

**OVA KURBAĞASI (PELOPHLAX RIDIBUNDA)' NIN KRİYOBİYOLOJİSİ
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Ayşe Nur GÖKMEN

Yüksek Lisans Tezi

DANIŞMAN: Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ
Afyonkarahisar

AFYONKOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSİTÜSÜ
MEDİKAL BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

OVA KURBAĞASI (PELOPHLAX RIDIBUNDA)' NİN KRİYOBİYOLOJİSİ
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Hazırlayan
Ayşe Nur GÖKMEN

Danışman
Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

AFYONKARAHİSAR

Bu tez Çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPK)

Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: "19.SAĞ.BİL.15"

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anabilim Dalı MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK Anabilim Dalı'nda. AYŞE NUR GÖKMEN Tarafından Hazırlanan “**Ova Kurbağası (*Pelophlax ridibunda*)’ nın Kriyobiyolojisi Üzerine Araştırmalar**”Adlı Tez Çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Ve Sınav Yönetmeliği'nin İlgili Maddeleri Uyarınca 22 / 07 / 2022 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Tarafından **Oy Birliği** İle **YÜKSEK LİSANS TEZİ** Olarak Kabul Edilmiştir

Başkan

Unvan,Ad,Soyad

İmza

Üye

Unvan,Ad,Soyad

İmza

Üye

Unvan,Ad,Soyad

İmza

Üye

Unvan,Ad,Soyad

İmza

Üye

Unvan,Ad,Soyad

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

..... /..... /..... tarih ve

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof.Dr.Esma KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

22 / 07 / 2022

İmza

Ayşe Nur GÖKMEN

ÖZET

OVA KURBAĞASI (PELOPHYLAX RIDIBUNDA)' NIN KRİYOBİYOLOJİSİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Bu çalışma, *Pelophylax ridibunda*' nın sıfırın altındaki sıcaklıklara maruz kaldığı kış dönemlerinde hayatta kalmasını sağlayan stratejileri inceledi. Bu bağlamda, bir kurbağa donma, anoksi ve dehidrasyona maruz kaldığında. kan, iskelet kası ve karaciğer dokusundaki glikoz seviyeleri, kas ve karaciğer dokusundaki su miktarı, vücut ağırlığındaki değişiklikler ve amfibi antifriz proteinlerinin transkriptlerinin (AFP; Fr10, Li16 ve Fr47) ekspresyon seviyesi, incelendi.

Soğuğa maruziyette *P. ridibunda* kan glikoz seviyesinde 2,54 kat (1,96'den 4,98 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ 'ye) yukarı yönlü regülasyon gösterdi. Karaciğer dokusu glikoz düzeylerinde donma, anoksi ve dehidrasyon maruziyet gruplarında sırasıyla; 6,5 kat (ortalama 18,4 $\mu\text{mol g}^{-1}$), 4,63 kat (ortalama 12,9 $\mu\text{mol g}^{-1}$) ve 2,8 kat (ortalama 7,84 $\mu\text{mol g}^{-1}$) yukarı yönlü regülasyon görüldü. Stres ve normalizasyon koşulları altında bazı AFP'lerde gen ekspresyon seviyelerinde önemli değişiklikler tespit edildi. *P. ridibunda* karaciğer dokusunda tüm stres ve normalleşme gruplarında Fr47 geni artmıştır. Soğuğa mağruziyette 1,430 kat, soğuğa mağruziyet normalleşmesi çözünme grubunda 1,618 kat, anoksi stresinde 0,862, anoksia normalleşmesi reoksia grubunda 0,47 kat, dehidrasyon mağruziyetinde 1,480, dehidrasyon normalleşmesi olan rehidrasyon grubunda 1,218 kat artmıştır.

Çalışma sonucumuz Afyonkarahisar ilinden toplanan *P. ridibunda* türünün donma noktasının altında sağ kalabildiğini ve sağ kalımını sağlayan en büyük faktörün kriyoprotektan olan glikoz ve kurbağaya özgü AFP'lerin varlığının olduğu kanıtlanmıştır. AFP'lerin genomik, transkriptomik ve proteomik araştırmalarının biyoinformatiği üstüne yoğunlaşılması, AFP'lerin buz kristallerine bağlanma ve test etme mekanizmalarının aydınlatılmasının sağlanmasıyla biyoteknoloji alanında faydalı gelişmeler sağlanacaktır.

