendir. Ağaç kurbağasında (*R. sylvatica*) anoksi sonrası normale dönüşte selenyum bağımlı glutatyon peroksidazın kalp, böbrek ve iskelet kasında yaklaşık iki kat arttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada 24 saatlik donmada da glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin %150'ye kadar arttığı ancak süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon S-transferaz enzimlerinde bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (Joanisse ve Storey 1996, Storey ve Storey 2004).

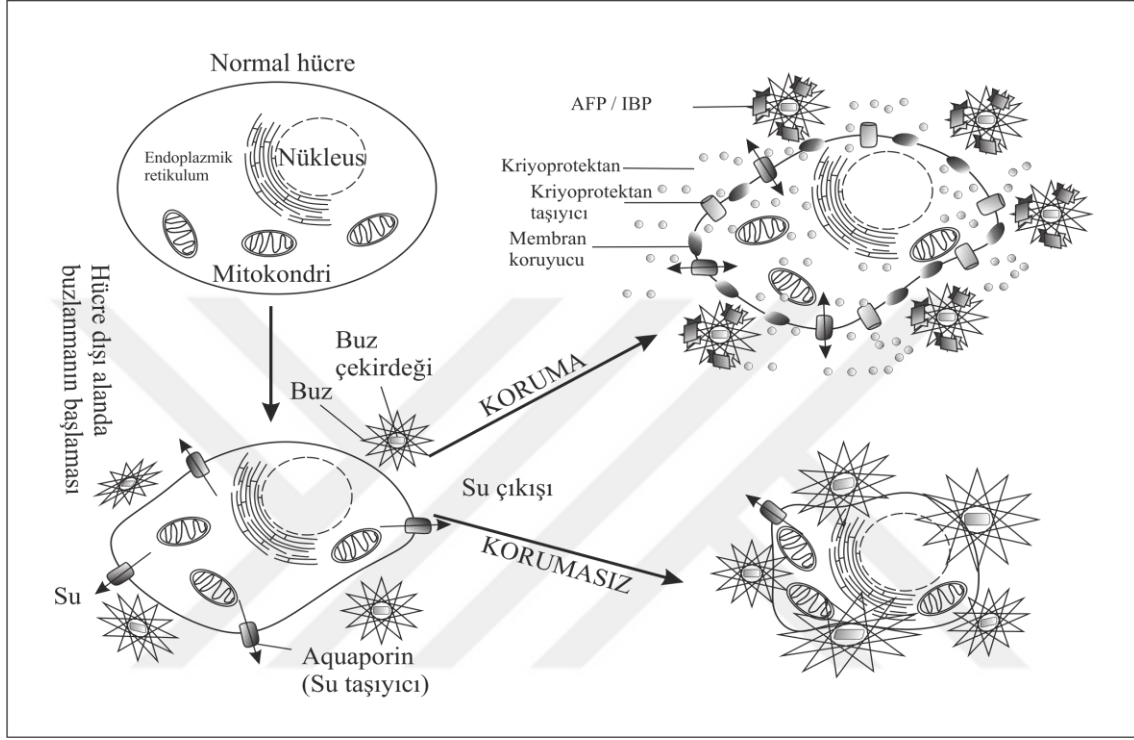
2.2.4 Metabolit Biriktirme

Donma, anoksi ve dehidrasyon koşullarında kullanılan stratejilerden en sık kullanılanı ve en önemlisi bazı metabolitlerin yüksek konsantrasyonda biriktirilmesidir. Kriyoprotektanlar olarak da bilinen bu metabolitler hücre içi ve etrafında birikerek ozmolaliteyi yükselterek donma noktasının düşmesini sağlar (Şekil 2.2). Kurbağa türlerinde kullanılan kriyoprotektanlar değişkenlik gösterse de çoğunlukla yaygın olanlar gliserol (*H. versicolor* ve *H. chrysoscelis* tarafından kullanılır) ve ağaç kurbağası (*R. sylvatica*) ile *Pseudacris* (*Pseudacris crucifer*, *P. triseriata*, *P. maculata*, *P. streckeri*) türlerinin kullandığı glikozdur (Layne ve Jones 2001, Edwards vd. 2004, Costanzo vd. 2013, Higgins ve Swanson 2013, Lung 2019, Roy ve Goswami 2019, Storey ve Storey 2020). Benzer mekanizmalar tatlı su kaplumbağalarında da tespit edilmiştir. *Chrysemys picta* karada geçirdiği ilk kış döneminde kan glikoz seviyesini 3 kat, gliserol seviyesini 3 kat ve amino asit seviyesini 2,25 kat artırmıştır (Storey ve Storey 1988, Costanzo vd. 2000).

Buz şekillendirici (ISP), çekirdekleyici (INP) ya da antifriz (AFP) proteinler olarak adlandırılan bazı özel proteinler donma sıcaklıklarında buz kristalleşmesinin indüklenmesi, şekillendirilmesi ya da baskılanmasına ve sıcaklığın daha düşük seviyelere ulaşmasını engellemeye yardımcı olurlar. Birçok böcek türü bu proteinler vasıtası ile çok düşük sıcaklıklarda bile hayatta kalmayı başarabilirler. INP'ler ile indüklenen buz çekirdeklenmesi esnasında, buza dönüşmeyen metabolitler sudan uzaklaştırılır, bu durum hemolenfin ozmolalitesini artırarak hücrelerin dehidrasyonuna yardımcı olur (Duman 2001). Antifriz proteinleri (AFP'ler) genellikle donma toleranslı türlerde bulunur ve bu hayvanlarda AFP'lerin birincil işlevinin buzun yeniden kristalleşmesini en aza indirmek olduğu gösterilmiştir (Duman 2001, Yu vd. 2010). Yeniden kristalleşme küçük buz kristallerinin, dokularda yapısal hasar bırakabilecek büyük buz kristallerine dönüşmesi esnasında gerçekleşir. AFP'ler bu büyümeleri önlemek için buz kristallerine bağlanırlar ve donma noktasını baskırlar (Martino ve Zaritzky 1989, Gupta ve Deswal 2014, Olijve vd. 2016).

Ağaç kurbağasında (*R. sylvatica*) yaz ve kış koşullarındaki hepatik proteinlerin değişimini izlemek ve değerlendirmek için sıvı kromatografisi (LC) tandem kütle spektrometresi (MS/MS) ve kantitatif izobarik (iTRAQTM) peptit haritalama tekniklerinin birlikte kullanıldığı bir çalışmada otuz üç farklı proteinin mevsimsel koşullara göre güçlü değişkenlik sergilediği tespit edilmiştir. Kış koşullarındaki kurbağaların karaciğerlerinde, kriyoprotektan proteinler, ısı şok proteinleri (HSP) ve antioksidanlar da dahil olmak üzere bazı proteinler nispeten yüksek seviyelerde görülmüş ancak hücre çoğalması, protein sentezi ve mitokondriyal fonksiyona katılan proteinlerin miktarlarının azaldığı kaydedilmiştir (Kiss vd. 2011). Yüksek verimlilikte RNA dizileme teknolojisi (RNA-Seq) gelişmesi ile transkript ve genomik farklılıkların izlenmesi de genişletilmiştir. Glikoz, gliserol ve üreyi kriyoprotektan olarak kullanabilen *Dryophytes chrysoscelis* kurbağasında soğuk ve donma uygulamalarının karaciğer transkriptomu RNA-Seq teknolojisi kullanılarak 159,556 transkript incelenmiştir. Soğuk ve donma uygulamalarında transkript seviyesindeki analizler takiben gen seviyesinde değerlendirmeler 3582 farklı genin eksprese olduğu ve 1324 genin farklı şekilde düzenlendiğini ortaya koymuştur. Glikoz üretiminde rol alan glikoz-6-fosfatazın ifadesi artarken, gliserol birikimini teşvik etme amacı ile gliserol kinazın azaldığı bildirilmiştir.

Bunun yanında soğuk ve donma uygulamalarında ısı şoku proteinleri, DNA tamiri ve ubiquitin proteazom yolu ile ilgili genlerin ekspresyonu artarken, oksidatif stres ve anoksi yanıtlarında yer alan, potansiyel hücre hasarına sebep olabilecek genlerin ekspresyonu azaldığı tespit edilmiştir (Amaral vd. 2020).



Şekil 2.2 Donma stresine karşı korunan ve korunmayan hücrelerin durumu, Storey ve Storey (2017)’den modifiye edilmiştir.

Şekil 2.2’de donma sürecinde hücrelerin korumalı ve korunmasız durumu açıklanmaktadır. Donma, hücre dışı sıvılarda cildin dış ortam buzı ile teması, bakteriler gibi bazı ajanlar yolu ile ya da özel buz oluşturu proteinler (ISP) tarafından başlatılır. Ortamdaki çözünbilir metabolitler buz içerisine alınmayarak dışarıda tutulur bu nedenle hücre dışı sıvıların ozmolalitesi yükselir. Hücrelerden su çıkışından kaynaklı hücre ve organların hacimleri azalır. Kritik seviyede bir azalış hücre stoplazmasına buz girmesine ya da çözünme sonrası hücre yapısının normalleşemeyerek kalıcı hasara sebep olur. AFP’ler kristal büyümesini düzenler ve rekristalizasyonu engeller. Diğer kriyoprotektanlar da hücre hacminin güvenli olan en az seviyeye indirilmesi için kolektif bir davranış sergiler. Aquaporinler, aquagliseroprinler, glikoz ve üre taşıyıcıları dahil birçok membran taşıyıcı, su ve kriyoprotektanların dağıtımında rol alırlar (Storey ve Storey 2017).

Genel olarak bu stratejiler (iç organların dehidrasyonu, hücre içi buz oluşumunu engellemek için metabolit birikmesi, anoksik koşullarla başa çıkabilme, buz oluşumunun yerini ve mekanizmasını kontrol etme, normalleşme sürecindeki oksidatif streslerin bertarafı) donma esnasında hayvanların tüm vücutlarının donmasını engellemeye ve hayatta kalmalarına yardımcı olurlar. Böylelikle bu özel ektotermik hayvanlar bulundukları habitatta zorlu iklimsel koşullara rağmen varlıklarını devam ettirebilirler.

2.3 Donma Toleransı Adaptasyonları

2.3.1 Hipometabolizma

Metabolizma hızının baskılanması ile ortaya çıkan hipometabolik durum çeşitli çevresel streslere karşı birçok organizma tarafından kullanılan ortak bir cevap yoludur. Metabolik hızın güçlü bir şekilde düşürülmesi (%1-30 oranına inmesi) birçok tür için hayat kurtarıcı bir özelliktir ve torpor (uyuşukluk), hibernasyon (kış uykusu), estivasyon (yaz uykusu), diyapoz, anaerobiyoz, anhidrobiyoz ve donma toleransı gibi birçok durumda hayatta kalma tepkisi olarak ortaya çıkar (Kart Gür vd. 2009, Storey ve Storey 2011, 2017, Geiser 2013, 2020, Kart Gür ve Gür 2015). Bazı memelilerin yüksek vücut sıcaklıklarını koruyabilmeleri için gerekli enerjiyi sağlamada kullanacakları besin kaynaklarına ulaşamadıkları dönemlerde hipotermik kış uykusuna geçmeleri ve düşük metabolizma hızları onların bu koşullardan sağ kurtulabilmelerini sağlar (Wang 1989, Storey ve Storey 2009, 2017, Geiser 2013, 2020, Kart Gür vd. 2014, Woods vd. 2019).

Ülkemizdeki memeli türlerinden biri olan Anadolu yer sincabına (*Spermophilus xanthoprymnus*) ait hibernasyon çalışmalarında 37 °C olan vücut sıcaklığının hibernasyon döneminde ortalama 4 °C'ye düştüğü, metabolizma hızının %90 azaldığı tespit edilmiştir. Bu süreçte kalp atış hızı dakikada 250'den 4'e, solunum hızı dakikada 150'den 5'e indiği ve enerjisini koruyarak hayatta kalabildiği ortaya konulmuştur. Toprak sıcaklığı düşüşüne paralel olarak hayvanlarında vücut sıcaklıkları düşerek metabolizmaları torpor duruma geçmektedir. Düşük ortam sıcaklığında erkek bireylerin dişilere oranla daha yüksek vücut sıcaklığı sağladığı ve juvenil bireylerin yetişkin bireylere göre daha düşük vücut sıcaklıklarına sahip oldukları belirtilmiştir (Kart Gür vd. 2014, Kart Gür ve Gür 2015, 2017).

Organizmaların hipometabolik bir duruma geçmesi ancak dinlenme fazındaki metabolik hızın %1 ile 30 arasında düşmesi ile başlar (bazı anhidrobiyoz durumlarda ise <%1) ve koşulların devam etmesi halinde depoladıkları enerji rezervlerine bağlı olarak hayatta kalabilme sürelerini uzatırlar. Örneğin *C. picta* kaplumbağası 10°C su sıcaklığında %10'luk metabolizma hızı ile 3-4 ay boyunca su altında hayatta kalabilir (Jackson 2002). Kertenkelelerden *Lacerta vivipara* ile yapılan bir çalışmada -2,5 °C sıcaklığa maruz kalmanın başlangıcındaki oksijen tüketimi ve karbondioksit salınımını normal koşullara göre %40 azalmış ve bu oran 5-6 saat sonra %0'a ulaşmıştır. Bu noktanın muhtemelen buz içeriğinin maksimuma ulaştığı noktada solunumun durmasından kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Costanzo vd. 1995a, Voituron vd. 2002a, 2002b, 2006, Rey vd. 2008). Kış su altında geçiren kurbağalar ile kurak bölgelerde yaşayan ve yılın 9-10 ayı yeraltında yaşayan birçok kurbağa türü de hipometabolizma gösterir. Güçlü metabolik hız baskılama özellikleri donma toleranslı türlerin kışı hayatta kalarak geçirmelerini sağlar. *R. sylvatica* 4 °C'den 1 °C'ye soğutulduğunda karbondioksit salınımının Q₁₀ değeri ile birlikte azaldığı tespit edilmiştir (Sinclair vd. 2013). Yapılan birçok çalışmada kurbağaların donma, anoksi/hipoksi ve dehidrasyona verdikleri metabolik yanıtların benzer olduğu gösterilmiştir (Storey ve Storey 2009, 2013, 2017, 2019, Costanzo ve Lee 2013, Costanzo vd. 2015).

Hipometabolizma kontrolü temelde şu faktörler ile gerçekleşir; epigenetik mekanizmalar ve transkripsiyonel kontrol, mikro RNA düzenlemeleri, hücre sinyalleri ve yüksek enerji gerektiren metabolik olayların baskılanması, hücre döngüsü kontrolü ve anti apoptozis mekanizmaları (Storey ve Storey 2007, 2011, Al-attar 2020, Zhang vd. 2020, Niu vd. 2021). Doğal hipometabolizma, hücrede ATP tüketen birçok sürecin baskılanmasını gerektirir. Bu baskılama genel olarak hücre döngüsü, moleküler adaptasyonlar, enzim aktiviteleri, biyokimyasal yolak değişiklikleri, membran iyon kanallarının taşıma süreçleri, protein ve RNA sentezini kapsar (Hand 1996, Hochachka vd. 1996, Storey ve Storey 2017, Mattice 2018). Bu baskılama stratejileri hücre bazda büyük ölçüde ATP tüketimini düşürür ve yeni bir homeostaz oluşmasına olanak sağlar. Birçok türün hipotermik koşullardaki temel stratejisi hipometabolizma evresine geçmektir. Örneğin, kış uykusuna yatan yer sincabında (*Spermophilus lateralis*) beyin dokularının araştırıldığında sentezledikleri protein seviyesi ötermik koşullardaki grubun protein

seviyesinin yalnızca %0,04'ü kadar olduğu ve ayrıca birçok dokuda sodyum/potasyum ATPaz aktivitesinin %40-60 azaldığı tespit edilmiştir (Frerichs vd. 1998, MacDonald ve Storey 1999, MacDonald vd. 2009).

2.3.1.1 Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik modifikasyonlar birincil DNA dizisindeki değişikliklere bağlı olmayan gen ifadesindeki ayrılabilir değişiklikler ve sonuçta ortaya çıkan fenotipik değişikliklerdir. Epigenetik kalıtım DNA'daki sitozinin C5 konumundan metilasyonu ve DNA'nın sarılı olduğu histon proteinlerin translasyon sonrası aminoasit fosforilasyon modifikasyonları ile birçok değişikliğe sebep olabilir. Bir sonraki nesillere aktarılabilen bu epigenetik değişiklikler ile hipoksi toleransının ve kardiyak performansın kontrol edilebildiği bildirilmiştir (Lin 2009, Storey ve Storey 2012, 2017, Hadj-Moussa ve Storey 2018). Hızla değişen çevre şartlarına fenotipik uyum sağlamada epigenetik faktörlerdeki hızlı çeşitlenme, DNA diziliminde oluşacak değişikliklerden çok daha fazla ve hızlı gerçekleşir. Örneğin, Ontario, Ohio ağaç kurbağaları (*R. sylvatica*) hayatta kalma limitleri -5 °C ile sınırlı iken Alaska ağaç kurbağalarının limiti -15 °C olarak belirtilmiştir. Birbirine çok ta uzak olmayan bu iki bölge arasındaki en önemli fark ise çevresel sıcaklık koşullarıdır (Amaral 2014).

Epigenetik değişiklikleri ortaya koyan etkenlerden biri olan DNA metil transferaz enziminin sucul kaplumbağalarda (*Trachemys scripta elegans*) anoksi koşullarındaki değişimi üzerine yapılan çalışmada DNA metiltransferaz enziminin karaciğer ve kaslarda anoksinin 5. ve 20. saatlerinde %30-50 arasında artış gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı epigenetik modifikasyonların kaplumbağalarda donma toleransından da sorumlu olduğu düşünülmüştür (Wijenayake ve Storey 2016, Storey ve Storey 2017).

Kriyobiolojide epigenetik mekanizmaların incelendiği bir çalışmada, *Rana sylvatica*'nın donma-çözünme döngüsünde karaciğer ve iskelet kasında histon metiltransferaz ile ilişkili 7 farklı protein (SMYD2, SETD7, ASH2L, RBBP5, SUV39H1, EHMT2 ve SET8), 4 metillenmiş H3 metiltransferaz aktivitesi (H3K4me1, H3K9me3, H3K27me1 ve H3K36me2) ve p53'ün metilasyon seviyeleri araştırılmıştır. Bu proteinlerin

metillenmesinin donma koşullarında hayatta kalmak için potansiyel rol oynadığı belirtilen sonuçlara göre donma sırasında karaciğer dokusunda H3K4me1 azalırken H3K36me2 artmıştır. Kas dokusunda ise her iki proteinin de azaldığı kaydedilirken p53'ün metillenmesinin önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir (Hawkins ve Storey 2018).

2.3.1.2 Mikro RNA'ların (miRNA) Etkisi

Neredeyse on yıl öncesine kadar pek bilinmeyen miRNA'lar, hayvanlarda transkriptlerin translasyonunda karar mekanizması olarak oldukça önemli transkripsiyon sonrası düzenleyiciler olarak kabul edilmektedir. miRNA'lar kısa, kodlanmayan (~22 nt) RNA molekülleridir ve mRNA transkripti ile korunmuş 3'-kodalanmayan bölge (UTR) kısmına bağlanarak etkileşime girerler (O'Brien vd. 2018, Storey ve Storey 2020). miRNA ifade seviyesindeki değişikliklerin, çevresel streslere karşı (kış uykusu, yaz uykusu, donma toleransı ve anaerobiyoz gibi) hayvanların hipometabolik durumlara girmesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Bansal vd. 2016, Hadj-Moussa ve Storey 2018).

Donma toleranslı *R. sylvatica*'daki ilk miRNA çalışması donma esnasında (-3 °C'de 24 saat) miR-21 in hem karaciğer hem kaslarda (sırası ile 1,5 ve 1,3 kat), miR16'nın ise sadece karaciğerde artış (1,5 kat) ancak kas dokusunda %50 oranında azalış gösterdiğini ortaya koymuştur. Tabi bu artışlar onların hedef mRNA'larının translasyonunu baskıladığı anlamına geldiği için burada bir aşağı yönlü regülasyon görülmüştür. miR21 ve 16 hücre döngüsü için gerekli proteinlerin kodlandığı mRNA'ları baskılamıştır ve hücre döngüsünü yavaşlatmıştır (Biggar vd. 2009). Apoptoz önleme ve karaciğer fibrozunun önüne geçmede rol alan miRNA-30'un donma koşullarında *R. sylvatica* iskelet kasında, *D. Chrysoscelis*'in de karaciğer dokularında artış gösterdiği bilinmektedir (Bansal vd. 2016, Amaral vd. 2020). Hadj-Moussa ve Storey (2018) tarafından *R. sylvatica* üzerinde yapılan bir diğer çalışmada sıfırın altındaki donma esnasında beyin kontrolünde rol alan 113 miRNA aktivitesi incelenmiş ve 41 miRNA'nın donma - çözünme döngüsünde farklı düzenlendiği ve yalnızca ikisinin artış yönünde olduğu tespit edilmiştir. Birçok miRNA'nın ekspresyonunun azalışının ile nöroprotektif etki amaçlı olduğu belirtilmiştir.

2.3.1.3 Hücre Sinyal Kontrolü

Hücre içi sinyal yolları hücrenin hücre dışı sinyallere karşı davranışından sorumludur. Büyüme ve çoğalma gibi emirlerin yanında tehlikeli stresler ve hücre dışı donma gibi olaylarda da hücre içi olayların kontrolünde rol alırlar (Storey ve Storey 2001, 2017, McNally 2002). Son çalışmalar, iki çekirdek sinyal transdüksiyon (sinyalin aktarılması) yolunun, hipometabolizmaya aracılık etmede, hücre sağ kalımını desteklemede ve hasar iyileştirmede yardımcı olacak şekilde donmaya tepki verdiğini göstermiştir (Storey ve Storey 2017). Hücrenin "enerji sensörü" olan AMP (Adenozin monofosfat)-aktifleşmiş protein kinase (AMPK), donma sırasında hücrelerde ATP seviyelerinin enzimatik düzenlemesinde rol oynar. AMPK'nın donmadaki rolü Asetil Co-A karboksilazı (ACC) inhibe ederek yağ asitlerinden karbonhidrat elde edilen ve yüksek enerji gerektiren reaksiyonları engeller (Rider vd. 2006).

Protein kinaz B donma esnasında rol alan bir diğer potansiyel faktör olduğu gösterilmiştir. Protein kinaz B glikoz metabolizması, protein sentezi, hücre döngüsü ve anti-apoptoz dahil olmak üzere birçok metabolizma üzerinde düzenleyici etkiye sahiptir. Protein kinaz B'nin *R. sylvatica*'da anoksia ve dehidrasyon deneylerinde oldukça etkin olduğu belirtilmiştir (Zhang vd. 2011, 2020, Tan vd. 2013). Bunun yanında, kurbağalar için donma stresiyle ilişkili olduğu bilinen *fr10*, *fr47* ve *li16* genlerine bağlı proteinlerin sentezinden Protein kinaz B'nin sorumlu olduğu kuvvetli tartışmalar arasında yer almaktadır. Bir diğer durumda donma esnasında karaciğer hücrelerinin apoptozise gitmesini engelleyen Protein kinaz B'dir. Böylelikle karaciğer donma esnasında yaşamsal faaliyetlerin devamı için hayati öneme sahip görevini yapabilmektedir (Dieni ve Storey 2009, 2014, Dieni vd. 2012, Tan vd. 2013, Storey ve Storey 2017).

2.3.1.4 Hücre Döngüsü Kontrolü

Hücre bölünmesi ve büyümesi oldukça fazla enerji gerektiren bir döngüdür. DNA sentezi, membran sentezi, protein sentezleri gibi birçok faaliyet hücre döngüsü boyunca enerji gerektiren metabolik olaylardır. Diapoz, hibernasyon, hipoksi/anoksi, donma gibi durumlarında hayatta kalmak için hücre döngüsünün minimuma indirilmesi gerekmektedir (Košťál vd. 2009, Biggar ve Storey 2012, Padilla ve Ladage 2012, Wu ve

Storey 2012). Temelde hücre döngüsünü kontrol eden siklin-bağılı-kinazlar (Cdk) hücre döngüsünün her aşamasında ilgili faza spesifik enzim/protein sentezinden sorumludur. Cdk'ların defosforilasyonu (Cdc25s, hücre bölünme döngüsü 25 fosfataz) ile inaktive olması ya da Cdk inhibe edici proteinlerin (p21, p27 gibi) bağlanması ile hücre bölünmesini yavaşlatır (Obaya ve Sedivy 2002, Harper ve Brooks 2005, Shah vd. 2020). *R. sylvatica*'da donma, anoksi ve %40 dehidre koşulları dört tip Cdk'nın seviyesini %50-60 oranında azalttığı, Cdk inhibe edici proteinlerin fosforilasyonunun artış gösterdiği, Cdc25a ve Cdc25c fosfataz enzimlerinin fosforilasyonunu 3-6 kat arttırdığı, p21 ve p27 proteinlerinin siklik-Cdk ile bağlanma yaptığı tespit edilmiştir (Storey ve Storey 2013, 2017, Tan vd. 2013). Biggar ve Storey (2012) *Trachemys scripta elegans*'ın anoksik koşullar altında karaciğer ve böbrek dokularında siklin D1 düzeyinin bastırıldığını ancak iskelet kasında baskılanmadığını tespit ederek siklin D1'in baskılanmasının proliferatif dokularda bir belirteç olabileceğini belirtmiştir.

2.3.1.5 Anti Apoptozis

Apoptozis özellikle doku/organ nakli gibi biyomedikal alanında önemli bir sorundur ve soğuk uygulaması ile geciktirilir, ancak çözülmeden 12-48 saat sonra iyonik güç, ozmotik denge bozuklukları, hücre hacmi değişiklikleri ve kısıtlı enerji olması gibi birçok stres apoptozisi tetikleyebilir (Baust vd. 2009). Donma toleransında bazı transkripsiyon faktörleri ve miRNA faaliyetleri, hücrelerin donma kaynaklı streslere yanıt olarak programlanmış hücre ölümünü inaktif hale getirmesinde rol alırlar ve anti-apoptozu sağlayarak donma toleransına katkılar sağlarlar. Kurbağa (*R. sylvatica*) ve kaplumbağalarda (*Emydoidea blandingi*, *C. p. bellii*, *T. s. elegans*) yapılan çalışmalar bazı mitokondrial apoptotik yolların anoksi ve donma toleransında rol oynadığı gösterilmiştir. Bcl (B-cell lymphoma protein ailesi) üyeleri anoksik koşullarda kaplumbağaların beyinlerinde apoptozisi baskılayıcı olarak rol almışlardır. Yine ağaç kurbağası (*R. sylvatica*) ile yapılan çalışmalarda Bcl-2 ailesinin, Bcl-xL ve c-IAP proteinleri anoksi ve donmada karaciğerde apoptozisi baskılamıştır (Du 2005, Kesaraju vd. 2009, Krivoruchko ve Storey 2010, Smith vd. 2015, Hadj-Moussa ve Storey 2018, Al-attar 2020).

2.3.2 Kriyoprotektan Biriktirme

Düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanların sentezi ve biriktirilmesi, donma toleransındaki en önemli adaptasyonlardan biridir. Storey vd. (1997)'e göre kriyoprotektanlar iki gruba ayrılabilir. Birinci grup bileşikler hücre membranı ile etkileşimde olurlar (teraloz ve prolin gibi) ve çoğunlukla invertebratlar tarafından kullanılır. Bu bileşikler donma esnasında indüklenen hücre hacmi azalışında mebranın çift katmanlı yapısının stabil kalmasına yardımcı olurlar. Diğer grup ise düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlardır. Bu moleküller ortamda yüksek konsantrasyonda bulunduklarında hücre içi su kaybını sınırlamak için kolligatif bir yapı oluşturarak minimum hücre hacminin korunmasına yardımcı olurlar. Çoğu durumda hücre hacminin azaltılması ile toplam vücut suyunun %65'i buza dönüşür ve donma toleranslı organizmalar kış uykusu boyunca donma koşulları altında bu buzlanma oranının artmasını engellemek için hücrelerinde yeterince kriyoprotektan biriktirirler (Storey vd. 1992, 2021).

Kriyoprotektan görevi gören düşük moleküler ağırlıklı organik moleküllerin yüksek konsantrasyonlarda birikmesi, ektotermiler arasında soğuğa dayanıklılığının yaygın bir özelliğidir. Karasal omurgasızlar, donmadan kaçınma veya donma toleransı stratejilerine hizmet etmek için tipik olarak büyük miktarlarda gliserol ve/veya diğer polihidrik alkoller biriktirirler (Storey ve Storey 2012, 2020). Araştırmalar kriyoprotektan olarak birçok farklı molekülün kullanılabileceğini göstermiştir. Örneğin donma toleranslı böcekler arasında gliserol oldukça yaygın bir kriyoprotektandır. Bunun yanında sorbitol, ribitol, eritrol ve etilen glikol gibi diğer polihidrik alkollerin yanında teraloz ve sükroz gibi disakkaritler de böcekler tarafından kullanılır (McNally 2002, Storey ve Storey 2005, Alexander I. Zhmakin 2009, Lin 2009). Bu glikanlara ek olarak *Chrysems picta marginata* kaplumbağası gibi bazı donma toleranslı hayvanların hücre içi amino asit miktarlarını donma durumunda yükselttikleri tespit edilmiştir (Churchill ve Storey 1993).

Glikoz, gliserol ve üre, donma toleranslı amfibiler tarafından kullanılan en yaygın kriyoprotektanlardır (Churchill ve Storey 1993, Layne ve Jones 2001, Storey 2004, Costanzo 2005, Biggar vd. 2015, Storey ve Storey 2017, Niu vd. 2018, Amaral vd. 2020).

Glikoz kalıntılarının çok dallı bir polimeri olan glikojen, omurgalı hayvanlarda karbonhidratların ana depolama şeklidir. Karaciğerdeki glikojen, omurgalılarda önemli bir enerji deposu olmasının yanında donma toleranslı organizmalarda bu glikan, donmadan korunma için de önemli bir kaynak görevi görür. Anurlarda, bu glikan sadece bazal metabolizmayı beslemekle kalmaz, aynı zamanda üreme mevsimi boyunca önemli bir enerji kaynağıdır ve donma toleranslı organizmalar söz konusu olduğunda kritik bir kriyoprotektan kaynağıdır (Wassersug vd. 1993, Bollen vd. 1998, Storey ve Storey 2004, Dieni vd. 2012, Sinclair vd. 2013). Ağaç kurbağasında donma sırasında harekete geçirilen ana kriyoprotektan glikozdur (Mattice 2018, Costanzo 2019, Hawkins vd. 2019, Storey ve Storey 2019, 2020). Kış uykusundan önce, ağaç kurbağalarının (*R. sylvatica*) karaciğerindeki glikojen depoları, gram ağırlığı başına 1000 μ mol glikoz eşdeğeri veya taze karaciğer ağırlığının % 18'i kadar olan çok yüksek seviyelerde bulunur (Storey ve Storey 1984, 1986, Storey vd. 1997).

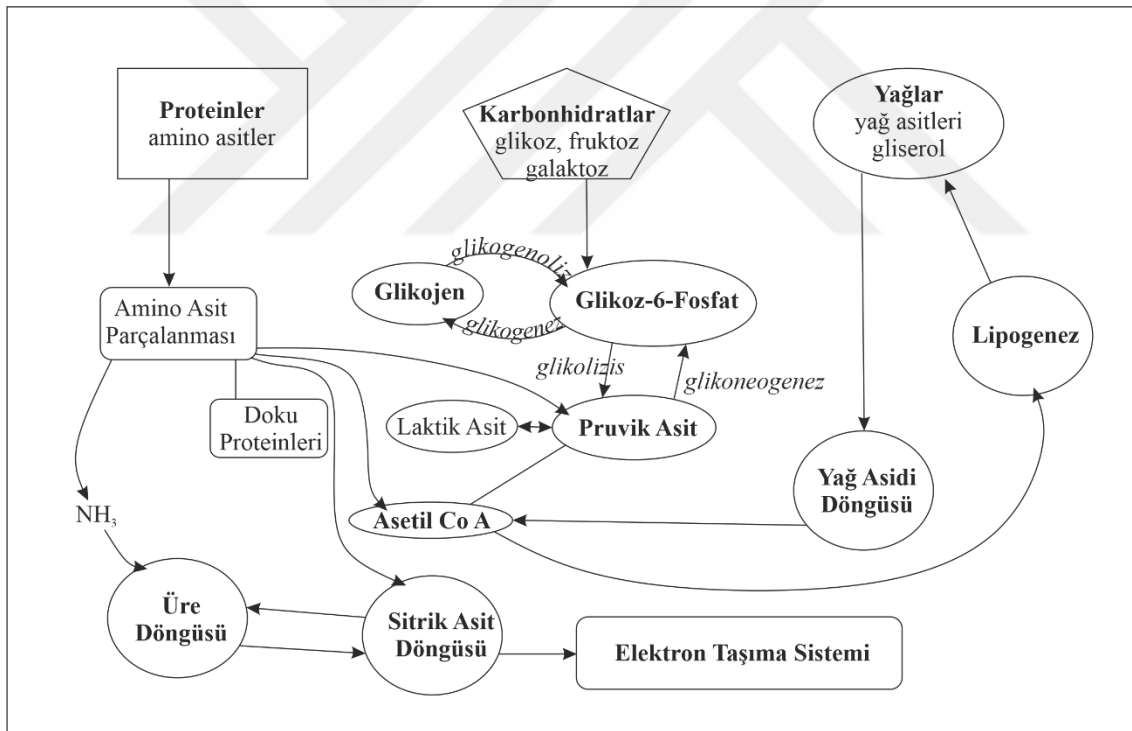
2.3.2.1 Glikoz

Dokularında glikoz seviyelerinin donmaya bağlı olarak yükselmesi, donma toleranslı *Rana* ve *Pseudacris* türlerinde (Tablo 1) yaygın olarak tespit edilmiştir; glikoz ekolojik olarak yüksek donma toleransı gösteren türlerde çok yüksek seviyelerde ancak yalnızca kısa donma maruziyetlerine dayanabilen türlerde daha düşük miktarlarda üretilir. Glikoz seviyesinin hayvanların doğal ortamlarındaki çevresel şartlara da bağlı olduğu, -2,5 °C'de donmaya maruz bırakılan Ohio bölgesindeki *R. sylvatica*'nın plazma ve iç organlarındaki glikoz seviyesi 5 mM'den 250 mM'a kadar çıkabilirken Alaska bölgesi hayvanlarında bu konsantrasyon 800 mM'a kadar çıkabildiği gösterilerek bildirilmiştir (Costanzo vd. 2013, Amaral 2014, Larson vd. 2014).

Glikoz donmanın yanında dehidrasyon koşullarına karşı da yükselen bir metabolittir. Örneğin donma toleranslı olmayan leopar kurbağası (*R. pipiens*) dehidrasyon koşullarında karaciğer glikoz seviyesini kontrol grubuna göre 24 kat artırmıştır. Bu oran yüksek donma toleranslı *R. sylvatica* ve *P. crucifer*'in dehidrasyon koşullarındaki artış oranlarından da yüksektir (Churchill ve Storey 1993, 1994, 1995). Vücut suyunun %50-60'ı kadar dehidrasyonu esnasında da donma koşullarında olduğu gibi doku ve

organlardaki glikoz seviyeleri artmaktadır. Bunun sebebi hücreler açısından, vücuttan buharlaşarak kaybedilen su miktarına bağlı olan ve hücrede buza dönüşecek olan suyun hücre dışına çıkması sonucu ortaya çıkan hücrelerdeki hacim kaybı ve iyonik güç aynı sonuçlara sebep olur (Storey ve Storey 2017).

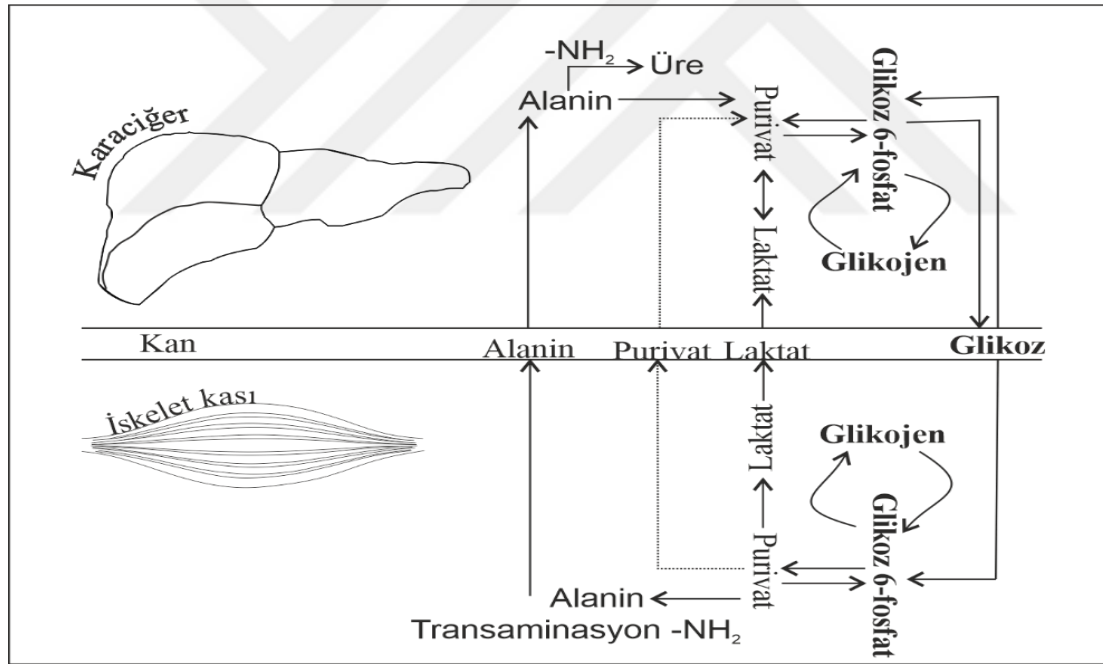
Metabolizmada enerji üretmek için kullanılan hammaddeler karbonhidratlar, yağlar ve proteinlerdir. Bu metabolitlerin parçalanması ve işlenmesi ile farklı yollar kullanılarak enerji eldesi sağlanır (Şekil 2.3). Organizmaların çoğu temel enerji kaynağını glikoz yıkımı (glikolizis) yolu ile elde eder. Kullanabileceğinden fazla glikoz ve benzeri glikanları da glikojene çevirerek (glikojenez, glikogenez) karaciğer ve kas dokularında depolar. İhtiyaç duyulduğu anda bu depo glikojen hızlıca glikoza dönüştürülür (glikojenoliz, glikogenoliz) (Şekil 2.4).



Şekil 2.3 Omurgalı canlılardaki metabolizma özeti.

Donma toleranslı kurbağalarda donma süreci başladığında hepatositlerin "beta-adrenerjik" uyarımı ile büyük miktarlarda glikogenolizis işlemi için süreç başlatılır ve bu, donmanın ilk dakikalarında protein kinaz A'nın (PKA) hızlı bir şekilde aktivasyonu ile sonuçlanır (Holden ve Storey 1996, McNally 2002, Rey vd. 2008, Roy ve Goswami 2019,

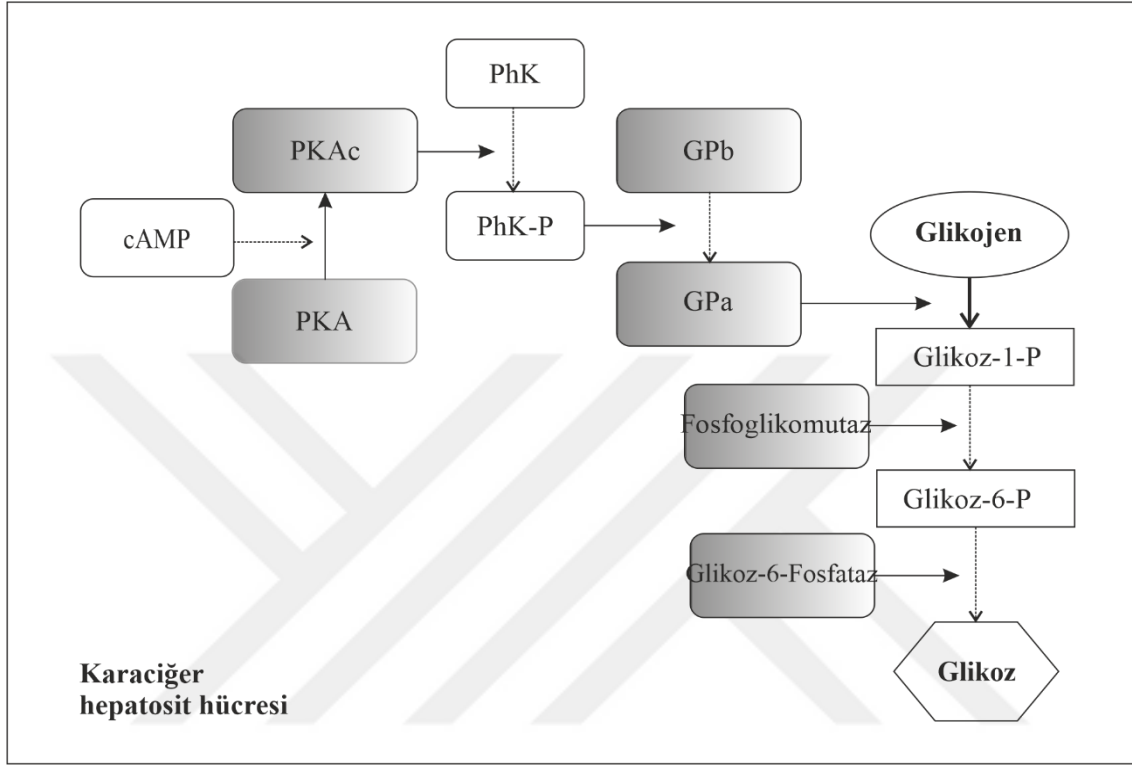
Zhang vd. 2020). Dört cAMP (siklik adenozin monofosfat) molekülünün PKA'nın iki düzenleyici alt birimine bağlanması, iki katalitik alt birimi (PKAc) inaktif tetramerik holoenzimden serbest bırakarak enzimi etkinleştirir (Taylor vd. 1990, Storey ve Storey 2004, Dieni vd. 2012, Amaral 2014, Mattice 2018). Aktif PKA, glikojen fosforilaz kinazı (PhK) fosforile eder, bu da glikojen fosforilazı (GP) fosforile eder. GP'nin fosforilasyonu, enzimin inaktif formu olan GPb'nin aktif forma yani GPa'ya dönüştürerek glikojenolizi tetikler, bunun sonucunda fosfoglikomutaz ve glikoz-6-fosfataz enzimlerinin aktifleşmesi ile glikoz üretimi gerçekleşir (Şekil 2.5) (Crerar vd. 1988, Storey ve Storey 2004, Amaral 2014, Amaral vd. 2020). Bu enzimatik yolun etkinliği, donma ilerledikçe ve buz biriktikçe kriyoprotektan dağılımı azaldığından, donma işleminin başlarında kan ve dokularda glikoz dağılımına izin vermek için hızlıca gerçekleşir (Lee vd. 1992, Storey ve Storey 2005, Roy ve Goswami 2019).



Şekil 2.4 Karaciğer ve kas ve kan dokusunda glikoz döngüsü ve taşınımı.

Anurlarda glikojen rezervleri kış dönemi sonrasında başlayan üreme dönemi ile minimuma, sonbahar ve kış başlarında ise maksimuma ulaşır. Ayrıca glikojen rezerv oranlarının da maruz kalınan çevresel şartlarla ilişkili olduğu *R. sylvatica*'nın Alaska ve Ohio populasyonlarının incelendiği bir çalışmada daha ılıman iklim şartlarına maruz

kalan Ohio kurbağalarının ilkbahar döneminde Alaska kurbağalarına göre daha düşük glikojen sentaz aktivitesi gösterdiği belirtilerek bildirilmiştir (Amaral 2014).



Şekil 2.5 Glikojenoliz süreci, hücrelerin glikojenden glikoz elde etme prosesi.

R. sylvatica'daki donma toleransının başarısı, donma kısmen başladığında tetiklenen glisemik tepkiye dayanır. Glikojen fosforilaz aktivitesi ile hızlı bir şekilde indüklenen glikojenoliz ile karaciğerdeki glikojenden üretilen glikoz, dolaşım tamamen durmadan önce hızlıca vücuttaki diğer dokulara taşınır (Storey ve Storey 1984, Storey 2004, Hawkins vd. 2019, Lung 2019, Gupta vd. 2020). Ayrıca glikozun dağıtımı için plazma membranındaki glikoz taşıyıcıların seviyesi de artar, böylece bu olay sadece glikoz salınımını değil aynı zamanda diğer organların glikoz alımını da hızlandırır (Storey ve Storey 1988, King vd. 1995, Roy ve Goswami 2019, Amaral vd. 2020). Glikoz, buz içeriğinin azaltılmasında ve hücrel dehidrasyonun kontrol edilmesinde rol alarak membranlar ve proteinler üzerinde spesifik etkiler gösteren bir kriyoprotektan görevi görür (Crerar vd. 1988, Costanzo vd. 2013, Lung 2019). Glikoz, konsantrasyona bağlı olarak sırası ile hücre, doku ve organizma düzeylerinde donma toleransını geliştirir.

Donmuş dokularda bulunan glikoz konsantrasyonu, hepatik glikojen rezervine, glikojen katabolizma hızına, dokuların donma hızına vb. diğer faktörlere bağlıdır (Costanzo vd. 1993b, Costanzo 2019, Amaral vd. 2020).

2.3.2.2 Gliserol

Gliserol çoğunlukla böceklerin soğuğa karşı koyma stratejilerinde rol alan bir kriyoprotektandır (Storey ve Storey 2012, Duman ve Newton 2020), bunun yanında gliserol *Salamandrella keyserlingii* ve *Hylid* türü kurbağalar tarafından da kriyoprotektan olarak kullanılabilir (Berman vd. 1984, Storey ve Storey 1985, 1986, Layne ve Lee 1989). *Dryophytes versicolor* (*Hyla versicolor*) ve *D. chrysoscelis*'de donma sürecinde gliserol seviyesi 300-425 mM seviyelerine ulaşabilir (Layne ve Lee 1989, Storey ve Storey 2004, Stogsdill vd. 2017, Storey vd. 2021). Glikozda olduğu gibi gliserol seviyelerini de hayvanların erişkin ya da juvenil olması, coğrafi dağılımı, örnekleme zamanı ve laboratuvar koşulları gibi değişkenler etkileyebilmektedir (Irwin ve Lee 2003, Layne ve Stapleton 2009). Gliserol üretimi ve kullanımı glikoza göre hücre hasarı açısından daha avantajlı görünse de gliserol üretimi daha fazla ATP harcanmasını ve daha kompleks yollar gerektirir. Hangi karbonhidrat koruyucunun kullanılacağını seçimi evrimsel bir sıçrama olabilir, ancak kesinlikle çok düşük sıcaklıklara dayanabilen semenderler için, gliserol biriktirmenin avantajı kışın hayatta kalması için çok önemli olabilir (Storey ve Storey 2017).

2.3.2.3 Üre

Bir diğer ana kriyoprotektan molekül olan üre, hücre hacminin azalmasına karşı kolligatif direnç sağlayan ve vücut sıvısı ozmolalitesindeki net artışa önemli ölçüde katkıda bulunan bir metabolittir (Costanzo ve Lee 2008, Costanzo vd. 2013). Bununla birlikte, donma toleranslı kurbağalar tarafından üre sentezi, donmaya karşı doğrudan tepki olarak nadiren etki gösterir. Üre esas olarak yıl boyunca vücut hidrasyonundaki değişikliklere yanıt olarak ve kış uykusu alanları kuraklaştıkça oluşturulur ve birikir (Costanzo 2005, Costanzo ve Lee 2008, Hawkins vd. 2019). Alaska ağaç kurbağaları (*R. sylvatica*) soğuğa maruziyete yanıt olarak belirgin bir üre artışı sergileyebilir. Yaz sonunda kan

plazmalarındaki üre seviyesi 10 mM'dan 86 mM'a kadar artan kurbağalar dehidrasyon koşullarına maruz kaldıklarında ise bu seviye 187 mM'a ulaşmıştır (Costanzo vd. 2013). Üre birikiminin, tüm anurlarda dehidrasyon stresine karşı yaygın bir tepki olup kurak ortamlarda estivasyon sırasında veya aşırı tuzlu çevresel şartlarda artış gösterdiği bilinmektedir (Hillman vd. 2008, Storey ve Storey 2017). Toprak altında ve yüzeyde yaşayan karasal kurbağalarda ortamdaki su miktarı azaldıkça vücutlarında kademeli olarak üre birikir ve oluşan yüksek ozmolalite vücuttan su kaybını geciktirmek ve aynı zamanda topraktan su alımını teşvik etmek için bir araç olarak kullanılır (Hillman vd. 2008).

Dryophytes chrysoscelis gliserolü kriyoprotektan olarak kullandığı bilinen donma toleranslı kurbağalardan biridir. Ancak yapılan yeni çalışmalar bu kurbağanın üreyi de kriyoprotektan olarak kullandığını ortaya koymuştur. Soğuğa maruz kalan hayvanların kas ve karaciğer dokularındaki üre miktarları kontrol grubuna göre en az 2 kat artmıştır (Amaral vd. 2018). Buna ek olarak, Tibet platosunda yayılış gösteren *Nanorana pleskei* (Dicroglossidae) vücut sıvısının %27,5'i -2,0°C'de donmasına rağmen hayatta kalabilmiştir. Bu süreçte üre seviyesi 72 mM'dan 102 mM'a yükselirken glikojen, glikoz ve laktat seviyelerinde önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Niu vd. 2018). Tibet platosuna endemik *N. parkeri*'de donma toleransı araştırmaları sırasında LC-MS bazlı metabolit değişiklikleri sonucu karaciğerde 33 kas dokusunda 36 metabolitin kontrol grubuna göre farklı ifade olduğu tespit edilmiştir. Donma sonrası büyük ölçüde değişimi kaydedilen ornitin, melezitoz ve maltotrioz moleküllerinin kriyoprotektan etki gösterebileceği bildirilmiştir (Niu vd. 2021).

2.3.2.4 Antioksidanlar

Organizmalar antioksidan savunmalarını, birçok strese karşı cevap olarak güçlendirirler (Kültz 2005). Bu streslere değişen çevresel koşullarının getirdiği oksijen kısıtlamasına bağlı anoksi ya da hipoksi durumları da dahildir ve antioksidan savunma hipometabolizmaya bağlı adaptif bir koruma tepkisi olarak ortaya çıkar (Storey ve Storey 2007, Hermes-Lima vd. 2015). Kışın genellikle metabolik aktivitenin düşük olduğu bir dönem olmasına rağmen, hayvanların temelde üç nedenden dolayı değiştirilmiş veya

geliştirilmiş antioksidan savunmaya ihtiyacı olabilir. Bu nedenlerden ilki, organizmalar bir dizi abiyotik strese karşı hala savunmasızdır (örneğin, ultraviyole radyasyon, oksijene erişim, donma, vb.) ve bu stresler serbest oksijen radikallerinin (ROS) oluşumunu tetikleyebilir. İkincisi, hipometabolik halde iken, donmuş veya uyuşuk hayvanların oksidatif strese rejenerasyon veya yeni antioksidan molekül sentezi ile yanıt verme kapasitesini sınırlayabilir. Son olarak, donma toleranslı hayvanlar için donma-çözülme döngüleri boyunca oksijen varlığında (donma sırasında tükenme, çözülmeyle birlikte hızla yeniden oksijenlenme) zararlı ROS seviyeleri ürettiği bilinen durumlardır, yani iskemi / reperfüzyon hasarının felç veya kalp krizi ile ilişkili olduğu iyi bilinir (Storey ve Storey 2017, Lung 2019, Hawkins 2020, Storey vd. 2021).

Oksijene erişim olanakları ve hareket kapasiteleri donan hayvanlara göre daha fazla olanlar (örneğin, anoksiye toleranslı kaplumbağalar ve kış uykusundaki memeliler) ya yüksek yapısal antioksidan savunmalarını sürdürürler ya da mevsimsel olarak değişkenlik gösteren antioksidan seviyelerine sahiptirler (Hermes-Lima ve Zenteno-Savín 2002, Hermes-Lima vd. 2015). Bunlara ek olarak, glikoz ve bazı glikoproteinler iyi bilinen prooksidanlardır. Böcekler ve gelgit bölgelerindeki yumuşakçalar dahil birçok donma toleranslı türden elde edilen veriler antioksidan savunmanın aynı zamanda başarılı bir donma toleransının en önemli parçalarından biri olduğunu göstermiştir (Storey ve Storey 2013, 2017, Tang vd. 2021).

2.3.3 Antifriz Proteinler

Kriyoprotektan biyosentezine ek olarak, donma toleranslı organizmaların 0 °C'nin altındaki sıcaklıklarda hayatta kalmasının bir diğer stratejisi de buz oluşumunu yönetmek ve engellemektir. Bu süreçte buz çekirdekleyici proteinler (INP, ice nucleating protein) ve antifriz proteinlerin (AFP, antifreeze protein ya da IBP, ice binding protein) sentezi ile donma sürecinin düzenlediği bilinmektedir (Duman 1982, 2001, Duman ve Newton 2020, Niu vd. 2021). INP'ler buz kristalizasyonunu teşvik ederken, AFP'ler buz kristallerinin genişleyen yüzeylerine bağlanırlar ve tehlikeli boyutlara ulaşmalarını engeller. INP'ler hücre dışı boşluklarda kristalleşmeyi indüklerken buz tutmayan hücreler ve çevrelerindeki ozmolalitenin artışı sağlanmış olurlar. Böylece bu bölgelerin buzlanması

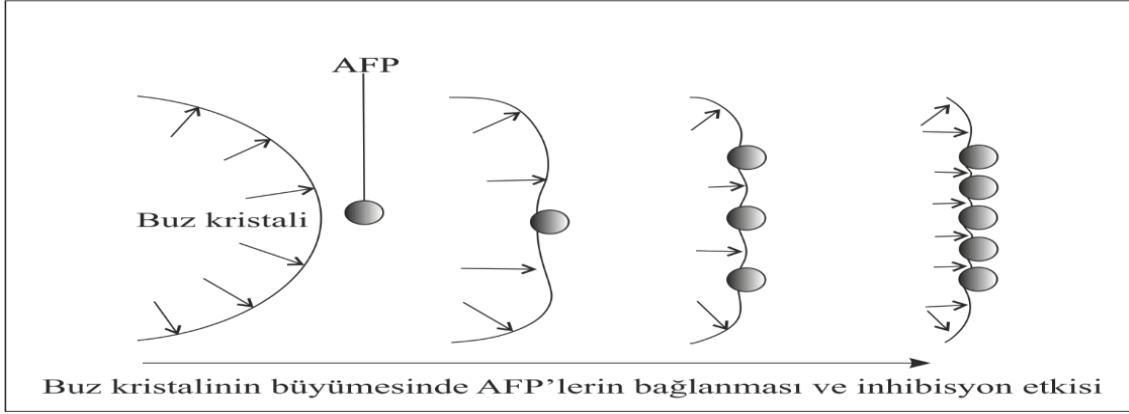
ve aşırı soğuması önlenir (McNally 2002, Lung 2019, Duman ve Newton 2020, Storey vd. 2021).

INP'ler donmaya toleranslı hayvanlar için önemlidir, çünkü buz büyümesinin tetiklenmesini yaparak hücre hacminin küçültülmesi tehlikeli olabilecek hücre içi donmayı engeller ve hücrelerin aşırı soğuması en aza indirilir ve böylece donma yavaş ve düzenli bir şekilde ilerleyebilir (Duman 2015, Duman ve Newton 2020, Storey vd. 2021). Böcekler son bahar döneminde INP sentezleyip depolayabilseler de amfibiler bunu gerçekleştiremezler. INP'ler, özellikle donmaya toleranslı kurbağalar için çok önemlidir, çünkü çeşitli kriyoprotektan önlemler (örneğin donmaya duyarlı proteinlerin ve kriyoprotektan birçok metabolitin ifade seviyesinin yükselmesi) yalnızca vücut sıvıları donmaya başladığında tetiklenir (Storey ve Storey 1988, 2013, Zachariassen ve Kristiansen 2000, Duman 2001). Buzun büyümesini ve rekristalizasyonunu engelleyen AFP'ler ilk olarak Antarktika teleost balıkları (Notothenioidei) üzerinde yapılan çalışmalarda keşfedilmiştir (Devries 1971) ve geçen süreçte birçok soğuk su deniz balığının yanı sıra donmadan kaçınma stratejisini kullanan bazı karasal böceklerde de tespit edilip tanımlandı (Duman 2001, 2015, Fletcher vd. 2001, Davies 2014).

Balıklar, AFP çalışmalarında en fazla çalışılan grup olmuştur ve antifriz proteinleri (AFP) Tip 1 AFP, Tip 2 AFP, Tip 3 AFP, Tip 4 AFP ve Antifriz glikoprotein (AFGP) olarak sınıflandırılmıştır (Storey ve Storey 1988, Duman vd. 1991b, Fletcher vd. 2001). Çoğu tropik ve subtropik iklim balıkları buzlu ortamlarda vücut sıcaklıkları $-0,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye düştüğünde donma stresine karşı koyamazlar, ancak Notothenioidlerin donmaları için vücut sıcaklıklarının $-2,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye düşmesi gerekmektedir (Eastman ve Devries 1986). Antarktik Okyanusunda bulunan Notothenioidei takımı buzullarla kaplı alanda yaşamlarını devam ettirebilen, yok olmaktan kurtulan ender canlılardır. Yapılan çalışmalarda bu koşullarda hayatta kalabilmelerinin sırrının glikoprotein yapıdaki antifriz proteinler (AFGP) olduğu anlaşılmış ve AFGP'lerin bulunduğu ilk tür Notothenioidlerden olmuştur (Crevel vd. 2002). AFGP'lerin varlığı Nototheniidae'den sonra 2000'li yıllara kadar Artedidraconidae, Batydracanydae, Channichthyidae, Muraenolepididae, Liparididae, Zoarcidae ve Myctophyidae familyalarında 37 türde tespit edilmiştir (Sidell 2000).

Günümüzde küresel olarak gıda, endüstri ve tıp alanlarında kullanım alanı bulunan AFP'ler mikroorganizmalar, bitkiler, sürüngenler, balıklar ve amfibilerde tespit edilmiştir (Crevel vd. 2002, Gupta ve Deswal 2014, Duman 2015, Naing ve Kim 2019). Antifriz proteinler adsorbsiyon-inhibisyon mekanizmaları ile termal histerisis (erime noktası düşmeden, donma noktasının düşürülmesi) etkilidirler. AFP'ler buz yüzeyine adsorbe olurlar ve dışbükey olarak buzlanmanın büyümesini kısıtlarlar (Şekil 2.6). Bu özellikleriyle AFP'ler organ naklinde, trombositlerin korunmasında, habis tümörlerin yok edilmesinde, donmuş gıda endüstrisinde yaygın kullanım alanı bulabilmektedir (Davies 2014, Olijve vd. 2016, Storey ve Storey 2017, Tejo vd. 2020). AFP'lerden uygulama ve araştırma aşamalarında olan; dokuların dondurularak korunmasında, kışın sert geçtiği bölgelerdeki ekinlerin donma noktasının düşürülmesinde, sıcak su balıklarının daha serin sularda üretilmesini ve adaptasyonunu sağlamada, dondurulmuş gıdaların raf ömrünü uzatmada, kriyocerrahinin gelişmesinde, transplantı veya transfüzyonu yapılacak dokuların daha iyi saklanmasında ve hipotermi tedavisinde olmak üzere farklı alanlarda yararlanılmaktadır (Bektaş ve Altıntaş 2007).

0 °C'de bile üreme faaliyetlerini devam ettirebilen psikrofil mikroorganizmaların varlığı bilinmektedir. Bazı gram pozitif ve gram negatif bakteriler, funguslar ve ökaryotik algler bu psikrofil mikroorganizmaları oluşturmaktadırlar. Psikrofillerin önemi donmuş ve hazır gıda endüstrisinin günümüzde yaygınlaşmasıyla insan sağlığı açısından etkili bir faktör oluşturdukları için daha iyi anlaşılmaktadır. Özellikle süt ürünlerinde sıkça rastlanan ve insan sağlığına zarar veren *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenesis*, *Chromobacterium* ve *Flavobacterium* cinsi bakteriler psikrofillere örnektir. Psikrofil bir maya olan *Trichosporon pullants* normal sıcaklıklardan 5 °C ortama transfer edildiğinde 26 farklı protein üretmiştir ve bunların çoğunun soğuğa direnç gösterme amaçlı olduğu belirtilmiştir (Üzümcü 2009).



Şekil 2.6 AFP lerin buz kristali yüzeyine bağlanması. Tejo vd. (2020)'den modifiye edilmiştir.

Böceklerde bulunan antifriz proteinler yüksek termal histerizis etkisine sahiptirler. Graham (1997) çalışmasında bulmuş olduğu böcek AFP'sini Tip 5 AFP olarak isimlendirmiştir. Yapılan çalışmalarda *Tenebrio* ve *Dendroides* familyalarında bulunan AFP'lerin diğer familyalardaki AFP'ler ile oldukça benzer olduğu belirtilmiş ve molekül ağırlıkları 8,3-12,5 kDa olup, aminoasit dizisi boyunca altıda bir sistin reziduesi yer aldığı bilinmektedir (Graham vd. 1997, Duman 2001). *Hypogastrura harveyi*'de (Kar piresi) AFP'lerin buza bağlanmasının diğer böceklerden farklı olduğu ortaya çıkmıştır. Kın kanatlılar ve güvelerde AFP'ler buza threonin bölgesinden bağlanırken, kar piresinde glisin bölgesinden bağlanmaktadır (Graham ve Davies 2005).

Bitki AFP'lerinin keşfi ile AFP'lerin sınıflandırılması daha karmaşık hale gelmiştir. Bitki AFP'leri diğer AFP'lere göre daha zayıf termal histerez aktivitesine sahiptir. Diğer AFP'lerin fizyolojik görevi ağırlıkla buz oluşumunu önlemek iken bitki AFP'leri çoğunlukla tekrar kristal oluşumunu (rekristalizasyon) engellemektedir (Griffith ve Ewart 1995, Gupta ve Deswal 2014, Naing ve Kim 2019). Bitki AFP'lerinin bazı durumlarda antifungal aktivite gösterdiği de bildirilmiştir (Griffith vd. 1992, Griffith ve Yaish 2004). Tahıllar gibi düşük sıcaklığa dayanıklı bitkiler, hücrelerinde buz oluşumunu ve gelişimini engellemede hücre duvarlarındaki bazı polisakkaritlerin üretimini ve antifriz proteinleri kullanırlar (Griffith vd. 1997).

AFP'lerin bitki ve hayvanlara dışarıdan enjekte edilmesi bazı metabolik ve fizyolojik değişiklikleri ortaya koymuştur. Fletcher (1986) Tip I AFP enjekte ettiği alabalıkların ölüm sıcaklığının düştüğünü göstermiştir. Bitkiler üzerine yapılan çalışmada,

Arabidopsis thaliana ve kanola bitkilerinin yapraklarına Tip I AFP'nin 1 mg/ml enjekte edilmesi, buz oluşma eşiğini kanola için 1,8  C, *Arabidopsis thaliana* için 4  C aşağı dışırmıştır. Fakat *Solanum tuberosum* yaprağına AFP eklendiğinde buz oluşma eşiğinin -7,2  C'den -0,8  C'ye yukseldiği bulunmuştur. Sonuç olarak AFP'lerin aynı yolla ilavesi tüm bitkilerde aynı etkiyi göstermemektedir (Fletcher vd. 1986, Cutler vd. 1989).

Birçok soğukkanlı tür için kışın hayatta kalma, donma, anoksi ve dehidrasyon toleransının yanında hücre dışı buz olarak toplam vücut suyunun yüksek bir yüzdesinin buza dönüşmesine dayanma kapasitesini içerir. *R. sylvatica* başta olmak üzere yüksek donma toleranslı hayvanlar sezonsal olarak ölümle yaşam arasında gidip gelmeyi başarabilmektedirler. Dondurucu soğuk koşullarından doku ve organlarında buz ve oksidatif stresin hasarlarına maruz kalmadan kurtulabilmektedir. Bu stratejinin insanlar için donör organ taşınmasındaki problemlere czm olacağı düşünülmektedir (Luu ve Storey 2018).

R. sylvatica, omurgalı donma toleransı clışmaları için kullanılan birincil model hayvandır ve güncel clışmalar, canlılığı destekleyen gen ifadelerindeki donmaya bağlı değişikliklere odaklanmaktadır (Liu vd. 2018, Lung 2019, Roy ve Goswami 2019, Hawkins 2020). *R. sylvatica* karaciğerinden elde edilen cDNA kütüphanelerinin incelenmesi ile donmaya bağlı indüklenen birtakım genler ortaya ckarılmıştır. Bunların bir kısmı daha önceden tanımlanmış olan proteinlere ait genler olup (fibrinojenin alfa ve gama alt niteleri, ATP/ADP translokaz ve mitokondriyal inorganik fosfat taşıyıcılardan sorumlu genler) diğer kısmı yeni keşfedilen amfibilere özgü proteinleri (FR10, FR47 ve Li16) ifade eden genleri içermektedir. Bu 3 yeni proteinin yapısal ortak özellikleri, membranlarla ilişkili hidrofobik bölgeleri bulunmaktadır ve her biri farklı dokularda farklı ekspresyon seviyeleri gösterebilmektedir. Farklı sinyal yolakları ile donma, anoksia ve dehidrasyon streslerinde aktif rol oynamaktadır (Cai ve Storey 1997, McNally 2002, Storey 2004).

Yapılan clışmalarda donma toleranslı amfibilere donma ve beraberindeki stresler ile ilişkili üç yeni gen tanımlanmıştır. Bu üç yeni gen *fr10*, *li16* ve *fr47* olarak isimlendirilmiştir (Cai ve Storey 1997, McNally 2002, McNally vd. 2003). Farklı

dokularda değişkenlik göstermekle beraber her üç geninde donmadan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Donma ile birlikte ortaya çıkan anoksi ve dehidrasyon koşulları ile de ilişkili olduğu bulunan bu genlerin protein ekspresyon seviyeleri incelendiğinde Li16 proteini donmaya yanıt olarak artarken FR10 ve FR47 protein seviyelerinde genel olarak değişiklik olmamış ya da aşağı yönlü regüle olduğu kaydedilmiştir (Sullivan 2011, Sullivan ve Storey 2012, Sullivan vd. 2015a, 2015b).

2.3.3.1 FR10

R. sylvatica'nın dokularından elde edilen cDNA kütüphanesinin incelenmesi sonucu kayıtlara geçen *fr10* geni, sekans analizleri yapıldığında protein kodlayan bölgesinin 457 bp olduğu bulunmuştur (Cai ve Storey 1997). Yapılan Northern blot analizi, tam mRNA sekansının yaklaşık 550 bp olduğunu göstermiştir. Dizinin bilgisayar yazılımı ile analizinde, 90 aa'lık, 10 kDa büyüklüğündeki bir polipeptidi (FR10 proteini) kodlayacak olan bir açık okuma çerçevesi öngörüldü. Polipeptit zinciri, 9 güçlü bazik ve 11 güçlü asidik amino asitten oluşur ve bu da tahmini izoelektrik noktasının pH 5,25 olduğunu göstermiştir. İlk 21 aa'nın N-terminal bölgesi oldukça hidrofobiktir, kalan peptit bölgesi ise güçlü bir şekilde hidrofilik olduğu kaydedilmiştir. 1997'de gerçekleştirilen BLAST kullanılarak benzerlikler için yapılan ilk araştırma, bu dizinin bilinen herhangi bir gen veya proteinle önemli bir homoloji paylaşmadığını gösterdi (Genbank U44831) (Cai ve Storey 1997).

R. sylvatica'nın donma maruziyeti sonrası karaciğerinden elde edilen cDNA kütüphanesi kullanılarak donma toleransından sorumlu *fr10* geni pBfFR14 rekombinant plazmidinde klonlanarak tanımlanmıştır. Hayvanın sekiz organındaki gen ekspresyonu için RNA blotlama analizi, donmaya (-2.5 °C'de 24 saat) maruz kalmanın transkripsiyon seviyesinin karaciğer ve bağırsakta yüksek oranda indüklendiğini; kalp, akciğer, beyin ve mesanede orta derecede yükseldiğini, ancak iskelet kasında hiçbir değişiklik göstermediğini ve böbrek dokusunda azaldığını göstermiştir. Bunn dışında donma ile birlikte indüklenen 3 gen daha kaydedilmiştir. Bunlardan ikisi karaciğer tarafından sentezlenen, pıhtılaşma ile ilişkili bir plazma proteini olan fibrinojenin alfa ve gama alt birimleri, sonuncusu da mitokondriyal iç plazmada yer alan ve ADP/ATP taşınımından

sorumlu ADP / ATP translokaz (AAT) genidir. AAT geni ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre, donmanın 8 saatlik bölümünde 4,5 kat yükselirken devam eden süreçte keskin bir düşüş göstermiştir (Cai ve Storey 1997, Storey ve Storey 2001).

2.3.3.2 Li16

İlk olarak *R. sylvatica*'dan izole edilen ve donma koşullarına duyarlı *li16* transkriptinin büyüklüğü 446 baz çiftidir (bp). Bu bölgenin yapılan araştırmalar sonucu 115 amino asitli (aa) bir proteini kodladığı tespit edilmiştir. Li16 proteinindeki amino asitlerin on altısının güçlü bazik ve on birinin kuvvetli asidik olarak bulunması ile izoelektrik noktasının pH 8.29 olduğu tahmin edilmiştir (McNally vd. 2002). Li16 proteininin bilgisayar modellemesi, N terminal uç bölgesine yakın güçlü hidrofobik özellikte olduğunu göstermiştir. Li16 proteininin hesaplanan moleküler kütlesi 12.8 kDa'dır, ancak yapılan Western blot çalışması, protein bandının 15 kDa'ya daha yakın olduğunu göstermiştir. Li16 keşfinin yapıldığı çalışmada ne transkript ne de protein sekansı, bilinen herhangi bir gen veya proteine önemli ölçüde benzerlik göstermediği için yeni bir gen ve protein olarak kaydedilmiştir (Genbank AF175980) (McNally vd. 2002).

Northern blot analizi *R. sylvatica* karaciğer dokusundan izole edilen *li16* transkript seviyesinin, 24 saat donma sonrasında kontrol grubuna göre 3,7 kat daha yüksek seviyeye ulaştığını gösterdi. Protein ekspresyon seviyesinin araştırıldığı immüno blotlama analizi, Li16 proteinin de transkript seviyesine paralel olarak kontrol grubuna göre 2,4 kat arttığını gösterdi. Karaciğerdeki gen ve protein ekspresyonu, anoksi maruziyetiyle kuvvetli bir şekilde uyarılırken dehidrasyon stresine daha az tepki göstermiştir. Li16'nın hem donmaya hem de anoksiye kuvvetli tepkisi ve oksijenin tekrar ortaya çıkması durumunda genin hızlı aşağı regülasyonu, Li16 proteininin donma sırasında iskemi direncinde rol oynayabileceğini göstermiştir (McNally vd. 2002).

2.3.3.3 FR47

Klonlama tekniği ile elde edilen ve 5 'RACE ile uzatılan *fr47* dizisinin 3678 bp olduğu bulunmuştur (Genbank AY100690) (McNally vd. 2002). Tam nükleotid dizisi bir açık

okuma çerçevesi için analiz edildiğinde, 2004 ve 2163 bp'de iki olası başlangıç bölgesi ve 3176 bp'de bir durdurma kodonu tespit edilmiştir. Teorik olarak bu bölgelerin, sırasıyla 45.7 ve 39.8 kDa'lık moleküler ağırlıklara sahip 390 ve 337 aa uzunluğunda polipeptitler üreteceği hesaplanmıştır. Bu gen, sentezini sağladığı proteinin büyüklüğünden dolayı *fr47* adını almıştır. Western blot analizi ile protein ürününün yaklaşık 47 kDa olduğunu belirledi, bu nedenle 2004. bp'deki ilk başlangıç kodonundan ifade olduğu anlaşıldı. Varsayılan FR47 proteininin bilgisayar modelleme analizi, aa dizisinin 350 ila 370 pozisyonları arasındaki C terminal bölgelerinin oldukça hidrofobik olduğunu göstermiştir. Böyle bir hidrofobik bölge muhtemelen proteine bir transmembran özellik sağlamaktadır (Sullivan 2011, Sullivan vd. 2015a).

R. sylvatica, *P. crucifer* ve *H. versicolor* gibi güçlü donma toleransına sahip kurbağalarda *fr47* geninin bulunduğu, ancak *R. pipiens* ve *Scaphiopus couchii* gibi donmaya dayanıklı olmayan türlerde ifade olmadığı belirtilmiştir. *R. sylvatica* ile yapılan çalışmada Northern blot analizi transkript seviyelerinin 24 saat donmada 5,1 kat, 24 saat anoksi maruziyetinde 6,4 kat ve %20 dehidrasyon sonrası 2,7 kat arttığını göstermiştir. Anti-FR47 antikoruyla gerçekleştirilen immüno blotlama çalışması, donma ve çözülme sırasında protein seviyelerinin arttığını, anoksi veya dehidrasyon maruziyetinde bir miktar azaldığını göstermiştir (McNally vd. 2002).

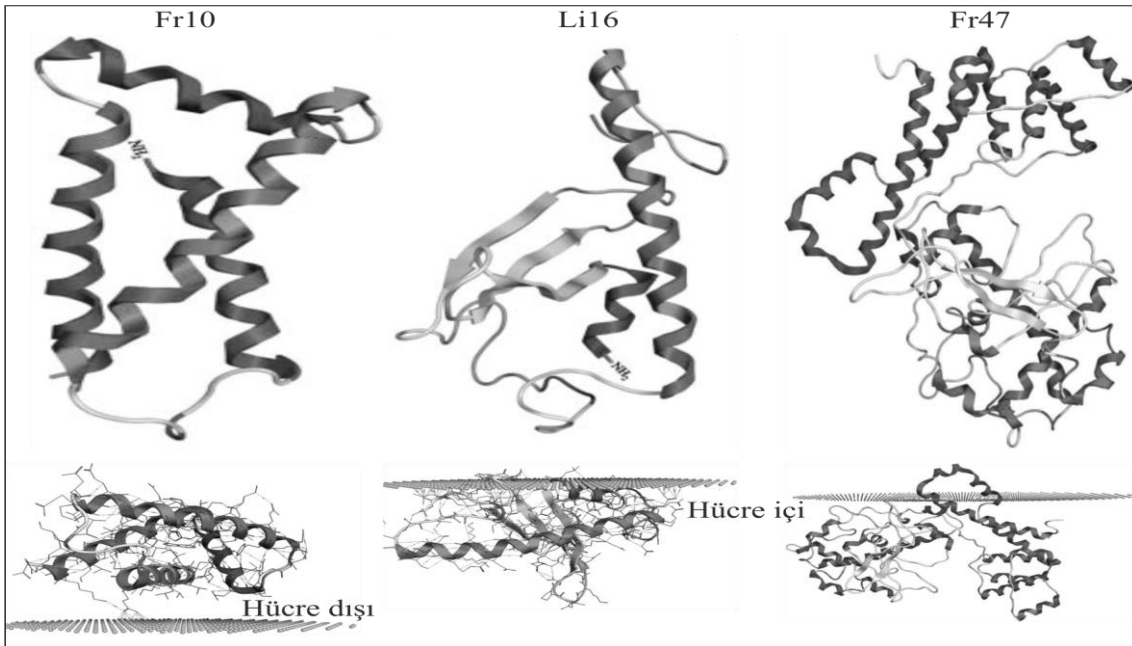
2.3.3.4 FR10, Li16 ve FR47 Proteinlerinin Biyoinformatiği

Bu tez kapsamında ele alınan ve literatüre donma toleransı ile ilişkili proteinler olarak kaydedilen FR10, Li16 ve FR47 proteinlerine ilişkin verileri aşağıdaki gibi derledik. İlgili genlere ait nükleotid dizileri NCBI web sitesinden (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) temin edilmiştir. GenBank erişim numaraları FR10, Li16 ve FR47 için sırası ile U44831.1, AF175980.2, AY100690.1'dir. Literatürden elde edilen 3 boyutlu protein yapıları ve hücre zarı geçiş modelleri de modifiye edilerek Şekil 2.7 de verilmiştir (Biggar vd. 2013, Sullivan vd. 2015a, 2015b).

FR10 proteinini kodlayan *fr10* geni 457 bp olarak tanımlanmıştır. Bu dizinin 42-314 ara bölgesi protein kodlayan bölge olarak tanımlanmıştır. FR10 proteini NCBI veri tabanına

AAC60284.1 protein tanımlama numarası ile kaydedilerek 90 amino asitten oluştuğu tespit edilmiştir. Bu amino asit dizisi “mkvllalvvlv iaisgleagv vkrdaqdplq qitdifqgis ktlqekfana eipsqtqelg akiqahgeti sasiqkwiee mvalskekls” sembolleri ile gösterilmektedir. UniProt veri tabanında Q91335 erişim numarası ile kayıtlı olan proteinin amino asit dizisindeki 1-18 arası bölgenin sinyal peptit bölgesi olduğunu görülmüştür. Bu bölge işleme bölgesi olup N-terminal sinyal ucunu içerir ve genellikle olgun proteinden çıkarılan bir bölümdür. Sinyal peptitleri tek geçişli zar proteinlerinde yer alır, sentezlenen proteinler hücre dışı veya periplazmik olarak görev yapabilirler.

li16 geni mRNA dizisi 429 bp’den oluşmaktadır. Nükleotit dizisinin 3-350 bölgesi protein kodlayan bölge olarak belirlenmiştir ve bu bölgenin 115 amino asitlik bir peptit zinciri oluşturduğu belirlenmiştir. 115 amino asitten oluşan Li16 geni NCBI veri tabanına AAG33070.2 protein tanımlama numarası ile kayıtlıdır. İlgili kayıt numarasına göre amino asit dizisi “maivlsalla ivliqvvepn skndrlrchs ctspackir nevecrsgqd tcqrthmpit dpsgtenrrn yyastsegii vlerlcttkk rcenakkrml srmsvdccqg plcna” sembolleri ile gösterilmektedir. Q9DG71 erişim kodu ile UniProt veri tabanında incelenen Li16 proteinindeki 115 amino asit dizisinin 1-19 bölgesi sinyal peptit bölgesi olarak tanımlanmıştır.



Şekil 2.7 FR10, Li16 ve FR47 proteinlerinin 3B yapıları ve hücre zarı ile etkileşim modelleri.

Donma toleransı ile ilişkili bir diğer protein olan FR47 proteini bu üç protein arasında en büyük olanıdır. Western blot analizlerine göre yaklaşık 47 kDa olan proteini kodlayan *fr47* gen bölgesi 3678 bp olarak tespit edilmiştir. Nükleotit dizisindeki 2004-3176 arası bölgenin protein kodlayan bölge olduğu belirlenmiş ve bu bölgeden 390 amino asitlik bir peptit dizisi sentezlendiği kaydedilmiştir. İlgili aminoasit dizisi “mgvmsgiqme miqnkwkhag ghiadgliit sqwlpftfet qisqvqltky lnamvnytii aslelwrrdq kfintlqcaf stlsyhiqvn rareelqsgn yhtwlkyfkg ldlentwfev pgreieceeq wcagrniym vegievmckl ivmpllvged ppefwypeiy ghyadtqdr hdlcllkhqs nickfqrmpv hignrfmeig pqhiclitnd ndtmrslrnt apfsgcimnv kvfkwlndtf ifesdadktf nrewavdnlt dttpfvisle pllqvlkese ilrkyiethe hylrnnllsa iidkgklihl ssqikeeth hwydvfsgws ptatktfswi fspilililg laivtvincc iyarikrrvk rlkrfstew” sembolleri ile gösterilmiştir. UniProt veri tabanında Q8JGN4 erişim numarası ile kayıtlı olan FR47 proteini amino asit dizisi incelendiğinde 349-375 arası bölgenin yoğun C-terminal bölgelere sahip güçlü hidrofobik özellikte olduğu ve bu bilgiler ışığında proteinin transmembran heliks özellikte olduğu belirlenmiştir.

Amfibilerin donma stresleri ile ilişkili oldukları bilinen bu proteinler hakkında hala yeterli düzeyde çalışma bulunmamaktadır. Proteinlerin donma streslerine cevap olarak seviyelerinin farklı dokularda koşullara göre değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenliklerin sebepleri yeterince aydınlatılmamıştır. Bunun dışında bu proteinlerin en önemli özellikleri olan buz kristallerine bağlanması ve buzı şekillendirmeleri hakkında da çalışmalar devam etmektedir. Buza bağlanma bölgeleri ve buz şekillendirme stratejileri de tam olarak aydınlatılmamış noktalardandır. Bu alanda daha fazla çalışma yapılması hayvanların donma toleransı stratejilerini anlaşılmasına olanak sağlayacaktır.

Genel olarak, donma toleransı hayvanların haftalarca hareketsiz, bir buz parçası şeklinde donup ancak hayatta kalabildikleri biyokimyasal ve ekofizyolojik bir adaptasyondur. Son yıllardaki çalışmalar hayatta kalmanın, hücre koruma stratejilerinde birçok karmaşık moleküler sistem sayesinde gerçekleştiğini göstermektedir. Bu alandaki öncü bilim insanlarından olan Prof. K. B. Storey donma toleransını şöyle ifade etmektedir; “Donma toleransı, hayvan adaptasyonlarının zirvelerinden biridir ve seçilmiş türlerin Dünya üzerindeki en soğuk bölgelere uyum sağlamalarına, direnmelerine, başa çıkabilmelerine ve yayılmalarına izin vermek için hemen her hileyi bir araya getirmesidir”.

2.4 Anadolu Dağ Kurbağaları ve Habitat Koşulları

Anadolu dağ kurbağaları genellikle yükseltisi 1000 m ve üzeri olan bölgelerde dağılım gösterirler. Anadolu’da yaşayan dağ kurbağaları ilk tanımlamalarına göre *Rana macrocnemis* (Boulenger 1885), *R. camerani* (Boulenger 1886), *R. holtzi* (Werner 1898) ve *R. tavasensis* (Baran ve Atatür 1986) türlerini içermektedir. Zaman içerisinde yapılan morfolojik, genomik ve proteomik çalışmalar ayrı tür olarak değerlendirilen bazı dağ kurbağası türlerinin aralarında fark olmadığını savunmaktadır. Bu konudaki bazı sistematik çalışmalarda Anadolu dağ kurbağalarının iki tür (*R. macrocnemis* ve *R. tavasensis*) ile temsil edildiğini belirtilmiştir (Çevik vd. 2006, Afsar vd. 2014, 2015, Ergül Kalaycı vd. 2017). Bu tez kapsamında hipotezimizi kurarken belirlediğimiz Anadolu dağ kurbağaları *R. macrocnemis* (Uludağ kurbağası), *R. holtzi* (Toros kurbağası) ve *R. tavasensis* (Tavas kurbağası) türleri olmasına rağmen ilerleyen süreçte endemik Tavas kurbağasının nesli tükenmekte olan (EN) türler listesinde olması (Kaska ve Avcı 2009) ve kısıtlı dağılım alanından dolayı çalışma kapsamından çıkartma kararı alınmıştır.

Kurbağalar için aktif dönem genellikle mayıs ayında başlar ve ekim ayında sona erer. En yaygın dağ kurbağası olan *R. macrocnemis*’in beslenme tercihleri incelendiğinde diyetlerinin büyük bir bölümünü (%96,5) böceklerin oluşturduğu tespit edilmiştir. Cinsiyete göre beslenme rejimlerinin farklılık göstermediği gibi üreme sonrası dönemde üreme dönemlerine göre daha fazla beslendikleri kaydedilmiştir (Çiçek 2011). Uludağ kurbağası olarak da bilinen *R. macrocnemis*, Kafkasya’nın orman ve subalpin kuşağında ve Türkiye ve İran’daki komşu bölgelerde yaygın olarak bulunur. Türler, IUCN Kırmızı Listesinde LC (Asgari Endişe) kategorisine dahil edilmiştir (Başoğlu ve Özeti 1973, Tarkhnishvili ve Gokhelashvili 1999, Veith vd. 2002, Kuzmin vd. 2009, Çiçek 2011, Gidiş ve Başkale 2020). Türkiye’nin doğusu ve Güney Kafkasya, *R. macrocnemis*’in dağılım aralığının merkezini oluşturmaktadır (Najibzadeh vd. 2017a, Pesarakloo vd. 2020). Türkiye’de *R. macrocnemis* Türkiye’nin en soğuk illerinden olan Ardahan ve Erzurum’da da dağılışı göstermektedir ve bu nedenle araştırma için uygun örnek toplama alanları bu illerden seçilmiştir. Ardahan yılda ortalama 40 gün kar yağışı olan ve yaklaşık 4-4,5 ay süren kar örtüsüyle kaplı bir bölgededir (Günel 2013). Türkiye için 5 cm toprak sıcaklığı verilerine göre (Şekil 2.7), Ardahan’ın son 30 yılda ortalama toprak sıcaklığı 3,1 °C ve minimum toprak sıcaklığı -30 °C olarak kaydedilmiştir. 61 yıllık hava sıcaklığı

kayıtlarına göre Kasım-Şubat ayları arası ortalama sıcaklıklar -0,3 ila -10,1 °C aralığında olduğu tespit edilmiştir (İnt. Kyn. 1, İnt. Kyn. 2).

Bu çalışmada kullanılan bir diğer tür ise Toros kurbağası olarak bilinen *R. holtzi*'dir. Bu tür, IUCN Tehdit Altındaki Hayvanların Kırmızı Listesinde kritik düzeyde nesli tükenmekte olan (CR) türler olarak kategorize edilmiştir (Kurtuluş vd. 2009). Toros kurbağası, Türkiye'nin güneyindeki Toros sıradağlarında yer alan Bolkar Dağları'na (rakım ≥ 2500 m) özgü bir kahverengi kurbağa türüdür (Kaya vd. 2005, Miaud vd. 2007, Guarino ve Erismis 2008). Endemik *R. holtzi*, Karagöl ve Çinigöl göllerinde sırasıyla 2500 ve 2600 m rakımlarda bulunmaktadır. Bu iki göl arasındaki doğrusal mesafe yaklaşık 325 m'dir. Çayırlarla çevrili olan Karagöl, bu türün tip yerleşim yeridir. *R. holtzi*'nin doğal yaşam alanını oluşturan göller bölgesi, neredeyse yılın altı ayı karla kaplıdır. Kurbağalar çayırılık alanlarda kış uykusuna yatarlar ve mayıs ayında yumurtalarını bırakmak için göle göç ederler. İlkbaharda yavru kurbağalar aktif döneme yetişkinlere göre daha geç geçer ve sonbaharın başında kış uykusuna yatarlar (Baran vd. 2007, Miaud vd. 2007, Yıldız ve Göçmen 2012). Bölgeye yakın olan Niğde iline ait iklim verilerine göre (1935-2019 yılları arası) ortalama en düşük sıcaklık değerleri Aralık, Ocak ve şubat aylarında sırası ile -2,5, -4,6 ve -3,4 °C olarak tespit edilmiştir (İnt. Kyn. 2).



Şekil 2.8 Türkiye 5 cm ortalama toprak sıcaklığı dağılım haritası.

2.4.1 Anadolu Dağ Kurbağalarının Sistematiği

Anadolu dağ kurbağalarından *R. macrocnemis* ilk olarak Uludağ, Türkiye’de tanımlanmıştır (Boulenger 1885). *R. camerani* ise bir yıl sonra ilk olarak Gürcistan’da tanımlanmış (Boulenger 1886) ve daha sonraları bu taksonun Anadolu’da Erciyes Dağında dağılışı gösterdiği tespit edilmiştir (Werner 1898). Dağ kurbağalarının yayılış alanları Anadolu ve Kafkas Sıradağları boyunca devam edip Rusya’nın Stavropolskii bölgesinde 3000 m rakıma kadar ulaşmaktadır (Kuzmin vd. 2009).