Anahtar Kelimeler: Donma toleransı, Kriyobiyoloji, Glikoz, Antifriz proteinler, Biyoteknoloji, Biyoinformatik.

ABSTRACT

RESEARCH ON THE CRYOBIOLOGY OF THE PLAIN FROG (*PELOPHYLAX RIDIBUNDA*)

This study examined the strategies that ensured the survival of *Pelophylax Ridibunda* during winter periods when exposed to sub-zero temperatures. In this regard, when a frog is subjected to freezing, anoxia and dehydration. Glucose levels in blood, skeletal muscle and liver tissue, amount of water in muscle and liver tissue, changes in body weight, and expression level of transcripts of amphibian antifreeze proteins (AFP; Fr10, Li16 and Fr47) were examined.

During freezing, a 2.54-fold increase in blood glucose level (from 1.96 to 4.98 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) was recorded in *P. Ridibunda*. In the freezing, anoxia and dehydration groups, glucose levels in liver tissue were 6.5 times (mean 18.4 $\mu\text{mol g}^{-1}$), 4.63 times (mean 12.9 $\mu\text{mol g}^{-1}$) and 2.8 times (mean 7.84 $\mu\text{mol g}^{-1}$), respectively. Significant changes in gene expression levels of some AFPs were noted under stress and normalization conditions. The fr47 gene was increased in all stress and normalization groups in liver tissue in *P. ridibunda*. Exposure to cold increased 1.430 times, cold exposure normalization increased 1.618 times in the dissolution group, 0.862 times in anoxia stress, 0.47 times increased anoxia normalization in the reoxya group, 1.480 times in dehydration exposure, and 1.218 times in the rehydration group with dehydration normalization.

As a result of our study, it has been proven that the Anatolian mountain frog *P. ridibunda* species collected from Afyonkarahisar can survive below the freezing point and the presence of cryoprotectant glucose and frog-specific AFPs are the biggest factors that ensure its survival. Concentrating on the bioinformatics of genomic, transcriptomic and proteomic research of AFPs and elucidating the mechanisms of binding and testing of AFPs to ice crystals will provide beneficial developments in the field of biotechnology.

2022, xiv + 165 pages

Keywords: Freeze tolerance, Cryobiology, Glucose, Antifreeze proteins, Biotechnology, Bioinformatics.



ÖNSÖZ

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı ve Afyon'da ikinci babamız olarak gördüğümüz tez danışmanım Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ'e, araştırma ve laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteğini esirgemeyen Düzce Üniversitesi Öğr. Gör. Taner Yoldaş ağabeyime, laboratuvar çalışmalarında laboratuvarlarını bize açarak yardımlarını esirgemeyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Medikal Biyoloji ve Genetik bölümündeki tüm hocalarıma, teşekkür ederim. Tez çalışmama 19.sağ.bil.15 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, araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı tüm aileme ayrıca teşekkür ederim.

Ayşe Nur GÖKMEN

Afyonkarahisar

2022

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET.....	i
SUMMARY.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Farklı Değişken Sıcaklıklarda Hayatta Kalma.....	7
1.1.1. Soğuk Sertleştirme.....	10
1.1.2. Donmadan Kaçınma Davranışı.....	11
1.1.3. Donma Toleransı Davranışı.....	11
1.1.3.1. Buz Çekirdeklenmesi	13
1.1.3.1.1. AQP.....	14
1.1.3.1.2. GLUT.....	16
1.1.3.1.3. INP.....	17
1.1.3.1.4. SCP.....	17
1.1.3.1.5. SORBİTOL.....	18
1.1.3.1.6. TREHALOZ.....	18
1.1.3.1.7	
Üre.....	19
1.2 Donma ve Normalleşme Döngüsünde Stres ve Mücadele	19
1.2.1. Dehidrasyon Stresi.....	21
1.2.2. Anoksi Stresi.....	22