Anadolu dağ kurbağalarının taksonomisine ait ilk çalışmalarda 24 farklı populasyon incelenerek *R. macrocnemis* ve *R. camerani* olarak sınıflandırılmıştır. Bunların yanında Denizli, Tavas, Akdağ Çakıroluk mevkiinden alınan örneklerin hem Uludağ kurbağası hem de Erciyes kurbağasından farklılıklar gösterdiği tespit edilerek *R. macrocnemis tavasensis* adı ile yeni alttür olarak tanımlanmıştır (Baran ve Atatür 1986). Kafkasya bölgesindeki 14 Gürcü dağ kurbağası populasyonu incelendiğinde *R. macrocnemis* ve *R. camerani*’nin sekiz morfolojik farklılıkla birbirinden ayrı türler olduğu; *R. macrocnemis*’in yüksek kesimlerdeki ormanlık bölgelerde, *R. camerani*’nin ise ağaçsız yaylalarda dağılışı gösterdiği belirtilmiştir (Tarkhnishvili ve Gokhelaşvili 1999).

Anadolu dağ kurbağalarının morfolojik ve serolojik incelemeleri sonucu Anadolu’da yalnızca iki tür dağ kurbağası olduğu savunulmuştur. Yapılan analizler daha önce ayrı tür sayılan *R. camerani*’nin *R. macrocnemis* ile sinonim olduğunu ve aynı tür olarak kabul edilmesi gerektiğini göstermiştir. Sonuçlara göre Anadolu dağ kurbağaları *R. macrocnemis* ve *R. holtzi* olarak sınıflandırılmıştır (Çevik vd. 2006). Bu çalışmadan iki yıl sonra *R. macrocnemis*’in İzmir-Bozdağ ve Denizli-Akdağ populasyonlarının incelenerek, iki populasyon arasında anlamlı ölçüde morfolojik farklılıklar içerdiği tespit edilmiş ve bu sonuçların daha önce bu bölgelerdeki populasyonları *R. macrocnemis macrocnemis* (Bozdağ) ve *R. macrocnemis tavasensis* (Akdağ) alttürleri olarak tanımlayan çalışmayı (Baran ve Atatür 1986) destekler nitelikte olduğu belirtilmiştir (Şahin 2008).

Güncel moleküler sistematik çalışmalar türlerin sınıflandırılmasına yeni bakış açıları kazandırmaktadır. Bu kapsamda, 16S rRNA gen bölgesinin incelemesi sonucu *R.*

macrocnemis ve *R. tavasensis* olarak iki türün varlığı rapor edilmiştir. *R. holtzi* ve *R. camerani*'nin *R. macrocnemis* den farklı olmadığını belirtilmiştir (Veith vd. 2002, Kurnaz 2020). Ancak diğer bir çalışma kan serumu ve morfolojik karakterlere dayanarak *R. holtzi*'nin ayrı bir tür olduğunu belirtmiştir (Çevik vd. 2006). Son yıllarda yapılan bir diğer moleküler çalışma kapsamında, *R. macrocnemis*, *R. camerani*, *R. holtzi* ve *R. tavasensis* türleri iki mitokondriyal gen (CytB, 481bp ve COI, 743 bp) ve iki protein kodlayan çekirdek geni (POMC, 401 bp ve RAG1, 717 bp) açısından incelenmiş ve karşılaştırılarak filogenetik analizleri yapılmıştır. Haplotip analizi sonuçlarında *R. tavasensis* diğer türlerden yüksek farklılıkla ayrışırken *R. macrocnemis*, *R. camerani*, *R. holtzi* grupları arasında bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlar ile Anadolu dağ kurbağaları *R. macrocnemis* ve *R. tavasensis* olarak ayrılmıştır (Ergül Kalaycı vd. 2017). Kahverengi kurbağalarının filogenetik ilişkisi defalarca çalışılmış olsa da Anadolu-Hyrkania (İran ve Türkmenistan'ın Hazar Denizi hattı; İran-Turan geçiş hattı) kahverengi kurbağalarının taksonomik durumu ve filogenetik ilişkisi hala tam olarak çözülememiş, araştırma ve tartışmalar devam etmektedir. Moleküler çalışmalarda 16S rRNA ve sitokrom b genleri incelenerek Batı Palearktik kahverengi kurbağalarının filogenetik durumu bir moleküler saat uygulaması ile araştırıldığında, Batı Palearktik kahverengi kurbağalarının erken Miyosende yaklaşık 20,2 myö (milyon yıl önce) ve Hyrkania soyu (*R. pseudodalmatina*) 16,6 myö Anadolu soyu olarak ayrıldığını göstermiştir. Anadolu soyunun daha sonra orta Miyosende yaklaşık 14,5 myö, *R. macrocnemis* ve *R. tavasensis* olarak iki alt-klad'a ayrıldığı belirtilmiştir. Bu iki soy arasındaki çeşitlenmenin Tetis okyanusunun (günümüzde geriye kalan Akdeniz ve kuzeyde Paratetis kolunda Karadeniz, Aral ve Hazar denizleridir) oluşumu ve Türk-İran Platosunun yükselmesi ile Türk-İran popülasyonları arasında gen aktarımının sınırlanması ile yakından ilişkili olduğu kaydedilmiştir (Najibzadeh vd. 2017b).

2.4.2 Anadolu Dağ Kurbağalarının Popülasyon Durumu ve Dağılımı

Azalmakta olduğu bildirilen (Kuzmin vd. 2009) *R. macrocnemis*'in Uludağ'da bulunan popülasyon dinamiği subalpin ve ormansal alanlarda yapılan incelemelerde 1,3 hektar alanda 7643 birey bulunduğunu, 1476 ile 2450 m yükseklik aralığında erkeklerin ortalama yaşının 4, dişilerin 4,5 olduğu göstermiştir. Nisan ayı başlarında üreme dönemi başlayan bu türün yumurtalarından larvaların çıkması sıcaklığa bağlı olarak 7-32 gün

aralığında olduğu ve akabinde 46-130 gün aralığında metamorfizmin tamamlandığı kaydedilmiştir (Çiçek vd. 2011). Anadolu'nun birçok bölgesinde dağılışı alanı bulabilen *R. macrocnemis* için yeni dağılışı alanları sürekli genişlemektedir (Erişmiş 2017, Gidiş ve Başkale 2020). Bolkar dağının Konya, Ereğli tarafında 2500 m yükseltideki Seçova mevkiinde ilk kez tespit edilen bu tür için Elazığ, Maden ilçesi Örtülü köyü mevkiinin de bu tür için güney sınırını teşkil ettiği belirtilmiştir (Baran vd. 2007). Emir dağı (Afyonkarahisar) ve Berçelan Yaylası (Hakkari) dağ kurbağası populasyonlarının morfolojik ve serolojik incelemesi bu bölgelerdeki hayvanların *R. macrocnemis* olduğunu göstermiştir (Afsar vd. 2014, 2015). *R. macrocnemis*'in dağılım alanları tercihinin yüksek rakımlı, düşük sıcaklığa sahip otlakları ve iğne yapraklı yaprak döken ağaçların yer aldığı ormanlık alanlar olduğu modelleme çalışmaları ile belirlenmiştir (Najibzadeh vd. 2017a).

Ortalama yaşam süresi yaklaşık 6 yıl olan (uzun yaşayan erkeklerde 8, dişilerde 10,5 yıl) ve populasyon büyüklüğü yaklaşık 17500 birey (Yıldız ve Göçmen 2012) olarak hesaplanan *R. holtzi* populasyonunun doğal habitatında ciddi bir azalış gösterdiği bilinmektedir (Kaya vd. 2005, Miaud vd. 2007, Kurtuluş vd. 2009). Daha önceleri yalnızca Karagöl ve Çinigöl'de dağılışı gösterdiği bilinen *R. holtzi*'nin Eğrigöl (rakım ~3000 m)'de de yer aldığı bildirilmiştir (Baran vd. 2007). Daha sonraki çalışmalarda *R. holtzi* türünün yalnızca Bolkar dağlarında yaşamayıp, Kahramanmaraş, Göksu çevresinde (1500-1600 m rakım) de yayılışı gösterdiği bildirilmiştir (Turan ve Karaardıç 2008). Benzer şekilde yeni bir dağılım lokalitesi 2012 yılında yapılmıştır. Mersin, Çamlıyayla bölgesinde yer alan Karagöl *R. holtzi* için yeni kayıt bildirilen bir nokta olmuştur (Baskale vd. 2011). Bu yeni kayıtların bildirilmesi, yeni bir lokalitede uygun yaşam ve üreme alanı bulan bu endemik türün geleceği için olumlu bir gelişme olarak değerlendirilmektedir.

Bir diğer Anadolu dağ kurbağası Denizli, Tavas, Çakıroluk mevkiinde dar bir yaşam alanı bulunan *R. tavasensis* türüdür. Endemik olan bu tür IUCN kriterlerine göre EN (nesli tükenmekte olan) kategorisinde yer almaktadır (Kaska ve Avcı 2009). Türün popülasyondaki birey sayısını 2011 yılı için 398 birey, 2012 için 348, 2013 için 275 ve 2014 yılında ise 117 birey olarak bildirmiştir. Bu azalışta rol alan faktörler olarak arazi faaliyetleri, eğlence faaliyetleri ve hayvan otlatma gibi antropojenik etkiler sıralanabilir (Çapar 2015, Çapar ve Başkale 2016).

2.4.3 Anadolu Dağ Kurbağalarının Karşılaştığı Tehditler

Antropojenik faaliyetler dolayısı ile doğal ortamlara ulaşan zirai ilaçların ya da gübreler (amonyum sülfat gibi) Anadolu dağ kurbağalarının doğal habitatlarındaki yaşam imkanlarını kısıtlar ve popülasyonun devamı için büyük tehlike oluşturmaktadır (Karaca 2015). İnsan faaliyetleri sonucu doğrudan ve dolaylı yollarla birçok doğal alana ulaşan mikroplastikler son yıllarda keşfedilen doğal yaşam tehditleri arasında önemli bir faktör olmuştur. İç sulardaki hem kara hem sucul yaşamı temsil eden kurbağalardaki mikroplastik kirliliğinin araştırıldığında *P. ridibundus* ve *R. macrocnemis* yavrularında polietilen teraftalat, naylon ve poliakriliklerin baskın mikroplastik kirleticiler olduğu kaydedilmiştir (Karaoğlu ve Gül 2020).

Diğer yandan kurbağaların doğal ortamlarında karşılaşılabilecekleri doğal tehditler de bulunmaktadır. Metabolizmanın zayıfladığı kış döneminde zorlu çevresel streslerin yanında organizmanın bağışıklık sistemi patojen mikroorganizmalara karşı da yetersiz kalabilir. Ancak, kurbağaların derilerinden salgıladıkları birçok peptit bulunduran sekresyonları doğal antimikrobiyal aktivite ile onları bir dereceye kadar koruyabilir. *R. macrocnemis*'in deri sekresyonunun *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Sarcina lutea*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* türlerine karşı etkili olduğu bilinmektedir (Afsar vd. 2011). Buna ek olarak *R. macrocnemis* sekresyonunun *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella thyphi*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* mikroorganizmaları üzerine etkili olmakla birlikte en fazla etkiyi *S. aureus* üzerine göstermektedir (Akyıl vd. 2019).

Küresel olarak amfibi türlerinin azalmasında etkili olan bir diğer tehlike ölümcül amfibi hastalığı chtridiomycosisdir ve ülkemizde de yayılış göstermektedir (Erismis vd. 2014). Buna sebep olan patojen fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*'in yaygınlığı doğu karadeniz bölgesinde dağılışı gösteren 10 farklı türde incelendiğinde, enfeksiyonun yükselti ve ortam sıcaklığı ile korelasyon gösterdiği bilinen patojenin, dağ kurbağalarından *R. macrocnemis*'in Uzungöl örneklerinde mevcut olduğu tespit edilmiştir (Erişmiş 2019).

Anadolu dağ kurbağalarının donma toleransı ile ilişkili Türkiye’de henüz çalışma yapılmamış olsa da donma toleransında önemli rol oynayan kan parametreleri incelenmiştir. Vücut için gerekli enerji, besin, hormonal ya da antioksidan dağılımında temel rol oynayan kan parametrelerinin ülkemizdeki dağ kurbağalarında incelenmesi güncel kriyobiyolojik çalışmaların temelinde kullanılabilecektir. Dağ kurbağalarındaki eritrositlerin yükseltiye bağlı olarak küçüldüğü bilinmektedir. 1630 m rakımdan toplanan *R. macrocnemis*, 2460 m’den toplanan *R. holtzi*’ye göre eritrositlerinde daha büyük nükleuslara sahiptir ve eritrosit büyüklüklerinin yükseltiye bağlı ters orantılı olarak değişmesi *R. ridibundus* karşılaştırması ile desteklemiştir (Arıkan vd. 2001). Buna göre genellikle düşük rakımlarda bulunan *R. ridibundus* dağ kurbağalarına göre daha büyük ve daha az eliptik eritrositlere sahiptir, bunun yanında dağ kurbağaları arasındaki karşılaştırma yükselti arttıkça eritrositlerin küçülmekte ve elipsoidlikleri artmaktadır. Ayrıca *R. macrocnemis* türünde lökosit ve trombosit sayısı açısından mevsimsel ve cinsiyete bağlı varyasyonlar da ortaya çıkmaktadır (Arserim ve Mermer 2008).

Bu tez çalışmasında incelenen iki Anadolu dağ kurbağasının (*R. macrocnemis* ve *R. holtzi*) dağılım alanları birbirinden farklı ve oldukça uzakta bulunsa da ikisi de kış uykusu döneminde donma sıcaklıklarına maruz kalmaktadır. Bu türlerin doğal habitatlarında iklim verileri göz önüne alındığında yaz-kış döngülerinde varlıklarını devam ettirmeleri, donmaya tepki olarak hayatta kalma becerisine sahip olduklarını gösterir. Ancak, donma sırasında hayatta kalmak için hangi kriyoprotektanların ve stratejilerin kullanıldığına dair Türkiye’den bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar, Türkiye’de bu türlerin kriyobiyolojisi üzerine yapılan ilk çalışmalar olmakla beraber; bu iki kurbağa türü donmaya toleranslı türlerde yaygın olarak kullanılan glikoz molekülünü kullanıyor mu, donma koşulları altında kan, karaciğer ve iskelet kasında glikoz düzeyi hangi seviyede değişmektedir ve Anadolu dağ kurbağalarında amfibilere özgü AFP’lerin (FR10, Li16 ve FR47) durumu nedir, ayrıca bu AFP’leri kullanıyor ise donma, anoksi ve dehidrasyona cevap olarak kas ve karaciğer dokusundaki transkript ekspresyon seviyelerinin durumu nedir sorularına cevaplar bulmayı hedeflemiştir.

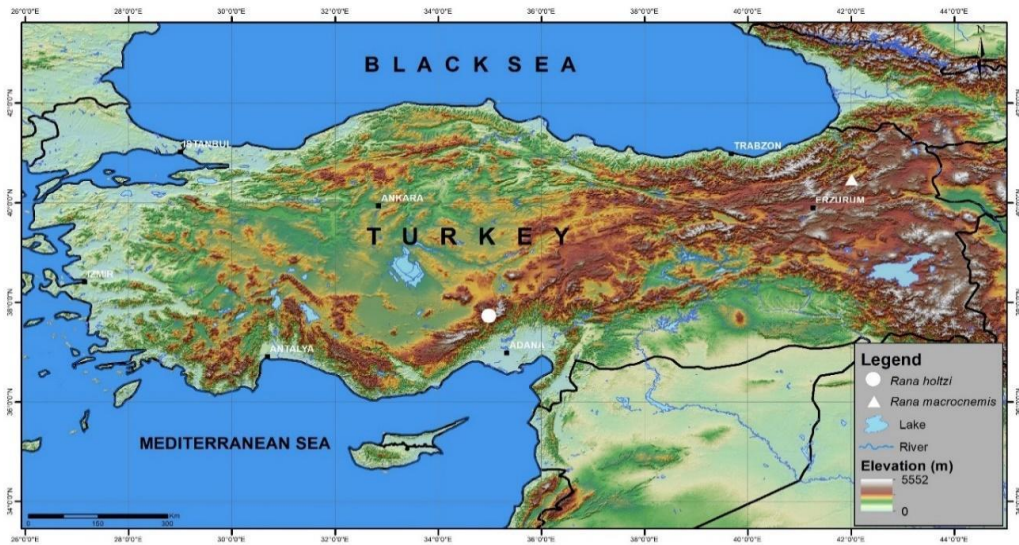
Bu çalışma kapsamında yapılan transkript ekspresyon seviyesi çalışmalarında qRT-PCR tekniği kullanılmıştır. Literatürdeki yer alan FR10, Li16 ve FR47 protein ve gen (*fr10*, *li16* ve *fr47*) ekspresyon çalışmalarında northern blotlama ve RT-PCR teknikleri kullanılmıştır. Gelişen teknoloji doğrultusunda biz transkript ekspresyonunu araştırırken real time PCR cihazı kullanarak, RT-qPCR tekniği ile önceki tekniklerde yer alan elektroforez aşamasını deney prosedüründen çıkarmış olduk. Bunun yanında konvansiyonel PCR'a göre daha hassas bir teknik olan real time PCR kullanmak daha doğru sonuçlar almamızın yanında zaman, iş gücü ve sarf malzeme tasarrufu yapılmasına da olanak sağlamaktadır.



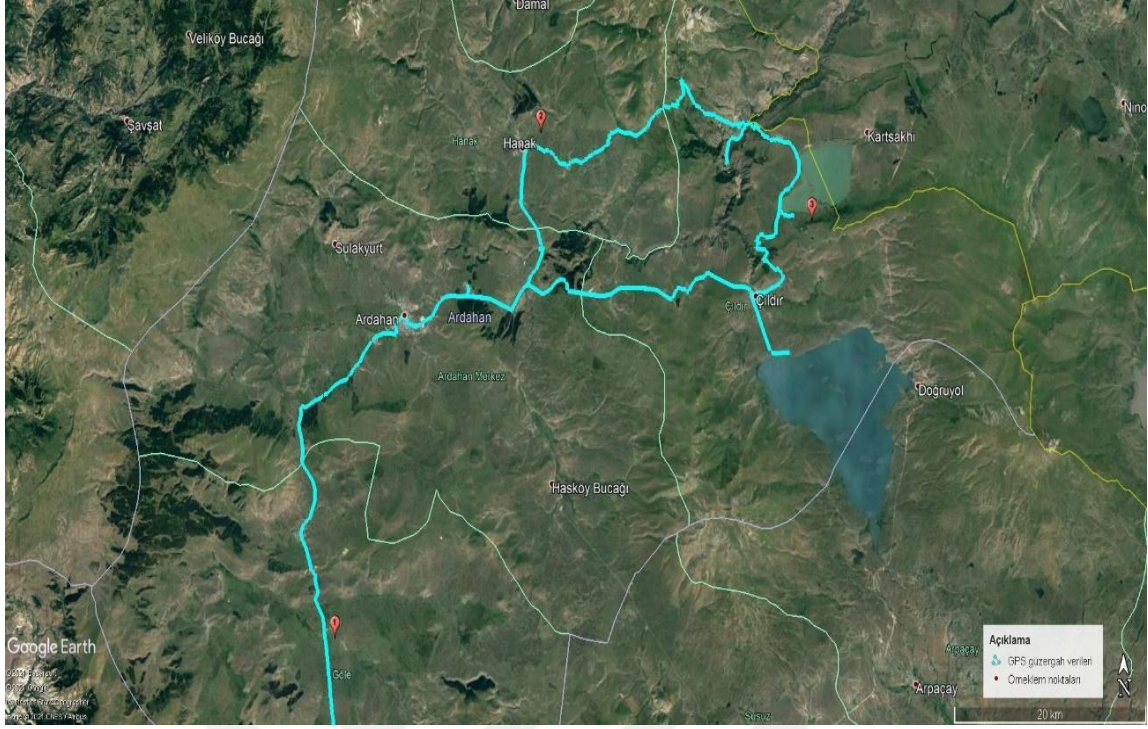
3. MATERYAL ve METOT

3.1 Arazi Çalışmaları ve Deney Grupları

Hayvanların aktif olduğu aylarda (*R. macrocnemis* Eylül, *R. holtzi* Temmuz) uygun bölgelerde (Şekil 3.1) yapılan arazi çalışmalarında (Şekil 3.2, 3.3, Resim 3.1, 3.2, 3.3, 3.4) kepçeleme yöntemiyle cinsiyet ayrımı dikkate alınmadan iki tür için de 28'er yetişkin hayvan yakalandı (*R. macrocnemis* için ortalama SVL 53.27 ± 8.25 mm, *R. holtzi* için 44.85 ± 5.01 mm olarak kaydedildi). *R. tavasensis* türü için de arazi çalışması yapılmıştır ancak gözlemlenen hayvan sayısı azlığı göz önünde bulundurularak örnek toplanmamıştır (Şekil 3.4, Resim 3.5, 3.6). Yakalanan hayvanlar önceden etiketlenmiş steril plastik kutularda uygun nem ve havalandırma koşulları altında muhafaza edilerek laboratuvar ortamına taşındı. Laboratuvara getirilen örnekler deneysel çalışmalardan önce hibernasyon evresine metabolizmalarını hazırlamak amacıyla en az 3 hafta boyunca beslenmeksizin tamamen karanlık +5 °C ortamda muhafaza edildi. Bu soğuk iklimlendirme koşulu hayvanların donma koşulları için hazırlanmalarını ve gerekli metabolik olayların tetiklenmesini sağlamaktadır. Her iki tür için de bu ortamdaki hayvanlardan birer grup kontrol grubu olarak belirlendi ve kontrol grubu çalışmaları doğrudan bu ortamdan alınan örneklerle yapıldı (Sullivan 2011, Sullivan ve Storey 2012, Sullivan vd. 2015a).



Şekil 3.1 Anadolu dağ kurbağalarının toplandığı arazi bölgeleri.



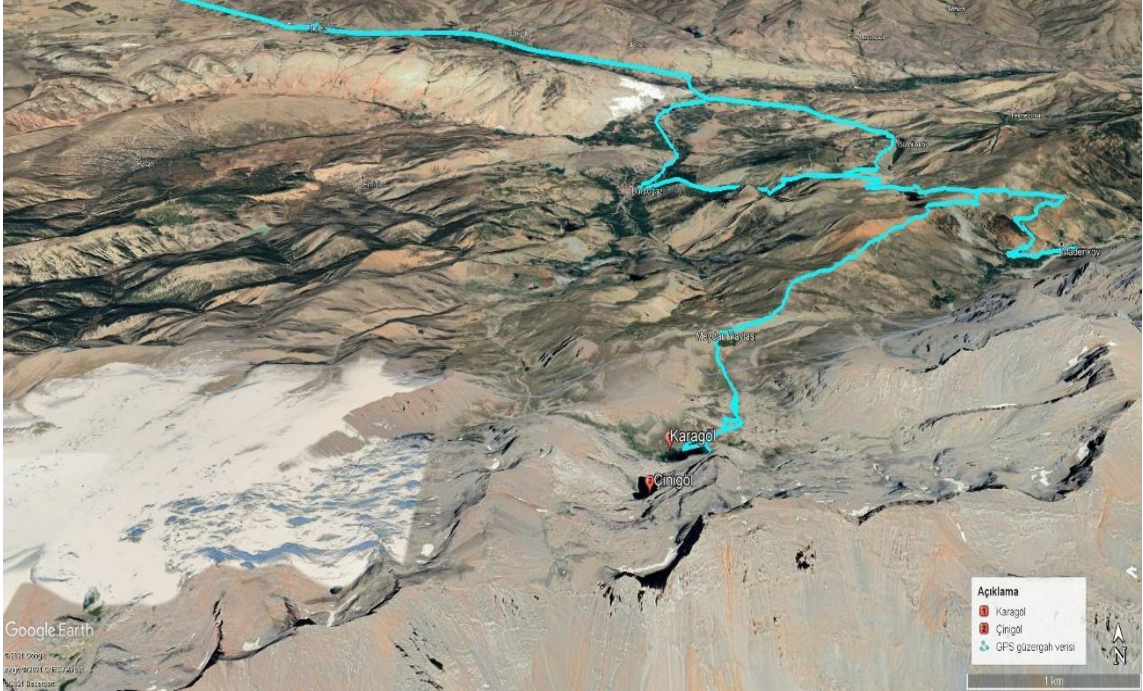
Şekil 3.2 *R. macrocnemis* arazi çalışmasında kullanılan rotayı gösteren GPS izlek görüntüsü.



Resim 3.1 *R. macrocnemis* türüne ait örnek fotoğraflar.



Resim 3.2 *R. macrocnemis* arazisine ait örnek fotoğraflar.



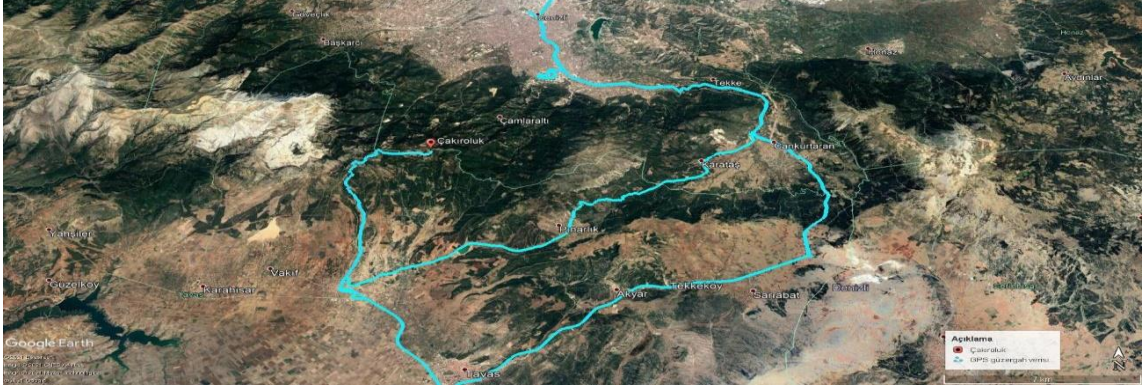
Şekil 3.3 *R. holtzi* arazi çalışmasında kullanılan rotayı gösteren GPS izlek görüntüsü.



Resim 3.3 *R. holtzi*'nin doğal habitatından örnek görüntüler.



Resim 3.4 *R. holtzi* arazisinden Karagöl'ün genel görünüm fotoğrafları.



Şekil 3.4 *R. tavasensis* arazi çalışmasında kullanılan rotayı gösteren GPS izlek görüntüsü.



Resim 3.5 *R. tavasensis* türüne ait örnek fotoğraflar.



Resim 3.6 *R. tavasensis* arazisi yapılan Çakıroluk lokalitesine ait genel görünüş.

Doğal ortamdaki habitatlarında kış dönemleri maruz kalınan donma, anoksi ve dehidrasyon stres koşulları laboratuvar ortamında oluşturuldu. Bu kapsamda hayvanlar 3 ana stres, 3 normalleşme ve 1 kontrol grubu olmak üzere toplam 7 gruba ayrıldı (Çizelge 3.1). Her bir grupta 4 (n=4) hayvan yer aldı. Bu stres, normalleşme ve kontrol gruplarındaki hayvanlar maruziyet periyotları sonunda fiziksel, biyokimyasal ve moleküler testleri yapılmak üzere örneklenmiştir.

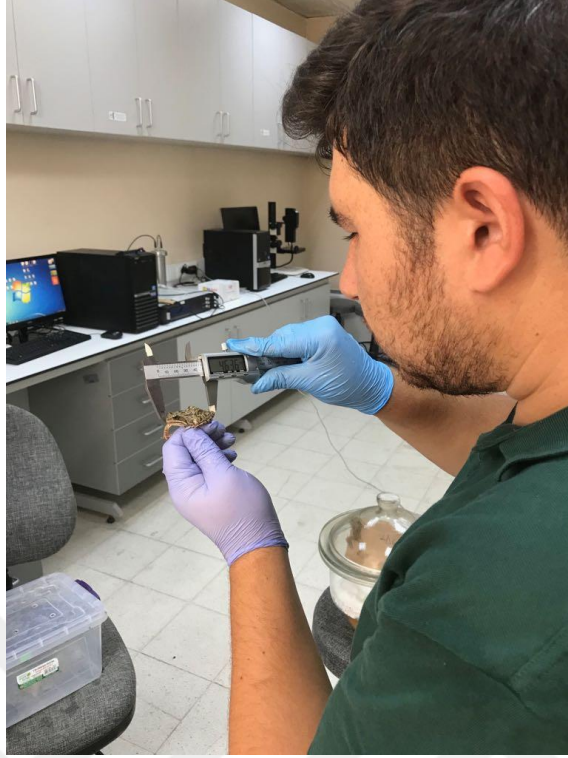
Bu çalışmada yapılan arazi çalışmaları ve laboratuvar çalışmaları T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü 21264211-288.04 sayılı etik kurul izni alınarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 1 *R. macrocnemis* ve *R. holtzi* türleri için kullanılan maruziyet grupları çizelgesi.

Deney Grubu	Maruziyet Koşulları
Kontrol	5 °C’de 1 cm seviyede su içeren kaplarda inkübasyon
Donma	-2,5 °C’de 24 saat inkübasyon
Anoksi	Oksijensiz ortamda 24 saat 5 °C’de inkübasyon
Dehidrasyon	Silika bulunan desikatör içerisinde 40 saat 5 °C’de inkübasyon
Çözünme	Donma koşulu sonrası çözünme ve 24 saat kontrol koşulları
Reoksi	Anoksi sonrası kontrol grubu koşullarında 24 saat inkübasyon
Rehidrasyon	Dehidrasyon sonrası kontrol koşullarında 24 saat inkübasyon

3.2 Deney Koşulları

Bu çalışmada her iki tür için de üç ana strese (donma, anoksi ve dehidrasyon) maruziyet, bu streslerden sonra normalleşme (çözünme, reoksi ve rehidrasyon) ve kontrol grubu koşulları oluşturuldu. Her bir grupta en az dört hayvan yer aldı. Tüm hayvanların deney koşulları öncesi SVL ve ağırlık ölçümleri yapıldı (Resim 3.7). Kontrol grupları “3.1 Arazi Çalışmaları ve Deney Grupları” bölümünde belirtildiği gibi +5 °C ortamda normal hava ve nem koşullarına maruz kalan hayvanlardan oluşmaktadır (Resim 3.8).



Resim 3.7 Hayvanların deney koşullarına maruz bırakılmadan önce SVL ölçümlerinin gerçekleştirilmesi.



Resim 3.8 Kontrol koşullarının sağlandığı kabin ve kontrol grubu.

3.2.1 Donma ve Çözünme Koşulları

Donma koşullarına maruz kalması için iki grup kurbağa, tabanında nemli kağıt havlular bulunan kapalı plastik kutulara aktarıldı ve $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış bir inkübatör içine yerleştirildi (Resim 3.9). Bir saatlik soğuma ve ekzoterm (dış kristalleşme, kurbağa derisinde küçük bir buzlanma görülmesi) noktasının oluşması için bekleddikten sonra 24

saatlik donmaya maruz kalma süresi başlatıldı. Kurbağaların vücut sıcaklığı bir veri kaydediciye (datalogger) abdomen kısmına sabitlenen termokupl vasıtası ile kaydedildi (Cai ve Storey 1997, Voituron vd. 2003, Sullivan ve Storey 2012). Çözünme grubu oluşturmak için öncelikle bir donma grubu daha oluşturuldu ve 24 saat sonunda inkübatörden alınan grubun tekrar yaşamsal faaliyetlerini yerine getirip getiremediği kayıt altına alındı ve hayatta olan bireyler +5 °C kontrol ortamına bırakılarak 24 saat beklenerek örneklendi (Costanzo vd. 1993a, Cai ve Storey 1997, Sullivan ve Storey 2012).



Resim 3.9 Donma koşulları ve donma deneyinin başlatılması.

3.2.2 Anoksi ve Reoksi Koşulları

Oksijen stresi çalışması için kontrol ortamından alınan bir grup hayvan plastik ya da cam kavanozlara (içerisinde azotla doyurulmuş 50 ml dH₂O bulunan) alındı. Önce 30 dk. N₂ (Azot) gazı verilerek buza batırılan kavanozlara daha sonra 15 dk. daha gaz verildi ve kavanozlar parafilm ile kapatıldı. Kavanozlar +5 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılarak daha sonra örnekleme yapıldı (Resim 3.10). Bir grup daha anoksi grubu ile aynı işlemlere maruz bırakıldıktan sonra örnekleme yapılmadan 1 cm yüksekliğinde dH₂O içeren kavanozlara alınarak +5 °C’ye yerleştirilir ve normal hava almaları sağlandı. 24 saat sonra refleksleri kontrol edilerek örnekleme yapıldı (McNally 2002, McNally vd. 2003, Sullivan vd. 2015b).



Resim 3.10 Anoksi ve reoksi deneyinin başlatılması ve inkübasyon koşulları.

3.2.3 Dehidrasyon ve Rehidrasyon Koşulları

Kontrol ortamından alınan bir grup dehidrasyon uygulaması için, içinde silika jel bulunan desikatörlere konur ve +5 °C’de 40 saat inkübe edildi. Her saat ~%1 vücut suyu kaybedileceği hesaplanarak %40 dehidre hayvanlar örneklendi (Resim 3.11). Bir grupta %40 dehidrasyondan sonra 1 cm yüksekliğinde dH₂O seviyeli kavanozlara alınacak ve rehidrasyon için +5 °C’de 24 saat bekletilerek örneklendi (McNally 2002, McNally vd. 2003, Sullivan ve Storey 2012, Sullivan vd. 2015b) .



Resim 3.11 Rehidrasyon koşullarının oluşturulması ve inkübasyon ortamı.

3.3 Kurbağalardan Doku Örnekleme

Tüm maruziyet gruplarındaki hayvanların deney periyodu sonunda bulunduklara ortama MS 222 (1-2 g/L; pH 7.0) eklenmesi ile anestezisi gerçekleştirildi. Anestezi altındaki hayvanların ventrikülünden heparinli tüplere kan alma işlemi yapıldı. Alınan kan örnekleri +5 °C’de 10,000 rpm de 5 dk. santrifüjlenerek elde edilen serumlar biyokimyasal parametrelerin tayininde kullanılmak üzere -80 °C’de saklandı (Costanzo ve Lee Jr. 1993, Voituron vd. 2002a). Kan alma işleminden sonra hayvanlara double-

pithing yöntemiyle ötonazi uygulanarak buz üzerinde hızlıca disekte edildi. Disekte edilen hayvanların öncelikle karaciğer ve kas dokularından örnekler kesilerek çıkarılıp sıvı azot içerisinde dondurulduktan sonra -80 °C'ye aktarıldı (Cai ve Storey 1997, McNally vd. 2002). Bu örnekler gen ekspresyon seviyelerini belirlemede kullanılacağı için RNA'ların nükleazlardan etkilenmeden dondurulması gerekmektedir. Disekte edilen hayvandan ikişer kısım daha kas ve karaciğer doku örneği alındı. Bunlardan biri dokulardaki glikoz miktarının belirlenmesinde kullanılmak üzere, diğer kısım ise su miktarının belirlenmesinde kullanıldı (Resim 3.12).



Resim 3.12 Kan ve doku örnekleme. Sıvı azot tankı ve etiketli tüplere aktarım.

3.4 Vücut Ağırlığı ve Doku Su Miktarı Ölçümleri

Vücut ağırlıklarındaki değişimi incelemek için, deney grubunda yer alan her bir hayvan farklı renkte bir elastik bant ile işaretlendi ve deney koşullarına tabi tutulmadan hemen öncesinde ve süreç tamamlandıktan sonra vücut ağırlıkları kaydedildi (Costanzo vd. 1993a, Voituron vd. 2005).

Farklı stres koşulları altında karaciğer ve iskelet kası dokularındaki su kaybını belirlemek için, nihai vücut ağırlığı ölçümünden sonra hayvanlardan kan ve doku örnekleme yapıldığı esnada birer kısım karaciğer ve arka bacak bölgesinden iskelet kas dokusu kesilerek tartıldı. Dokular 105 °C’de iki gün inkübasyon sonrasında tekrar tartılarak taze doku ve kuru doku arasındaki net ağırlık farkı hesaplanarak su miktarı hesaplandı (Voituron vd. 2003, Costanzo 2005).

3.5 Glikoz Tayini

Glikoz seviyelerinin belirlenmesi için kan ve doku örnekleri kullanıldı. Bu örneklerin hayvandan alınması “3.3 Kurbağalardan Doku Örnekleme” bölümünde belirtildiği gibi yapıldı. Kan örneklerinin santrifüjlenmesi sonucu elde edilen plazmalar glikoz ölçümünde kullanılmak üzere yeni tüplere alındı. Doku örneklerinin glikoz ölçümünde kullanılmak üzere hazırlanması için 80-100 mg doku kesildi ve yüzey nemi uzaklaştırıldı. Bir hassas terazi (0,0001 g hassasiyetle, Ohaus PA224C) kullanılarak dokuların ağırlığı kaydedildi. Dokular, 10 hacim buz soğukluğunda perklorik asit (%7 w/v) içinde homojenizatör kullanarak (Heidolph Silentcrusher M) hemen homojenize edildikten sonra proteinleri çöktürmek için 2.000 x g’de 5 dk. santrifüjlendi. Süpernatant kısım alınarak KOH tampon ile nötralize edildi. Nötralize doku özütleri ve plazma örneklerinde glikoz oksidaz metodu ile çalışan ölçüm kiti (Biolabo, # 87109) kullanarak spektrofotometrik olarak glikoz miktar tayini yapıldı (Resim 3.13) (Storey ve Storey 1984, Cai ve Storey 1997, Voituron vd. 2002a, 2003, Amaral vd. 2018).



Resim 3.13 Kan, karaciğer ve kas dokularında glikoz ölçümü.

3.6 Antifriz Proteinlerin Gen Ekspresyonu

Genetik analizler kapsamında antifriz proteinlerin (FR47, FR10 ve Lİ16) var olup olmadıkları, yapılacak gen ekspresyonu çalışmaları ile bu proteinlerin ifade seviyerleri mRNA tabanlı olarak belirlendi ve çalıştığımız türlerde hangi stres ortamında hangi protein genlerinin ekspresyon seviyesi arttığı belirlendi. Bu kapsamda iş akışı sırası ile total RNA izolasyonu, cDNA eldesi, RT-qPCR çalışmaları ve verilerin değerlendirilmesi şeklinde gerçekleştirildi.

3.6.1 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

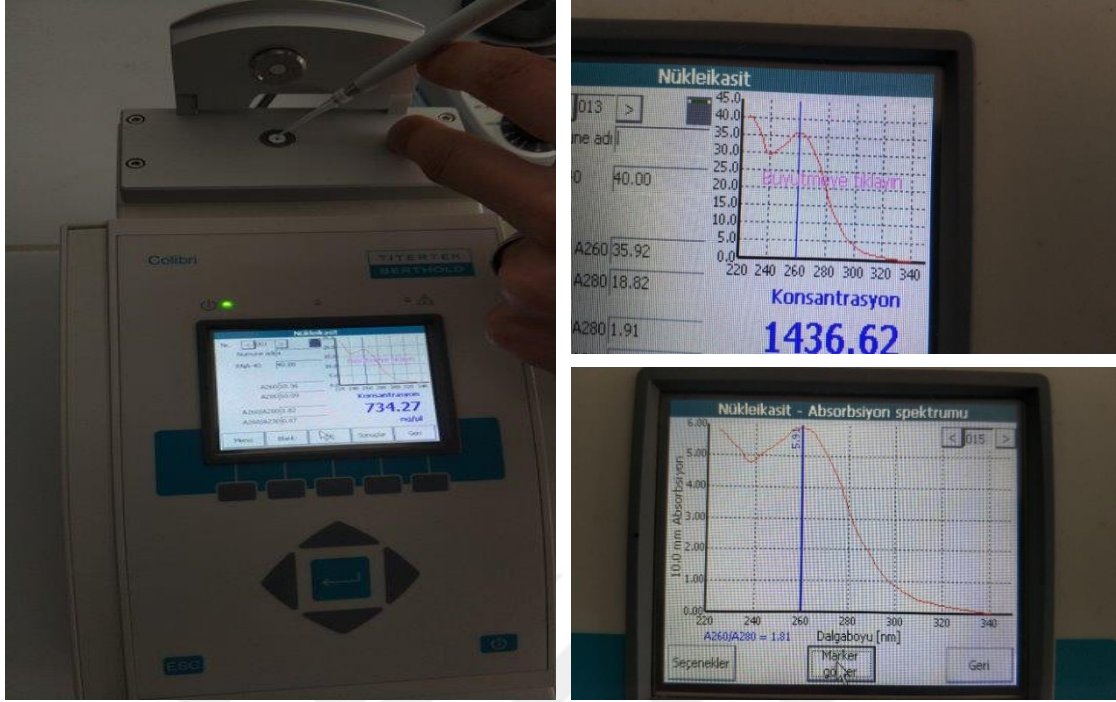
Moleküler çalışmaların yapıldığı oda UV ışık kaynağı ile önceden steril edildi. Çalışmalarda kullanılacak tüm plastik kaplar ve solüsyonlar %0,1 (v/v) diethylpyrocarbonate (DEPC) ile yıkanıp etanol solüsyonları hariç solüsyonlar ve cam malzemeler otokovlandı.

Donmuş olarak saklanan dokular sıvı azot ile toz hale getirildi. Karaciğer dokularından 50 mg ve iskelet kası dokularından 100 mg tartılarak steril tüplere alınan her örneğe 1 ml PureZOL™ (Biorad, ABD, Kat. No: 732-6890) solüsyonu eklendi. Daha sonra 200 µl kloroform eklenip homojenizatör yardımı ile homojenize edildi. Homojenize örnekler 10,000 g de 15 dk, 4 °C’de santrifüjlendikten sonra RNA içeren akuatik (üst) faz 1.5 ml

hacimli yeni steril tüplere aktarıldı. Daha sonra 500 µl izopropil alkol eklenerek oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. Tüpler 12,000 g de 15 dk 4 °C’de tekrar santrifüjlendi. Pellet 1 ml %70 etanol (DEPC ddH₂O ile hazırlanmış) ile yıkandı ve tekrar 7,500 g de 5 dk 4 °C’de santrifüjlenerek sıvı faz dikkatlice uzaklaştırıldı. Pellet 10 dk hava kurumasına bırakıldı ve 25 µl DEPC ddH₂O ile resüspanse edilerek RNA izolasyonu tamamlandı (Resim 3.14). RNA kalitesine nanodrop kullanarak 260/280 nm absorbans değerleri oranına göre karar verilip 260 nm de miktar tayini yapıldı (Resim 3.15) (Sullivan vd. 2015b). Ayrıca kloroform içeren bu yöntemin yanında RT-qPCR çalışmalarında sorun yaşamamak için spin-kolon tekniği ile çalışan ticari total RNA izolasyon kiti (Norgen #37500) ile de kit protokolüne göre uygulama yapılarak paralel bir RNA ekstraksiyonu basamağı gerçekleştirildi.



Resim 3.14 PureZol ile RNA ekstraksiyonuna ait resimler.



Resim 3.15 Nanodrop cihazı ve nanodrop cihazında nükleik asit ölçüm resimleri.