1.2.3.	Metabolit	
Biriktirme.....		23
1.3.	Donma	Toleransı
Adaptasyonları.....		25
1.3.1. Hipometabolizma.....		25
1.3.1.1. Antioksidan Savunma.....		27
1.3.1.2. Şaperonlar.....		29
1.3.1.3.	Hipometabolizma	Genlerinin
Düzenlenmesi.....		30
1.3.2.		Kriyoprotektan
Biriktirme.....		35
1.3.2.1.		
Glikoz.....		37
1.3.2.2.		
Gliserol.....		40
1.3.2.3.		
Üre.....		41
1.3.2.3 Antifriz Proteinler.....		41
1.3.2.3.1. Antifreeze Proteinlerinin Biyokimyası.....		45
1.3.2.3.2.	Antifriz	Proteinler ve
Biyoteknoloji.....		47
1.3.2.3.2.1.	Kryomedisin	İçinde Antifriz Glikoproteinlerin
Uygulamaları.....		48
1.3.2.3.2.2.	Antifriz	Glikoproteinler ile Lipit Membran
Stabilizasyonu.....		50
1.3.2.3.2.3.	Katkı	Olarak Antifriz Glikoproteinler Kullanılarak
Virtifikasyon.....		51
1.3.2.4.	Günümüz	ve Gelecekte Antifriz
Proteinleri.....		53
1.3.3. Li16, FR10, FR47.....		58
1.3.3.1.		
FR10.....		58
1.3.3.2. Li16.....		59

1.3.3.3.						
FR47						60
1.3.3.4.	FR10,	Li16	ve	FR47	Proteinlerinin	
Biyoinformatiği						60
1.3.2.4.	<i>P.Ridibunda</i>					63
1.3.2.4.1.		Türkiye’de			<i>P.</i>	
<i>Ridibunda</i>						66
1.3.2.4.2.	Anadolu	Dağ	Kurbağalarının		Karşılaştığı	
Tehditler						67
2.		MATERYAL			VE	
METOT						71
2.1.	Saha	Çalışmaları	ve		Deney	
Grupları						71
2.2.	Deney Koşulları					74
2.2.1.		Donma			ve	
Çözünme						74
2.2.2.		Anoksi			ve	
Reoksi						75
2.2.3.		Dehidrasyon			ve	
Rehidrasyon						76
2.3.	Kurbağalardan Doku Örnekleri Alınması					78
2.4.	Vücut	Ağırlığı	Ve	Doku	Su	İçeriğinin
Ölçülmesi						79
2.5.		Glikoz			Miktar	
Tayini						80
2.6.	Antifriz		Proteinlerinin		Gen	
Ekspresyonları						81
2.6.1.	Total	RNA	İzolasyonu	ve	cDNA	Sentezi
Eldesi						82
2.6.2.		Ters	Transkriptaz		PCR	
Çalışması						85
2.6.3.						
Değerlendirme						86
2.6.3.1.2 ^{-(ΔΔCt)}	Metodu					87

2.7. İstatiksel Analiz.....	87
3.BULGULAR.....	88
3.1. Saha Çalışmaları.....	88
3.2. Donma ve Hayatta Kalma.....	89
3.3. Dokudaki Nem İçeriği ve Ağırlık Değişimi.....	91
3.4. Glikoz Tayini.....	92
3.4.1. <i>P.Ridibunda</i> Glikoz Konsantrasyonları.....	93
3.5. Gen Ekspresyon Sonuçları.....	95
3.5.2. RT-qPCR Sonuçları.....	95
3.5.2.1. <i>P.Ridibunda</i> Antifriz Proteinleri.....	95
4. TARTIŞMA	98
4.1. Donma ve Çözölmeye Karşı Fizyolojik Tepkiler.....	100
4.2. Dokulardaki Su Miktarı ve Vücut Ağırlığı.....	102
4.3. Kriyoprotektan Olarak Glikozun Durumu.....	104
4.4. Amfibi Antifriz Proteinleri.....	106
4.4.1. Li16 Gen Ekspresyonu.....	106
4.4.2.Fr10 Gen Ekspresyonu.....	109
4.4.3.Fr47 Gen Ekspresyonu.....	113
5. SONUÇ.....	115
6. KAYNAKÇA.....	120
7. ÖZGEÇMİŞ.....	165

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µmol	Mikromolar
°C	Santigrat derece
C	Ct değerleri arasındaki fark
ΔC	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
AFP	Antifriz protein
AMPK	Aktive edici protein kinaz
ATP	Adenozin trifosfat
cAMP	Siklik adenozin mono fosfat
Cdk	Siklin-Bağlı-Kinazlar
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
ISP	Buz şekillendirici protein
IUCN	Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği

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
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-qPCR	Ters transkriptas kantitatif PCR
SVL	Snout-vent length
UV	Ultraviyole