Total RNA içerisinde yer alan mRNA'lar ile PCR işlemi yapabilmek için ve uzun süre stabil olarak saklayabilmek için onları cDNA'ya dönüştürmek gereklidir. cDNA çalışmaları için, izole edilen total RNA'lar ~1 µg olacak şekilde DEPC distile su ile seyreltildi, böylelikle cDNA sentezi sonrası her tüpte neredeyse eşit miktar cDNA elde etmiş olduk. Ticari olarak temin edilen cDNA sentez kiti malzemeleri kullanılarak kit protokolüne uygun olarak reaksiyon tüpü hazırlandı. Bu işlemde 4 µl 5x reaksiyon karışımı (OligodT 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' içeren), 1 µl revers transkriptaz enzimi, nükleaz içermeyen su ve toplam RNA hacimleri ayarlanarak son hacim 20 µl ayarlandı (Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit #04896866001 ve BioRad iScript™ cDNA Synthesis Kit #1708891). Bu karışım 5 dk 25 °C, 30 dk 42 °C, 5 dk 85 °C'de konvensiyonel PCR cihazı (Prime Thermal Cycler) ile inkübe edildi ve 1 dk süre ile buz üstünde hızlıca soğutularak cDNA eldesi işlemi tamamlandı (Resim 3.16). cDNA sentezi sonrası kontrol için ssDNA (tek iplikli DNA) ölçüm modunda nanodrop yardımı ile miktar ve kalite tayini işlemleri yapıldı. Elde edilen cDNA'lardan seri dilüsyonlar hazırlanıp RT-qPCR işlemleri için -20/-80 °C'de saklandı (Sullivan ve Storey 2012, Sullivan vd. 2015b).



Resim 3.16 cDNA eldesi ve nanodrop ölçümleri.

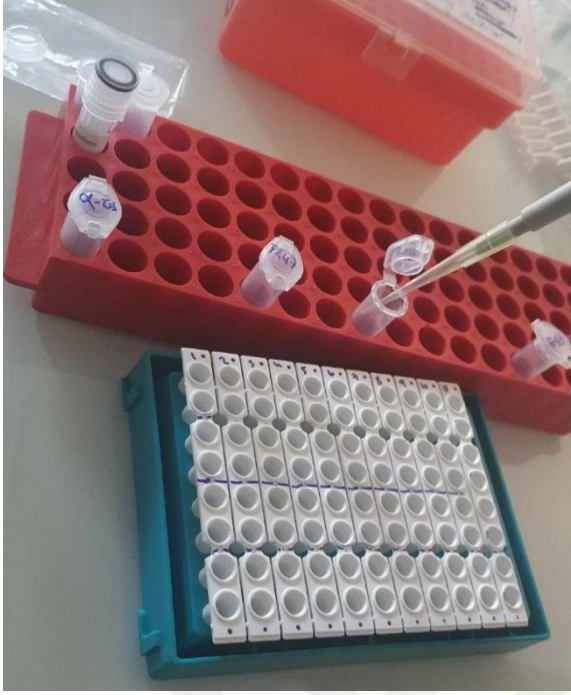
3.6.2 Ters Transkriptaz PCR Çalışması

Ters transkriptaz PCR (reverse transcriptase PCR, RT-qPCR) çalışması laboratuvarımızda bulunan Bioneer Exicycler 96 real time PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Bir önceki aşamada elde edilen cDNA'lar hedef genlerimizin primerleri ile PCR işlemine tabi tutuldu. SYBR green floresans boya içerikli reaksiyon tamponu (BioRad SsoAdvanced Universal Inhibitor-Tolerant SYBR Green Supremix #1725016 ve Roche LightCycler® 480 SYBR Green I Master #04896866001) kullanılarak hazırlanan reaksiyon karışımları real time PCR cihazı ile aşağıdaki protokole göre çalışıldı. Bu kapsamda amplifikasyon gerçekleştiğinde hedef genler mevcut ise cihaz tarafından ışımaya tespit edilerek Ct (cycle threshold) / Cq (quantification cycle) değerleri elde edildi. Hedef genlerimiz olan *fr47*, *fr10*, *li16* ve housekeeping (normalizasyon, endojen kontrol geni) genimiz *α -tubulin*'in ekspresyon seviyelerini belirlemek için her numuneye ait ayrı ayrı PCR reaksiyonları yapıldı (Resim 3.17, 3.18).



Resim 3.17 PCR çalışmaları için ön hazırlıklar, primerlerin konsantrasyon ayarlanması ve kullanılan kit.

Her bir çalışma için 0,2 ml’lik real time PCR tüpleri içerisine RNAz içermeyen su, çalışılan gen bölgesine ait primerler (Çizelge 3.3), dilüe edilmiş cDNA örneği ve Taq DNA Polimeraz enzimi içeren RT-PCR reaksiyon tamponu eklenerek son hacim 20 µl’ye ayarlandı (Çizelge 3.2) ve spin vorteks (Bioneer, Kore) cihazında homojen olarak karışmaları sağlandı. Daha sonra RT-PCR kiti protokollerinde belirtilen sıcaklık, süre ve döngü sayıları kullanılarak PCR amplifikasyon işlemi uygulandı. Her bir gen bölgesi için uygun primerler (Sullivan 2011) kullanılarak bu işlemler tekrarlandı.



Resim 3.18 PCR reaksiyonlarının hazırlanması, 96 well plate yüklenmesi ve cihaza konulması.

Çizelge 3.2 RT-qPCR reaksiyon karışım oranları ve real time PCR döngü koşulları.

RT-qPCR Reaksiyon karışımı		RT-qPCR Koşulları	
2x reaksiyon mix	10 μ l	1. Aktivasyon	98 °C’de 2-3 dk.
Revers primer*	0,4 μ l	2. Denatüreasyon	98 °C’de 5-15 sn.
Forward primer*	0,4 μ l	3. Bağlanma-Uzama	60 °C’de 15-60sn
cDNA**	2 μ l	Okuma	
Su***	x μ l	4. 2 ve 3. Basamaklarda	35-40 döngü
Son hacim	20 μ l	5. Melting Curve	60-95 °C

*: Stok konsantrasyonu 250-500 nM, **: kullanılan cDNA miktarı 100 ng/ μ l, ***: Nükleaz içermeyen “PCR grade” su

Çizelge 3.3 *α-tubulin*, *fr47*, *li16* ve *fr10* gen bölgelerine ait primerler.

Gen Adı	F primer	R primer	RefSeq No
<i>fr47</i>	TCCACCAGCTTCTCTGTACC	GAGTCAGGATCTGGAATGGA	AY100690
<i>li16</i>	TAGAATGTCGCAGTGGTCAG	TTGTCGCCTCCTGGTGATGG	AF175980
<i>fr10</i>	AGATTGGCAGAGAACCTCAG	AGTGCCACGGATCGCAGGAA	U44831
<i>α-tubulin</i>	GCCTCATTGTCCACCATGAA	GTGTCGGTACTGGATCTGGC	

Değerlendirme:

Gen ekspresyonu çalışmalarının sonuç değerlendirmesinde rölatif kantitasyon yöntemi kullanıldı. Hedef genlerimiz olan *fr47*, *fr10* ve *li16* genlerinin ekspresyon seviyeleri amplifiye olan örneklerin Ct/Cq değerleri vasıtasıyla kontrol grubu ve deney grupları arasında *α-tubulin* geni normalizasyon işlemi yapılarak değerlendirildi. Bu değerlendirme yapılırken Delta-Delta Ct Metodu (Yaklaşım metodu, $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) kullanıldı (Livak ve Schmittgen 2001). Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde REST yazılımından faydalanıldı (Relative Expression Software Tool – Multiple Condition solver REST-MCS ©- version 2).

$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ Metodu:

$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ Metodu rölatif gen ekspresyon çalışmalarında sıklıkla kullanılan kolay bir metottur. Bu yöntem hem hedef hem de referans genlerin, %100'e yakın verimliliklerle amplifiye olduğunu varsayar. Yöntemi kullanmadan önce, hedefin ve referans genlerin amplifikasyon verimlerini belirleyerek varsayımların doğrulanması esastır (Livak ve Schmittgen 2001).

Hedef ve referans genlerin benzer ve neredeyse % 100 amplifikasyon verimliliğine sahip olduğunu belirledikten sonra, aşağıdaki adımı kullanarak farklı örneklerde hedef gen ekspresyon seviyesindeki farkı belirlenir:

İlk olarak hem test numunesi hem de kontrol numunesi için hedef genin Ct değeri referans geninkine göre normalleştirilir. İkinci olarak, test numunesinin ΔCt değeri kontrol ΔCt değerine göre normalleştirilir. Son olarak, ekspresyon oranı hesaplanır.

- 1a. $\Delta C_t (\text{test grubu}) = C_t (\text{hedef gen}) - C_t (\text{referans gen})$
- 1b. $\Delta C_t (\text{kontrol grubu}) = C_t (\text{hedef gen}) - C_t (\text{referans gen})$
2. $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t (\text{test grubu}) - \Delta C_t (\text{kontrol grubu})$
3. $2^{-\Delta \Delta C_t} = \text{Normalleştirilmiş ekspresyon oranı}$

3.7 İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamındaki veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. Kurbağaların stres öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları Wilcoxon Signed-Ranks Test kullanılarak karşılaştırıldı. Stres ve normalizasyon koşullarının kan, iskelet kası ve karaciğer glikoz seviyeleri üzerindeki etkileri, varyans analizi (ANOVA) ile test edildi ve grup ortalamaları arasındaki fark Tukey-HSD post-hoc karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Dokulardaki su miktarları sonuçlar bölümünde yüzde olarak ifade edildi, ancak yüzdelik veriler arcsine / square-root dönüşümü yapıldıktan sonra istatistiksel analizi (ANOVA Tukey-HSD) yapıldı. Rölatif gen ekspresyon analizlerinde normalleştirilmiş ekspresyon oranı ($2^{-\Delta \Delta C_t}$) değerlerinin 2 tabanında logaritması alındıktan sonra elde edilen veriler istatistik analizinde kullanıldı. Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farkın anlamlılığı Student's *t*-test ile kontrol edildi.

4. BULGULAR

4.1 Arazi Çalışmaları

R. macrocnemis türü arazi çalışmaları Erzurum ve Ardahan illerinde eylül ayı içerisinde gerçekleştirildi. Arazi çalışması yapılan biyotoplardaki ortalama hava ve su ortamlarının fiziksel koşulları da kaydedildi (Çizelge 4.1). Kurbağaların genellikle küçük akarsulara uzak olmayan çayırılık otlaklarda, kaya ve taşların alt kısımlarında ve çalılıklara yakın alanlarda bulunduğu gözlemlendi. Suyu uzak kalmamaları, bulundukları alanlar ve ortama uygun renklerde olan deri desenleri göz önüne alındığında hem besin kaynaklarına yakınlık ve vücut nemi ihtiyacı açısından hem de predatörlere karşı kamuflaj ve saklanma stratejileri açısından çok başarılı hayvanlar olduğu belirtilebilir. Hayvanların toplandığı suya yakın bölgelerin birçok kanatlı ve kanatsız böcek popülasyonunca zengin olması üreme dönemi sonrası, son baharda kışa hazırlık yapan kurbağalar için besin bulma açısından zengin bölgeler olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1 Arazi çalışmaları fiziksel koşullar.

Tür	Lokalite	Enlem	Boylam	Yükselti (m)	Hava Sıc. (°C)	Su Sıc. (°C)	Nem (RH %)
<i>R. macrocnemis</i> (n = 28)	Ardahan Erzurum	38T 0298599 37T 0667117	4525464 4453205	1976 – 2370	14,1 – 17,0	12,3 – 15,1	53,0 – 55,1
<i>R. holtzi</i> (n = 28)	Karagöl, Niğde	36S 0638059	4140860	2500 – 2600	18,0 – 22,0	17,0 – 18,0	30,5 – 32,5
<i>R. tavasensis</i> (n = 28)	Tavas, Denizli	35S 0680576	4173410	1600 – 1700	20,0 – 22,0	10,0 – 13,0	42,0 – 45,0

R. macrocnemis'e göre çok daha sınırlı dağılış alanına sahip olan *R. holtzi* türünün arazi çalışmaları Bolkar dağlarında yer alan Karagöl'de temmuz ayı içerisinde gerçekleştirildi (Çizelge 4.1). Arazi çalışmaları esnasında göl kenarındaki kuzey yamaçların hala kar örtüsü ile kaplı olduğu gözlemlendi. Yüzölçümü açısından küçük bir alana sahip olan göl küçük bir akarsu ile çıkış noktasına sahiptir. Su içerisinde ve göl çevresindeki çayırılık alanlarda koruma altında olan endemik *R. holtzi* türüne sıklıkla rastlanabilmektedir. Çevredeki çayırılık alanlar, göl içerisindeki otlak bölgeler ve akarsuda yer alan taşlık alanların türün beslenme ve saklanması için önemli rol oynadığı gözlemlenmiştir. Bölgede türün beslenme ihtiyacını giderebileceği birçok böcek türü de mevcuttur. Göle yakın olan

Meydan yaylasının ve çevre göllerin de bölgeye olan yerel halk ve turist ilgisini arttırmasından dolayı bölgede antropojenik faaliyetlerin fazla olduğunu göstermektedir. Buna karşılık türün koruma altında olduğunu belirten bilgilendirme tabelaları ve işaretçiler bölgede yer almaktadır.

Bir diğer endemik dağ kurbağası türü olan *R. tavasensis* türü için de arazi çalışması gerçekleştirilmiştir. Denizli ili Tavas ilçesinde ve Muğla sınırlarında yer alan Girdev gölünde dar bir alanda dağılışı kayıt altında olan bu türün arazi çalışması Denizli, Tavas, Çakıroluk mevkiinde yapılmıştır (Çizelge 4.1). Ancak yapılan arazi çalışmasında çok az sayıda hayvan gözlemlenmiştir. Yapılan son çalışmalarda da populasyonun azalmakta olan statüsü göz önünde bulundurularak hiçbir örnek alıkonmamıştır. Bölgedeki çayırılık alandaki otlaklar Çakıroluk çeşmesinden gelen su ile beslenmektedir. Yaklaşık 10°C çıkış sıcaklığına sahip su akıntı yönünde dağılarak bölgedeki otlukların yükselmesini sağlamaktadır. Bölgenin yerleşim yerlerine yakın ve araçla kolay erişilebilir olması insan faaliyetlerinin fazla olduğunu göstermektedir. Yapılan gözlemlerde bilinçsizce arazi araçları ile habitatın tahrip edildiği tespit edilmiştir (Resim 3.6). Ülke mirası biyoçeşitliliğimizin önemli bir parçası olan endemik *R. tavasensis*'in populasyon durumu göz önünde bulundurularak bu çalışma kapsamında kullanılmamasına karar verildi.

4.2 Donma ve Hayatta Kalma

Anadolu dağ kurbağalarından Uludağ kurbağası (*R. macrocnemis*) ve endemik Toros kurbağası (*R. holtzi*)'nın donma koşullarında hayatta kalma stratejileri laboratuvar ortamında oluşturulan deneyler ile araştırıldı. Bu kapsamda her bir tür (N = 28) 7 deney koşuluna (n=4) maruz bırakıldı. Her iki türe ait deney koşullarındaki tüm hayvanlar deney koşulları sonrasında hayatta kaldı. Özellikle donma maruziyeti sonrası hayatta kalabilmeleri, bu türlerin donmaya karşı toleransa sahip olduklarının bir göstergesidir.

Her iki türün donma grupları 24 saat boyunca -2,5°C'de inkübe edildi. Donma maruziyeti sonrasında kurbağalar koyulaşan deri rengi, sertleşmiş uzuvlar, hareketsizlik ve opak gözler gibi donma belirtilerine sahipti (Resim 4.1). Donmadan sonra çözünme sürecine alınan hayvanlarda göğüs bölgesinde deri üzerinden ilk kalp atışının gözle görülmesi yaklaşık 30 dk. sonra gerçekleşti. İskelet kası refleksleri ise 45-60 dk. sonra gözlemlendi.

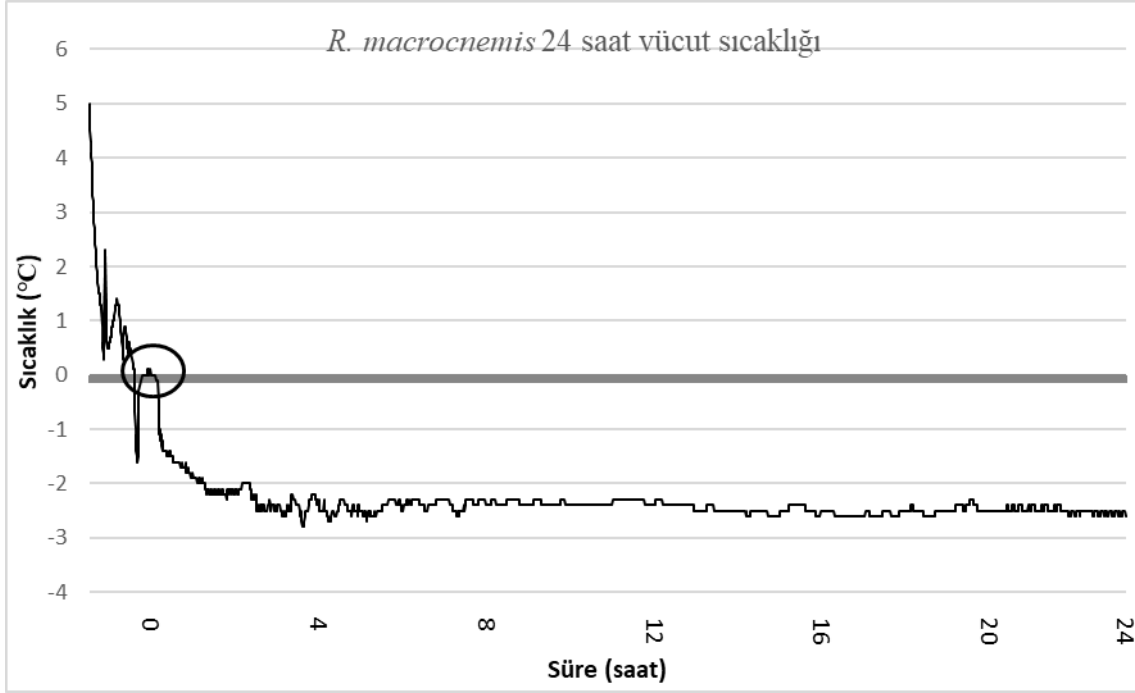
Çözünme sürecinde ilk kalp atışı belirtisinin görülmesini takiben zamana bağlı olarak gözlerdeki opaklık kaybolmakta, öncelikli olarak parmaklarda titreme şeklinde refleks hareketleri, daha sonra uzuvlarda reflekslerin gerçekleştiği gözlemlendi. Çözünen hayvanın tamamen doğal duruşa sahip olması için ve rahat hareket kabiliyeti kazanması için geçen sürenin yaklaşık 2 saat kadar olduğu kaydedildi.



Resim 4.1 Donma sonrası kurbağaların genel görünüşü.

Donma maruziyetinde hayvanların abdomen bölgesine sabitlenen sıcaklık kayıt verileri incelendiğinde, hayvandaki ani tetiklenen metabolik hızlanmanın olduğu ve kriyoprotektan üretiminin en üst seviyeye çıktığı (Şekil 2.1) ekzoterm noktasının (dış kristallenme) oluşmasının yaklaşık 70 dakika sonra gerçekleştiği kaydedilmiştir. Bu noktaya kadar kontrol ortamındaki vücut sıcaklığı olan 5 °C'den 0,2°C'ye kadar ani bir düşüş olduğu ancak bu noktadan sonra vücut sıcaklığı dış ortam sıcaklığına karşı direnç göstermeye başladığı görülmektedir (Şekil 4.1). Yaklaşık bir saatlik bu donma öncesi süreçte donma esnasında hayatta kalmaya yardımcı olan kriyoprotektanlar sentezlenmektedir. Belirli bir noktadan sonra vücut sıcaklığı ayarlanmış olan dış ortam

sıcaklığına düşmüş ve bu noktadan sonra tam donma halinde kalmıştır. Şekil 4.1'e göre bu evrenin ilk 8 saatinde gözlemlenen vücut sıcaklığındaki $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'lik dalgalanmalar metabolik olayların ve donmaya karşı koyma mekanizmalarının devam ettiğini göstermiştir. Bundan sonraki geçen sürede vücut sıcaklığı dış ortam sıcaklığına ($-2,5^{\circ}\text{C}$) yakın, daha az dalgalanma gösteren bir stabilite sergilemiştir.



Şekil 4.1 Donma esnasında kaydedilen datalogger verilerine ait bir örnek. İşaretli bölge ekzoterm noktasının gerçekleştiğini göstermekte ve yaklaşık 70. Dakikaya tekabül etmektedir.

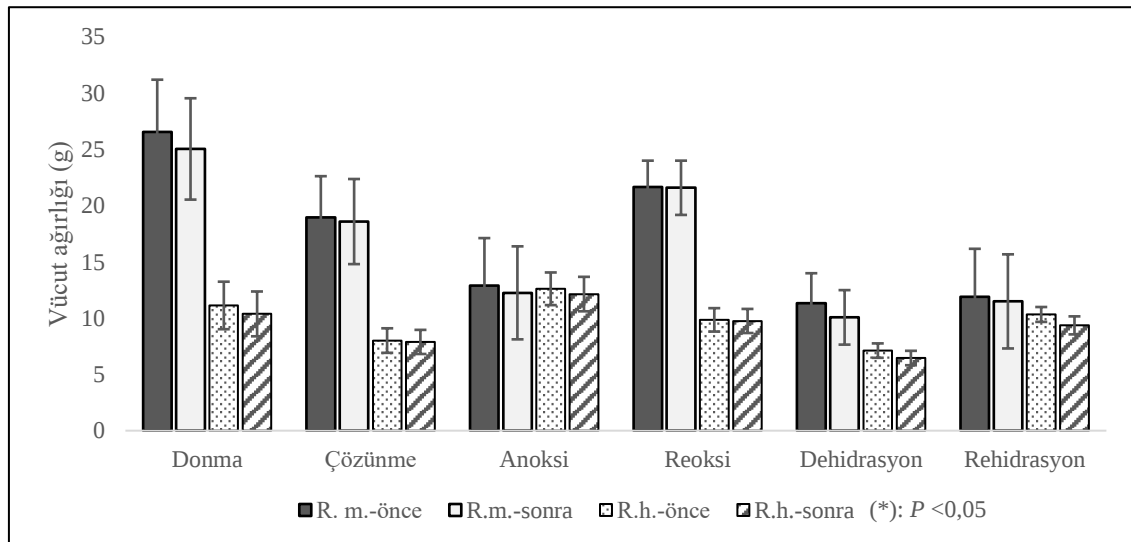
Donma maruziyeti sonrası örneklem yapılan kurbağalarıda organlar arası boşluklarda, karın boşluğunda ve mesanede buz kütleleri biriktiği gözlemlenmiştir. Bu da donma esnasında hücre içi buzlanmanın önüne geçmek için dokulardaki suyun hücre dışına ve dokular arası boşluklara çıkarıldığını göstermektedir.

4.3 Ağırlık Değişimi ve Dokuların Su Miktarı

Kontrol grubu dışındaki tüm gruptaki hayvanlar deney koşullarına maruz bırakılmadan önce ve sonra tartılarak vücut ağırlıkları kaydedildi (Çizelge 4.2). *R. macrocnemis*'te en fazla kilo kaybı $\%11,21$ ($11,33 \pm 2,65 - 10,06 \pm 2,42$; $P = 0,068$) ile dehidratasyon grubunda bulundu ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi

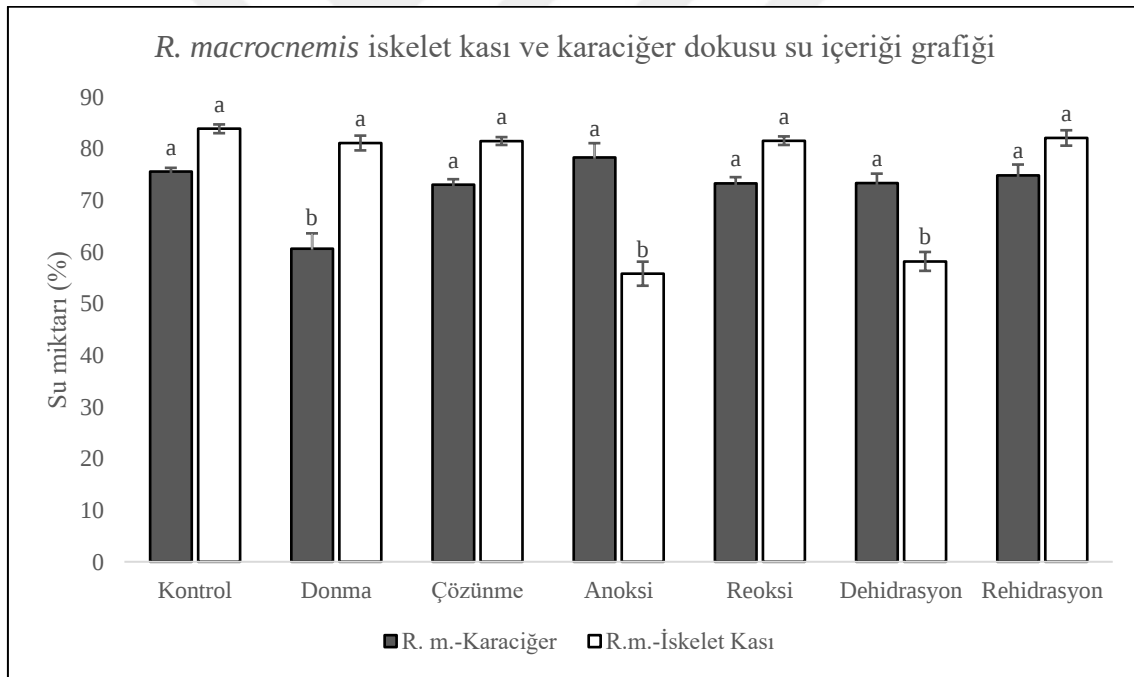
(Çizelge 4.2, Şekil 4.2). Donma grubunda ($26,54 \pm 4,63$ 'den $25,02 \pm 4,50$ 'ye; $P = 0,068$) ve anoksi grubundaki ($12,88 \pm 4,22$ 'den $12,24 \pm 4,13$ 'e; $P = 0,068$) vücut ağırlığı değişiklikleri de istatistiksel olarak anlamsız bulundu (Çizelge 4.2, Şekil 4.2). *R. holtzi* grupları da benzer eğilimler sergiledi. Donma ($11,12 \pm 2,11$ 'den $10,37 \pm 1,99$ 'ye; $P = 0,068$), anoksi ($12,60 \pm 1,45$ 'den $12,13 \pm 1,53$ 'e; $P = 0,068$) ve dehidrasyon ($7,11 \pm 0,64$ 'den $6,45 \pm 0,64$ 'e; $P = 0,068$) gruplarında maruziyet öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (Çizelge 4.2, Şekil 4.2). Ayrıca her iki türde normalizasyon olarak adlandırılan iyileşme (normal koşullara alınan) gruplarının kilo kayıplarının azaldığı kaydedildi. Bu gruplarda koşul öncesi ve sonrası arasındaki vücut ağırlığı farkları istatistiksel olarak önemsizdi ($P > 0,05$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Donma ve donma streslerinde oluşan karaciğer ve kas dokularındaki dehidrasyonu incelemek için deney koşulları sonrası hayvanlardan alınan dokulardaki su miktarı ölçümleri yapılmıştır. Deney gruplarındaki sonuçlar kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında her iki türde de farklı stres koşullarında, farklı dokulardaki su miktarları anlamlı değişiklikler göstermiştir. Ayrıca normalleşme gruplarının kontrol gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemesi de normal koşullara dönüşte dokuların tekrar eski formuna kavuştuğunu ortaya koymuştur (Çizelge 4.1, Şekil 4.3, Şekil 4.4).



Şekil 4.2 *R. macrocnemis* ve *R. holtzi* türlerine ait stres koşulları öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarındaki değişim

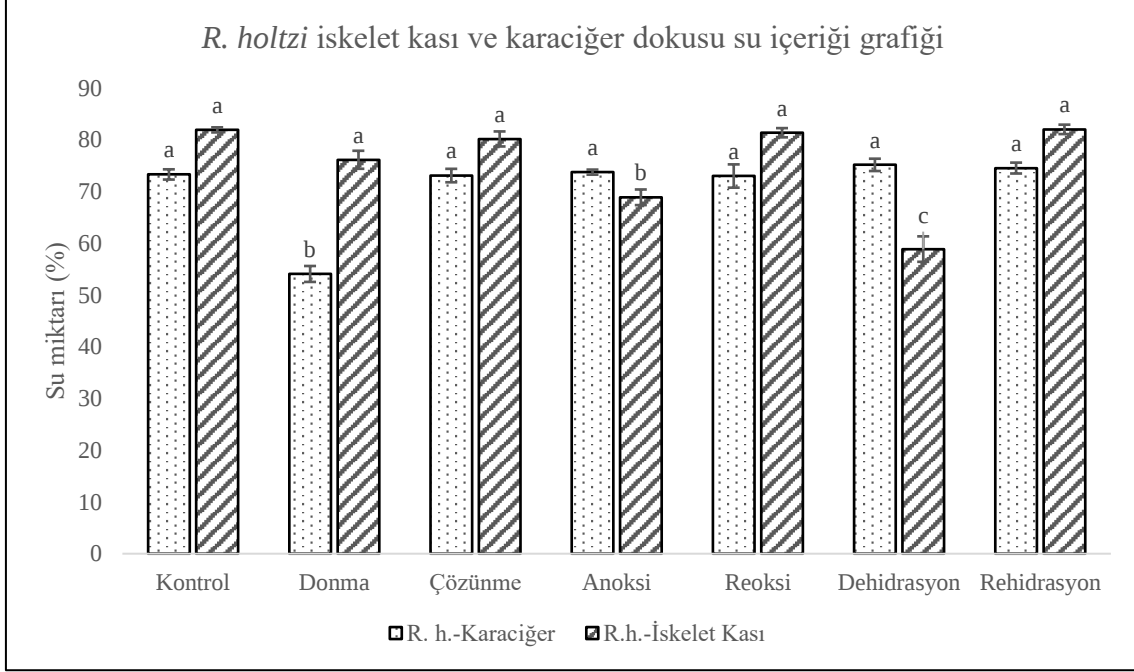
Donma, anoksi ve dehidrasyon uygulamaları, kontrol gruplarına kıyasla her iki türdeki kurbağaların da iskelet kası ve karaciğerlerindeki ortalama su içeriğini önemli ölçüde düşürdü (Çizelge 4.2). Her iki tür için de donma sırasında karaciğer dokusundaki su kaybı diğer gruplarda oluşan su kayıplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$). Donma maruziyetinde karaciğer dokusundaki su içeriği, kontrol gruplarına göre kıyaslandığında *R. macrocnemis* için %75,54'ten %60,58'e ve *R. holtzi* için %73,32'den %54,08'e düşüş göstererek istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmuştur. *R. macrocnemis* anoksi grubunda karaciğer dokusu su içeriği %78,27 ve dehidrasyon grubunda %73,32 olarak tespit edildi (Çizelge 4.2, Şekil 4.3). *R. holtzi*'nin karaciğer dokusunda su miktarları anoksi ve dehidrasyon gruplarında sırası ile %73,76 ve %75,17 olarak bulundu. Her iki tür için normalleşme gruplarında karaciğer dokusu su miktarları kontrol grubuna yakın değerler göstermiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4).



Şekil 4.3 *R. macrocnemis* türünde iskelet kası ve karaciğer dokusu su miktarı.

İskelet kas dokusu açısından incelendiğinde her iki türün anoksi ve dehidrasyon gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0,05$) azalışlar tespit edildi (Çizelge 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). *R. macrocnemis*'in kontrol grubu iskelet kasında ortalama %83,82 su içeriğine sahipken, anoksi ve dehidrasyon grupları sırasıyla ortalama %55,77 ve %58,15 oranlarında su içeriğine sahip olarak bulundu. *R. holtzi* kontrol

grubunun iskelet kası dokusu ortalama %81,93 su içeriğine sahipken, anoksi ve dehidrasyon gruplarında bu oran sırasıyla %68,90 ve %58,89 olarak bulundu. Her iki tür için de diğer gruplardaki kas dokusu su miktarı kontrol gruplarına göre önemli değişiklikler göstermedi (Çizelge 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4).



Şekil 4.4 *R. holtzi* türü iskelet kası ve karaciğer dokusu su miktarı.

Çizelge 4.2 *R. macrocnemis* ve *R. holtzi*'nin karaciğer ve kas dokularındaki su içerikleri, kontrol grubu dışındaki tüm grupların uygulama öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları.

Gruplar	<i>Rana macrocnemis</i>			<i>Rana holtzi</i>						
	<u>Vücut ağırlığı (g)</u>		<i>P</i>	<u>Su içeriği (%; taze doku)</u>		<u>Vücut ağırlığı (g)</u>		<i>P</i>	<u>Su içeriği (%; taze doku)</u>	
	Önce	Sonra		Karaciğer	İskelet kası	Önce	Sonra		Karaciğer	İskelet kası
Kontrol				75,54±0,72 ^a	83,82±0,85 ^a				73,32±0,99 ^a	81,93±0,49 ^a
Donma	26,54±4,63	25,02±4,50	0,068	60,58±3,00 ^b	81,07±1,43 ^a	11,12±2,11	10,37±1,99	0,068	54,08±1,54 ^b	76,15±1,74 ^a
Çözünme	18,95±3,65	18,57±3,78	0,068	73,02±1,04 ^a	81,45±0,76 ^a	8,00±1,09	7,88±1,07	0,068	73,10±1,30 ^a	80,18±1,45 ^a
Anoksi	12,88±4,22	12,24±4,13	0,068	78,27±2,77 ^a	55,77±2,33 ^b	12,60±1,45	12,13±1,53	0,068	73,76±0,49 ^a	68,90±1,51 ^b
Reoksi	21,63±2,35	21,57±2,41	0,465	73,26±1,20 ^a	81,52±0,83 ^a	9,84±1,04	9,74±1,07	0,068	73,01±2,25 ^a	81,38±0,89 ^a
Dehidrasyon	11,33±2,65	10,06±2,42	0,068	73,32±1,82 ^a	58,15±1,83 ^b	7,11±0,64	6,45±0,64	0,068	75,17±1,19 ^a	58,89±2,46 ^c
Rehidrasyon	11,89±4,26	11,48±4,18	0,066	74,83±2,07 ^a	82,05±1,49 ^a	10,32±0,66	9,35±0,80	0,068	74,55±1,05 ^a	82,03±0,91 ^a

Tablodaki veriler her grup (n=4) için ortalama ± s.e.m olarak verilmiştir. Vücut ağırlığı verilerinin olduğu satırlar (önce ve sonra) Wilcoxon Signed-Ranks Test ile karşılaştırılmıştır ve anlamlı bulunan veriler “*” ile gösterilmiştir ($P<0,05$). Su içeriği verileri yüzde olarak sunulmuştur, ancak istatistik analizleri arcsin dönüşümü yapılarak ANOVA’yı takiben Tukey-HSD test ile gerçekleştirilmiştir. Her kolondaki ortalamaların anlamlı farklılıkları farklı harfler ile belirtilmiştir (ANOVA Tukey’s HSD; $P<0.05$).

4.4 Glikoz Analizi

Anadolu dağ kurbağalarında donma, anoksi ve dehidrasyon maruziyetlerinin ve stres sonrası normal koşullara dönüşün kan, karaciğer ve iskelet kasında glikoz seviyeleri üzerindeki etkisini araştırmak için ölçümler yapıldı. Doku glikoz seviyeleri taze dokularda test edildi ve hesaplanırken kuru kütle düzeltmesi yapılmadı.

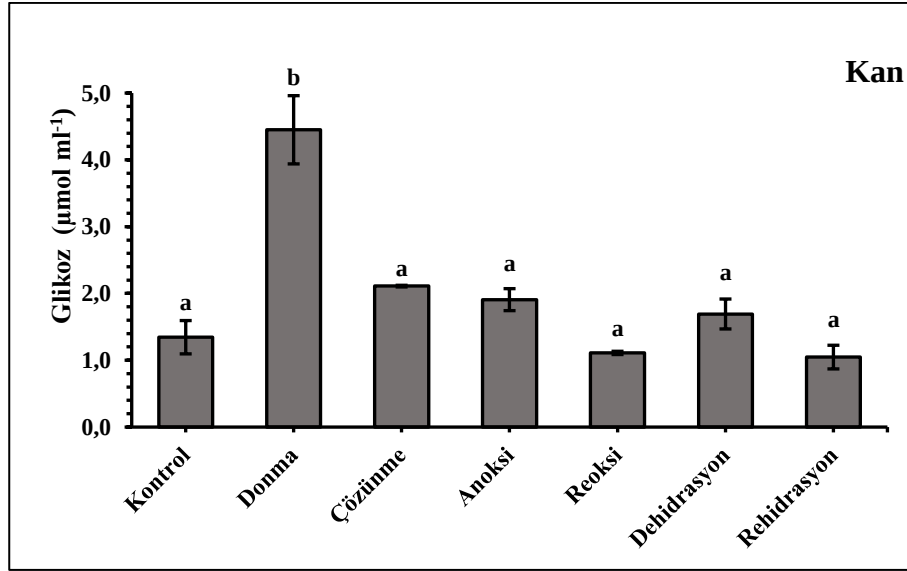
4.4.1 *R. macrocnemis* Glikoz Konsantrasyonları

R. macrocnemis'te kan glikoz seviyesi, kontrol grubuna göre donma grubunda 3,3 kat arttı ($1,35 \pm 0,25$ 'ten $4,45 \pm 0,51 \mu\text{mol ml}^{-1}$ 'e) ve istatistiksel olarak aralarındaki fark anlamlı bulundu ($P < 0,05$). Diğer stresler olan anoksi ve dehidrasyon gruplarında da sırası ile 1,42 kat ($1,91 \pm 0,16 \mu\text{mol ml}^{-1}$) ve 1,26 kat ($1,69 \pm 0,22 \mu\text{mol ml}^{-1}$) artış gösterse de bu artışlar istatistiksel olarak anlamsızdı ($P > 0,05$). Donma, anoksi ve dehidrasyon gruplarında artış gösteren glikoz seviyesinin normalizasyon gruplarında (çözünme, reoksi ve rehidrasyon) tekrar kontrol grubunun glikoz seviyesi değerine yaklaştığı tespit edildi. Donmadan sonraki normalleşme safhası olan çözünme grubunda $2,11 \mu\text{mol ml}^{-1}$, oksijensiz ortamı simüle eden anoksi koşulundan sonraki normalleşme koşulu reoksi grubunda $1,11 \mu\text{mol ml}^{-1}$ ve dehidrasyon sonrası normalleşme koşulu olan rehidrasyon koşullarında $1,05 \mu\text{mol ml}^{-1}$ glikoz konsantrasyonları kaydedildi (Çizelge 4.3, Şekil 4.5).

Çizelge 4.3 *R. macrocnemis* plazma glikoz seviyesi.

Plazma glikozu ($\mu\text{mol/ml}$)	Ortalama	SS	SH	%95 GA	Min. – Maks.
Kontrol	1,35 ^a	0,50	0,25	0,55–2,14	0,89–1,83
Donma	4,45 ^b	1,02	0,51	2,82–6,08	3,00–5,22
Çözünme	2,11 ^a	0,02	0,01	2,07–2,15	2,08–2,14
Anoksi	1,91 ^a	0,33	0,16	1,38–2,43	1,58–2,22
Reoksi	1,11 ^a	0,05	0,02	1,03–1,19	1,05–1,17
Dehidrasyon	1,69 ^a	0,45	0,22	0,98–2,41	1,33–2,33
Rehidrasyon	1,05 ^a	0,35	0,18	0,48–1,61	0,61–1,47

SS: Standart sapma; SH: Standart hata; GA: Güven aralığı; Min. – Maks.: Minimum ve maksimum değerler. Gruplar arasındaki farkı belirlemek için ANOVA testi ve ardından farklardaki anlamlılık seviyesini belirlemek için Tukey-HSD test gerçekleştirilmiştir. Ortalama değerlerin yer aldığı sütunda yer alan değerler arasındaki farklılık farklı harfler kullanılarak belirtilmiştir.



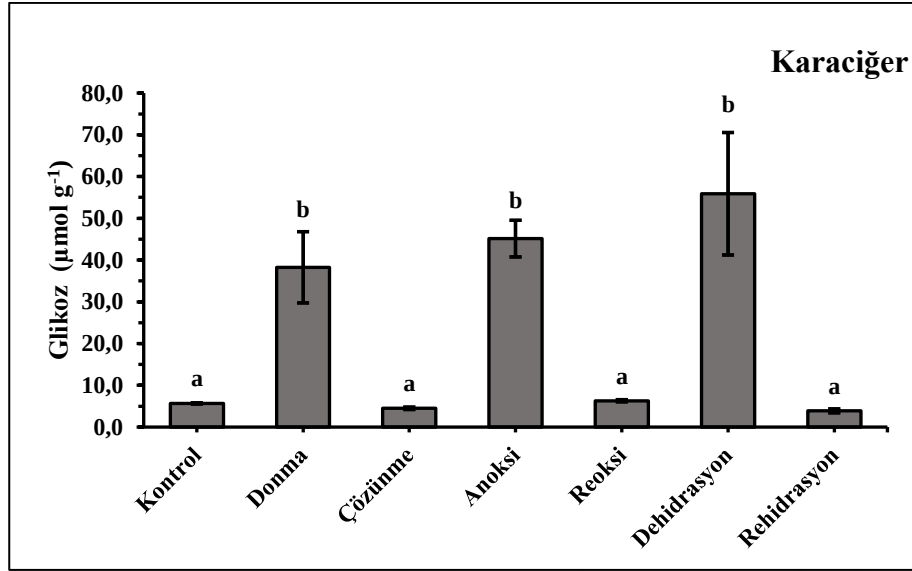
Şekil 4. 5 *R. macrocnemis*'in stres koşulları altında kan glikoz seviyesi.

Karaciğer dokusundaki glikoz seviyesi donma, anoksi ve dehidrasyon gruplarında kontrol grubuna ($5,66 \pm 0,15 \mu\text{mol g}^{-1}$) göre anlamlı olarak arttı ($P < 0,05$). Karaciğer dokusunda glikoz düzeylerinde donma, anoksi ve dehidrasyon gruplarında sırasıyla 6,76 kat ($38,27 \pm 8,53 \mu\text{mol g}^{-1}$), 7,97 kat ($45,14 \pm 4,39 \mu\text{mol g}^{-1}$) ve 9,86 kat ($55,88 \pm 14,67 \mu\text{mol g}^{-1}$) olarak artış tespit edildi. Çözünme, reoksi ve rehidrasyon gruplarından elde edilen veriler kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar içermedi ($P > 0,05$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.6).

Çizelge 4.4 *R. macrocnemis* karaciğer dokusu glikoz seviyesi.

Karaciğer (µmol/g)	Ortalama	SS	SH	%95 GA	Min. – Maks.
Kontrol	5,66 ^a	0,31	0,15	5,18–6,15	5,30–6,01
Donma	38,27 ^b	17,07	8,53	11,11–65,43	25,21–62,17
Çözünme	4,49 ^a	0,58	0,29	3,57–5,41	3,79–5,20
Anoksi	45,14 ^b	8,77	4,39	31,18–59,1	35,73–56,93
Reoksi	6,31 ^a	0,53	0,27	5,46–7,16	5,70–6,91
Dehidrasyon	55,88 ^b	29,34	14,67	9,19–102,56	27,48–84,28
Rehidrasyon	3,88 ^a	0,95	0,47	2,38–5,39	2,86–4,90

SS: Standart sapma; SH: Standart hata; GA: Güven aralığı; Min. – Maks.: Minimum ve maksimum değerler. Gruplar arasındaki farkı belirlemek için ANOVA testi ve ardından farklılardaki anlamlılık seviyesini belirlemek için Tukey-HSD test gerçekleştirilmiştir. Ortalama değerlerin yer aldığı sütunda yer alan değerler arasındaki farklılık farklı harfler kullanılarak belirtilmiştir.