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1: Hücrenin AFP varlığında ve yokluğunda donma maruziyetinin sonuçlarının şematik gösterimi	21
Şekil 1.2: AFP'lerin buz kristallerine adsorbe olup gelişimini engelleme modeli. (i) AFP adsorbe olmadığında buz disk şeklinde büyümeye eğilimlidir. (ii) AFP'nin adsorbe olduğu bölgede buz gelişimi yavaşlar. (iii) Birçok AFP moleküller biraraya geldiğinde AFP molekülleri arasında buz oluşumu zorlanır ve buz yüzeyi oluşumu engellenerek sabitlenir.....	26
Şekil 1.3: Soğuk maruziyetinde korunan ve korunmayan hücreler.....	35
Şekil 1.4: <i>R. sylvatica</i> 'nın 4 ve -2,5°C sıcaklıklarında donma ve çözünme döngüsü	36
Şekil 1.5: Her aşamayı düzenleyen Cdk ve siklin çiftlerini gösteren hücre döngüsünün dört aşaması. Siklin: Cdk kompleksinin kinaz aktivitesi, her fazın ilerlemesini ve tamamlanmasını düzenleyen substratları aktive eder.....	37
Şekil 1.6: Glikojen metabolizmasının kontrolü ve glikoz homeostazının moleküler mekanizmaları.	42
Şekil 1.7: Omurgalı metabolizmasının özeti.....	48
Şekil 1.8: Hücrelerin glikojenden glikoz oluşturduğu glikojenoliz işlemi.....	52
Şekil 1.9: Karaciğer, kas ve kan dokusunda glikoz döngüsü ve taşınma yolağı	58
Şekil 1.10: Termal Histerizisde sıcaklık azaldıkça basınç artmalıdır.	59
Şekil 1.11: AFP 'nin buz kristali yüzeyine bağlanması	60
Şekil 1.12: FR10, Li16 ve FR47 proteinlerinin 3B yapıları ve hücre zarı etkileşim modelleri.....	62
Şekil 1.13: Ridibunda dağılım haritası.....	81
Şekil 2.1: Arazi çalışmalarından alınmış resimler.....	82
Şekil 2.2: Laboratuvara getirilen numuneler, deneysel çalışma öncesinde en az 3 hafta beslenmeden +5°C'de tamamen karanlıkta tutulur.	83
Şekil 2.3: Hayvanların deneysel koşullara maruz bırakmadan önce SVL ölçümleri yapılması.	84
Şekil 2.4: Donma koşullarının oluşturulması için -2.5 °C' ye ayarlanmış inkübatör.	87
Şekil 2.5: Donma stresi hazırlık sürecinde hayvanlara sabitlenen termokupl	88
Şekil 2.6: Anoksi deneyi	89

Şekil 2.7: Anoksia işlemlerine maruz kaldıktan sonra normal nefes almalarına izin verilen örnekler.....	90
Şekil 2.8: Dehidrasyon ve Rehidrasyon deneyi..	91
Şekil 2.9: Kan ve dokudan örnek alınarak etiketli tüplere ve sıvı nitrojen tankına aktarımı.....	92
Şekil 2.10: Hassas terazi ile soğuğa maruziyet sonrası ağırlık ölçümü.	93
Şekil 2.11: Kan, karaciğer ve kas dokularından alınan örneklerle yapılan glikoz ölçümü..	93
Şekil 2.12: RNA ekstraksiyonu resimleri.....	94
Şekil 2.13: cDNA eldesi basamakları resimleri..	94
Şekil 2.14: Nanodrop ölçümleri..	95
Şekil 2.15: RT-PCR aşamaları..	95
Şekil 3.1: Ağustos ayı için Raporlanan sıcaklıkların günlük aralığı (gri çubuklar) ve son 24 saatlik yüksekler (kırmızı işaretler) ve düşükler (mavi işaretler), günlük ortalama yüksekler (açık kırmızı çizgi) ve düşük (açık mavi çizgi) sıcaklıkların 25'likten 75'lik yüzdelik aralığına ve 10'luktan 90'lık yüzdelik aralığı üzerine yerleştirilmiş hali	98
Şekil 3.2: Eylül ayı için raporlanan sıcaklıkların günlük aralığı (gri çubuklar) ve son 24 saatlik yüksekler (kırmızı işaretler) ve düşükler (mavi işaretler), günlük ortalama yüksekler (açık kırmızı çizgi) ve düşük (açık mavi çizgi) sıcaklıkların 25'likten 75'lik yüzdelik aralığına ve 10'luktan 90'lık yüzdelik aralığı üzerine yerleştirilmiş hali	99
Şekil 3.3: Donma sonrası kurbağaların genel görünüşü.....	101
Şekil 3.4: Donma Çözünme sürecinde <i>P.Ridibunda</i>	102
Şekil 3.5: Donma sırasında datalogger verilerinin kayıtlarına ait bir örnek. İşaretli bölge ekzoterm noktasının gerçekleştiğini göstermekte ve yaklaşık 90. dakikaya denk gelir.....	110
Şekil 3.6: <i>P.Ridibunda</i> 'nın stres koşulları öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarındaki değişim	111
Şekil 3.7: <i>P.Ridibunda</i> 'nın iskelet kası ve karaciğer dokusu su miktarı.....	101
Şekil 3.8: Stres koşulları altında kan glikoz seviyesi.	102
Şekil 3.9: Stres koşulları altında karaciğer glikoz seviyesi.....	110
Şekil 3.10: Stres koşulları altında kas glikoz seviyesi.	111
Şekil 3.11: Kan rt-PCR.	101
Şekil 3.12: Kas rt-PCR.....	102