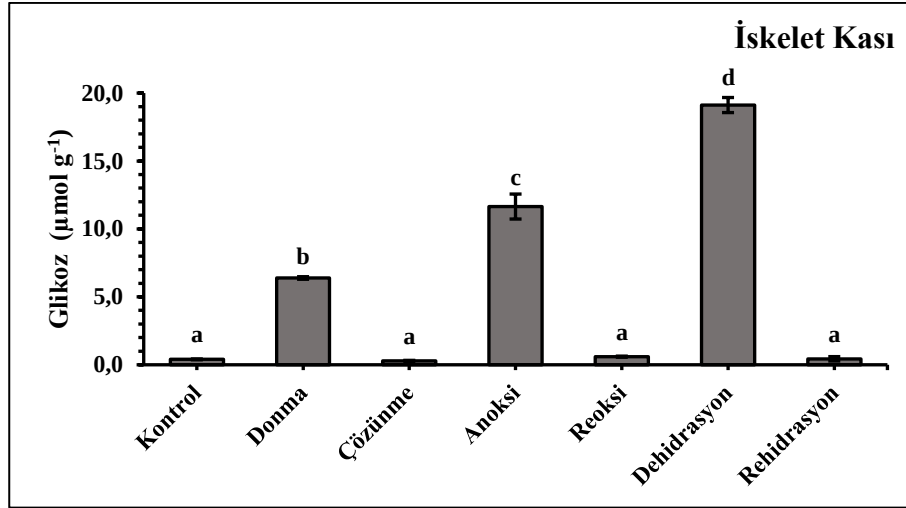
Şekil 4.6 *R. macrocnemis*'in stres koşulları altında karaciğer dokusu glikoz seviyesi.

Benzer şekilde, *R. macrocnemis* iskelet kası dokusunun glikoz seviyelerindeki değişiklikler kontrol grubuna ($0,40 \pm 0,03 \mu\text{mol g}^{-1}$) göre tüm stres gruplarında önemli ölçüde arttı ($P < 0,05$). İskelet kasında glikoz seviyeleri artışı donma, anoksi ve dehidrasyon gruplarında sırasıyla 16 kat ($6,39 \pm 0,10 \mu\text{mol g}^{-1}$), 29,24 kat ($11,65 \pm 0,92 \mu\text{mol g}^{-1}$) ve 48,01 kat ($19,12 \pm 0,55 \mu\text{mol g}^{-1}$) olarak kaydedildi (Çizelge 4.5, Şekil 4.7). Diğer dokularda olduğu gibi kas dokusu stres grupları haricindeki gruplarda ki değerler kontrol grubuna kıyasla anlamsız farklar içerdi ($P > 0,05$).

Çizelge 4.5 *R. macrocnemis* iskelet kas dokusu glikoz seviyesi.

İskelet kası ($\mu\text{mol/g}$)	Ortalama	SS	SH	%95 GA	Min. – Maks.
Kontrol	0,40 ^a	0,06	0,03	0,30–0,49	0,32–0,47
Donma	6,39 ^b	0,19	0,10	6,08–6,69	6,27–6,67
Çözünme	0,29 ^a	0,08	0,04	0,16–0,41	0,19–0,39
Anoksi	11,65 ^c	1,84	0,92	8,72–14,57	9,71–13,88
Reoksi	0,60 ^a	0,08	0,04	0,47–0,73	0,49–0,69
Dehidrasyon	19,12 ^d	1,11	0,55	17,35–20,88	17,91–20,34
Rehidrasyon	0,44 ^a	0,32	0,16	-0,07–0,95	0,05–0,83

SS: Standart sapma; SH: Standart hata; GA: Güven aralığı; Min. – Maks.: Minimum ve maksimum değerler. Gruplar arasındaki farkı belirlemek için ANOVA testi ve ardından farklardaki anlamlılık seviyesini belirlemek için Tukey-HSD test gerçekleştirilmiştir. Ortalama değerlerin yer aldığı sütunda yer alan değerler arasındaki farklılık farklı harfler kullanılarak belirtilmiştir.



Şekil 4.7 *R. macrocnemis*'in stres koşulları altında iskelet kası dokusu glikoz seviyesi.

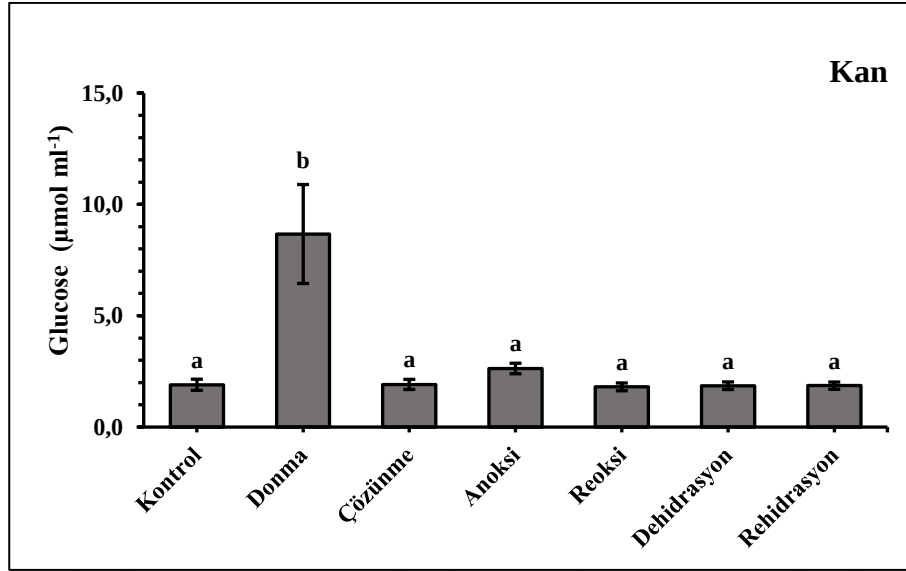
4.4.2 *R. holtzi* Glikoz Konsantrasyonları

Rana holtzi'de donma grubunda kan glikoz seviyesi kontrol grubuna göre 4,56 kat ($1,90 \pm 0,25$ 'ten $8,67 \pm 2,22 \mu\text{mol ml}^{-1}$ 'e) yükseldi ($P < 0,05$). Anoksi grubunda 1,38 kat ($1,90 \pm 0,25$ 'ten $2,63 \pm 0,24 \mu\text{mol ml}^{-1}$ 'e) artış görülse de bu artış önemsiz olarak bulundu ($P > 0,05$). Dehidrasyon ve rehidrasyon gruplarında ise artış tespit edilmeyerek $0,04 \mu\text{mol ml}^{-1}$ azalışlar kaydedildi. Anoksi grubu ve normalizasyon gruplarındaki kan glikoz seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamsızdı ($P < 0,05$) (Çizelge 4.6, Şekil 4.8).

Çizelge 4.6 *R. holtzi* plazma glikoz seviyesi.

Plazma (µmol/ml)	Ortalama	SS	SH	%95 GA	Min. – Maks.
Kontrol	1,90 ^a	0,50	0,25	1,10–2,70	1,20–2,39
Donma	8,67 ^b	4,44	2,22	1,60–15,74	4,72–13,35
Çözünme	1,92 ^a	0,45	0,23	1,19–2,64	1,44–2,53
Anoksi	2,63 ^a	0,47	0,24	1,88–3,38	1,95–3,05
Reoksi	1,81 ^a	0,35	0,17	1,25–2,36	1,35–2,2
Dehidrasyon	1,86 ^a	0,34	0,17	1,31–2,4	1,60–2,35
Rehidrasyon	1,86 ^a	0,32	0,16	1,35–2,37	1,54–2,31

SS: Standart sapma; SH: Standart hata; GA: Güven aralığı; Min. – Maks.: Minimum ve maksimum değerler. Gruplar arasındaki farkı belirlemek için ANOVA testi ve ardından farklardaki anlamlılık seviyesini belirlemek için Tukey-HSD test gerçekleştirilmiştir. Ortalama değerlerin yer aldığı sütunda yer alan değerler arasındaki farklılık farklı harfler kullanılarak belirtilmiştir.



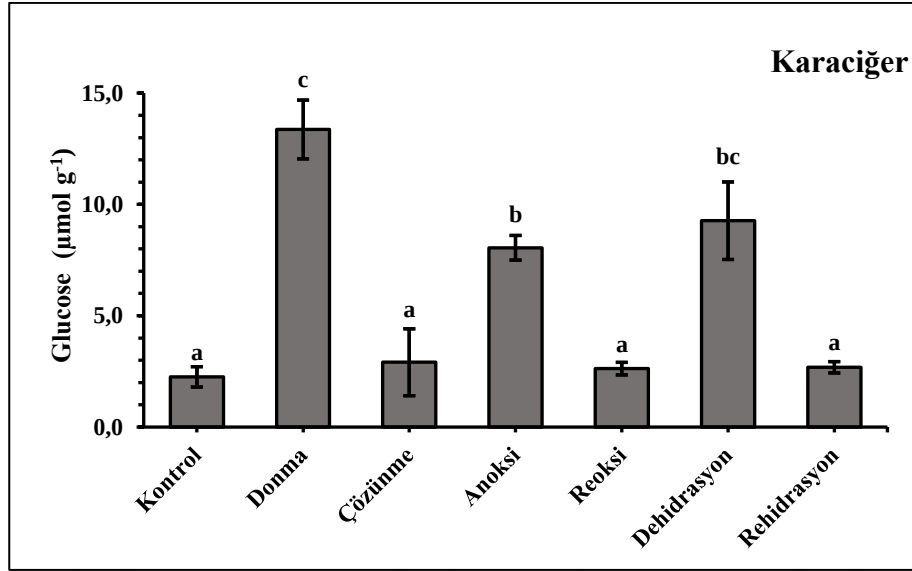
Şekil 4.8 *R. holtzi*'nin stres koşulları altında kan glikoz seviyesi.

Karaciğer dokusundaki glikoz seviyeleri donma, anoksi ve dehidrasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olarak arttı ($P < 0,05$). Glikoz değerleri kontrol, donma, anoksi ve dehidrasyon gruplarında sırasıyla $2,56 \pm 0,46$, $13,36 \pm 1,32$, $8,05 \pm 0,55$ ve $9,26 \pm 1,74$ $\mu\text{mol g}^{-1}$ olarak ölçüldü. Bu veriler göre kontrole kıyasla donmada 5,93 kat, anoksida 3,57 kat ve dehidrasyonda 4,11 kat artış gerçekleştiği kaydedildi. Çözünme, reoksi ve rehidrasyon gruplarındaki değişimler istatistiksel olarak anlamsızdı ($P > 0,05$) (Çizelge 4.7, Şekil 4.9).

Çizelge 4.7 *R. holtzi* karaciğer dokusu glikoz seviyesi.

Karaciğer ($\mu\text{mol/g}$)	Ortalama	SS	SH	%95 GA	Min. – Maks.
Kontrol	2,26 ^a	0,91	0,46	0,80–3,71	1,00–3,17
Donma	13,36 ^c	2,64	1,32	9,16–17,56	11,08–16,77
Çözünme	2,91 ^a	3,00	1,50	-1,87–7,69	0,34–6,65
Anoksi	8,05 ^b	1,11	0,55	6,29–9,81	6,84–9,08
Reoksi	2,62 ^a	0,56	0,28	1,73–3,52	2,03–3,15
Dehidrasyon	9,27 ^{b,c}	3,48	1,74	3,72–14,81	6,11–14,21
Rehidrasyon	2,68 ^a	0,51	0,25	1,87–3,49	2,2–3,37

SS: Standart sapma; SH: Standart hata; GA: Güven aralığı; Min. – Maks.: Minimum ve maksimum değerler. Gruplar arasındaki farkı belirlemek için ANOVA testi ve ardından farklardaki anlamlılık seviyesini belirlemek için Tukey-HSD test gerçekleştirilmiştir. Ortalama değerlerin yer aldığı sütunda yer alan değerler arasındaki farklılık farklı harfler kullanılarak belirtilmiştir.



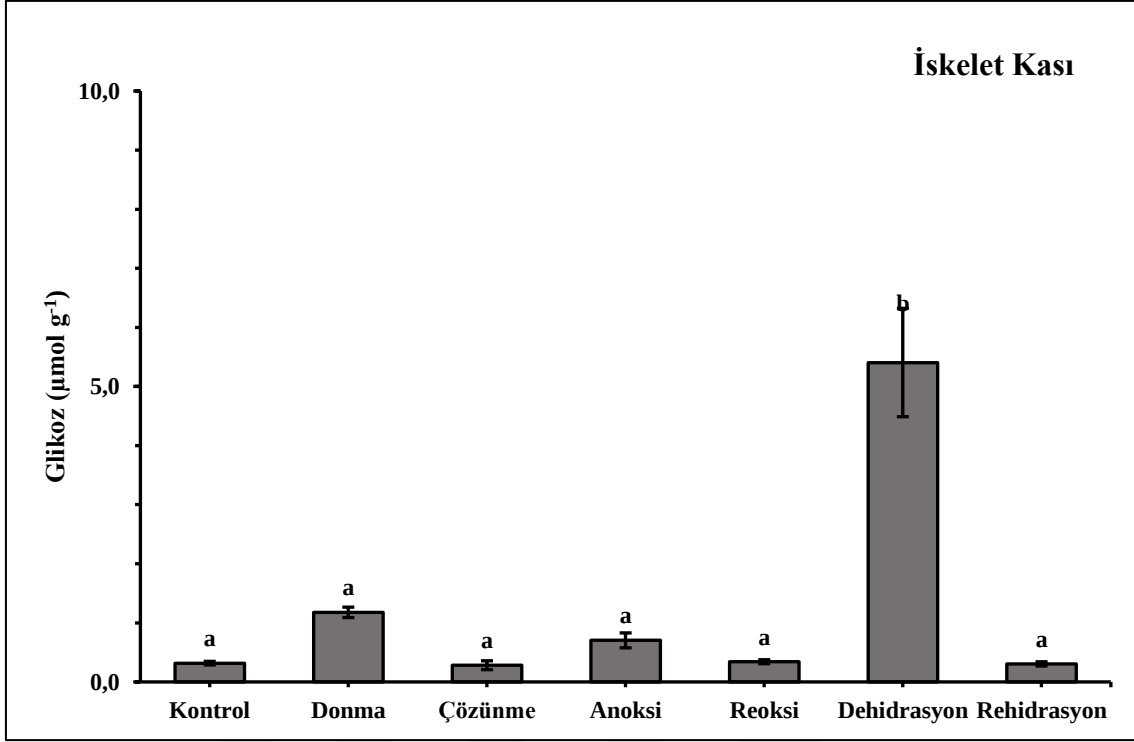
Şekil 4.9 *R. holtzi*'nin stres koşulları altında karaciğer dokusu glikoz seviyesi.

Rana holtzi'nin iskelet kası dokusundaki glikoz seviyeleri, kontrol grubuna göre yalnız dehidrasyon grubunda 17,02 kat artış ile ($0,32 \pm 0,03$ 'ten $5,41 \pm 0,92 \mu\text{mol g}^{-1}$ 'e) önemli ölçüde yükseldi ($P < 0,05$). Donma grubunda 3,71 kat, anoksi grubunda da 2,21 kat artış gerçekleşmiş olsa da bu artışlar istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($P > 0,05$). Bunların dışındaki normalizasyon gruplarındaki değişiklikler de kontrol grubuna göre anlamsızdı (Çizelge 4.8, Şekil 4.10).

Çizelge 4.8 *R. holtzi* iskelet kas dokusu glikoz seviyesi.

İskelet kası ($\mu\text{mol/g}$)	Ortalama	SS	SH	%95 GA	Min. – Maks.
Kontrol	0,32 ^a	0,06	0,03	0,22–0,41	0,26–0,37
Donma	1,18 ^a	0,18	0,09	0,90–1,46	1,02–1,38
Çözünme	0,28 ^a	0,15	0,08	0,04–0,52	0,07–0,42
Anoksi	0,70 ^a	0,25	0,13	0,30–1,11	0,40–1,02
Reoksi	0,34 ^a	0,07	0,03	0,24–0,45	0,25–0,40
Dehidrasyon	5,41 ^b	1,83	0,92	2,49–8,32	4,32–8,15
Rehidrasyon	0,31 ^a	0,07	0,04	0,19–0,42	0,25–0,41

SS: Standart sapma; SH: Standart hata; GA: Güven aralığı; Min. – Maks.: Minimum ve maksimum değerler. Gruplar arasındaki farkı belirlemek için ANOVA testi ve ardından farklardaki anlamlılık seviyesini belirlemek için Tukey-HSD test gerçekleştirilmiştir. Ortalama değerlerin yer aldığı sütunda yer alan değerler arasındaki farklılık farklı harfler kullanılarak belirtilmiştir.

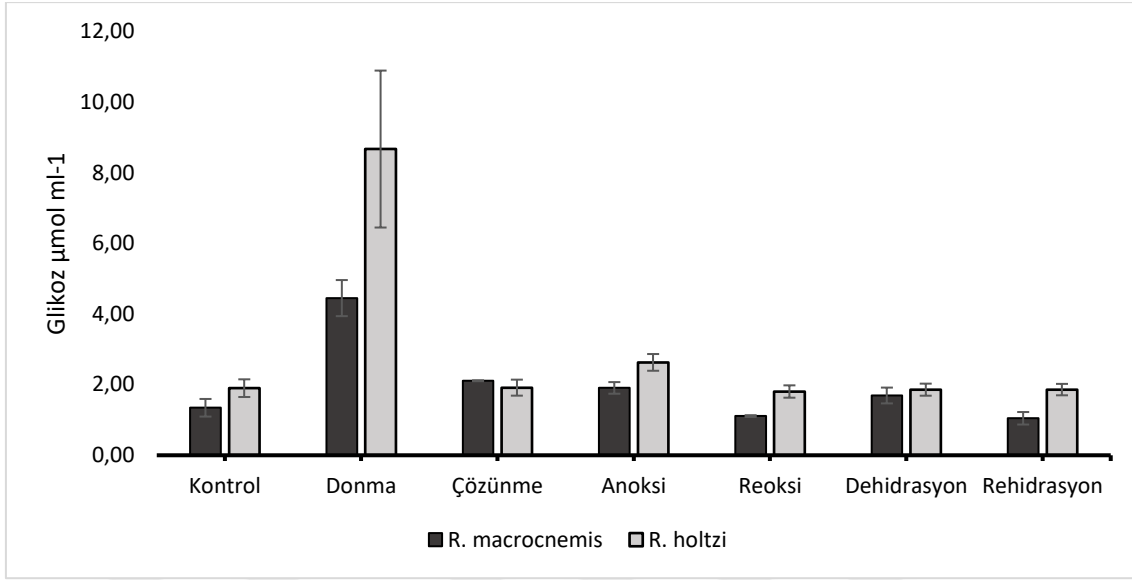


Şekil 4.10 *R. holtzi*'nin stres koşulları altında iskelet kası dokusu glikoz seviyesi.

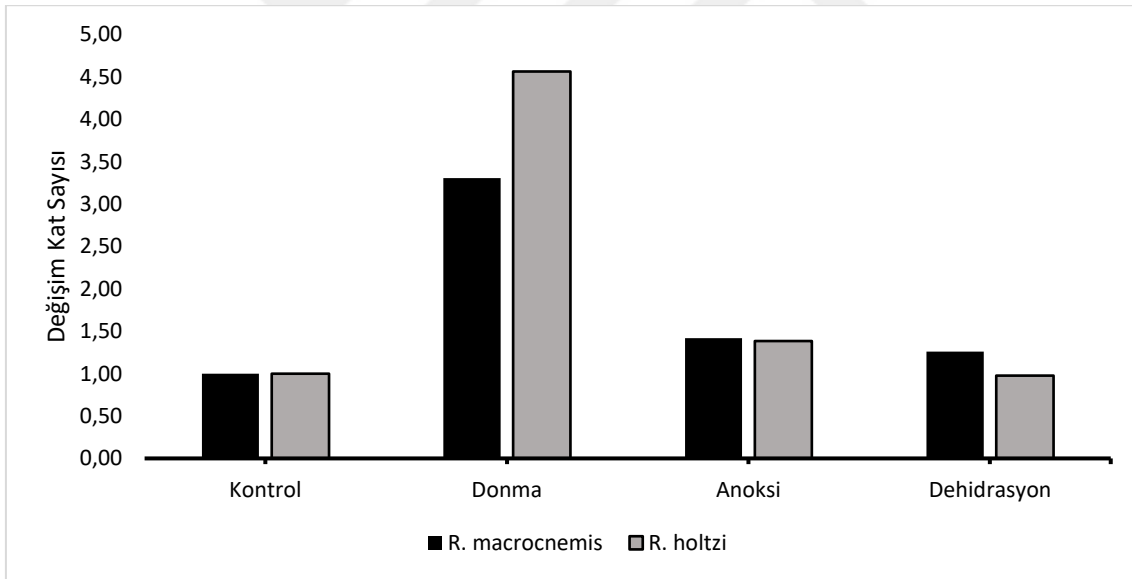
4.4.3 *R. macrocnemis* ve *R. holtzi* Glikoz Konsantrasyon Karşılaştırmaları

Donma ile donmaya bağlı stresler olan anoksi ve dehidrasyon koşullarına maruz bırakılan, bu koşullardan sonra normal koşullara da tabi tutulan deney grupları incelenerek deney koşullarına bağlı olarak kan, karaciğer ve iskelet kası dokularında glikoz seviyesindeki değişim araştırılmıştır. Her iki tür de kendi deney gurplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında stres koşullarında farklı dokularda anlamlı glikoz seviyesi değişiklikleri göstermiştir.

R. macrocnemis ve *R. holtzi* türlerine ait kan serumu glikoz seviyesi değerleri şekil 4.11'de belirtilmiştir. Bu veriler göz önüne alınarak kontrol gruplarına göre stres koşullarındaki kan glikoz değişim katsayıları da şekil 4.12'de belirtilmiştir. Bu kapsamda kontrol grupları bir olarak kabul edildiğinde en fazla değişim donma koşulları altında gerçekleşmiştir. *R. holtzi* donma koşulunda kan glikoz seviyesinde *R. macrocnemis*'e göre daha fazla artış göstermiştir. Kan glikoz seviyesi değişim kat sayısı donma koşullarında *R. macrocnemis* için 3,31 ve *R. holtzi* için 4,56 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12).



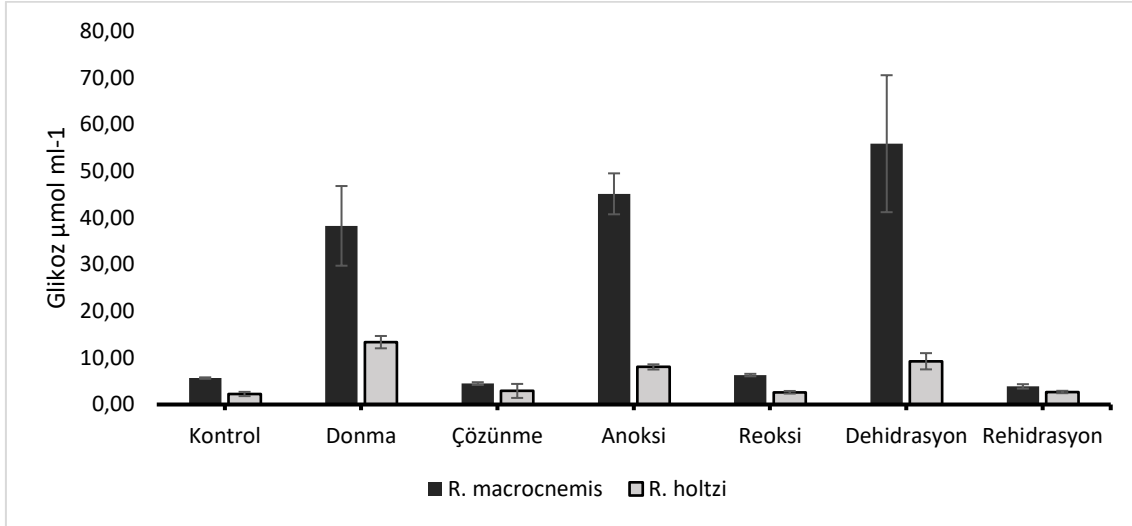
Şekil 4.11 *R. macrocnemis* ve *R. holtzi* türlerine ait deney koşullarına bağlı kan glikoz konsantrasyonları.



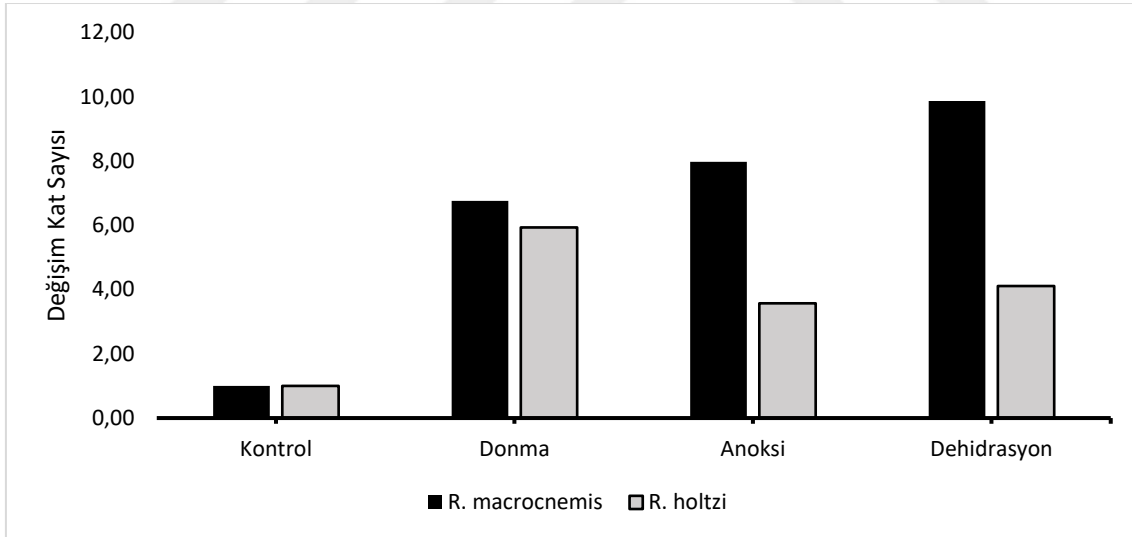
Şekil 4.12 *R. macrocnemis* ve *R. holtzi*'nin stres koşullarında kontrole göre kan glikoz seviyesi değişim katsayıları.

Benzer şekilde iki türe ait karaciğer glikoz seviyesi değerleri birlikte olarak şekil 4.13'de belirtilmiştir. Bu kapsamda kontrol gruplarına göre bir normalizasyon yapılarak değişim kat sayısı hesaplandığında, *R. macrocnemis* türünün üç stres koşulunda da *R. holtzi*'ye göre daha fazla artış gösterdiği kaydedilmiştir (Şekil 4.14). Karaciğer dokusundaki glikoz seviyesi artış katsayıları donma koşulu altında *R. macrocnemis*'de 6,76 iken *R. holtzi*'de

5,93 olarak; anoksi maruziyetinde *R. macrocnemis*'de 7,97 kat iken *R. holtzi*'de 3,57 kat ve dehidrasyon stresinde *R. macrocnemis*'de 9,86 kat iken *R. holtzi*'de 4,11 kat olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.14).

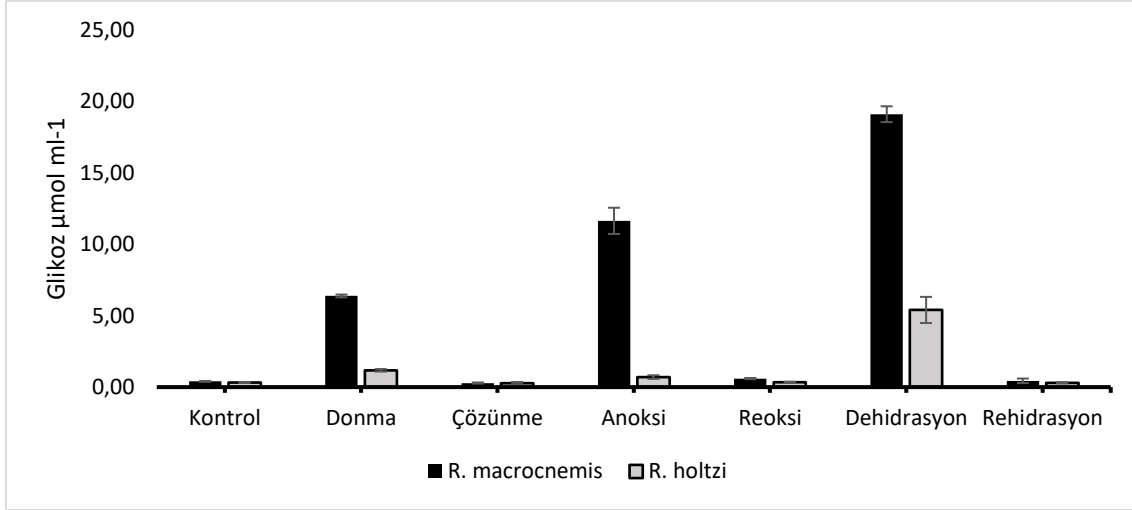


Şekil 4.13 *R. macrocnemis* ve *R. holtzi* türlerine ait deney koşullarına bağlı karaciğer glikoz konsantrasyonları.



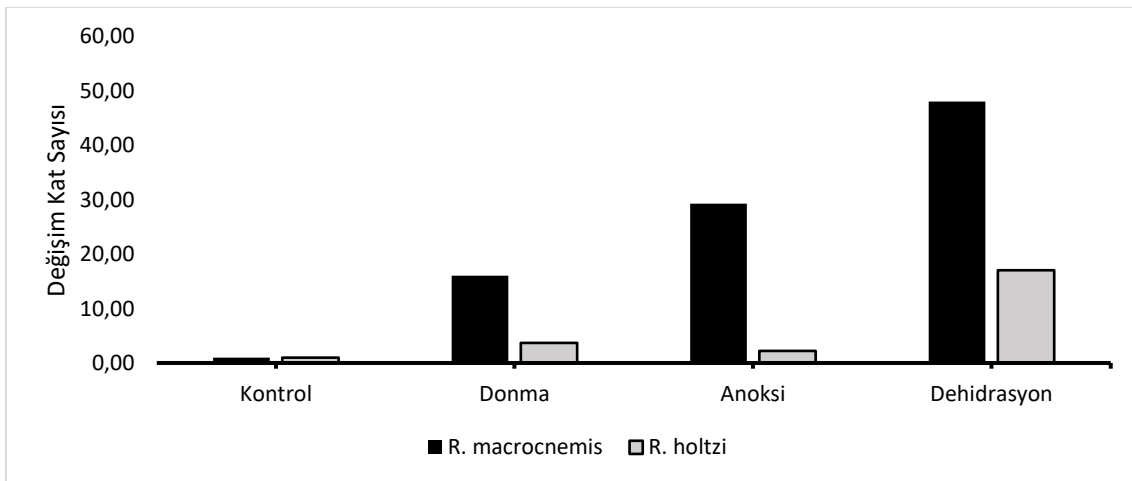
Şekil 4.14 *R. macrocnemis* ve *R. holtzi*'nin stres koşullarında kontrole göre karaciğer glikoz seviyesi değişim katsayıları.

Son olarak iskelet kası glikoz seviyesi verileri her iki tür için de şekil 4.15'de gösterilmiştir. Türlerin stres koşullarındaki iskelet kası glikoz seviyeleri kontrol gruplarına göre normalize edildiğindeki değişim katsayıları da Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.15 *R. macrocnemis* ve *R. holtzi* türlerine ait deney koşullarına bağlı iskelet kası glikoz konsantrasyonları.

Karaciğer dokusuna benzer şekilde iskelet kası dokusunda da donma, anoksi ve dehidrasyon streslerine karşılık verilen glikoz cevapları *R. macrocnemis* türünde *R. holtzi* türüne göre daha fazla olduğu hesaplanmıştır. *R. macrocnemis* iskelet kası glikoz seviyesi donma koşullarında 16 kat artarken *R. holtzi*'de 3,7 kat artış kaydedilmiştir. Anoksi stresinde de *R. macrocnemis* kas glikoz seviyesi 29 kattan fazla artarken diğer türde 2 kattan biraz fazla artış gerçekleşmiştir. Son olarak dehidrasyon koşullarında *R. macrocnemis* iskelet kasında glikoz seviyesi kontrole göre 48 ka artarken *R. holtzi*'de bu artış 17 kat olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 *R. macrocnemis* ve *R. holtzi*'nin stres koşullarında kontrole göre iskelet kası glikoz seviyesi değişim katsayıları.

4.5 Gen Ekspresyon Analizi

Amfibilere özgü antifriz protein genlerinin (*fr47*, *li16*, *fr10*) *R. macrocnemis* ve *R. holtzi* türlerinin karaciğer ve iskelet kası dokularındaki ekspresyon seviyeleri RT-qPCR tekniği ile belirlendi. Bu kapsamda gerçekleştirilen total RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve PCR işlemlerinden elde edilen bulgular aşağıda detaylı olarak belirtilmiştir.

4.5.1 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Total RNA izolasyonunda hem spin kolon yöntemi hem de fenol bazlı hazır RNA izolasyon tamponu (PureZOL™) kullanıldı. Elde edilen total RNA'lar Thermo MultiscanGo ve Colibri Titertrek Brethold nanodrop cihazları ile miktarları ve kaliteleri açısından (260/280) kontrol edildi. Karaciğer dokularında ~388 ng/μl ile 3128 ng/μl arasında değişen miktarlarda total RNA elde edildi. Bu miktarlar kas dokusunda ~100 ng/μl ile 1309 ng/μl arasında elde edildi. Elde edilen total RNA lar eşit miktarda cDNA eldesi için en düşük örneğe göre ~100 ng/μl olacak şekilde seyreltilti. Yaklaşık 100 ng/μl başlangıcı ile gerçekleştirilen cDNA eldesi işlemi sonrası 720-830 ng/μl cDNA sentezi gerçekleşti. Bu ürünlerde de RT-qPCR da kullanılmak üzere uygun seyreltme işlemleri gerçekleştirildi.

4.5.2 RT-qPCR Sonuçları

Amfibilerde tanımlanan antifriz proteinlerin (*fr10*, *li16* ve *fr47*) mRNA ekspresyon seviyeleri kullanarak gen ifadelerinin tespiti için *α-tubulin* geni referans gen (housekeeping) olarak kullanılmıştır. Gerçekleştirilen RT-qPCR işlemleri sonrası elde edilen Ct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu uygulanmış ve hedef genlerin kontrol genlerine göre yukarı / aşağı regülasyonu hesaplandı (Örn., Çizelge 4.9) (Relative Expression Software Tool – Multiple Condition solver REST-MCS © - version 2). Gruplar arasında gen ekspresyon seviyesi değişikliklerinin anlamlılığı için istatistiksel analizlerde verilerin normallik ve homojenlik standartlarına uygun olabilmesi için $\Delta\Delta Ct$ değerleri $\log_2$ dönüşümü gerçekleştirilerek ANOVA ve Tukey-HSD posthoc testi yapılmıştır.

Çizelge 4.9 *R. macrocnemis* karaciğer dokusunda kontrol, donma ve çözünme koşullarındaki *li16* geninin ekspresyon seviyesinin hesaplanma örneği.

Grup	Örnek	α -tubulin	<i>li16</i>	ΔCt	Ort. ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Ort. $\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\uparrow\downarrow$ Reg.
Kontrol	1. örn.	23,93	19,35	-4,58		-0,22			
	2. örn.	23,73	19,17	-4,56	-4,36	-0,20	0,000	1,00	
	3. örn.	23,09	19,14	-3,95		0,41			
	4. örn.	23,58	19,22	-4,36		0,00			
Donma	1. örn.	24,08	17,81	-6,27		-1,91			
	2. örn.	24,35	18,00	-6,35	-6,16	-1,99	-1,793	3,47	3,468
	3. örn.	23,18	17,33	-5,85		-1,49			
	4. örn.	23,87	17,71	-6,16		-1,79			
Çözünme	1. örn.	24,10	21,02	-3,08		1,28			
	2. örn.	24,89	21,23	-3,66	-3,36	0,70	1,007	0,50	-2,008
	3. örn.	24,90	21,57	-3,33		1,03			
	4. örn.	24,63	21,27	-3,36		1,01			

α -tubulin ve *li16* sütunlarındaki değerler RT-qPCR çalışmasından elde edilen Ct değerleridir. ΔCt : $Ct_{(hedef\ gen)} - Ct_{(referans\ gen)}$; $\Delta\Delta Ct$: $\Delta Ct_{(test\ grubu)} - \Delta Ct_{(kontrol\ grubu)}$; $\uparrow\downarrow$ Reg.: aşağı yönlü ya da yukarı yönlü regülasyon (düzenlenme, ekspresyon) katı.

4.5.2.1 *R. macrocnemis* Antifriz Proteinleri

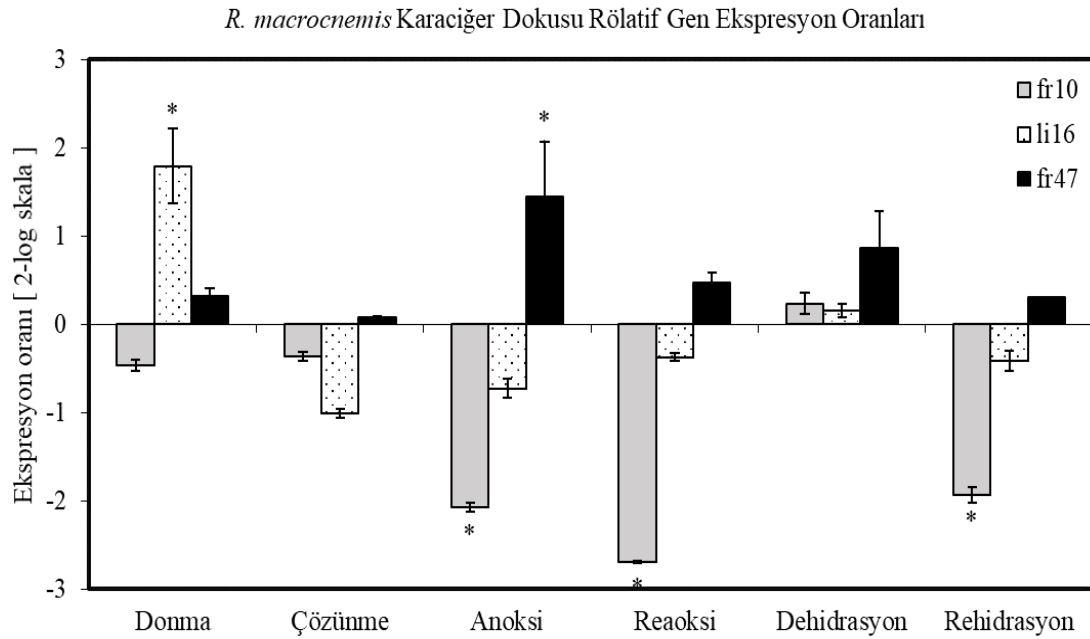
R. macrocnemis'in karaciğer dokusu ile yapılan çalışmada gen regülasyonları incelendiğinde donma, anoksi ve dehidrasyon streslerinde genel olarak düşüş gösterdiği ancak bazı durumlarda hayvanları bu streslerin zararlarından koruma amaçlı gen ifade seviyelerinin yukarı yönlü regülasyon gösterdiği tespit edildi (Çizelge 4.9).

R. macrocnemis karaciğer dokusunda donma koşulu *li16* geni mRNA ekspresyon seviyesini 3,468 kat, *fr47* geni için 1,249 kat artırırken *fr10* geni ekspresyonunu 1,381 kat azaltmıştır. Anoksi koşulu karaciğerde *fr47*'yi 2,721 kat artırmıştır ancak *li16* (-1,654 kat) ve *fr10* (-4,216 kat) genlerinde aşağı yönlü regülasyona sebep olmuştur. Dehidrasyon koşullarında karaciğer dokusunda her üç gen bölgesi de pozitif regülasyon göstermiştir. *fr10* geni 1,176 kat, *li16* geni 1,115 ve *fr47* geni 1,813 kat artış kaydedildi. Ayrıca *fr47* gen ekspresyon seviyelerinin tüm stres koşullarında yukarı yönlü ifade olduğu tespit edildi (Çizelge 4.10, Şekil 4.17).

Çizelge 4.10 *R. macrocnemis* karaciğer dokusu AFP'ler gen ekspresyon seviyeleri özet tablosu.

Karaciğer	<i>fr10</i>		<i>li16</i>		<i>fr47</i>	
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	↑↓ Reg.	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		$2^{-\Delta\Delta Ct}$	↑↓ Reg.
Kontrol	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Donma	0,72	-1,381	3,47*	3,468	1,25	1,249
Çözünme	0,78	-1,289	0,50	-2,008	1,05	1,055
Anoksi	0,24*	-4,216	0,60	-1,654	2,72*	2,721
Reoksi	0,15*	-6,480	0,77	-1,295	1,39	1,386
Dehidrasyon	1,18	1,176	1,11	1,115	1,81	1,813
Rehidrasyon	0,26*	-3,826	0,75	-1,331	1,23	1,235

↑↓ Reg.: aşağı yönlü ya da yukarı yönlü regülasyon (düzenlenme, ekspresyon) katı. Normalleştirilmiş ekspresyon oranları Log₂ dönüşümü yapıldıktan sonra Student's *t*-test analizi yapılarak kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile karşılaştırılan gruplar arasındaki anlamlı farklılık ($P < 0,05$) yıldız (*) ile işaretlenmiştir.



Şekil 4.17 *R. macrocnemis* karaciğer dokusunda AFP'lerin deney koşullarına karşı cevabı. Kontrol grubu ile karşılaştırılan gruplar arasındaki anlamlı farklılık ($P < 0,05$) yıldız (*) ile işaretlenmiştir.

Kas dokusundaki hedef genlerin analizinde de farklı stres koşullarında yukarı yönlü regülasyonlar gerçekleştiği görüldü. *R. macrocnemis* kas dokusu donma koşulunda *li16* geninde yukarı yönde 1,647 kat ekspresyon gösterdi. Çözünme grubunda her üç gen için yukarı yönlü düzenleme gerçekleştiği görüldü (*fr10* 1,094; *li16* 2,367; *fr47* 1,741 kat).

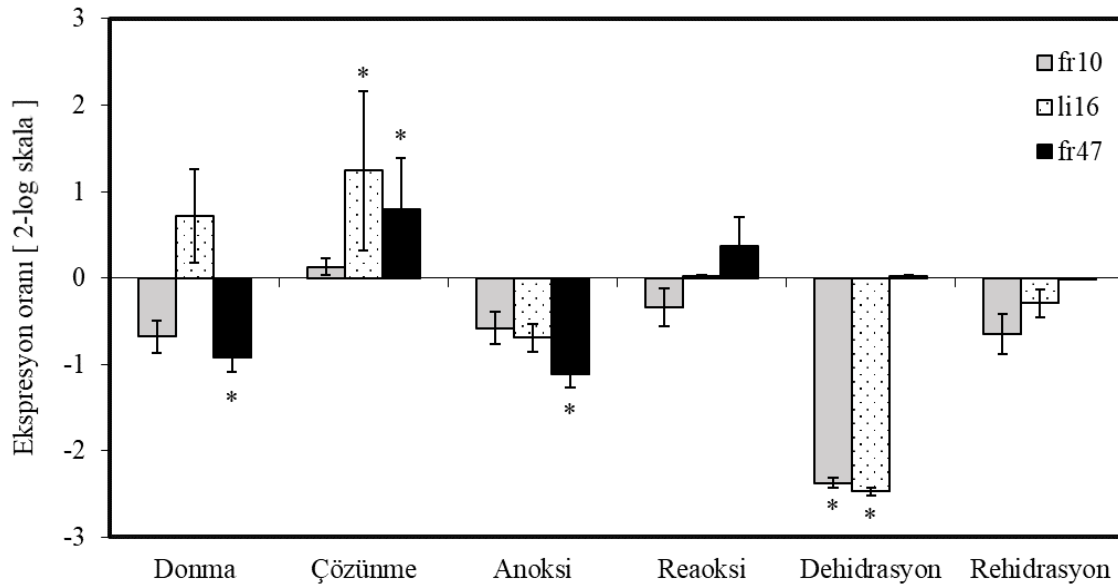
Anoksi koşullarında ise her üç gende aşağı yönlü ekspresyon gerçekleşti (*fr10* -1,495; *li16* -1,617; *fr47* -2,158 kat). Dehidrasyon koşullarında ise *fr47* geni ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre değişmezken (1,017 kat) *fr10* ve *li16* genleri ekspresyon seviyeleri sırası ile -5,18 ve -5,55 kat azalış gösterdi (Çizelge 4.11, Şekil 4.18).

Çizelge 4.11 *R. macrocnemis* kas dokusu AFP'ler gen ekspresyon seviyeleri özet tablosu.

Kas	<i>fr10</i>		<i>li16</i>		<i>fr47</i>	
	$2^{\Delta\Delta Ct}$	$\uparrow\downarrow$ Reg.	$2^{\Delta\Delta Ct}$		$2^{\Delta\Delta Ct}$	$\uparrow\downarrow$ Reg.
Kontrol	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Donma	0,62	-1,602	1,65	1,647	0,48*	-1,889
Çözünme	1,09	1,094	2,37*	2,367	1,74*	1,741
Anoksi	0,67	-1,495	0,62	-1,617	0,46*	-2,158
Reoksi	0,79	-1,263	1,01	1,013	1,29	1,286
Dehidrasyon	0,19*	-5,180	0,18*	-5,552	1,02	1,017
Rehidrasyon	0,64	-1,563	0,82	-1,223	0,98	-1,016

$\uparrow\downarrow$ Reg.: aşağı yönlü ya da yukarı yönlü regülasyon (düzenlenme, ekspresyon) katı. Normalleştirilmiş ekspresyon oranları $\log_2$ dönüşümü yapıldıktan sonra Student's *t*-test analizi yapıldı. Kontrol grubu ile karşılaştırılan gruplar arasındaki anlamlı farklılık ($P < 0,05$) yıldız (*) ile işaretlenmiştir.

R. macrocnemis Kas Dokusu Rölatif Gen Ekspresyon Oranları



Şekil 4.18 *R. macrocnemis* iskelet kası dokusunda AFP'lerin deney koşullarına karşı cevabı. Kontrol grubu ile karşılaştırılan gruplar arasındaki anlamlı farklılık ($P < 0,05$) yıldız (*) ile işaretlenmiştir.

4.5.2.2 *R. holtzi* Antifriz Proteinleri

FR10 protein sentezinden sorumlu genin karaciğer dokusundaki mRNA ekspresyon seviyesi donma ve donmayla bağlantılı ana streslerde (anoksi ve dehidrasyon) kontrol koşullarındaki gruba göre artış göstermiştir. Laboratuvar koşullarındaki uygulamamız sonuçlarına göre bu streslerin karaciğer dokusunda bu genin eksprese olmasını tetiklediği tespit edildi. *R. holtzi* karaciğer dokusu gen ifade seviyeleri incelendiğinde *fr10* geninin ekspresyon seviyesi donma (1,662 kat), anoksi (1,417 kat) ve dehidrasyon (1,154 kat) koşullarında yukarı yönlü olduğu tespit edildi. Çözünme ve rehidrasyon koşullarında kontrol grubu seviyesine yaklaşım gösteren *fr10* ekspresyonu ortamdaki oksijen seviyesinin hızla yükseldiği reoksi koşulunda 4,837 kat anlamlı bir azalış gösterdi ($P<0,05$) (Çizelge 4.12, Şekil 4.19).

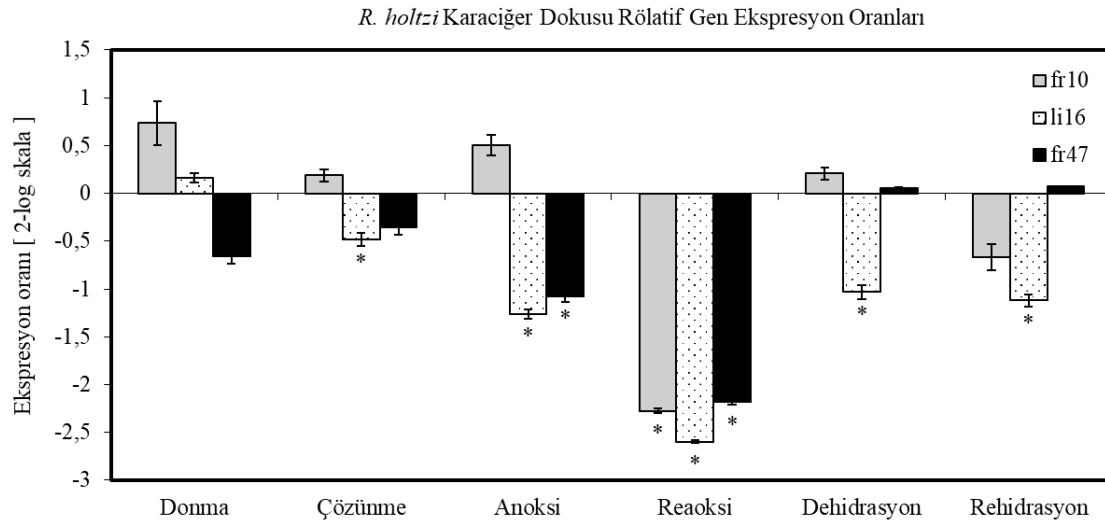
Karaciğer dokusu *li16* mRNA ekspresyon seviyesi donma koşulunda (1,12 kat) yukarı yönlü olsa da diğer tüm koşullarda aşağı yönlü olduğu kaydedildi. Uygulanan stres koşullarındaki durumunun ise anoksi koşulunda 2,4 kat azalış ve dehidrasyon koşulunda da 2,04 kat azalış yönünde olduğu tespit edilmiştir. Bu iki gruptaki azalışlar istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($P<0,05$). Normalleşme grupları olan çözünme, reoksi ve dehidrasyon gruplarındaki ekspresyon seviyesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalışlar göstermiştir ($P<0,05$). Doğal koşullara göre oldukça hızlı gerçekleşen bu normalleşme süreçlerinden çözünme grubunda 1,4 kat, reoksi grubunda 6,04 kat ve rehidrasyon grubunda 3,17 kat *li16* mRNA ekspresyon seviyesinde azalış tespit edilmiştir (Çizelge 4.12, Şekil 4.19).

R. holtzi karaciğer dokusunda *fr47* geni ekspresyon seviyeleri dehidrasyon ve rehidrasyon koşullarında kontrol grubuna yakın değerler gösterirken donma, anoksi ve bu grupların normalizasyon koşullarında aşağı yönlü ifade seviyesi gösterdi (Çizelge 4.12, Şekil 4.19). Anoksik koşullara maruz kalan grupta *fr47* gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre 2,1 kat, ve aynı koşulların normalleşme şartlarına tabi olan reoksi grubunda da 4,5 kat azalış gösterdi. Ayrıca, reoksi grubunda her üç genin de önemli ölçüde aşağı yönlü eksprese (*fr10* -4,837; *li16* -6,05 *fr47* -4,544 kat) olduğu tespit edildi (Çizelge 4.12, Şekil 4.19).

Çizelge 4.12 *R. holtzi* karaciğer dokusu AFP'ler gen ekspresyon seviyeleri özet tablosu.

Karaciğer	<i>fr10</i>		<i>li16</i>		<i>fr47</i>	
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	↑↓ Reg.	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		$2^{-\Delta\Delta Ct}$	↑↓ Reg.
Kontrol	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Donma	1,66	1,662	1,12	1,120	0,63	-1,577
Çözünme	1,14	1,138	0,72*	-1,399	0,78	-1,278
Anoksi	1,42	1,417	0,42*	-2,402	0,47*	-2,110
Reoksi	0,21*	-4,837	0,17*	-6,050	0,22*	-4,544
Dehidrasyon	1,15	1,154	0,49*	-2,046	1,04	1,035
Rehidrasyon	0,63	-1,591	0,46*	-2,173	1,05	1,050

↑↓ Reg.: aşağı yönlü ya da yukarı yönlü regülasyon (düzenlenme, ekspresyon) katı. Normalleştirilmiş ekspresyon oranları Log₂ dönüşümü yapıldıktan sonra Student's *t*-test analizi yapıldı. Kontrol grubu ile karşılaştırılan gruplar arasındaki anlamlı farklılık ($P < 0,05$) yıldız (*) ile işaretlenmiştir.



Şekil 4.19 *R. holtzi* karaciğer dokusunda AFP'lerin deney koşullarına karşı cevabı. Kontrol grubu ile karşılaştırılan gruplar arasındaki anlamlı farklılık ($P < 0,05$) yıldız (*) ile işaretlenmiştir.

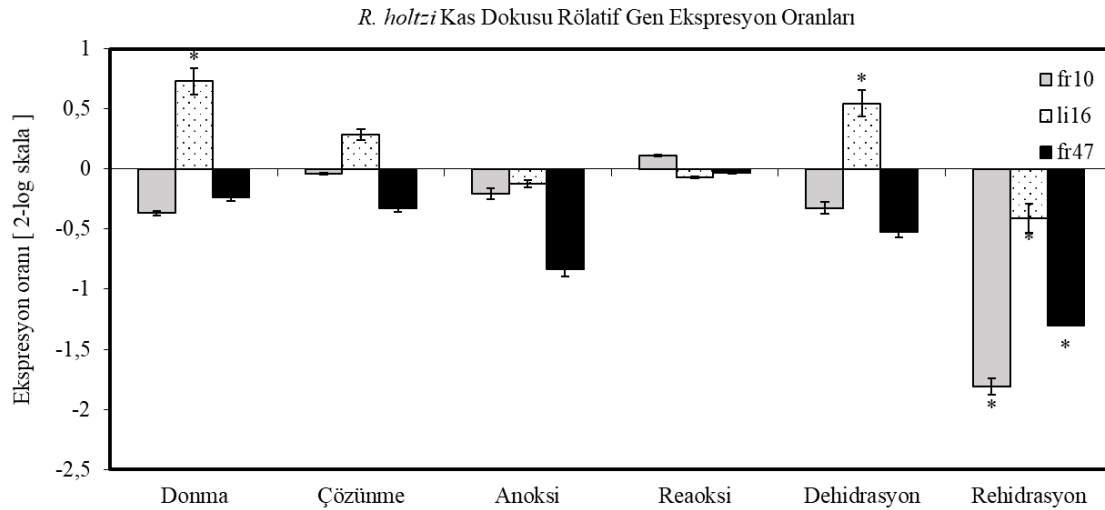
R. holtzi kas dokusu için hedef genlerin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde *li16* geninde donma ve dehidrasyon koşullarında sırası ile 1,659 kat ve 1,461 kat artış olduğu kaydedildi. Çözünme ve rehidrasyon koşullarında bu değerlerin kontrol grubu değerine yaklaştığı görüldü (Çözünme 1,217; rehidrasyon -1,329 kat). Anoksi ve reoksi gruplarında *li16* ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik göstermedi. Kas dokusu *fr10* gen ekspresyonu incelendiğinde en büyük değişiklik aşağı

yönlü 3,504 kat ile rehidrasyon grubunda tespit edildi. Diğer gruplardaki *fr10* geni ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna yakın olduğu görüldü. *fr47* geninin kas dokusundaki ekspresyon seviyeleri tüm stres ve normalleşme gruplarında kontrol grubuna göre negatif yönlü olduğu tespit edildi. Donma ve reoksi gruplarındaki değerler kontrol grubu seviyesine yakın iken rehidrasyon grubunda -2,473 kata kadar yükseldiği kaydedildi (Çizelge 4.13, Şekil 4.20).

Çizelge 4.13 *R. holtzi* kas dokusu AFP'ler gen ekspresyon seviyeleri özet tablosu.

Kas	<i>fr10</i>		<i>li16</i>		<i>fr47</i>	
	$2^{\Delta\Delta Ct}$	↑↓ Reg.	$2^{\Delta\Delta Ct}$		$2^{\Delta\Delta Ct}$	↑↓ Reg.
Kontrol	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Donma	0,78	-1,289	1,66*	1,659	0,85	-1,180
Çözünme	0,97	-1,027	1,22	1,217	0,80	-1,251
Anoksi	0,87	-1,153	0,92	-1,090	0,56	-1,781
Reoksi	1,08	1,082	0,95	-1,050	0,98	-1,023
Dehidrasyon	0,80	-1,251	1,46*	1,461	0,69	-1,440
Rehidrasyon	0,29*	-3,504	0,75*	-1,329	0,40*	-2,473

↑↓ Reg.: aşağı yönlü ya da yukarı yönlü regülasyon (düzenlenme, ekspresyon) katı. Normalleştirilmiş ekspresyon oranları Log₂ dönüşümü yapıldıktan sonra Student's *t*-test analizi yapıldı. Kontrol grubu ile karşılaştırılan gruplar arasındaki anlamlı farklılık ($P < 0,05$) yıldız (*) ile işaretlenmiştir.



Şekil 4.20 *R. holtzi* iskelet kası dokusunda AFP'lerin deney koşullarına karşı cevabı. Kontrol grubu ile karşılaştırılan gruplar arasındaki anlamlı farklılık ($P < 0,05$) yıldız (*) ile işaretlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen ana sonuçlar şunlardır: (i) hem *R. macrocnemis* hem de *R. holtzi*'nin kanındaki glikoz seviyeleri donmaya yanıt olarak artış gösterdi; (ii) donma, anoksi ve dehidrasyon, *R. macrocnemis*'in karaciğer ve iskelet kası dokusundaki glikoz seviyelerini arttırdı; (iii) *R. holtzi*'de donma, anoksi ve dehidrasyon, karaciğer dokusunda glikoz seviyesini artırırken iskelet kası dokusunda glikoz seviyesini sadece dehidrasyon arttırdı; (iv) her iki türde de karaciğerdeki su içeriği donma stresi altında azalırken, iskelet kasının su içeriği yalnızca anoksi ve dehidrasyon koşullarında azalış gösterdi; (v) stres koşulları her iki türde de vücut ağırlığında bir azalmaya neden olmasına rağmen, istatistiksel olarak önemsizdi; (vi) donma toleranslı kurbağalarda donma ve streslerinden sorumlu olan *fr47*, *li16* ve *fr10* genleri bizim çalıştığımız Anadolu dağ kurbağalarında da etkinlik gösterdi; (vii) *li16* geni her iki türün de kas ve karaciğer dokularında donma maruziyetine karşı yukarı yönlü ifade seviyesi göstererek donma ile ilişkili olduğunu gösterdi.

Bu çalışmada Anadolu'da yaşayan iki dağ kurbağası türünün sıfırın altındaki koşullarda nasıl hayatta kaldığının incelenmesi amaçlanmıştır. Anadolu'nun dağlık bölgelerindeki kış mevsiminde genellikle uzun süreli donma koşulları yaşanır ve buralarda yaşayan kurbağalar bir şekilde bu koşullarda hayatta kalabilirler. Birçok çalışma, glikoz, gliserol, üre, antioksidanlar ve antifriz proteinler gibi kriyoprotektanların donma toleransında ana faktörler olduğunu göstermiştir (Costanzo 2005, Costanzo vd. 2013, Storey ve Storey 2017, Amaral vd. 2018). Glikoz, donmaya toleranslı kurbağalar tarafından kullanılan en yaygın kriyoprotektan olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada *R. macrocnemis* ve *R. holtzi*'nin kan, karaciğer ve iskelet kasında glikoz seviyesi değişiklikleri araştırıldı. Bunun yanında amfibilere özgü antifriz proteinlerin gen ekspresyon seviyeleri mRNA tabanlı olarak tespit edildi. Ayrıca sıfırın altındaki sıcaklıkların getirdiği stres koşulları altında vücut ağırlığı ve su içeriğindeki değişimler incelendi.

Sonuçlarımız, glikozun Anadolu dağ kurbağalarının kriyobiyolojisinde önemli bir parametre olabileceğini gösterdi, çünkü her iki kurbağa türü de laboratuvarında oluşturulan donma, anoksi ve dehidrasyon koşulları altında hayatta kaldı ve bu süreçte kan, karaciğer

ve iskelet kası dokularının glikoz seviyelerinde önemli artışlar gösterdi. Ayrıca normalleşme gruplarında kan, karaciğer ve kas dokularındaki glikoz seviyeleri uygun sıcaklık, oksijen ve su bulunan bir ortamda normale (kontrol grubu seviyesi) dönerek glikozun donma toleransında önemli rol oynadığını göstermektedir. Antifriz proteinlerin durumunu genel olarak değerlendirdiğimizde literatürde amfibilere özgü olarak tanımlanmış bu genler (*fr47*, *li16*, *fr10*) bizim çalıştığımız Anadolu dağ kurbağalarında da donma, anoksi ve dehidrasyon koşullarında farklı ekspresyon seviyeleri gösterdi. Özellikle *li16* geni her iki hayvan türünde karaciğer ve kas dokularında donma koşulunda yukarı yönlü regülasyon göstererek donma stresinde koruyucu rolü olduğunu göstermiştir.

Doğal habitatlarında hem *R. macrocnemis* hem de *R. holtzi*, yaşam alanlarının dondurucu kış koşulları ile uzun süreler boyunca başa çıkabilmektedirler. Benzer şekilde laboratuvar ortamındaki stres koşullarında da hayatta kaldıkları kaydedilen bu çalışmanın sonuçları, bu türlerin donmaya dayanma yeteneklerinden, anoksi ve dehidrasyon gibi donmanın bileşen streslerine de dayanabilmelerinden dolayı donma-toleranslı olduklarını göstermiştir. Ancak, *R. macrocnemis*'in Dağıstan (Rusya) bölgesinden alınan örneklerin -1 °C donmaya 5 gün boyunca maruziyeti sonucu hayatta kalma oranı %5 (n=20), -2 °C'nin tüm hayvanlar için ölümcül olduğu bildirilmiştir (Bulakhova vd. 2020). Aynı çalışma içerisinde *R. macrocnemis*'in 1 günlük 1,3-1,9 mg/L oksijen konsantrasyonu tolere edebildiği, 3-4 mg/L oksijen konsantrasyonunda 50 gün sonunda hayatta kalma oranının %13 olduğu kaydedilmiştir. *R. macrocnemis*'in donmaya kısmi toleranslı olduğunu ve anoksi toleransının da düşük olduğunu bildirilmiştir. Bulakhova vd. (2020)'nin sonuçları bizim sonuçlarımızla örtüşmemesi benzer zıtlıkların *R. sylvatica* çalışmalarında da görülüp sebeplerinin; hayvanların yaşadığı çevre, maruz kalınan sıcaklık, toplanma dönemi, bulunduğu rakım ve beslenme alışkanlıkları ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Costanzo vd. 2013, 2014, 2015, Amaral 2014). Çalışmalar arasındaki örnek lokasyonlarına ait temel farklılık rakımdan kaynaklanmaktadır, bizim örneklerimiz ortalama 2000 m ve üzeri rakımlardan elde edilirken, Bulakhova vd. (2020) çalışmasında kurbağalar Khunzakh platosundan 1170 ve 1820 m rakımlardan toplanmıştır.

Bu çalışmada ölçülen glikoz seviyeleri diğer donma–toleranslı türlere kıyasla daha düşük değerler olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte, tür, yükseklik, habitat, metabolizma vb. farklılıkların hepsinin glikoz seviyelerini etkileyebileceği iyi bilinmektedir, bu da bu çalışmada elde edilen düşük glikoz seviyelerinin nedenini açıklayabilir. Sonuç olarak, gelecekteki çalışmaların bu çalışmada incelenen iki türde kriyoprotektanlar olarak diğer glikanlar, üre ve gliserol gibi farklı molekülleri araştırması gerektiğini vurgulamak önemlidir.

5.1 Dokulardaki Su Miktarı ve Vücut Ağırlığı

Bu çalışmada, bu kurbağa türlerinin donma, anoksi ve dehidrasyona tepkilerini incelemek için karaciğer ve iskelet kası dokularının su içeriği de araştırıldı. Donma sırasında veya donma koşulları altında, hücre dışı boşluklardaki buz oluşumu, çözünen maddeleri matriksten dışarı atar, bu da kalan hücre dışı sıvının ozmolalitesinde bir artışa neden olur. Hücre içi su, ozmotik kuvvet nedeniyle çekilir ve bu durumda kriyoprotektanlar hücre içi sıvının donmasını önlemek için çok önemlidir. Hücre içi sıvıların donma noktası vücut sıcaklığına eşit olana kadar ozmolaliteyi arttırırlar ve bu nedenle hücre içi sıvılar daha fazla soğutulamaz (yani sıcaklıkları düşemez) ve hücre içi buz çekirdeklenmesi riski en aza indirilir (Storey ve Storey 2017).

Çalışmamızdaki kurbağa türlerinin karaciğer ve iskelet kası dokularındaki su içeriğinin donma, dehidrasyon ve anoksi maruziyetleri altında azaldığı görülmüştür. *R. macrocnemis* karaciğer dokusundaki su miktarı donma koşulunda yaklaşık %11,3 azalarak kontrole ve diğer gruplara göre anlamlı farklılık oluşturmuştur. Kas dokusunda ise anoksi ve dehidrasyon koşullarında kontrol ve diğer gruplara göre anlamlı azalışlar kaydedilmiştir (Şekil 4.3). *R. holtzi* türünde de donma koşullarında sadece karaciğer dokusunda kontrole göre %10,4 ile anlamlı azalma gerçekleşmiştir. İskelet kası su miktarlarında da diğer tür ile benzer şekilde anoksi ve dehidrasyon gruplarında anlamlı azalmalar kaydedilmiştir (Şekil 4.4). Donmanın karaciğerde önemli ölçüde su miktarını azaltması bu azalmanın donma sürecinde fizyolojik dehidrasyonun gerçekleştiğini ve hücrelerdeki suyun dokular arası boşluklara çıkarılmasından kaynaklı olduğunu göstermektedir. Anoksi ve dehidrasyon streslerinde özellikle iskelet kasındaki su miktarının azalması fizyolojik dehidrasyon yanında dış ortam suyuna erişememe ve

kaybedilen suyun yerine konulamaması kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızın sonuçlarına benzer olarak *R. sylvatica*'da yapılan önceki bir çalışma dehidrasyon ve donma stresi sırasında kas dokusunda %50'ye ve karaciğer dokusunda yaklaşık %25'e varan su kayıpları gerçekleştiğini göstermiştir. Öte yandan diğer bir çalışmada donma sırasında Alaska'daki *R. sylvatica*'da bazı durumlarda donma esnasında karaciğeri dokusunda hiperhidrasyon da gözlenebildiğini gösteren bulgular elde edilmiştir bu durumun sebebinin, farklı mevsimlerde toplanan hayvanların karaciğerlerindeki yüksek glikojenez kapasitelerinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (Churchill ve Storey 1993, Costanzo vd. 1993a, 2013, 2015, Dieni ve Storey 2014). Donma sırasında Cope'un gri ağaç kurbağasının (*D. chrysoscelis*) karaciğerinden %36 oranında su kaybı bildirilmiştir (Amaral vd. 2018). Üç Avrupa su kurbağasının (*P. lessonae*, *P. ridibundus* ve melezleri *P. esculentus*) karaciğer ve kas dokularındaki suyun donma koşulları altında önemli bir değişiklik olmadığını gösteren sonuçlar elde edilmiştir (Voituron vd. 2003, 2005). Avrupa su kurbağalarında su kaybı değişikliklerinin donmaya toleranslı türlere kıyasla oldukça düşük olduğu bildirilmiştir.

Yukarıda belirtilen çalışmaların sonuçları ile birlikte çalışmamızın sonuçları, hücrelerin başlangıçtaki su içeriğinin hücre içi boşluklara salındığını ve organların olası doku hasarını azaltmak için küçüldüğünü göstermektedir. Su ve oksijen eksikliği iskelet kasının su içeriğinin azalmasına neden olur ve bu şekilde hücreler dehidrasyon ve anoksi durumlarında stres ortamına uyum sağlayarak hipometabolizmayı harekete geçirir. Ayrıca donma koşulları altında donmuş kurbağanın dokularındaki anoksi ve iskemiye bağlı olarak solunum ve dolaşımda durma meydana gelebilir. Bu nedenle her hücre sadece anaerobik enerji kullanarak oksijensiz olarak yaşamaya çalışır. Kurbağalarda donma esnasında hücre dışı boşluklarda buz oluşumu, hayvan için ozmotik bir probleme neden olur. Buz kristalleri çözünebilir maddeler içermediği ve genişlediği için buz miktarı arttıkça hücre dışı buza dönüşmeyen sıvıların ozmolalitesi de artar, bu da hücreler üzerindeki hiperozmotik basınca bağlı olarak hücre dehidrasyonu ve küçülmesine neden olur (Storey ve Storey 2013).

Diğer bir faktör, donma, anoksi ve dehidrasyon sırasında donmaya toleranslı

kurbağalarda vücut ağırlığı değişimidir. Bu nedenle bu çalışmada vücut ağırlığındaki değişiklikler de gözlemlenmiştir. Sonuçlarımız donma, anoksi ve dehidrasyon stresleri esnasında her iki türde de vücut ağırlığı kaybı gerçekleştiğini gösterdi. Ancak bu ağırlıklarındaki azalışlar istatistiksel açıdan önemsiz olarak kaydedildi. Ek olarak, her iki kurbağa türünün de normalleşme gruplarının yeniden kilo almaya başladığını vurgulamak önemlidir. Sonuçlarımız, farklı koşullar altında *Rana sylvatica*'nın vücut kitle indeksini ölçen önceki bir çalışma ile tutarlıdır. Bu yüksek donma toleransına sahip türde de kış koşulları altında vücut kitle endeksinin düştüğü kaydedilmiş (yaz sonu 0.48 ± 0.03 , kış şartları/dehidrasyon 0.44 ± 0.04 ve kışın şartları/dehidrasyon 0.44 ± 0.03 g cm⁻¹); ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Costanzo vd. 2015). Benzer şekilde, diğer bir çalışma *D. chrysoscelis*'in ne soğuk ne de sıcak koşullardaki vücut ağırlığı değişikliklerinin önemli olmadığını göstermiştir (Amaral vd. 2018). Genel olarak dokuların dehidrasyonu, kurbağaların dokularından suyu uzaklaştırarak donma, anoksi ve dehidrasyon etkilerinden korur. Sonuç olarak, sonuçlarımız cilt yüzeyinden buharlaşan sudan bir miktar kilo kaybına işaret etse de vücut ağırlığındaki bu değişikliğin kriyoprotektif etkiyi vurgulamak için yeterli olduğunu söylemek zordur.

5.2 Kriyoprotektan Olarak Glikozun Durumu

5.2.1 Kan Glikoz Seviyesi

Bu çalışmada, kan glikoz seviyeleri her iki türde de donma gruplarında önemli artışlar göstermiştir. Donma grupları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, *R. macrocnemis*'de yaklaşık 3,3 kat, *R. holtzi*'de 4,5 kat artış olduğu görüldü (Şekil 4.12). Anoksi veya dehidrasyon koşulları altında her iki türün de kan glikoz seviyelerinde önemli bir değişiklik olmamıştır (Şekil 5.1, 5.2). Literatürde yer alan bazı çalışmaların sonuçları, mevcut çalışmamızın sonuçlarına benzerdir. *Lithobates catesbeianus* ve *Rhinella schneideri*'nin kullanıldığı bir araştırmada, *R. schneideri*'nin -2 °C'de donarken öldüğünü, *L. catesbeianus*'un ise aynı koşullar altında hayatta kaldığı tespit edilmiş ve donma sırasında, *L. catesbeianus*'un kan şekeri seviyesi üç katından fazla artmıştır (Steiner vd. 2000). Bataklık kurbağası *Pelophylax ridibundus* ile yapılan çalışmada, vücudunun %58'ine kadar donarak yaşayabildiği belirlenmiş, donma sonrası kan plazmasında gliserol ve laktat konsantrasyonlarında artış olmasına rağmen, glikoz tespit

edilememiştir. Pelophylax cinsleri ile yapılan başka bir çalışmada, donma koşulları altında *P. lessonae* ve *P. esculentus*'un kan glikoz düzeylerinde sınırlı bir artış (sırasıyla 3,4 kat ve 2,9 kat) gösterdiği bildirilmiştir (Voituron vd. 2003, 2005, Valbona 2013). Bu çalışmalar, suda yaşayan kurbağaların belirli bir düzeyde donmaya dayanabildiğini göstermiştir, ancak kriyoprotektan birikme seviyelerinin, iyi bilinen donmaya toleranslı türlerdekilere kıyasla oldukça düşük olduğu bulunmuştur.

İyi bilinen donmaya toleranslı bir tür olan *R. sylvatica*'daki glikoz miktarının, donma koşulları altında birçok dokuda arttığı bildirilmiştir. Yüksek donma toleransına sahip *R. sylvatica*'nın Alaska ve Ohio populasyonları üzerinde yapılan çalışmada, her iki bölgedeki kurbağaların kan plazmasındaki glikoz seviyesi 48 saatlik donmanın ardından $\sim 220 \mu\text{mol ml}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Churchill ve Storey 1993, Costanzo vd. 2013, 2015). Bu değerler dikkate alındığında, Avrupa su kurbağaları ve bu çalışmada kullanılan türlerdeki kan glikoz seviyeleri, donmaya karşı yüksek toleranslı türlere göre oldukça düşüktür. Kuzey Amerika'nın, özellikle Alaska bölgesindeki uzun vadeli soğuk ikliminin, o bölgedeki ağaç kurbağası türlerinin sürekliliği için evrimsel süreçte nihai bir donma tolerans seviyesini tetiklediği düşünülmektedir. *R. sylvatica*, glikoza ek bir kriyoprotektan olarak üreyi de kullanır. Bu türün Alaska ve Ohio populasyonları üzerinde yapılan çalışmada, Alaska kurbağalarının hem plazmasında hem de dokularında (birçok dokuda $100 \mu\text{mol}$ 'ün üzerinde olarak) etkileyici düzeyde üre tespit edilmiştir (Costanzo vd. 2013). Bazı türler de gliserolü kriyoprotektan olarak kullanabilir. Donmaya yanıt olarak, Cope'un gri ağaç kurbağasının (*Dryophytes chrysoscelis*) kan plazmasında gliserol, glikoz ve üre düzeylerinin artış sergilediği bildirilmiştir (Amaral vd. 2018). Bu tez çalışması kapsamında, sadece glikoz seviyelerini araştırdık ve önemli değişiklikler bulduk. Bir sonraki adım, diğer kriyoprotektanların varlığını ve değişikliklerini araştırmak olacaktır.

5.2.2 Kas ve Karaciğer Dokularında Glikoz Seviyesi

Karaciğer dokusunun glikoz seviyelerindeki artışlar, tüm stres koşullarında (donma, anoksi ve dehidrasyon) her iki kurbağa türü için anlamlı olarak artış gösterdi (Şekil 4.14, Şekil 4.16). *R. macrocnemis*'de kontrole göre en yüksek artış dehidrasyon grubunda olurken (9,86 kat), bunu anoksi (7,97 kat) ve donma (6,76 kat) grupları izledi (Şekil 5.1).

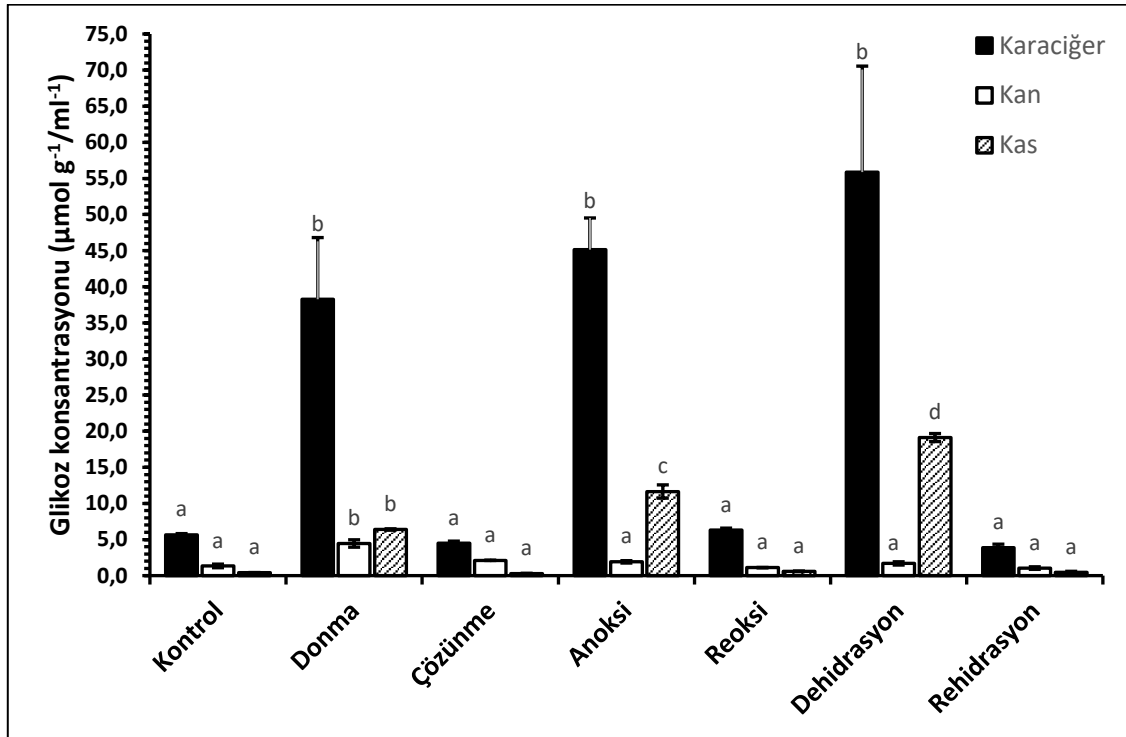
R. holtzi'de bu sıralama biraz farklıydı, kontrol grubuna kıyasla en yüksek artış donma grubunda (5,9 kat) gerçekleşmiş olup bunu sırasıyla 4,1 kat ve 3,5 kat artışla dehidrasyon ve anoksi grupları izledi (Şekil 5.2). Ayrıca donma grubundaki glikoz seviyesindeki artış, kontrol ve normalleşme gruplarından anlamlı olarak farklı olmasının yanında anoksi grubundan da anlamlı derecede yüksekti.

R. macrocnemis kas dokusunun glikoz seviyeleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her üç stres koşulunda da önemli ölçüde arttı (donmada 16,04 kat, anoksida 29,24 kat ve dehidrasyonda 48,01 kat artış gerçekleşmiştir). Dehidrasyon grubundaki artış aynı zamanda donma ve anoksi gruplarına göre daha yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Benzer şekilde ikinci en yüksek değer olan anoksi koşulundaki glikoz seviyesi ile donma grubunun glikoz seviyesi de istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi (Şekil 5.1). *R. holtzi*'nin kas dokusundaki glikoz seviyesi, yalnız dehidrasyon grubunda kontrol grubuna göre 17 kat daha artış ile önemli bir farklılık gösterdi (Şekil 5.2).

Bu sonuçlar, strese maruz kalmanın karaciğer ve kas dokusunda glikojenolizi tetiklediğini göstermektedir. Burada üretilen glikoz, kan yoluyla diğer dokulara dağıtılır ve stres koşullarının etkilerini önlemede rol oynar. Ayrıca bu sonuçlar, anoksi ve dehidrasyon koşulları altında kas dokusunda glikojenin glikoza dönüşümünün arttığını ve normalleşme koşullarında da kontrol grubu seviyesine indiğini göstermiştir. Bu durumda salınan glikozun strese karşı hücre, doku ve organların korunması görevinde kullanıldığı anlaşılmaktadır.

Farklı türlerle yapılan benzer çalışmalarda da bizim sonuçlara paralel sonuçlar tespit edilmiştir. *P. crucifer*'in dehidrasyon koşulu altında ve *D. chrysoscelis*'in donma koşullarında Karaciğer ve kas dokusu glikoz seviyelerinde önemli artışlar rapor edilmiştir (Churchill ve Storey 1993, Amaral vd. 2018). Avrupa su kurbağalarının karaciğer ve kas dokusu glikoz seviyeleri donma koşulları altında incelendiğinde, *P. ridibundus*'da önemli bir değişiklik bulunamamıştır. Diğer yandan, *P. lessonea* ve *P. esculentus* türlerinde düşük düzeyde (2–3 kat) artışlar tespit edilmiştir; ancak, donmaya toleranslı olarak tanımlanan bozkır kurbağasının (*R. arvalis*) glikoz seviyeleri donma koşullarında,

karaciğerde 14 kat, kas dokusunda 4 kat artış göstermiştir (Voituron vd. 2005, 2009). -16 °C’de donmayı tolere edebilen *R. sylvatica*’nın, donma koşullarında kas ve karaciğer glikoz seviyeleri sırasıyla 54 ve 80 kata kadar yükseldiği bildirilmiştir. *R. sylvatica* ile yapılan başka bir çalışma, kurbağaların doğal ortamlarındaki glikoz konsantrasyonundaki artışın, laboratuvar koşullarındaki artışa kıyasla kas dokusunda 13 kat ve karaciğer dokusunda 3.3 kat daha yüksek olduğunu göstermiştir (Costanzo vd. 2013, 2015, Larson vd. 2014).

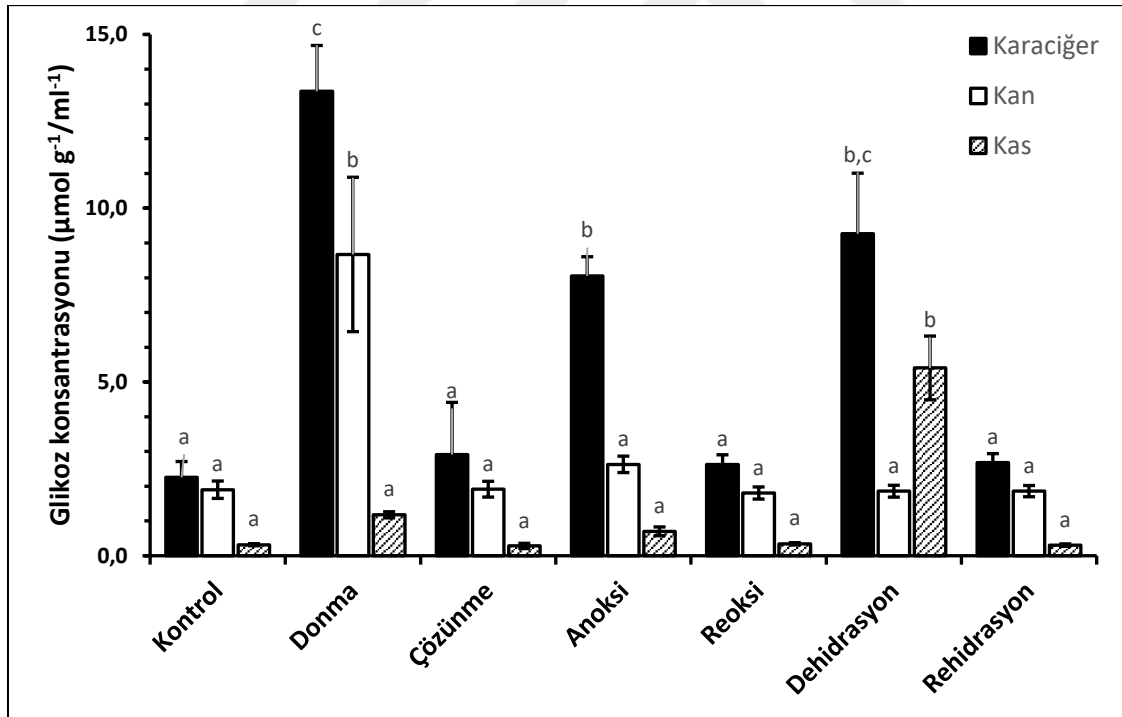


Şekil 5.1 *R. macrocnemis* kan, karaciğer ve kas dokularında glikoz konsantrasyonları grafiği. ANOVA_{Tukey-HSD} testi ile yapılan karşılaştırmada her doku içerisindeki gruplar arası farklılıklar farklı harfler ile belirtilmiştir ($P < 0,05$).

Bu tez kapsamında çalışılan türlerin diğer donma toleranslı türler gibi donma, anoksi ve dehidrasyon koşulları altında glikoz depoladığını ve normalleşme gruplarında glikoz seviyesinin normale (kontrol grubu seviyesi) döndüğünü tespit ettik (Şekil 5.1, 5.2). Bizim türlerimizdeki glikoz seviyeleri aşırı soğuk mevsimlere adapte olan türlere göre glikoz miktarları daha düşük olmasına rağmen, stres altındaki artış katsayıları oldukça yüksekti. Glikoz dışında herhangi bir kriyoprotektan birikimi olup olmadığını henüz bilinmemektedir. Gelecekteki çalışmalarda bu alanlardaki eksikliklerin giderilmesi planlanmaktadır. Özellikle, donma koşullarının stresleri altında üre ve gliserol gibi

karbonhidrat dışında da bir kriyoprotektan kullanıp kullanmadığının da tespit edilmesi gereklidir. Ek olarak, bu türlerin donmaya maruz kalmaya dayanabileceği süre ve hayatta kalmak için gereken minimum sıcaklığa ilişkin çalışmalar bu türlerin donma toleransları ve hayatta kalma stratejileri hakkında daha fazla bilgi edinmemizi sağlayacak çalışmalar olacaktır.

İncelediğimiz iki tür arasında kriyoprotektan seviyeleri açısından bir karşılaştırma yapmadığımızı da belirtmek gerekir çünkü türler farklı zamanlarda toplanmıştır. *R. macrocnemis* sonbaharda ve *R. holtzi* yaz döneminde toplandı. Bu nedenle, deneyler aynı anda gerçekleştirilemedi. Kurbağalar kış boyunca yaz ve ilkbaharda depolanan glikanları metabolize ederler. Bu nedenle, bu türler arasındaki glikoz seviyesi farklılıklarının, toplama zamanıyla ilişkili olabileceğine inanıyoruz. İleriki dönem çalışmalarında aynı dönem toplanan hayvanların kullanılması ve aynı koşullara eş zamanlı tabi tutulmasını içeren çalışmalar yapılarak türler arası karşılaştırma yapılabilir.



Şekil 5.2 *R. holtzi* kan, karaciğer ve kas dokularında glikoz konsantrasyonları grafiği. ANOVA Tukey-HSD testi ile yapılan karşılaştırmada her doku içerisindeki gruplar arası farklılıklar farklı harfler ile belirtilmiştir ($P < 0,05$).