Şekil 3.13: Karaciğer rt-PCR.	10
---	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1: Ektotermik hayvanlarda donma sürecindeki hayatta kalmalarına göre sınıflandırılması	16
Çizelge 2.1: <i>P.Ridibundus</i> türleri için planlanan maruziyet grupları tablosu.	63
Çizelge 2.3: RT-q PCR reaksiyon karışım oranı ve döngü koşulları.	76
Çizelge 2.4: fr47,li16,fr10 ve α -tubulin.....	76
Çizelge 3.1: Tablodaki veriler her grup (n=4) için ortalama $\pm$ s.e.m olarak verilmiştir. Vücut ağırlığı verilerinin olduğu satırlar (önce ve sonra) Wilcoxon Signed-Ranks Test ile karşılaştırılmıştır (P<0.05).....	78



1.GİRİŞ

Canlılar bir çok biyotik ve abiyotik değişim ve maruziyetlere maruz kalırlar. Maruziyet stresleri organizmaların beslenmelerini, gelişimlerini, morfolojilerini ve üremeleri gibi bir çok hayati fonksyonlarını etkilemektedir. Streslerin başında sıcaklık değişimleri gelmekte olup bir çok omurgalı bu stresle başa çıkamaz, fakat bazı omurgalılar soğuk stresi için stratejiler geliştirmiş olup donma sıcaklıklarından dahi sağ çıkabilmektedirler.

Donma, canlı organizmaların doğada karşılaşabileceği en şiddetli çevresel streslerden biridir. Birkaç istisna dışında, hücre içi buz oluşumunun, neden olduğu ciddi yapısal ve metabolik hasar nedeniyle hücreler için her zaman ölümcüldür. Dünya'nın mevsimsel olarak soğuk bölgeleri sebebiyle organizmalar, hücre dışı sıvıların donmasına karşı direnç kazanmıştır. Birçok böcek ve diğer omurgasızların yanı sıra bazı amfibiler ve sürüngenler, toplam vücut suyunun %70'ini hücre dışı buza dönüştürerek günler veya haftalarca hayatta kalabilir (Storey, 1996). Ilıman iklimlerde donan kış sıcaklıkları birçok hayvan türü için sorunlara neden olur. Vahşi doğada, memeliler, kuşlar ve benzeri endotermik hayvanlar, soğukun mevsimsel etkilerine kısmen uyum sağlamıştır. Yüksek metabolik hızları ve endotermik yapıları, genellikle yeterli olmayan büyük miktarlarda besin gerektirir. Bu nedenle; ya daha sıcak ve daha fazla gıdanın bulunduğu yerlere göç davranışı sergilerler ya da metabolik hızlarını düşürüp stabilize ederek hibernasyon gibi fiziksel baş etme mekanizmalarını geliştirmeleri gerekir (Green, 2017).

Tropikal hayvanlarda uzun süreli soğuğa maruz kalma, endotermik hayvanlardan daha tehlikelidir. Birçok soğukkanlı organizma göç etme yeteneğine sahip olmadığından, donmayı tolere etmeye meyilli olmalıdırlar. Karadaki termofilik kurbağalar vücut sıcaklıklarını ortam sıcaklığına göre artıramazlar, bu nedenle metabolizma hızlarını indirmek zorundadırlar (PincheiraDonoso vd., 2013; Green, 2017). Metabolik hızı azalır ve ekofizyolojik adaptasyon mekanizması aktifleşerek, donma sıcaklıklarında hayatta kalma şansları artmaktadır. Dondurucu soğuk iklime maruz kalmasına rağmen hayatta kalabilen türler, donmaktan kaçınır veya vücut sıvılarının büyük kısmını donmuş halde bırakır. Bu türler, donma oluşumunu önleyen veya geciktiren kriyoprotektanlar olarak düşük moleküler ağırlıklı karbonhidratları biriktirir (Ultsch, 2006; Green, 2017).

Donmayı önlemek için bu canlılar, okyanus gelgitlerinin, karasal eklembacaklıların, omurgasızların ve göllerin dibinde kışlayan hayvanların sık olduğu bölgelerde bulunur. Birçok su kurbağası ve deniz kaplumbağası türü de kışın soğuğuyla başa çıkmak için bu stratejileri rutin olarak kullanır (Tattersall ve Ultsch, 2008). Kışlarını karada geçiren bazı türlerin yuva yapması, sürüngenlerin soğuktan kaçarak yer altı barınaklarına gitmesi gibi davranışlar donmayı önlemede onlara destek olur. Bazı böcek türleri, gliserol formunda kriyoprotektanları biriktirerek sıfırın altındaki çok düşük sıcaklıklarda bile donmayı tamamen önleyebilir. Organizmanın donma noktasını çevresel koşullara göre ayarlamasını sağlamak için vücutta antifriz metabolitleri ve proteinleri biriktirirler (Kelleher vd, 1987; Green, 2017). Donma koşullarından kaçınamayan bazı omurgalı ektotermik türleri, çoğu vücut sıvısının donmasını tolere etmek için adaptif bir mekanizma geliştirmiştir. Doğada donma toleransı söz konusu olduğunda vücut suyunun P-65 oranında hücre dışı buz olarak birikmesinden de anlaşılabileceği gibi burada amaç suyun büyük bir kısmını hücre dışı buz kristalleri halinde tolere ederek sıvı formu hücre içinde tutmaktır. Dayanıklılık, birçok böcek, bazı gelgitler arası deniz yumuşakçaları ve bazı karada kış uykusuna yatan amfibiler ve sürüngenler için tercih edilen bir kış stratejisidir (Steiner vd, 2000; Green, 2017; Storey, 2004a; Storey ve Storey, 2017).

Donma toleransı önemli bir stres adaptasyon mekanizması meydana getirir. Bu stresler, (i) buz kristali oluşumuyla hassas dokularda fizyolojik hasar, (ii) suyun hücrelerden hücre dışı buz kütlelerine akışının neden olduğu dehidrasyon, (iii) oksijen ve besin taşıyan kan akışının kesilmesine bağlı iskemi, (iv) Plazmanın donmasına bağlı akciğer, kalp ve kan hipoksik evreleri ve (v) nöronal sinyalleşmenin kesilmesi nedeniyle hayati süreçlerin durmasıdır. Donmaya dayanıklı hayvanlar, geri bildirim (çözülme) sürecinde de ortaya çıkan bazı sorunlarla uğraşmak zorundadır. (vi) oksijenli kanın ani reperfüzyonu nedeniyle reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve (vii) hücreler arası buzun çözünmesi nedeniyle su hücrelere girmeye çalıştığında oluşan ozmotik basınç şeklinde sıralanmaktadır. (McNally vd., 2003; Sullivan, 2008; Sullivan, 2011). Dondurulduklarında, bu hayvanların saptanabilir hiçbir yaşamsal belirtisi yoktur ve hayatta kalmaları, donmanın neden olduğu çoklu streslerle başa çıkabilecekleri stratejilere bağlıdır. Ağaç kurbağası *Rana sylvatica*, omurgalıların dondurucu hayatta kalmasını destekleyen biyokimyasal ve fizyolojik adaptasyonları incelemek için

kullanılan birincil model hayvandır (Storey, 2004). *Rana sylvatica* derisindeki gen ekspresyonunun PCR analizi, donmaya toleranslı bir omurgalıda donmaya duyarlı genlerin tanımlanmasına yönelik ilk verileri sağlamıştır. Varsayımsal olarak yukarı regüle edilmiş genler, Northern blot ile teyit edildi ve gen transkript seviyelerindeki değişiklikler, tipik olarak, organa özgü ekspresyon, ekspresyonda dondurma-çözülme değişiklikleri ve anoksiya ve dehidrasyona ekspresyon yanıtları dahil olmak üzere birçok yolla değerlendirildi. Bu termal toleransların, donma toleransının başarılı bir şekilde geliştirilmesinde önemli unsurlar olduğu önerisine yol açmıştır (Storey ve Storey, 1992).