5.3 Antifriz Proteinlerin Durumu

5.3.1 *fr47* Gen Ekspresyonu

Antifriz proteinler içerisinde en büyük kütleye sahip olan (~47 kDa) FR47 proteini aynı zamanda donma toleransında en etkili olanı olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızdaki türlerin iskelet kası ve karaciğer dokularında *fr47* geninin mRNA transkript seviyeleri donma, anoksi, dehidrasyon ve normalleşme şartları kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. *R. macrocnemis* karaciğer dokusundaki gen ekspresyon seviyesi tüm stres koşullarında artış göstermiştir. Özellikle anoksi maruziyetinde kaydedilen 2,7 kat artış istatistiksel olarak da anlamlı seviyelere ulaşmıştır ($P<0,05$). Donma ve dehidrasyon koşullarında da sırası ile yaklaşık 1,25 kat ve 1,8 kat artış gerçekleşmiştir. Çözünme, reoksi ve rehidrasyon gruplarındaki gen ekspresyon seviyesi kontrol grubu seviyesine dönüş yapmıştır. Kas dokusu gen ekspresyon seviyelerini incelediğimizde ise donma ve anoksi gruplarında anlamlı ölçüde azalış olduğunu, çözünme grubunda ise 1,7 kat gibi artış olduğunu görmekteyiz ($P<0,05$). Diğer gruplardaki değişiklikler kontrol grubu seviyesinde gerçekleşmiştir. Literatüre baktığımızda sonuçlarımızla paralellik gösteren bulgularla karşılaşmaktayız. Ağaç kurbağasında *fr47* transkript ekspresyonu donma, anoksi ve dehidrasyon koşullarında transkript seviyeleri artış göstermiştir. İmmünoablottama ile yapılan protein seviyesi çalışmaları da donma ve çözünme sırasında artış olduğunu, anoksi ve dehidrasyon koşullarında bir miktar azalış olduğu bildirilmiştir (McNally vd. 2003). Bu sonuçlar *fr47* geninin *R. macrocnemis* karaciğer dokusunda donma ve ilişkili streslerine karşı ifade seviyesini arttırarak rol oynadığını göstermektedir. Hayati organlardan uzak iskelet kası dokusunda ise stres koşullarında transkript seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu azalışların hipometabolizma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

R. holtzi karaciğer dokusundaki *fr47* mRNA ekspresyon seviyeleri incelendiğinde dehidrasyon ve rehidrasyon dışındaki koşullarda aşağı yönlü regülasyon gösterdiği görülmektedir. Özellikle anoksi ve reoksi koşullarındaki sırası ile ~2 kat ve ~4,5 kat düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunarak ($P<0,05$) dikkat çekmektedir. Reoksi koşulundaki ani düşüşün stres koşullarında oluşan ani oksijen eksikliğine karşı rol oynaması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Kas dokusu incelendiğinde de dehidrasyon ve rehidrasyon

grubundaki aşağı yönlü azalan bir ekspresyon seviyesi kaydedilmiştir. Dehidre durumda -1,5 kat ifade seviyesi gösteren *fr47* rehidrasyon koşulunda -2,4 kat ($P<0,05$) eksprese olmuştur. Bu hızlı düşüşe karşılık dehidrasyon seviyesindeki daha fazla ekspresyon hücrelerin karşılaştığı hızlı dehidrasyon stresi ile mücadelede rol oynaması ile ilişkili olması muhtemeldir. Hipometabolizmadan kaynaklı birçok gen baskılanmaktadır, ancak bazı genlerin baskılanması sınırlandırılarak gerektiği seviyede eksprese edilebilir. Literatürde de sonuçlarımızı destekler nitelikte çalışmalar yer almaktadır. Örneğin Ağaç kurbağasında *fr47* geninin RT-PCR ile yapılan ekspresyon seviyesi çalışmasında, donma stresi *fr47* transkript seviyesini incelenen 6 dokuda (kalp, akciğer, karaciğer, iskelet kası, böbrek ve testisler) artırmıştır. Benzer şekilde anoksi stresi de *fr47* transkript seviyesini artırmıştır. Dehidrasyon stresinde ise karaciğer dokusunda artış görülürken kas dokusunda değişiklik kaydedilmemiştir. Aynı çalışmada *fr47* geninin durumu larval gelişim safhalarında da incelenmiş olup embriyonik safhada (gosner 14-20) düşük olduğu, metamorfozun görüldüğü (gosner 44-45) safhalarda artış gerçekleştiği tespit edilmiştir (Sullivan vd. 2015a). Bir diğer çalışmada ise donma, anoksi ve dehidrasyon koşulları *fr47* transkript seviyesinin arttığını gösterse de protein seviyesi incelendiğinde dehidrasyon ve anoksia koşullarında kontrol grubuna göre neredeyse yarı yarıya azalış göstermiştir. Stresler esnasında post-transkripsiyonel faktörlerin etkili oldupunu düşünülerek metabolik hızın düzenlediği belirtilmiştir (Storey 2004).

5.3.2 *li16* Gen Ekspresyonu

Amfibilere özgü donma toleransından sorumlu diğer bir protein olan *Li16*'nın mRNA ekspresyonu da her iki türün iskelet kası ve karaciğer dokularında stres koşullarına cevap olarak değişiklikler göstermiştir. *R. macrocnemis* karaciğer dokusunda donma koşuluna yanıt olarak yaklaşık 3,5 kat artış kaydedilmiştir ($P<0,05$). Dehidrasyon koşulunda kontrol grubu seviyesine yakın olan *li16* gen ekspresyon seviyesi diğer stres koşullarında aşağı yönlü regülasyon göstermiştir. Kas dokusundaki *li16* ekspresyon seviyesi ise en fazla çözünme grubunda artış göstermiştir. Donma grubunda 1,65 kat ($P> 0,05$) artarken çözünme grubunda 2,37 kat ($P<0,05$) artış gerçekleşmiştir. Bu artışlar *Li16* proteinin hem donma stresi ile başa çıkmada hem de donma sonrası oluşan hızlı oksijen ve hidrasyon koşullarından kaynaklı stresler ile mücadelede rol oynayabileceğini göstermektedir. Dehidrasyon stresinde ise -5,5 kat gibi ani bir düşüş göstermiştir ($P>0,05$).

Bu sonuçlar *li16* geninin donma ve dehidrasyon koşullarında karaciğer ve kas dokularında aktif rol aldığını göstermektedir. *li16* geninin farklı koşullarda farklı ekspresyon seviyeleri gösterdiği diğer bazı çalışmalarda da belirtilmiştir. Donmadan sorumlu yeni bir gen olarak *li16*'nın keşfedildiği çalışmada 24 saatlik donma koşulunda karaciğerde 3,7 kat transkript artışı görülürken kas dokusunda transkript tespit edilmemiştir. Aynı çalışmada *li16* transkript seviyesinin anoksiye kuvvetli tepki göstererek 4 saatte 3 kat, 24 saatte 7,6 kat arttığı belirtilmiştir. Dehidrasyon koşullarında ise dehidrasyon seviyesi %40 olduğunda 6 kat artış gösterdiği ancak %20 dehidre durumda değişimin önemsiz olduğu vurgulanmıştır. *li16*'nın hem donmaya hem de anoksiye kuvvetli tepkisi ve oksijenin tekrar ortaya çıkması durumunda genin hızlı aşağı regülasyonu, Li16 proteininin donma sırasında iskemi direncinde rol oynayabileceği belirtilmiştir (McNally vd. 2002). RT-PCR tekniği ile *li16* transkriptinin donma ve ilişkili streslere karşı durumunun incelendiği bir çalışmada donma kas ve karaciğerde 1,5 kattan fazla artırmıştır. Anoksi ve dehidrasyon streslerinde hem karaciğer dokusunda hem de kas dokusunda *li16* transkripti aşağı yönlü regüle olurken beyin, böbrek ve kalp dokularında önemli artışlar kaydedilmiştir (Sullivan ve Storey 2012).

Donma ve ilişkili stresler ile normalleşme koşullarında *R. holtzi* karaciğer dokusundaki *li16* transkript ekspresyonunu incelediğimizde donma stresinde kontrol grubunun üzerinde bir ekspresyon seviyesi gösterirken diğer tüm koşullarda aşağı yönlü ekspresyon seviyesi kaydedilmiştir. Normalleşme koşulları kontrol grubuna dönüş yönünde eğilim göstermiştir. Donma koşulunda ekspresyon seviyesinin hipometabolizmaya direnç göstermesi genin *R. holtzi* karaciğer dokusunda donmaya karşı bir cevap oluşturduğunu göstermektedir. Kas dokusu transkript seviyeleri incelendiğinde donma ve dehidrasyon koşullarında yukarı yönlü anlamlı seviyede ($P<0,05$) ifade seviyeleri elde edilmiştir. Rehidrasyon koşulunda ise -1,3 kat azalış normalleşmenin ilgili genin ekspresyon seviyesinin azaltılması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Ağaç kurbağası ile yapılan bir çalışmada donma sırasında *li16* transkripti 3,7 kat, Li16 proteini ise 2,4 kat artmıştır. 2 saatlik çözünme sonrasında protein seviyesi 8,4 kat artışa kadar ulaşmıştır. Metabolik hızın normale dönmesinden kaynaklı protein sentezinin artış gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca dehidrasyon ve anoksiada da transkript ve protein seviyeleri benzer şekilde paralel

artış gösterirken normalleşme süreçlerinde protein ifade seviyelerinde azalış kaydedilmiştir (Storey 2004). Protein ifade seviyelerindeki değişimlerin sebepleri daha detaylı araştırmalara ihtiyaç duymaktadır.

5.3.3 *fr10* Gen Ekspresyonu

Amfibilere özgü AFP'lerden sonuncusu olan FR10 proteininin sentezinden sorumlu *fr10* mRNA bazlı gen ekspresyon seviyesi sonuçlarını incelediğimizde *R. macrocnemis* karaciğer dokusunda anoksi, reoksi ve rehidrasyon koşullarında istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde ($P < 0,05$) azalış olduğu kaydedilmiştir. Diğer koşullardaki azalışın bu koşullara göre daha az olması *fr10* geninin karaciğerde hipoksi ve dehidrasyon dirençlerinde rol aldığını göstermektedir. Kas dokusundaki ekspresyon seviyesi ise dehidrasyona ilk olarak ve en yüksek seviyede maruz kalan kas dokusunda önemli seviyede azalış göstermiştir (~5,2 kat; $P < 0,05$). Diğer koşullarda genellikle aşağı yönlü regülasyon tespit edilmiştir ancak bu azalışlar istatistiksel olarak anlamsızdı.

Literatürdeki benzer çalışmaları da incelediğimizde de *fr10* geninin doku ve strese bağlı ekspresyon farklılıkları görülmektedir. FR10 proteinine ait gen ekspresyon çalışmalarının yapıldığı ilk çalışmada zamana bağlı *fr10* gen ekspresyon çalışması yapılmıştır. *R. sylvatica* karaciğer dokusunda transkript seviyesinin 1 saat donma sonrasında 2 kat arttığını, 24 saat donma sonrası 3,5 kat arttığını ve 24 saat çözünme sonrası tekrar kontrol seviyelerine düştüğünü göstermiştir. Karaciğerdeki gen ekspresyonu, 5 ° C'de dehidrasyonda artış göstermiş ancak anoksi maruziyetinde azalış göstermiştir. Bu durumun genin doğal donma sırasında in vivo hücre hacmi düzenleyici sinyallerine cevap verebildiğini gösterdiği belirtilmiştir. FR10 proteinin tanımlandığı bu çalışmada donma stresinin karaciğer ve bağırsakta yukarı yönlü yüksek oranda regülasyona, kalp akciğer, beyin ve mesanede orta seviyede indüklemeye sebep olduğu, kas dokusunda değişiklik olmadığı ve böbrek dokusunda azalış gösterdiği belirtilmiştir. Anoksia maruziyetine tepki olarak karaciğerde transkript seviyesi azalış gösterirken, dehidrasyona cevap olarak artış göstermiştir (Cai ve Storey 1997). Bazı sonuçları çalışmamızla benzerlik gösteren bir diğer çalışmada *fr10* transkript seviyesi donma koşullarında karaciğerde 2 kattan fazla, kas dokusunda 2,5 kattan fazla artış göstermiştir. Bunun yanında anoksia koşullarında karaciğerde kontrole göre azalış gösterip kas dokusunda değişiklik oluşmamıştır.

Dehidrasyon koşullarında ise hem karaciğer hem kas dokusunda aşağı yönlü regülasyon gerçekleştiği kaydedilmiştir (Sullivan vd. 2015b).

R. holtzi'nin karaciğer dokusundaki *fr10* gen ekspresyon seviyelerinde donma, anoksi ve dehidrasyon streslerine karşı yukarı yönlü bir regülasyon görülmüştür. Buna karşın çözünme grubunda kontrol seviyesine dönüş görülürken, rehidrasyon ve reoksi grubunda ekspresyon seviyesinin negatif kat değişimi gösterdiği kaydedilmiştir. Özellikle reoksi grubundaki yaklaşık -5 kat artışından dolayı, genin hipoksi ve iskemi stresleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. *R. holtzi*'nin kas dokusu *li16* transkript ifade seviyesi rehidrasyona karşı anlamlı seviyede (~3,5 kat; $P<0,05$) azalarak yanıt vermiştir. Dehidrasyon seviyesindeki azalış ise bu seviyenin neredeyse %30'u kadar olmuştur. İskelet kası (arka bacak) dokusu vücudun dış ortama en yakın bölümlerinden biri olması dehidrasyon sırasındaki susuzluk ile ilk karşılaşan dokulardandır. Bu sebeple AFP'lerin transkript seviyelerinin dehidrasyon ve anoksi streslerinde kas dokularında anlamlı değişiklikler göstermesi bu streslere karşı aktif rol oynamaları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ağaç kurbağası ile yapılan bazı çalışmalarda da benzer sonuçlar ve yorumlar kaydedilmiştir. Örneğin *fr10* transkriptinin donma ve dehidrasyonda artış gösterirken anoksia da azalış gösterdiği belirtilmiştir (Storey 2004). Ağaç kurbağasının 24 saatlik donma koşullarına maruziyetinde AAT (ADP / ATP translokaz) transkript seviyesinin 8 saatte 4,5 kat artmasına rağmen daha uzun donma işleminde keskin bir şekilde azaldı ve 24 saatlik çözülmeden sonra kontrol değerlerinin altına düştüğü belirtilmiştir (Storey ve Storey 2001).

Fr10 ve Li16 proteinlerinin amfibiler dışında in vitro olarak ipek böceği hücre hattına (BmN) transfekte edildiği bir çalışmada, 1 saat -6 °C de donma koşullarında AFP ilave edilen hücrelerde sağ kalım oranı artmıştır. Çalışma sonuçlarına göre kurbağa AFP'lerinin aşırı ekspresyonu yolu ile donma toleranssız hücrelere donma koruması sağlanabileceği gösterilirken, tıbbi organ kriyoprezervasyonunda toleranssız hücrelerin de adapte edilebilmesine imkan sağlanacağı belirtilmiştir.

Türler arasında gen ifadelerinin stres koşulları ile ilişkilerinde paralel artış veya azalışlar tespit edilmemesi bu türlerin gen / protein düzenleme sistemleri açısından farklılıklar

içerdiğini göstermektedir. Yapmış olduğumuz çalışma yalnızca mRNA düzeyinde bir ifade seviyesini yorumladığı için bundan sonraki çalışmalarda protein seviyesi ifade çalışmaları da gerçekleştirilerek epigenetik faktörlerin bu genlerin ifade seviyeleri üzerindeki etkileri ve tam olarak hangi proteinlerin bu maruziyet koşullarında işlevsel olduğu tespit edilebilir. Bu kapsamda *R. sylvatica*'nın yaz ve kış dönemi hepatik proteinlerindeki değişim kütle spektroskopisi ve peptit haritalama teknikleri ile araştırıldığında 33 eşsiz proteinin mevsimsel olarak güçlü değişiklikler gösterdiği tespit edilmiştir (Kiss vd. 2011).

AFP'lerin araştırılması günümüzde oldukça önemli hale gelmiştir. Antifriz proteinlerin ekspresyon seviyeleri, etki mekanizmaları, yapıları gibi birçok mekanik araştırılması yapılırken bir yandan da filogenetik ilişkilerde de bir belirteç haline gelmektedir. Bu kapsamda amfibilerdeki donma toleransının evrimi araştırıldığında kullanılan moleküler saate göre donma toleranslı türler ve toleranssız türler arasındaki son ayrılma sapmasının $15,9 \pm 7,6$ milyon yıl önce (*Rana arvalis* ve *R. temporaria* arasında) gerçekleştiği bulunmuştur. Aynı çalışma kapsamındaki filogenetik analizler, donma toleransının *Ranidae* arasında en az iki kez, *Hylidae* arasında bir veya iki kez ve *Bufo*'da hiç evrim geçirmediğini göstermiştir (Voituron vd. 2009a).

5.4 Sonuç

Birçok ektoterm canlı, sıra dışı iklim koşullarında hayatta kalmak için çeşitli stratejiler geliştirmiştir. Kışın, bazı hayvanlar sıfırın altındaki bölgelerden göç ederken, bazıları kış uykusuna yatarak bu dönemi atlatırlar. Karasal kış uykusuna yatanlar, hipometabolizma ve kriyoprotektan birikimi yoluyla donma, anoksi ve dehidrasyon koşullarında hayatta kalabilirler. Önceki çalışmalar, düşük moleküler ağırlıklı glikanların, antioksidanların ve ürenin kurbağalarda kriyoprotektan olarak kullanıldığını göstermiştir. Bu çalışmada kullanılan Anadolu dağ kurbağası türlerinin donma sonrasında hayatta kalması, donma ve ilişkili stres koşullarında dokularında glikoz biriktirmesi ve bazı AFP'lerin artışı bu türlerin donma toleransına sahip olduklarını göstermektedir. Bu nedenle, aşırı soğuk koşullarda nasıl hayatta kalabildiklerini daha iyi anlamak için bu türler üzerinde daha fazla çalışma yapılmalıdır. Türkiye'nin endemik dağ kurbağalarından *R. tavasensis*'in de kriyobiyojisinin araştırılması ülkemizdeki dağ kurbağalarının yüksek rakımlarda soğuk

koşulları ile başa çıkma stratejilerinin anlaşılması konusudaki temel çalışmaların tamamlanması için gereklidir. Ancak türün populasyon durumunun azalış göstermesi bu tür ile ilgili özel koruma tedbirlerinin alınması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar Türkiyedeki amfibilerin kriyobiyojisi üzerine ilk adımların atılmasını temsil etmektedir. Anadolu'nun zorlu koşullarında soğukkanlı canlıların nasıl hayatta kaldıklarının aydınlatılması biyoçeşitliliğin korunması için de doğru adımların atılmasına katkı sağlayacaktır. Türlerin çevresel koşullara bağlı yaşam limitlerinin belirlenmesi doğru koruma planlarının yapılması, bölgesel çeşitliliğin artırılması, üreme verimliliği, patojenlerle ve istilacı türler ile mücadele gibi birçok konuda önemli adımlar atılmasını sağlayabilir.

Bunun yanında kriyoprotektan olarak görev yapan antifriz proteinlerin biyoteknoloji, tarım, gıda, genetik mühendisliği, kriyoprezervasyon, kriyocerrahi gibi birçok alanda kullanımı yaygınlaşmaktadır. Örneğin balık rekombinant AFP'leri gıdaların donmaya karşı korunmasında kullanılmaktadır. Bakteriyel kökenli INP'ler de gıda endüstrisinde yoğun çalışılan proteinlerdir. Buz çekirdeklenmesini tetikleyen INP'ler kullanılarak gıdaların dondurulması daha kısa sürelerde ve daha küçük boyutlu buz kristalleri ile gerçekleştirilerek donmuş gıdaların kalitesi arttırılabilmektedir (Bryon vd. 2013, Ye vd. 2020). AFP'lerin gıda alanındaki en fazla dikkat e eken etkileri dondurma ürünlerinde, donmuş balık ve et ürünlerinde ve donmuş hamur ürünlerinde incelenmektedir. Hazır gıda endüstrisine benzer şekilde bitkilerin donmaya karşı daha dayanıklı hale gelmesi, meyvelerin donma-çözünme süreçlerinden daha az etkilenmesi, genetiğı değıştirilmiş bitkiler ile daha kaliteli ve verimli ürünler elde edilmesi gibi tarımsal faaliyetlerde de AFP'lerin rolü ön ümüzdeki yıllarda artış gösterecektir (Eskandari vd. 2020).

Gıda endüstrisinin yanında AFP'lerin kullanım alanı polimer ve elemental sanayi ürünlerini de kapsamaktadır. AFP içeren donma toleranslı jellerin eldesi ile seramik üretiminde gözenekli malzemeler elde etmede kullanılabileceğı belirtilmiştir (Fukushima vd. 2013). Al üminyum gibi birçok alanda kullanılan metallerin donması elektrik hatlarında patlamalar, uçak kanatlarının ömrünün kısalması, dondurucu ve buzdolaplarında hava sirkülasyonunun sekteye uğraması gibi güvenlik ve ekomonik

sorunlar oluşturmaktadır. AFP'ler, polioller veya şeker molekülleri ile birlikte bu yüzeylere kaplama yapıldığında bu sorunların büyük ölçüde ortadan kalktığı rapor edilmiştir (Eskandari vd. 2020). Bu kaplama tekniğinin diğer kimyasal tekniklere göre en büyük avantajı çevre ve sağlık dostu olmasıdır.

AFP'lerin medikal alanlarda kullanımı da oldukça etkili sonuçlar ortaya çıkarmıştır. AFP'lerin bakteriler, funguslar, virüsler ve protozoalara karşı anti-infektif etki gösterdiği bilinmektedir. Örneğin *Ixodes scapularis* böceğinin antifriz glikoproteinleri (IAFGP) bakterilere bağlanarak onlara karşı anti-infektif etki göstermiştir. Bu proteinlerin bakterin biyofilm oluşturabileceği birçok alanda (deri, yüzeyler, katater enfeksiyonları vb.) tedavi edici olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (Abraham vd. 2017). Günümüzde kriyotıp alanı da büyük önem arz etmektedir. Kriyotıp uygulamalarında kriyocerrahi ve kriyoprezervasyon da kullanılarak gen tedavisi, doku mühendisliği ve ilaçların doku koruma taraması gibi farklı alanlarda başarılı sonuçlar alınmaktadır (Celik vd. 2013). Hücre ve dokuların güvenle dondurulması uzun yıllar saklanabilmesi de AFP'lerin kullanılması ile daha güvenli ve kullanışlı bir alan olmuştur (Eskandari). Kriyoprotektif ajanların kullanılması ile kristallenme ve rekristalizasyon kontrol edilebildiğinde organ transplantasyonundaki başarı oranı da artmaktadır. AFP'lerin kullanılması, doku ve hücre kaybı yaşanmadan organların düşük sıcaklıklarda uzun süre saklanabilmesini mümkün kılar. Ancak, doğal olarak elde edilen AFP'lerin saflıklarının düşük olması ve maliyetin yüksek olması henüz aktif olarak kullanılmalarına olanak vermemektedir (Bagis vd. 2008).

Uluslararası bazı araştırma enstitüleri ve özel şirketler insanların dondurulması üzerine de yoğun çalışmalar gerçekleştirmektedirler. Bazı hastaların klinik olarak ölümünden hemen sonra uygun prosedürler ile yüksek kriyoprotektanlar verilerek -196 °C'de dondurulduğu bilinmektedir. Ancak teorik olarak vitrifikasyon (suyun tamamen uzaklaştırılması) sonrası sinir hücreleri de dahil beyne büyük hasar vereceği için gelecekte tekrar hayata dönmelerinin mümkün olmadığı savunulmaktadır. Bunun yanında yoğun çalışmalar dokuların korunmasında umut verici olsa da yasal sorunlar ve etik bakış açıları sebebi ile insanlar üzerinde kriyotip uygulamalar sektöre uğramaktadır.

Sonuç olarak birçok alanda kullanılmakta ve gelecekte kullanılma potansiyeli olan kryoprotektif proteinlerin önemi gün geçtikçe artmaktadır. İnsan hayatını kolaylaştırma, tedavi etme, gıda sorunlarının üzülmesi, ekstrem koşullarda hayatta kalma gibi birçok sorunun zm odağı antifriz proteinler olacaktır. Bu kapsamda türlerin hangi kriyoprotektanları biriktirdiğı ve hangi proteinleri kullandığının belirlenmesi, hangi sıcaklık limitlerinde ne kadar süre hayatta kalabilecekleri gibi daha detaylı araştırmalar yapılmalıdır.



6. KAYNAKLAR

- Abraham N M, Liu L, Jutras B L, Murfin K, Acar A, Yarovinsky T O, vd., 2017, A Tick Antivirulence Protein Potentiates Antibiotics against *Staphylococcus aureus*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 61, 1–14.
- Afsar B, Afsar M, Kalyoncu F, 2011, Antimicrobial Activity In The Skin Secretion of Brown Frog, *Rana macrocnemis* (Boulenger, 1885) Collected From Turkey, Scientific Research and Essays, 6, 1001–1004.
- Afsar M, Afsar B, Arıkan H, 2014, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885, From The Emir Mountains in Western inner Anatolia (Turkey), Herpetozoa, 26, 115–123.
- Afsar M, Afsar B, Arıkan H, 2015, Classification of the Mountain Frogs of the Berçelan Plateau (Hakkari), East Anatolia (Turkey), Herpetozoa, 28, 15–27.
- Akyıl D, Özkara A, Erişmiş U C, 2019, Assessment of Antimicrobial Activity on The Skin Secretions of Nine Anuran Species from Turkey, Journal of Science and Technology of Dumlupınar University, 43, 43–52.
- Al-attar R, 2020, Frozen but alive : Molecular Responses to Autophagy, Angiogenesis and Energy Metabolism in the Stress-Tolerant Wood Frog , *Rana sylvatica*, Carleton University, Ph.D. Thesis, 271p, Ottawa.
- Alexander I. Zhmakin, 2009, Fundamentals of Cryobiology, Springer Berlin Heidelberg, 286p, Berlin, Heidelberg.
- Ali F, Wharton D A, 2014, Intracellular Freezing in the Infective Juveniles of *Steinernema feltiae*: An Entomopathogenic Nematode, PLoS ONE, 9, e94179.
- Amaral M C F do, 2014, Geographical Variation of Freeze Tolerance in the Wood Frog, *Rana sylvatica*: The Role of Hepatic Glycogen Metabolism, Miami University, Ph.D. Thesis, 85p, Miami.
- Amaral M C F do, Frisbie J, Goldstein D L, Krane C M, 2018, The Cryoprotectant System of Cope's Gray Treefrog, *Dryophytes chrysoscelis*: Responses to Cold Acclimation, Freezing, And Thawing, Journal of Comparative Physiology B, 188, 611–621.
- Amaral M C F do, Frisbie J, Crum R J, Goldstein D L, Krane C M, 2020, Hepatic

- Transcriptome of the Freeze-Tolerant Cope's Gray Treefrog, *Dryophytes chrysoscelis* : Responses to Cold Acclimation and Freezing, BMC Genomics, 21, 1–18.
- Andersson S, Johansson L, 2001, Cold hardiness in the boreal adder, *Vipera berus*, Cryo-Letters, 22, 1–8.
- Arıkan H, Çevik İ E, Kaya U, Mermer A, 2001, Anadolu Dağ Kurbağalarında Eritrosit Ölçümleri, Anadolu University Journal of Science and Technology, 2, 387–391.
- Arserim S K, Mermer A, 2008, Hematology of the Uludağ Frog , *Rana macrocnemis Boulenger* , 1885 in Uludağ National Park (Bursa, Turkey), E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 25, 39–46.
- Bagis H, Akkoç T, Taş A, Aktoprakligil D, 2008, Cryogenic effect of antifreeze protein on transgenic mouse ovaries and the production of live offspring by orthotopic transplantation of cryopreserved mouse ovaries, Molecular Reproduction and Development, 75, 608–613.
- Baker P J, Costanzo J P, Iverson J B, Lee R E, 2003, Adaptations to terrestrial overwintering of hatchling northern map turtles, *Graptemys geographica*, Journal of Comparative Physiology B, 173, 643–651.
- Bansal S, Luu B E, Storey K B, 2016, MicroRNA regulation in heart and skeletal muscle over the freeze–thaw cycle in the freeze tolerant wood frog, Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 186, 229–241.
- Baran I, Atatür M K, 1986, A Taxonomical Survey of the Mountains Frogs of Anatolia, Amphibia Reptilia, 7, 115–133.
- Baran I, Ilgaz Ç, Kumlutaş Y, Olgun K, Avcı A, İret F, 2007, On New Populations of *Rana holtzi* and *Rana macrocnemis* (Ranidae: Anura), Turkish Journal of Zoology, 31, 241–247.
- Başkale E, Çevik İ E, Kaya U, Kumlutaş Y, Olgun K, 2011, New Data on The Distribution of The Taurus Frog *Rana holtzi* Werner, 1898, in The Bolkar Mountains of Turkey (Anura: Ranidae), Herpetozoa, 24, 113–120.

- Baçoğlu M, Özeti N, 1973, Türkiye amfibileri = The amphibians of Turkey, Ege Üniversitesi Basımevi, 155s, İzmir.
- Baust J G, Gao D, Baust J M, 2009, Cryopreservation: An emerging paradigm change, *Organogenesis*, 5, 90–96.
- Bazin Y, Wharton D A, Bishop P J, 2007, Cold tolerance and overwintering of an introduced New Zealand frog, the brown tree frog (*Litoria ewingii*), *Cryo-Letters*, 28, 347–358.
- Bektaş G I, Altıntaş A, 2007, Antifriz Proteinler, *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 18, 27–32.
- Berman D I, Lerikh A N, Mikhailova E I, 1984, Winter Hibernation of the Siberian Salamander, *Hynobius keyserlingi*, *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 323–327.
- Berman D I, Leirikh A N, Meshcheryakova E N, 2010, The Schrenck Newt (*Salamandrella schrenckii*, Amphibia, Caudata, Hynobiidae) is The Second Amphibian That Withstands Extremely Low Temperatures, *Doklady Biological Sciences*, 431, 131–134.
- Berman D I, Meshcheryakova E N, 2012, Is the western boundary of the Siberian salamander (*Salamandrella keyserlingii*, Amphibia, Caudata, Hynobiidae) range determined by the specific features of its wintering?, *Doklady Biological Sciences*, 443, 97–100.
- Berman D I, Bulakhova N A, Meshcheryakova E N, 2017, Adaptive strategies of brown frogs (amphibia, anura, Rana) in relation to winter temperatures in the northern Palaearctic, *Zoologicheskii Zhurnal*, 96, 1392–1403.
- Berman D, Bulakhova N, Meshcheryakova E, Yermokhin M, Tabachishin V, 2019, Cold-Hardiness of the Common Spadefoot *Pelobates fuscus* (pelobatidae, Anura, Amphibia), *Cryoletters*, 40, 284–290.
- Berman D I, Bulakhova N A, Meshcheryakova E N, Shekhovtsov S V, 2020, Overwintering and cold tolerance in the Moor Frog (*Rana arvalis*) across its range, *Canadian Journal of Zoology*, 98, 705–714.

- Biggar K K, Dubuc A, Storey K, 2009, MicroRNA Regulation Below Zero: Differential Expression of miRNA-21 and miRNA-16 During Freezing in Wood Frogs, *Cryobiology*, 59, 317–321.
- Biggar K K, Storey K B, 2012, Evidence for cell cycle suppression and microRNA regulation of cyclin D1 during anoxia exposure in turtles, *Cell Cycle*, 11, 1705–1713.
- Biggar K K, Kotani E, Furusawa T, Storey K B, 2013, Expression of freeze-responsive proteins, Fr10 and Li16, from freeze-tolerant frogs enhances freezing survival of BmN insect cells, *FASEB Journal*, 27, 3376–3383.
- Biggar K K, Biggar Y, Storey K B, 2015, Identification of a Novel Dehydration Responsive gene, *drp10*, From the African clawed frog, *Xenopus laevis*, *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 323, 375–381.
- Bollen M, Keppens S, Stalmans W, 1998, Specific Features of Glycogen Metabolism In The Liver, *Biochemical Journal J.*, 336, 19–31.
- Bouffard M C, 2007, Involvement of Foxo Transcriptional Factors and Glycogen Synthase Kinase 3 in the Freeze Tolerance Capability of the Wood Frog, *Rana sylvatica*, 88,
- Boulenger G A, 1885, Description of a New Species of Frog From Asia Minor., *Proceedings of the Zoological Society of London*, 53, 22–23.
- Boulenger G A, 1886, Note Zur Les Grenouilles Rousses d' Asie, *Bull. Soc. Zool.*, 11, 595–600.
- Bryon A, Wybouw N, Dermauw W, Tirry L, Van Leeuwen T, 2013, Genome wide gene-expression analysis of facultative reproductive diapause in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*, *BMC Genomics*, 14, .
- Bulakhova N A, Mazanaeva L F, Meshcheryakova E N, Berman D I, 2020, Resistance of the Iranian long-legged wood frog (*Rana macrocnemis* Boulenger, 1885) (Amphibia, Anura) to negative temperatures on land and to hypoxia in water during overwintering, *Herpetology Notes*, 13, 1079–1086.

- Burke R L, Hussain A A, Storey J M, Storey K B, 2002, Freeze Tolerance and Supercooling Ability in the Italian Wall Lizard, *Podarcis sicula*, Introduced to Long Island, New York, *Copeia*, 2002, 836–842.
- Cai Q, Storey K B, 1997, Upregulation of a Novel Gene by Freezing Exposure in The Freeze-Tolerant Wood Frog (*Rana sylvatica*), *Gene*, 198, 305–312.
- Celik Y, Drori R, Pertaya-Braun N, Altan A, Barton T, Bar-Dolev M, vd., 2013, Microfluidic experiments reveal that antifreeze proteins bound to ice crystals suffice to prevent their growth, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 1309–1314.
- Churchill T A, Storey K B, 1993, Dehydration Tolerance In Wood Frogs: A New Perspective on Development of Amphibian Freeze Tolerance, *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 265, R1324–R1332.
- Churchill T A, Storey K B, 1994, Effects of Dehydration on Organ Metabolism In The Frog *Pseudacris crucifer*: Hyperglycemic Responses to Dehydration Mimic Freezing-Induced Cryoprotectant Production, *Journal of Comparative Physiology B*, 164, 492–498.
- Churchill T A, Storey K B, 1995, Metabolic Effects of Dehydration on An Aquatic Frog, *Rana pipiens*., *The Journal of experimental biology*, 198, 147–54.
- Claussen D L, Townsley M D, Bausch R G, 1990, Supercooling and freeze-tolerance in the European wall lizard, *Podarcis muralis*, with a revisional history of the discovery of freeze-tolerance in vertebrates, *Journal of Comparative Physiology B*, 160, 137–143.
- Costanzo J P, Claussen D L, Lee R E, 1988, Natural Freeze Tolerance in a Reptile, *Cryobiology*, 25, 519.
- Costanzo J P, Lee R E, 1993, Cryoprotectant Production Capacity of The Freeze-Tolerant Wood Frog , *Rana sylvatica*, *Canadian Journal of Zoology*, 71, 71–75.
- Costanzo J P, Lee R E, Lortz P H, 1993a, Glucose Concentration Regulates Freeze Tolerance In The Wood Frog *Rana sylvatica*, *The Journal of experimental biology*, 181, 245–55.

- Costanzo J P, Lee R E, Lortz P H, 1993b, Physiological responses of freeze-tolerant and -intolerant frogs: Clues to evolution of anuran freeze tolerance, *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 265, R721-R725.
- Costanzo J P, Grenot C, Lee R E, 1995a, Supercooling, ice inoculation and freeze tolerance in the European common lizard, *Lacerta vivipara*, *Journal of Comparative Physiology B*, 165, 238–244.
- Costanzo J P, Lee R E, DeVries A L, Wang T, Layne J R, 1995b, Survival mechanisms of vertebrate ectotherms at subfreezing temperatures: applications in cryomedicine, *The FASEB Journal*, 9, 351–352.
- Costanzo J P, Litzgus J D, Iverson J B, Lee J, 2000, Seasonal changes in physiology and development of cold hardiness in the hatchling painted turtle *Chrysemys picta*, *Journal of Experimental Biology*, 203, 3459–3470.
- Costanzo J P, 2005, Cryoprotection By Urea In A Terrestrially Hibernating Frog, *Journal of Experimental Biology*, 208, 4079–4089.
- Costanzo J P, Lee R E, 2008, Urea Loading Enhances Freezing Survival and Postfreeze Recovery In A Terrestrially Hibernating Frog, *Journal of Experimental Biology*, 211, 2969–2975.
- Costanzo J P, Lee R E, Ultsch G R, 2008, Physiological ecology of overwintering in hatchling turtles, *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309A, 297–379.
- Costanzo J P, do Amaral M C F, Rosendale A J, Lee R E, 2013, Hibernation Physiology, Freezing Adaptation and Extreme Freeze Tolerance In A Northern Population of The Wood Frog, *Journal of Experimental Biology*, 216, 3461–3473.
- Costanzo J P, Lee R E, 2013, Avoidance and Tolerance of Freezing In Ectothermic Vertebrates, *Journal of Experimental Biology*, 216, 1961–1967.
- Costanzo J P, Do Amaral M C F, Rosendale A J, Lee R E, 2014, Seasonality of freeze tolerance in a subarctic population of the wood frog, *Rana sylvatica*, *International Journal of Zoology*, 2014, .

- Costanzo J P, Reynolds A M, do Amaral M C F, Rosendale A J, Lee R E, 2015, Cryoprotectants and Extreme Freeze Tolerance In A Subarctic Population of The Wood Frog, PLOS ONE, 10, e0117234.
- Costanzo J P, 2019, Overwintering adaptations and extreme freeze tolerance in a subarctic population of the wood frog, *Rana sylvatica*, Journal of Comparative Physiology B, 189, 1–15.
- Crerar M M, David E S, Storey K B, 1988, Electrophoretic Analysis of Liver Glycogen Phosphorylase Activation In The Freeze-Tolerant Wood Frog, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 971, 72–84.
- Crevel R W R, Fedyk J K, Spurgeon M J, 2002, Antifreeze Proteins: Characteristics, Occurrence and Human Exposure, Food and Chemical Toxicology, 40, 899–903.
- Croes S A, Thomas R E, 2000, Freeze tolerance and cryoprotectant synthesis of the Pacific Tree Frog *Hyla regilla*, Copeia, 863–868.
- Cubillos C, Cáceres J C, Villablanca C, Villarreal P, Baeza M, Cabrera R, vd., 2018, Cold tolerance mechanisms of two arthropods from the Andean Range of Central Chile: *Agathemera crassa* (Insecta: Agathemeridae) and *Euathlus condorito* (Arachnida: Theraphosidae), Journal of Thermal Biology, 74, 133–139.
- Cutler A J, Saleem M, Kendall E, Gusta L V., Georges F, Fletcher G L, 1989, Winter Flounder Antifreeze Protein Improves the Cold Hardiness of Plant Tissues, Journal of Plant Physiology, 135, 351–354.
- Çapar D, 2015, Endemik *Rana tavasensis* Baran ve Atatür, 1986 (Tavas Kurbağası) Türünün Populasyon Ekolojisi ve Korunma Stratejilerinin Geliştirilmesi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 58s, Denizli.
- Çapar D, Başkale E, 2016, Population size of endemic *Rana tavasensis* in its terra typica, Turkey, Turkish Journal of Zoology, 40, 729–733.
- Çevik İ E, Arikan H, Kaya U U, Atatür M K, 2006, Comparative Morphological and Serological Studies of Three Anatolian Mountain Frogs, *Rana macrocnemis*, *R. camerani* and *R. holtzi* (Anura, Ranidae), Amphibia Reptilia, 27, 63–71.

- Çiçek K, 2011, Food Composition of Uludağ Frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 In Uludağ (Bursa, Turkey), *Acta Herpetologica*, 6, 87–99.
- Çiçek K, Mermer A, Tok C V, 2011, Population Dynamics of *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 at Uludağ, Western Turkey, *Zoology in the Middle East*, 53, 41–60.
- Daan S, Barnes B M, Strijkstra A M, 1991, Warming up for sleep? — Ground squirrels sleep during arousals from hibernation, *Neuroscience Letters*, 128, 265–268.
- Davies P L, 2014, Ice-Binding Proteins: A Remarkable Diversity of Structures For Stopping and Starting Ice Growth, *Trends in Biochemical Sciences*, 39, 548–555.
- Degree T, Mutyam V, 2013, Aquaglyceroporin Expression and Regulation in Erythrocytes From Freeze Tolerant Cope's Gray Treefrog , *Hyla Chrysoscelis*, .
- Denlinger D L, Lee R E, 2010, *Low Temperature Biology of Insects*, Cambridge University Press, 1-390, Cambridge.
- Devries A L, 1971, Glycoproteins As Biological Antifreeze Agents In Antarctic Fishes, *Science*, 172, 1152–1155.
- Dieni C A, Storey K B, 2009, Creatine Kinase Regulation by Reversible Phosphorylation In Frog Muscle, *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 152, 405–412.
- Dieni C A, Bouffard M C, Storey K B, 2012, Glycogen Synthase Kinase-3: Cryoprotection and Glycogen Metabolism In The Freeze-Tolerant Wood Frog, *Journal of Experimental Biology*, 215, 543–551.
- Dieni C A, Storey K B, 2014, Protein Kinase C In The Wood Frog, *Rana sylvatica*: Reassessing The Tissue-Specific Regulation of PKC Isozymes During Freezing, *PeerJ*, 2, e558.
- Du J, 2005, *Anti-Apoptotic and Antioxidant Defenses In The Freeze Tolerant Wood Frog, Rana sylvatica*, Carleton University, M. Sc. Thesis, 108p, Ottawa.
- Duman J G, 1982, Insect Antifreezes And Ice-Nucleating Agents, *Cryobiology*, 19, 613–627.
- Duman J G, Wu D W, Xu L, Tursman D, Olsen T M, 1991a, Adaptations of Insects to

- Subzero Temperatures, *The Quarterly Review of Biology*, 66, 387–410.
- Duman J G, Xu L, Neven L G, Tursman D, Wu D W, 1991b, Hemolymph Proteins Involved in Insect Subzero-Temperature Tolerance: Ice Nucleators and Antifreeze Proteins, Lee R E ve Denlinger D L (Ed.), *Insects At Low Temperature* (94–127), Springer US, 513p, Boston.
- Duman J G, 2001, Antifreeze and Ice Nucleator Proteins in Terrestrial Arthropods, *Annual Review of Physiology*, 63, 327–357.
- Duman J G, 2015, Animal Ice-Binding (Antifreeze) Proteins And Glycolipids: An Overview With Emphasis on Physiological Function, *Journal of Experimental Biology*, 218, 1846–1855.
- Duman J G, Newton S S, 2020, Insect Antifreeze Proteins, Ramløv H ve Friis D S (Ed.), *Antifreeze Proteins Volume 1* (131–187), Springer International Publishing, Cham.
- Eastman J T, Devries A L, 1986, Renal Glomerular Evolution In Antarctic Notothenioid Fishes, *Journal of Fish Biology*, 29, 649–662.
- Edwards J R, Jenkins J L, Swanson D L, 2004, Seasonal effects of dehydration on glucose mobilization in freeze-tolerant chorus frogs (*Pseudacris triseriata*) and freeze-intolerant toads (*Bufo woodhousii* and *B. cognatus*), *Journal of Experimental Zoology*, 301A, 521–531.
- Elnitsky M A, Benoit J B, Denlinger D L, Lee R E, 2008, Desiccation tolerance and drought acclimation in the Antarctic collembolan *Cryptopygus antarcticus*, *Journal of Insect Physiology*, 54, 1432–1439.
- Ergül Kalaycı T, Kalaycı G, Özdemir N, 2017, Phylogeny and Systematics of Anatolian Mountain Frogs, *Biochemical Systematics and Ecology*, 73, 26–34.
- Erismis U, Konuk M, Yoldas T, Agyar P, Yumuk D, Korcan S, 2014, Survey of Turkey's Endemic Amphibians for Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 111, 153–157.
- Erişmiş U C, 2017, Herpetofauna of the Province of Kütahya, Turkey, *Journal of Applied Biological Sciences*, 11, 33–38.