Donmaya dayanıklı organizmalar, kriyoprotektanlar, antifriz proteinleri (AFP'ler) ve antioksidan enzimler yardımıyla kendilerini donmanın olumsuz etkilerinden koruyabilirler. Vücut sıvılarında yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanların birikmesi, vücudu donma hasarından korumada en önemli faktördür ve hücre içi buz kristali oluşumunun engellenmesine veya gecikmesine yol açar (Storey ve Storey, 2009; Sullivan, 2011). Düşük moleküler ağırlıklı kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonları, hücre hacminin azalmasını engelleyen yaşam döngüsüne logaritmik bir direnç sağlar ve hücre içi buz oluşumuna karşı makromolekülleri stabilize eder. Buz, deri ve iskelet kasına benzer periferik bölgelerin donarak iç organlara doğru hareket etmesiyle oluşur. Karaciğerde üretilen ve kanda dağılan kriyoprotektanların birikmesi, oluşan buz miktarını azaltır. Bu nedenle sıcaklık düşmeye başladığında glikoz seviyeleri hızla yükselir ve tüm organlara dağılır (Storey ve Storey, 2005).

PAG'ler mikroorganizmalardan, bitkilerden, sürüngenlerden, balıklardan ve amfibilerden elde edilebilir. Antikoagülan protein adsorpsiyonunun inhibisyonu, termal histereziste de etkilidir (erime noktasını düşürmeden donma noktasının düşmesi). Bu nedenle AFP, organ nakli, trombositlerin korunması, melanomun öldürülmesi, kriyocerrahi, hipotermi tedavisi, bazı bitki türlerinin mevsim etkilerinden korunması, donma noktasının düşürülerek gıdaların dondurulması, daha soğuk sularda sıcak su balıklarının yetiştirilmesi ve donmuş sularda kullanılmaktadır (Griffith ve Ewart, 1995; Duman, 2015; Tejo vd., 2020). AFP çalışmalarında balıklar en çok çalışılan takson olup, bunların AFP'leri; AFP tip 1, AFP tip 2, AFP tip 3 ve AFP tip ve antikoagülan glikoprotein (AFGP) olarak sınıflandırılmaktadır (Yıldırım, 2008). Amfibi genleri Fr10, Fr47 ve Li16'nın donma toleransı ile ilişkili olduğu bilinmektedir, sadece amfibilerde

bulunur, Fr10, Fr47 ve Li16 genleri, donma, hipoksi ve dehidrasyon koşulları altında vücut dokularını ve hücrelerini korumada aktif rol oynar. (Storey ve Storey, 2013)

Birçok sürüngen belirli sıcaklık aralıklarında kısa süreli donmayı tolere edebilirken, bazı kaplumbağa ve kertenkelelerin uzun süreli donma düşük sıcaklıklarına maruz kalmayı tolere edebildiği bilinmektedir (Ultsch, 2006; Storey ve Storey, 2017). Yerin üstünde ve kışı yaprak katmanlarında veya yüzeye yakın yerin altında kış uykusuna yatan, dona dayanıklı amfibilerde görülür. *Rana sylvatica* ve *Pseudacris cross* gibi bazı türler sistemik donmayı tolere edebilir (Storey vd., 1992). Semenderlerde don toleransının yaygın olmadığı göz önüne alındığında, ayrıntılı çalışmalar yapılmamıştır. Sibirya semenderleri (*Salamandrella keyerlingii*) ve Schrenck semenderleri (*Salamandrella schrenckii*), 30 °C gibi olağandışı donma sıcaklıklarına dayanabilir (Berman vd., 2010; Berman ve Meshcheryakova, 2012).