- Erişmiş U C, 2019, Potential Distribution of the Amphibian Pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Eastern Black Sea Region of Turkey, *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 5, 27–33.
- Eskandari A, Leow T C, Rahman M B A, Oslan S N, 2020, Antifreeze Proteins and Their Practical Utilization in Industry, Medicine, and Agriculture, *Biomolecules*, 10, 1649.
- Fletcher G L, Hew C L, Davies P L, 2001, Antifreeze Proteins of Teleost Fishes, *Annual Review of Physiology*, 63, 359–390.
- Fletcher G L, Kao M H, Fournay R M, 1986, Antifreeze peptides confer freezing resistance to fish, *Canadian Journal of Zoology*, 64, 1897–1901.
- Frerichs K U, Smith C B, Brenner M, DeGracia D J, Krause G S, Marrone L, vd., 1998, Suppression of Protein Synthesis In Brain During Hibernation Involves Inhibition of Protein Initiation and Elongation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 14511–14516.
- Fukushima M, Tsuda S, Yoshizawa Y I, 2013, Fabrication of highly porous alumina prepared by gelation freezing route with antifreeze protein, *Journal of the American Ceramic Society*, 96, 1029–1031.
- García F C, Bestion E, Warfield R, Yvon-Durocher G, 2018, Changes in temperature alter the relationship between biodiversity and ecosystem functioning, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 10989–10994.
- Geiser F, 2004, Metabolic Rate and Body Temperature Reduction During Hibernation and Daily Torpor, *Annual Review of Physiology*, 66, 239–274.
- Geiser F, 2007, Yearlong hibernation in a marsupial mammal, *Naturwissenschaften*, 94, 941–944.
- Geiser F, 2013, Hibernation, *Current Biology*, 23, R188–R193.
- Geiser F, 2020, Seasonal Expression of Avian and Mammalian Daily Torpor and Hibernation: Not a Simple Summer-Winter Affair†, *Frontiers in Physiology*, 11, 1–19.
- Gidiş M, Başkale E, 2020, The Herpetofauna of Honaz Mountain National Park (Denizli

- Province , Turkey) and Threatening Factors, *Amphibian & Reptile Conservation*, 14, 147–155.
- Graham L A, Liou Y-C, Walker V K, Davies P L, 1997, Hyperactive Antifreeze Protein From Beetles, *Nature*, 388, 727–728.
- Graham L A, Davies P L, 2005, Glycine-Rich Antifreeze Proteins from Snow Fleas, *Science*, 310, 461–461.
- Green S R, 2017, Regulation of Urea Cycle Related Enzymes In Response to Freezing In The Wood Frog, *Rana sylvatica*, Carleton University, Ph.D. Thesis, 123p, Ottawa.
- Griffith M, Ala P, Yang D S C, Hon W-C, Moffatt B A, 1992, Antifreeze Protein Produced Endogenously in Winter Rye Leaves, *Plant Physiology*, 100, 593–596.
- Griffith M, Ewart K V V, 1995, Antifreeze Proteins and Their Potential Use In Frozen Foods, *Biotechnology Advances*, 13, 375–402.
- Griffith M, Antikainen M, Hon W-C C, Pihakaski-Maunsbach K, Yu X-M M, Chun J U, vd., 1997, Antifreeze Proteins In Winter Rye, *Physiologia Plantarum*, 100, 327–332.
- Griffith M, Yaish M W F, 2004, Antifreeze Proteins In Overwintering Plants: A Tale of Two Activities, *Trends in Plant Science*, 9, 399–405.
- Guarino F M, Erismis U C, 2008, Age Determination and Growth by Skeletochronology of *Rana holtzi*, An Endemic Frog From Turkey, *Italian Journal of Zoology*, 75, 237–242.
- Gupta R, Deswal R, 2014, Antifreeze Proteins Enable Plants To Survive In Freezing Conditions, *Journal of Biosciences*, 39, 931–944.
- Gupta A, Brooks C, Storey K B, 2020, Regulation of NF- κ B, FHC and SOD2 in response to oxidative stress in the freeze tolerant wood frog, *Rana sylvatica*, *Cryobiology*, 97, 28–36.
- Günel N, 2013, Snowfall, Snow Cover Duration and Snow Line Elevation in Turkey, *Acta Turcica*, 1, 1–13.
- Gür H, Gür M K, 2010, Anatolian ground squirrels (*Spermophilus xanthoprymnus*): Hibernation and geographic variation of body size in a species of old world ground

- squirrels, Hacettepe Journal of Biology And Chemistry, 38, 247–253.
- Hadj-Moussa H, Storey K B, 2018, Micromanaging freeze tolerance: the biogenesis and regulation of neuroprotective microRNAs in frozen brains, Cellular and Molecular Life Sciences, 75, 3635–3647.
- Hand S C, 1996, Downregulation of Cellular Metabolism During Environmental Stress: Mechanisms and Implications, Annual Review of Physiology, 58, 539–563.
- Harper J V., Brooks G, 2005, The mammalian cell cycle: an overview., Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 296, 113–153.
- Hawes T C, Wharton D A, 2010, Tolerance of freezing in caterpillars of the New Zealand Magpie moth (*Nyctemera annulata*), Physiological Entomology, 35, 296–300.
- Hawkins L J, Storey K B, 2018, Histone Methylation In The Freeze-Tolerant Wood Frog (*Rana sylvatica*), Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 188, 113–125.
- Hawkins L J, Wang M, Zhang B, Xiao Q, Wang H, Storey K B, 2019, Glucose and urea metabolic enzymes are differentially phosphorylated during freezing, anoxia, and dehydration exposures in a freeze tolerant frog, Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 30, 1–13.
- Hawkins L J, 2020, The Molecular Biology of Dehydration Tolerance : Regulation of Gene Expression and Function in *Xenopus laevis*, Carleton University, PhD. Thesis, Ottawa.
- Hermes-Lima M, Storey J M, Storey K B, 2001, Chapter 20 Antioxidant Defenses and Animal Adaptation to Oxygen Availability During Environmental Stress, Storey K B ve Storey J M (Ed.), Cell And Molecular Response To Stress (263–287), Elsevier B.V., 291p, Amsterdam.
- Hermes-Lima M, Zenteno-Savín T, 2002, Animal Response to Drastic Changes In Oxygen Availability and Physiological Oxidative Stress, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 133, 537–556.
- Hermes-Lima M, Moreira D C, Rivera-Ingraham G A, Giraud-Billoud M, Genaro-Mattos

- T C, Campos É G, 2015, Preparation For Oxidative Stress Under Hypoxia And Metabolic Depression: Revisiting The Proposal Two Decades Later, *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 1122–1143.
- Higgins S A, Swanson D L, 2013, Urea is not a universal cryoprotectant among hibernating anurans: Evidence from the freeze-tolerant boreal chorus frog (*Pseudacris maculata*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 164, 344–350.
- Hillman S S, Withers P C, Drewes R C, Hillyard S D, 2008, *Ecological and Environmental Physiology of Amphibians*, Oxford University Press, 469p, Oxford.
- Hirota A, Takiya Y, Sakamoto J, Shiojiri N, Suzuki M, Tanaka S, vd., 2015, Molecular Cloning of cDNA Encoding an Aquaglyceroporin, AQP-h9, in the Japanese Tree Frog, *Hyla japonica*: Possible Roles of AQP-h9 in Freeze Tolerance, *Zoological Science*, 32, 296–306.
- Hochachka P W, Buck L T, Doll C J, Land S C, 1996, Unifying Theory of Hypoxia Tolerance: Molecular/Metabolic Defense and Rescue Mechanisms For Surviving Oxygen Lack, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 9493–9498.
- Hoelzl F, Bieber C, Cornils J S, Gerritsmann H, Stalder G L, Walzer C, vd., 2015, How to spend the summer? Free-living dormice (*Glis glis*) can hibernate for 11 months in non-reproductive years, *Journal of Comparative Physiology B*, 185, 931–939.
- Holden C P, Storey K B, 1996, Signal Transduction, Second Messenger, and Protein Kinase Responses During Freezing Exposures In Wood Frogs, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 271, R1205–R1211.
- Holmstrup M, 2014, The ins and outs of water dynamics in cold tolerant soil invertebrates, *Journal of Thermal Biology*, 45, 117–123.
- Holmstrup M, Westh P, 1994, Dehydration of earthworm cocoons exposed to cold: a novel cold hardiness mechanism, *Journal of Comparative Physiology B*, 164, 312–315.
- Holmstrup M, Zachariassen K E, 1996, Physiology of cold hardiness in earthworms,

- Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology, 115, 91–101.
- Irwin J T, Costanzo J P, Lee, Jr. R E, 1999, Terrestrial hibernation in the northern cricket frog, *Acris crepitans*, Canadian Journal of Zoology, 77, 1240–1246.
- Irwin J T, Lee J R E, 2003, Geographic Variation In Energy Storage and Physiological Responses to Freezing In The Gray Treefrogs *Hyla versicolor* and *H. chrysoscelis*, Journal of Experimental Biology, 206, 2859–2867.
- Jackson D C, 2002, Hibernating Without Oxygen: Physiological Adaptations of The Painted Turtle, Journal of Physiology, 543, 731-737.
- Joanisse D R, Storey K B, 1996, Oxidative Damage And Antioxidants In *Rana sylvatica*, The Freeze-Tolerant Wood Frog, American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 271, R545–R553.
- Karaca B, 2015, Amonyum Sülfat’ın Uludağ Kurbağası (*Rana macrocnemis*) Larvaları Üzerindeki Akut Toksikolojik, Morfolojik ve Histopatolojik Etkileri, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 83s, Rize.
- Karaoğlu K, Gül S, 2020, Characterization of Microplastic Pollution In Tadpoles Living In Small Water-Bodies From Rize, The Northeast of Turkey, Chemosphere, 255, 126915.
- Kart Gür M, Refinetti R, Gür H, 2009, Daily Rhythmicity and Hibernation In The Anatolian Ground Squirrel Under Natural and Laboratory Conditions, Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 179, 155–164.
- Kart Gür M, Bulut Ş, Gür H, Refinetti R, 2014, Body Temperature Patterns And Use of Torpor In An Alpine Glirid Species, Woolly Dormouse, Acta Theriologica, 59, 299–309.
- Kart Gür M, Gür H, 2015, Age And Sex Differences In Hibernation Patterns In Free-Living Anatolian Ground Squirrels, Mammalian Biology, 80, 265–272.
- Kart Gür M, Gür H, 2017, Küçük Bir Memeli Türünün Ekofizyolojisi ve Evrimsel Coğrafyası: Anadolu Yer Sincabı, Kebikec: İnsan Bilimleri İçin Kaynak

- Arastirmali Dergisi, 43, 189–198.
- Kaska Y, Avcı A, 2009, *Rana tavasensis*, The IUCN Red List of Threatened Species 2009, 1, 1–6.
- Kaya U, Çevik I E, Erişmiş U C, 2005, Population Status of The Taurus Frog, *Rana holtzi* Werner (1898), In Its Terra Typica: Is There a Decline?, Turkish Journal of Zoology, 29, 317–319.
- Kelleher M J, Rickards J, Storey K B, 1987, Strategies of Freeze Avoidance in Larvae of The Goldenrod Gall Moth, *Epiblema scudderiana*: Laboratory Investigations of Temperature Cues In The Regulation of Cold Hardiness, Journal of Insect Physiology, 33, 581–586.
- Kesaraju S, Schmidt-Kastner R, Prentice H M, Milton S L, 2009, Modulation of stress proteins and apoptotic regulators in the anoxia tolerant turtle brain, Journal of Neurochemistry, 109, 1413–1426.
- King P A, Rosholt M N, Storey K B, 1995, Seasonal Changes in Plasma Membrane Glucose Transporters Enhance Cryoprotectant Distribution in The Freeze-Tolerant Wood Frog, Canadian Journal of Zoology, 73, 1–9.
- Kiss A J, Muir T J, Lee, Jr R E, Costanzo J P, 2011, Seasonal Variation in The Hepatoproteome of The Dehydration and Freeze-Tolerant Wood Frog, *Rana sylvatica*, International Journal of Molecular Sciences, 12, 8406–8414.
- Kontaş Aşkar T, Ergün N, Turunç V, 2007, Heat Shock Proteins and Their Physiological Roles, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 13, 109–114.
- Košťál V, Šimůnková P, Kobelková A, Shimada K, 2009, Cell cycle arrest as a hallmark of insect diapause: Changes in gene transcription during diapause induction in the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 39, 875–883.
- Krivoruchko A, Storey K B, 2010, Molecular mechanisms of turtle anoxia tolerance: A role for NF-κB, Gene, 450, 63–69.
- Kurnaz M, 2020, Species List of Amphibians and Reptiles From Turkey, Journal of Animal Diversity, 2, 10–32.

- Kurtuluş O, Bozdoğan M, Öz M, Kaska Y, Kumlutaş Y, Kaya U, vd., 2009, *Rana holtzi*, The IUCN Red List of Threatened Species 2009, 1, 1–6.
- Kuzmin S, Tarkhnishvili D, Ishchenko V, Ananjeva N, Orlov N, Tuniyev B, vd., 2009, *Rana macrocnemis*, The IUCN Red List of Threatened Species 2009, 1, 1–9.
- Kültz D, 2005, Molecular and Evolutionary Basis of the Cellular Stress Response, Annual Review of Physiology, 67, 225–257.
- Larson D J, Middle L, Vu H, Zhang W, Serianni A S, Duman J, vd., 2014, Wood Frog Adaptations to Overwintering In Alaska: New Limits to Freezing Tolerance, Journal of Experimental Biology, 217, 2193–2200.
- Layne J R, Lee Jr. R E, 1987, Freeze tolerance and the dynamics of ice formation in wood frogs (*Rana sylvatica*) from southern Ohio, Canadian Journal of Zoology, 65, 2062–2065.
- Layne J R, Lee R E, 1989, Seasonal variation in freeze tolerance and ice content of the tree frog *Hyla versicolor*., The Journal of experimental zoology, 249, 133–137.
- Layne J R, Lee R E, 1991, The importance of body tissue composition to calorimetric assessments of ice content in whole animals, Journal of Thermal Biology, 16, 61–64.
- Layne J R, Jones A L, 2001, Freeze Tolerance in the Gray Treefrog: Cryoprotectant Mobilization and Organ Dehydration, Journal of Experimental Zoology, 290, 1–5.
- Layne J R, Stapleton M G, 2009, Annual Variation In Glycerol Mobilization and Effect of Freeze Rigor on Post-Thaw Locomotion in the Freeze-Tolerant Frog *Hyla versicolor*, Journal of Comparative Physiology B, 179, 215.
- Lee R E, Costanzo J P, Davidson E C, Layne J R, 1992, Dynamics of Body Water During Freezing and Thawing in a Freeze-Tolerant Frog (*Rana sylvatica*), J. Therm. Biol, 17, 263–266.
- Li N G, Toxopeus J, Moos M, Sørensen J G, Sinclair B J, 2020, A comparison of low temperature biology of *Pieris rapae* from Ontario, Canada, and Yakutia, Far Eastern Russia, Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular &

- Integrative Physiology, 242, 110649.
- Lin C, 2009, Studies on the Effect of Cryopreservation on Gene Expression in Zebrafish Blastomeres, University of Bedfordshire, Ph.D. Thesis, 167p., Bedfordshire UK.
- Liu Z-P, Gu W-B, Tu D-D, Zhu Q-H, Zhou Y-L, Wang C, vd., 2018, Effects of Both Cold and Heat Stress on the Liver of the Giant Spiny Frog (*Quasipaa spinosa*): stress response and histological changes, Journal of Experimental Biology, 221, 1-11.
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and The 2- $\Delta\Delta$ CT Method, Methods, 25, 402–408.
- Lovich J E, Ernst C H, Ernst E M, Riley J L, 2014, A 21-year study of seasonal and interspecific variation of hatchling emergence in a nearctic freshwater turtle community: To overwinter or not to overwinter?, Herpetological Monographs, 28, 93–109.
- Lung Z D, 2019, Regulation of DNA damage repair in response to freezing and anoxia in the wood frog , *Rana sylvatica*, Carleton University, Msc. Thesis, 114 p., Ottawa.
- Luu B E, Storey K B, 2018, Solving Donor Organ Shortage with Insights from Freeze Tolerance in Nature, BioEssays, 40, 1800092.
- MacDonald J A, Storey K B, 1999, Regulation of Ground Squirrel Na⁺K⁺-ATPase Activity by Reversible Phosphorylation During Hibernation, Biochemical and Biophysical Research Communications, 254, 424–429.
- MacDonald J A, Degenhardt T, Baynes J W, Storey K B, 2009, Glycation of Wood Frog (*Rana sylvatica*) Hemoglobin and Blood Proteins: in Vivo and in Vitro Studies, Cryobiology, 59, 223–225.
- Martino M N, Zaritzky N E, 1989, Ice Recrystallization in A Model System and in Frozen Muscle Tissue, Cryobiology, 26, 138–148.
- Mattice J J M, 2018, Regulation of glutathione-based antioxidant defenses in response to dehydration stress in the African Clawed frog, *Xenopus laevis*, Carleton University, Msc. Thesis, 124 p., Ottawa.
- McNally J D, 2002, Response to Freeze Exposure by The Wood Frog, *Rana sylvatica*:

- Investigating The Freeze Induced Changes In Transcription and Translation Patterns In Heart and Liver, Carleton University, Ph.D. Thesis, 265p, Ottawa.
- McNally J D, Wu S-B, Sturgeon C M C M, Storey K B, 2002, Identification and Characterization of a Novel Freezing Inducible Gene, *li16*, In The Wood Frog *Rana sylvatica*, The FASEB Journal, 16, 902–904.
- McNally J D, Sturgeon C M, Storey K B, 2003, Freeze-Induced Expression of a Novel Gene, *fr47*, In The Liver of The Freeze-Tolerant Wood Frog, *Rana sylvatica*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 1625, 183–191.
- Merlin C, Liedvogel M, 2019, The genetics and epigenetics of animal migration and orientation: birds, butterflies and beyond, Journal of Experimental Biology, 222, jeb191890.
- Miaud C, Üzümlü N, Avci A, Olgun K, 2007, Age, Size and Growth of The Endemic Anatolian Mountain Frog *Rana holtzi* From Turkey, Herpetological Journal, 17, 167–173.
- Miller K, 1982, Cold-hardiness strategies of some adult and immature insects overwintering in interior Alaska, Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 73, 595–604.
- Naing A H, Kim C K, 2019, A brief review of applications of antifreeze proteins in cryopreservation and metabolic genetic engineering, 3 Biotech, 9, 1–9.
- Najibzadeh M, Gharzi A, Rastegar-Pouyani N, Rastegar-Pouyani E, Pesarakloo A, 2017a, Habitat Suitability For The Caucasian Frog *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 (Amphibia:Anura: Ranidae), Russian Journal of Ecology, 48, 280–286.
- Najibzadeh M, Veith M, Gharzi A, Rastegar-Pouyani N, Rastegar-Pouyani E, Kieren S, vd., 2017b, Molecular Phylogenetic Relationships Among Anatolian-Hyrcanian Brown Frog Taxa (Ranidae: Rana), Amphibia-Reptilia, 38, 339–350.
- Niu Y, Cao W, Wang J, He J, Storey K B, Ding L, vd., 2021, Freeze tolerance and the underlying metabolite responses in the Xizang plateau frog, *Nanorana parkeri*, Journal of Comparative Physiology B, 191, 173–184.

- Niu Y, Wang J, Men S, Zhao Y, Lu S, Tang X, vd., 2018, Urea and Plasma Ice-Nucleating Pproteins Ppromoted The Modest Freeze Tolerance in Pleske's High Altitude Frog *Nanorana pleskei*, *Journal of Comparative Physiology B*, 188, 599–610.
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C, 2018, Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation, *Frontiers in Endocrinology*, 9, 1-12.
- Obaya A J, Sedivy J M, 2002, Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells, *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 59, 126–142.
- Olijve L L C, Meister K, DeVries A L, Duman J G, Guo S, Bakker H J, vd., 2016, Blocking Rapid Ice Crystal Growth Through Nonbasal Plane Adsorption of Antifreeze Proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 3740–3745.
- Packard G C, Tucker J K, Lohmiller L D, 1998, Distribution of Strecker's Chorus Frogs (*Pseudacris streckeri*) in Relation to Their Tolerance for Freezing, *Journal of Herpetology*, 32, 437–440.
- Packard G C, Packard M J, 2004, Natural freeze-tolerance in reptiles, *Cryo-Letters*, 25, 253-236.
- Padilla P A, Ladage M L, 2012, Suspended animation, diapause and quiescence: Arresting the cell cycle in *C. elegans*, *Cell Cycle*, 11, 1672–1679.
- Pedersen P G, Holmstrup M, 2003, Freeze or dehydrate: only two options for the survival of subzero temperatures in the arctic enchytraeid *Fridericia ratzeli*, *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 173, 601–609.
- Pegg D E, 1987, Mechanisms of Freezing Damage, *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 41, 363–78.
- Pesarakloo A, Najibzadeh M, Mirkamali S J, 2020, Novel Method For Detection Probability and Estimating Population Size of Mountain Frog, *Rana macrocnemis* (Boulenger, 1885) at The End of Its Distribution Range, *Landscape and Ecological Engineering*, 16, 11–21.
- Pincheira-Donoso D, Bauer A M, Meiri S, Uetz P, 2013, Global Taxonomic Diversity of

- Living Reptiles, PLoS ONE, 8, e59741.
- Raymond M R, Wharton D A, 2016, The ability to survive intracellular freezing in nematodes is related to the pattern and distribution of ice formed, *Journal of Experimental Biology*, 219, 2060-2065.
- Rey B, Sibille B, Romestaing C, Belouze M, Letexier D, Servais S, vd., 2008, Reptilian uncoupling protein: Functionality and expression in sub-zero temperatures, *Journal of Experimental Biology*, 211, 1456–1462.
- Rider M H, Hussain N, Horman S, Dilworth S M, Storey K B, 2006, Stress-induced activation of the AMP-activated protein kinase in the freeze-tolerant frog *Rana sylvatica*, *Cryobiology*, 53, 297–309.
- Ring R A, 1981, The physiology and biochemistry of cold tolerance in arctic insects, *Journal of Thermal Biology*, 6, 219–229.
- Robert J, 2003, Evolution of heat shock protein and immunity, *Developmental & Comparative Immunology*, 27, 449–464.
- Roy P, Goswami P, 2019, Freeze tolerance in wood frogs, *Journal of Investigative Genomics*, 6, 1–4.
- Rubinsky B, Pegg D E, 1988, A Mathematical Model For The Freezing Process In Biological Tissue, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 234, 343–358.
- Rubinsky B, Lee C Y, Bastacky J, Onik G, 1990, The Process of Freezing and The Mechanism of Damage During Hepatic Cryosurgery, *Cryobiology*, 27, 85–97.
- Rubinsky B, Hong J S, Storey K B, 1994a, Freeze tolerance in turtles: Visual analysis by microscopy and magnetic resonance imaging, *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 267, R1078-R1088.
- Rubinsky B, Wong S T S, Hong J S, Gilbert J, Roos M, Storey K B, 1994b, 1H magnetic resonance imaging of freezing and thawing in freeze-tolerant frogs, *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 266, R1771-R1777.
- Saltveit M E, 2001, Chilling Injury Is Reduced In Cucumber and Rice Seedlings and In

- Tomato Pericarp Discs by Heat-Shocks Applied After Chilling, *Postharvest Biology and Technology*, 21, 169–177.
- Sandve S R, Kosmala A, Rudi H, Fjellheim S, Rapacz M, Yamada T, vd., 2011, Molecular mechanisms underlying frost tolerance in perennial grasses adapted to cold climates, *Plant Science*, 180, 69–77.
- Schmid W D, 1982, Survival of Frogs in Low Temperature, *Science*, 215, 697–698.
- Sformo T, Walters K, Jeannet K, Wowk B, Fahy G M, Barnes B M, vd., 2010, Deep supercooling, vitrification and limited survival to -100°C in the Alaskan beetle *Cucujus clavipes puniceus* (Coleoptera: Cucujidae) larvae, *Journal of Experimental Biology*, 213, 502–509.
- Shah M, Qureshi M F H, Mohammad D, Lakhani M, Urooj T, Mushtaq S, 2020, CDKs family -a glimpse into the past and present: from cell cycle control to current biological functions, *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*, 5, 1–9.
- Sidell B D, 2000, Life at Body Temperatures Below 0 degrees C: The Physiology and Biochemistry of Antarctic Fishes, *Gravitational and space biology bulletin: publication of the American Society for Gravitational and Space Biology*, 13, 25–34.
- Sinclair B J, Renault D, 2010, Intracellular Ice Formation In Insects: Unresolved After 50years?, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 155, 14–18.
- Sinclair B J, Stinziano J R, Williams C M, MacMillan H A, Marshall K E, Storey K B, 2013, Real-time measurement of metabolic rate during freezing and thawing of the wood frog, *Rana sylvatica* : implications for overwinter energy use, *Journal of Experimental Biology*, 216, 292–302.
- Smith R W, Cash P, Hogg D W, Buck L T, 2015, Proteomic changes in the brain of the western painted turtle (*Chrysemys picta bellii*) during exposure to anoxia, *Proteomics*, 15, 1587–1597.
- Steiner A A, Petenusci S O, Brentegani L G, Branco L G S, 2000, The Importance of Glucose For The Freezing Tolerance/Intolerance of The Anuran Amphibians *Rana catesbeiana* and *Bufo paracnemis*, *Revista Brasileira de Biologia*, 60, 321–

328.

- Stogsdill B, Frisbie J, Krane C M, Goldstein D L, 2017, Expression of the aquaglyceroporin HC-9 in a freeze-tolerant amphibian that accumulates glycerol seasonally, *Physiological Reports*, 15, e13331.
- Storey J M, Storey K B, 1985, Adaptations of metabolism for freeze tolerance in the gray tree frog, *Hyla versicolor*, *Canadian Journal of Zoology*, 63, 49–54.
- Storey J M, Storey K B, 2019, In defense of proteins: Chaperones respond to freezing, anoxia, or dehydration stress in tissues of freeze tolerant wood frogs, *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 331, 392–402.
- Storey J M, Wu S, Storey K B, 2021, Mitochondria and the Frozen Frog, *Antioxidants*, 10, 543.
- Storey K B, Storey J M, 1984, Biochemical Adaption For Freezing Tolerance In The Wood Frog, *Rana sylvatica*, *Journal of Comparative Physiology B*, 155, 29–36.
- Storey K B, Storey J M, 1986a, Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially-hibernating amphibians, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 83, 613–617.
- Storey K B, Storey J M, 1986b, Freeze tolerant frogs: cryoprotectants and tissue metabolism during freeze–thaw cycles, *Canadian Journal of Zoology*, 64, 49–56.
- Storey K B, Storey J M, 1987, Persistence of Freeze Tolerance in Terrestrially Hibernating Frogs after Spring Emergence, *Copeia*, 1987, 720.
- Storey K B, Storey J M, 1988, Freeze Tolerance In Animals, *Physiological Reviews*, 68, 27–84.
- Storey K B, Storey J M, 1992, Natural Freeze Tolerance in Ectothermic Vertebrates, *Annual Review of Physiology*, 54, 619–637.
- Storey K B, Bischof J, Rubinsky B, 1992, Cryomicroscopic Analysis of Freezing In Liver of The Freeze-Tolerant Wood Frog, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 263, R185–R194.
- Storey K B, Storey J M, Churchill T A, 1997, De Novo Protein Biosynthesis Responses

- to Water Stresses In Wood Frogs: Freeze–Thaw and Dehydration–Rehydration, *Cryobiology*, 34, 200–213.
- Storey K B, 1999, Living in the cold: Freeze-induced gene responses in freeze-tolerant vertebrates, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 26, 57–63.
- Storey K B, Storey J M, 2001, Signal Transduction and Gene Expression In The Regulation of Natural Freezing Survival, *Cell and Molecular Response to Stress*, 2, 1–19.
- Storey K B, 2004, Strategies for exploration of freeze responsive gene expression: advances in vertebrate freeze tolerance, *Cryobiology*, 48, 134–145.
- Storey K B, Storey J M, 2004, Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Vertebrate Freeze Tolerance: The Wood Frog, Benson E , Fuller B , ve Lane N (Ed.), *Life In The Frozen State* (243–274), CRC Press, Boca Raton.
- Storey K B, Storey J M, 2005, Freeze Tolerance, Gerday C ve Glandorff N (Ed.), *Encyclopedia Of Life Support Systems (EOLSS)* (1–25), UNESCO, 357p, Oxford, UK.
- Storey K B, 2006, Reptile Freeze Tolerance: Metabolism and Gene Expression, *Cryobiology*, 52, 1–16.
- Storey K B, Storey J M, 2007, Tribute to P. L. Lutz: Putting Life on 'Pause' - Molecular Regulation of Hypometabolism, *Journal of Experimental Biology*, 210, 1700–1714.
- Storey K B, Storey J M, 2009, Animal Cold Hardiness, 9, 40–53.
- Storey K B, Storey J M, 2010, Oxygen: Stress and adaptation in cold-hardy insects, Denlinger D L ve Lee R E J (Ed.), *Low Temperature Biology Of Insects* (141–165), Cambridge University Press, Cambridge.
- Storey K B, Storey J M, 2011, Heat shock proteins and hypometabolism: adaptive strategy for proteome preservation, *Research and Reports in Biology*, 2, 57–68.
- Storey K B, Storey J M, 2012, Insect cold hardiness: metabolic, gene, and protein adaptation, *Canadian Journal of Zoology*, 90, 456–475.
- Storey K B, Storey J M, 2013, Molecular Biology of Freezing Tolerance, *Comprehensive*

- Physiology, 3, 1283–1308.
- Storey K B, Storey J M, 2017, Molecular Physiology of Freeze Tolerance In Vertebrates, Physiological Reviews, 97, 623–665.
- Storey K B, Storey J M, 2020, Mitochondria, metabolic control and microRNA: Advances in understanding amphibian freeze tolerance, BioFactors, 46, 220–228.
- Strimbeck G R, Schaberg P G, Fossdal C G, Schröder W P, Kjellsen T D, 2015, Extreme low temperature tolerance in woody plants, Frontiers in Plant Science, 6, 62–64.
- Sullivan K J, 2011, Expression Pattern of The Novel Freeze-Responsive Genes *li16*, *fr10* and *fr47* In The Wood Frog, *Rana sylvatica*, Carleton University, Ph.D. Thesis, 143p, Ottawa.
- Sullivan K J, Storey K B, 2012, Environmental Stress Responsive Expression of The Gene *li16* In *Rana sylvatica*, The Freeze Tolerant Wood Frog, Cryobiology, 64, 192–200.
- Sullivan K J, Biggar K K, Storey K B, 2015a, Expression and Characterization of the Novel Gene *fr47* During Freezing In The Wood Frog, *Rana sylvatica*, Biochemistry Research International, 2015, 1–8.
- Sullivan K J, Biggar K K, Storey K B, 2015b, Transcript Expression of The Freeze Responsive Gene *fr10* In *Rana sylvatica* During Freezing, Anoxia, Dehydration, and Development, Molecular and Cellular Biochemistry, 399, 17–25.
- Swanson D L, Graves B M, Koster K L, 1996, Freezing tolerance/intolerance and cryoprotectant synthesis in terrestrially overwintering anurans in the Great Plains, USA, Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 166, 110–119.
- Swanson D L, Burdick S L, 2010, Overwintering physiology and hibernacula microclimates of Blanchard's Cricket Frogs at their Northwestern range boundary, Copeia, 247–253.
- Şahin F, 2008, Bozdağ (Ödemiş) ve Akdağ (Tavas)'daki *Rana macrocnemis* (Anura: Amphibia) Türünün Taksonomik İncelenmesi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 40s, Aydın.

- Tan Y J, Xiong Y, Ding G L, Zhang D, Meng Y, Huang H F, vd., 2013, Cryoprotectants up-regulate expression of mouse oocyte AQP7, which facilitates water diffusion during cryopreservation, *Fertility and Sterility*, 99, 1428–1435.
- Tang Z, Chen B, Niu C, 2021, Antioxidant defense response during hibernation and arousal in Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* juveniles, *Cryobiology*, 99, 46–54.
- Tarkhnishvili D N, Gokhelasvili R K, 1999, *The Amphibians of the Caucasus*, Pensoft Pub., 233p, Sofia-Moscow.
- Tattersall G J, Ultsch G R, 2008, Physiological Ecology of Aquatic Overwintering in Ranid Frogs, *Biological Reviews*, 83, 119–140.
- Taylor S S, Buechler J A, Yonemoto W, 1990, cAMP-Dependent Protein Kinase: Framework For A Diverse Family of Regulatory Enzymes, *Annual Review of Biochemistry*, 59, 971–1005.
- Tejo B A, Asmawi A A, Rahman M B A, 2020, Antifreeze Proteins: Characteristics and Potential Applications Bimo, *Makara Journal of Science*, 24, 58–64.
- Turan L, Karaardıç H, 2008, A New Locality For Endemic Taurus Frog *Rana holtzi* Werner (1898) In Turkey, *Journal of Applied Biological Sciences*, 2, 25–26.
- Turbill C, Geiser F, 2008, Hibernation by tree-roosting bats, *Journal of Comparative Physiology B*, 178, 597–605.
- Ultsch G R, 2006, The Ecology of Overwintering Among Turtles: Where Turtles Overwinter and Its Consequences, *Biological Reviews*, 81, 339.
- Üzümcü Z, 2009, *Pseudomanas sp.* Suşlarında Cold Shock Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE Analizi, Çukurova Üniversitesi, YL Tezi, 69s, Adana.
- Valbona A, 2013, Physiological Response to Freezing In Pool Frog *Pelophylax lessonae* (Camerano,1882), The 1st International Conference on Research and Education – Challenges Toward the Future (ICRAE2013), 24-25 May 2013, 1–7.
- Veith M, Schmidtler J F, Kosuch J, Baran I, Seitz A, 2002, Palaeoclimatic Changes Explain Anatolian Mountain Frog Evolution: A Test For Alternating Vicariance and Dispersal Events, *Molecular Ecology*, 12, 185–199.

- Voituron Y, Storey J M, Grenot C, Storey K B, 2002a, Freezing Survival, Body Ice Content and Blood Composition of The Freeze-Tolerant European Common Lizard, *Lacerta vivipara*, Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 172, 71–76.
- Voituron Y, Verdier B, Grenot C, 2002b, The respiratory metabolism of a lizard (*Lacerta vivipara*) in supercooled and frozen states, American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 283, R181–R186.
- Voituron Y, Eugene M, Barré H, 2003, Survival and Metabolic Responses to Freezing by The Water Frog (*Rana ridibunda*), Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, 299A, 118–126.
- Voituron Y, Heulin B, Surget-Groba Y, 2004, Comparison of the cold hardiness capacities of the oviparous and viviparous forms of *Lacerta vivipara*, Journal of Experimental Zoology, 301A, 367–373.
- Voituron Y, Joly P, Eugène M, Barré H, 2005, Freezing Tolerance of The European Water Frogs: The Good, The Bad, and The Ugly, American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 288, R1563–R1570.
- Voituron Y, Servais S, Romestaing C, Douki T, Barré H, 2006, Oxidative DNA Damage and Antioxidant Defenses In The European Common Lizard (*Lacerta vivipara*) In Supercooled and Frozen States, Cryobiology, 52, 74–82.
- Voituron Y, Barré H, Ramløv H, Douady C J, 2009a, Freeze Tolerance Evolution Among Anurans: Frequency and Timing of Appearance, Cryobiology, 58, 241–247.
- Voituron Y, Paaschburg L, Holmstrup M, Barré H, Ramløv H, 2009b, Survival and Metabolism of *Rana arvalis* During Freezing, Journal of Comparative Physiology B, 179, 223–230.
- Wang L C H, 1989, Ecological, Physiological, and Biochemical Aspects of Torpor In Mammals and Birds, Advances In Comparative And Environmental Physiology (361–401),
- Wassersug R, Feder M E, Burggren W W, 1993, Environmental Physiology of The Amphibians, Copeia, 1993, 1185.

- Werner F, 1898, Über Einige Neue Reptilien und Einen Neuen Frosch aus dem Cilicischen Taurus, Zool. Anz., 21, 217.
- Wharton D A, Ferns, 1995, Survival of Intracellular Freezing by The Antarctic Nematode *Panagrolaimus davidi*, The Journal of experimental biology, 198, 1381–7.
- Wharton D A, Goodall G, Marshall C J, 2003, Freezing Survival and Cryoprotective Dehydration As Cold Tolerance Mechanisms In The Antarctic Nematode *Panagrolaimus davidi*, Journal of Experimental Biology, 206, 215–221.
- Wharton D A, Pow B, Kristensen M, Ramløv H, Marshall C J, 2009, Ice-Active Proteins and Cryoprotectants From The New Zealand Alpine Cockroach, *Celatoblatta quinque maculata*, Journal of Insect Physiology, 55, 27–31.
- Wijenayake S, Storey K B, 2016, The role of DNA methylation during anoxia tolerance in a freshwater turtle (*Trachemys scripta elegans*), Journal of Comparative Physiology B, 186, 333–342.
- Willits D H, Peet M M, 1998, The Effect of Night Temperature on Greenhouse Grown Tomato Yields In Warm Climates, Agricultural and Forest Meteorology, 92, 191–202.
- Woods C P, Czenze Z J, Brigham R M, 2019, The avian “hibernation” enigma: thermoregulatory patterns and roost choice of the common poorwill, Oecologia, 189, 47–53.
- Worland M R, Block W, 2003, Desiccation stress at sub-zero temperatures in polar terrestrial arthropods, Journal of Insect Physiology, 49, 193–203.
- Wu C W, Storey K B, 2012, Pattern of cellular quiescence over the hibernation cycle in liver of thirteen-lined ground squirrels, Cell Cycle, 11, 1714–1726.
- Wu C W, Tessier S N, Storey K B, 2018, Stress-induced antioxidant defense and protein chaperone response in the freeze-tolerant wood frog *Rana sylvatica*, Cell Stress and Chaperones, 23, 1205–1217.
- Ye Q, Eves R, Campbell R L, Davies P L, 2020, Crystal structure of an insect antifreeze protein reveals ordered waters on the ice-binding surface, Biochemical Journal, 477, 3271–3286.

- Yıldırım C, 2008, Model Sistemlerde Antifriz Protein Kullanımının Yeniden Kristallenmeye ve Bazı Isısal Özelliklere Etkisinin İncelenmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Dr. Tezi, 127p, İzmir.
- Yıldız M, Göçmen B, 2012, Population Dynamics, Reproduction, and Life History Traits of Taurus Frog, *Rana holtzi* Werner, 1898 (Anura: Ranidae) In Karagöl (Ulukışla, Niğde), Turkey, Herpetologica Romanica, 6, 1–40.
- Yu S O, Brown A, Middleton A J, Tomczak M M, Walker V K, Davies P L, 2010, Ice Restructuring Inhibition Activities In Antifreeze Proteins with Distinct Differences In Thermal Hysteresis, Cryobiology, 61, 327–334.
- Zachariassen K E, Kristiansen E, 2000, Ice Nucleation and Antinucleation in Nature, Cryobiology, 41, 257–279.
- Zhang J, Hawkins L J, Storey K B, 2020, DNA methylation and regulation of DNA methyltransferases in a freeze-tolerant vertebrate, Biochemistry and Cell Biology, 98, 145–153.
- Zhang J, Tessier S N, Storey K B, 2011, PI3K-Akt regulation as a molecular mechanism of the stress response during aerobic dormancy, Nowakowska A ve Caputa K E (Ed.), Hypometabolism (147–182), Research Signpost, Kerala.
- Zhenhong L, 2004, Gene Expression Supporting Freeze Tolerance in the Wood Frog, *Rana sylvatica*, Caletton University, 147,

İnternet Kaynakları

- 1- <https://www.mgm.gov.tr/FILES/resmi-istatistikler/parametreAnalizi/Turkiye-5cm-Toprak-Sicakliklari-2019.pdf>, 01.08.2020
- 2- <https://www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/il-ve-ilceler-istatistik.aspx?k=A>, 01.08.2020

- Erişmiş U C, Chinsamy Turan A, Malkoç S, Yoldas T, Agyar P, 2015, Kemik Paleohistolojisi, XII. Ulusal Ekoloji Ve Çevre Kongresi, Muğla.
- Erişmiş U C, Yoldas T, Agyar P, 2015, Anadolu Su Kurbağaları (ranidae: Pelophylax)’da İki Amfibi Patojeni (*Batrachochytrium dendrobatidis*, Ranavirüs) Yaygınlığının Saptanması, XII. Ulusal Ekoloji Ve Çevre Kongresi, Muğla.
- Erişmiş U C, Yoldas T, 2017, Presence Of The Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Populations Of The Critically Endangered Frog *Rana holtzi* in Bolkar Mountains, Turkey, Viii. International Symposium On Ecology And Environmental Problems, Çanakkale.
- Erişmiş U C, Yoldaş T, Uğuz C, 2019, Endemik Beyşehir Kurbağası (*Pelophylax caralitanus*)’nda *Batrachochytrium dendrobatidis* ve Ranavirus ile Ko-enfeksiyon Yaygınlığının Araştırılması, Acta Aquatica Turcica, 240–247.
- Korcan S E, Yoldas T, Agyar P, Erişmiş U C, Pat F, 2014, Amfibilerde Azalma Nedeni İki Patojeni (*Batrachochytrium dendrobatidis* ve Ranavirus)’in Durumuyla İlgili Türkiye’de İlk Kayıtlar, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir.
- Yoldas P A, Yoldas T, Sipahi N, 2020, Cytotoxicity of Some Retail Food Supplements in the Market, International Journal of Traditional and Complementary Medicine Research, 1, 131–136.
- Yoldas T, Cengiz Erismis U, 2021, Response of Anatolian Mountain Frogs (*Rana macrocnemis* and *Rana holtzi*) to Freezing, Anoxia, and Dehydration: Glucose as a Cryoprotectant, Cryobiology, 98, 96–102. (Doktora Tezinden Üretilmiştir)

Diğer Konular : Sertifika ve Eğitimler

1. Eğitim Sertifikası, Deney Laboratuvarları için Metot Validasyon/Verifikasyon Eğitimi, Deney Laboratuvarları için Ölçüm Belirsizliği Eğitimi, Düzce Üniversitesi (DÜBİT), Sertifika, 24.05.2019 (Ulusal)
2. Eğitim Sertifikası, TS EN ISO/IEC 17025:2017 Standart Eğitimi, TS EN ISO/IEC 17025:2017 İç Tetkik Eğitimi (TS EN ISO 19011:2018 Standart Tabanlı), Deney Laboratuvarları için Risk Analizi Eğitimi (ISO 31000:2018), Düzce Üniversitesi (DÜBİT), Sertifika, 22.05.2019 - 23.05.2019 (Ulusal)
3. Katılım Sertifikası, Güvenli Çalışma Sempozyumu kapsamında Güvenli İskele ve Yangından Korunma Eğitimi, Düzce Üniversitesi, Sertifika, 22.03.2019 (Ulusal)
4. Eğitim Sertifikası, QIAGEN, QIAcubeQIAGEN, Rotor-Gene QIAGEN, QIAxcelSensQuest, Lab Cycler 96QIAGEN, QIAxpertQIAGEN, Tissue LyserCihaz eğitimleri, ATQ biyoteknoloji, Sertifika, 26.12.2017 (Ulusal)
5. Eğitim Sertifikası, PERKINELMER TM HS 40 Trap cihaz Eğitimi, Düzce Üniversitesi, Sertifika, 03.05.2017 (Ulusal)
6. Eğitim Sertifikası, PERKINELMER ICP-OES AVİO Cihaz eğitimi, Düzce Üniversitesi, Sertifika, 27.04.2017 (Ulusal)
7. Eğitim Sertifikası, Thermo Scientific X Series II Model ICP-MS Cihaz Eğitimi, Düzce Üniversitesi, Sertifika, 17.11.2016 - 20.11.2016 (Ulusal)
8. Eğitim Sertifikası, Thermo Scientific Marka ICS 5000 Model İyon Kromatografi cihazı Eğitimi, Düzce Üniversitesi, Sertifika, 13.10.2016 - 16.10.2016 (Ulusal)
9. Eğitim Sertifikası, Thermo Scientific Marka Flash 2000 Model Elemental Analiz Cihazı Eğitimi, Düzce Üniversitesi, Sertifika, 05.09.2016 - 08.09.2016 (Ulusal)
10. Eğitim Sertifikası, Metod Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Eğitimi, Düzce Üniversitesi (DÜBİT), Sertifika, 16.06.2016 - 17.06.2016 (Ulusal)
11. Eğitim Sertifikası, TS EN ISO/IEC 17025:2012 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği İçin Genel Şartlat Standart Eğitimi, Düzce Üniversitesi (DÜBİT), Sertifika, 18.02.2016 - 19.02.2016 (Ulusal)
12. Eğitim Sertifikası, TS EN ISO/IEC 17025:2012 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği İçin Genel Şartlat Standardı İç Denetçi Eğitimi, Düzce Üniversitesi (DÜBİT), Sertifika, 08.02.2016 - 09.02.2016 (Ulusal)

13. Katılım Sertifikası, Turnitin Palagiarism, Düzce Üniversitesi, Sertifika, 10.12.2015 - 10.12.2015 (Ulusal)
14. Eğitim Sertifikası, Shimadzu MarkaHPLC, UV, FTIR, TGA, DSC, TOC Cihazları eğitimi, Düzce Üniversitesi, Sertifika, 08.06.2015 - 12.06.2015 (Ulusal)
15. Katılım Sertifikası, Uygulamalı Filogenetik Analiz Eğitimi, Biyans Biyoakademi, Sertifika, 25.04.2015 - 26.04.2015 (Ulusal)
16. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Deney hayvanları kullanımına ilişkin teorik ve uygulamalı dersler., Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Sertifika, 06.01.2014 - 12.01.2014 (Ulusal)
17. Katılım Sertifikası, Biyoloji ve Ekoloji Alanlarında Proje Hazırlama ve Uygulama Eğitim Etkinliği, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sertifika, 20.11.2013 - 22.11.2013 (Ulusal)
18. Katılım Sertifikası, Genetik Çalışmalarda Biyoinformatik Uygulamalar: Genom Veri Bankaları ve DNA Dizi Analizi Programları, TÜBİTAK MAM, Sertifika, 08.10.2012 - 12.10.2012 (Ulusal)