Hücre dehidrasyonu, iskemi ve/veya hipoksi donmanın iki sonucudur. Donma sırasında kısmi dehidrasyon veya kısıtlı su erişimi durumlarında, bazı amfibiler dokularını ve organlarını bu streslerin zararlarından koruyan glikoz, gliserol ve üre gibi moleküllerin konsantrasyonlarını hızla artırır. Anoksik işlemlere yanıt olarak, anaerobik optimizasyon ile adenosin trifosfat (ATP) üretimi sağlanır. Böylece, donmaya dayanıklı kurbağalardaki glikoz ve laktat seviyeleri, hipoksik ve/veya hipoksik koşullar altında arttı. Hücreler, kriyoprotektan moleküllerden elde ettikleri anaerobik enerjiyi üretmek için endojen yakıtı ihtiyaç duyarlar (Storey ve Storey, 2004). Bu proteinler şu anda tıbbi, gıda ve endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır ve balıklarda ve bazı bakteri, bitki ve böcek türlerinde yüksek moleküler ağırlıklı dondurma hızlandırıcılarında bulunur. AFP, buz kristallerinin büyümesini önler ve bu izleme yoluyla donma hasarına karşı direnç sağlar. AFP'nin minimolar ve hatta nanomolar konsantrasyonu, vücut büyümesini önler, bu nedenle bazı kaynaklarda Buz Oluşturan Protein (ISP) olarak adlandırılmaktadır (Bektaş ve Altıntaş, 2007).

Geçtiğimiz on yıl içinde antifriz glikoproteinleri, birçok endüstriyel, ticari ve tıbbi uygulama için muazzam potansiyel göstermiştir. Bununla birlikte, bu tür bileşiklerin ticarileştirilmesi sınırlı olduğundan, bu tür bileşiklerin ticarileştirilmesi yalnızca doğal AFGP elde etmek için zaman alıcı ve pahalı derin deniz kutup balıklarından izolasyon ve saflaştırma sürecini içerdiğinden, bu uygulamaların fiilen gerçekleştirilmesi hala çok

uzaktır (Bouvet ve Ben, 2003). Elli yıldır tanımlanmış olmasına rağmen, fiziksel aktiviteleri hala bir tartışma konusudur (Tas vd., 2022). Ne yazık ki, seri üretim ve ticari uygulamalar için uygun değildir ve bu nedenle AFGP ve AFGP analoglarının kimyasal sentezi çekici bir alternatiftir (Bouvet ve Ben, 2003). Bir AFP'nin kullanımının sadece immünojenik reaksiyonlar nedeniyle sınırlı olması durumunda, AFP'nin çözülme sonrasında tam olarak çıkarılmasını sağlamak için tekniklerin araştırılması ve ayrıca immünosupresanların birlikte uygulanmasının etkisinin değerlendirilmesi önerilir. AFP toksisitesinin üstesinden gelmek için bir başka güçlü strateji, AFP kullanan organizmalarda doğal olarak nasıl metabolize edildiğini ve elimine edildiğini incelemektir. Bu, bu işlemin nasıl simüle edileceğine veya AFP kullanımının yalnızca bu tür metabolik reaksiyonları gerçekleştirebilen sistemlerle nasıl kısıtlanacağına dair bilgiler sağlayabilir. AFP'lerin denatüre edilmesini önlemek için uygun optimal koşullar hakkında daha fazla araştırma yapılması da teşvik edilmektedir (Ekpo vd., 2022).

Bu buz bağlayıcı proteinler (IBP'ler) tarafından paylaşılan farklı buz bağlama özelliği, buz adsorpsiyonu ile saflaştırmalarını kolaylaştırdı ve IBP'lerin rekombinant versiyonlarını oluşturma yeteneği, yapısal karakterizasyonlarına ve saha kullanımı bant ilişkilendirme haritalamasına izin verdi. Bölgeye yönelik mutajenez Buz ilişkileri için bir hipotez, buz bağlama bölgesinin, buz-dondurucu proteinlerinkine benzer bir modelde yüzey suyunu değiştirmesidir. Şimdi, hızla genişleyen genomik dizi veritabanlarına erişimle, gen duplikasyonu ve ayrışması yoluyla bazı balık AFP'lerinin kökenini izlemek ve hatta AFP geninin bir türden diğerine yatay transferini göstermek mümkündür. AFGP varyantının (Davies, 2022), hRBC model membranı ile gelişmiş bir etkileşime sahip olduğu bulunmuştur, bu da hücre zarını stabilize etme yeteneğinin, donmadan sonra hücrelerin hayatta kalmasını iyileştirmede bir başka önemli faktör olduğunu düşündürmektedir. Yeni sentetik kriyoprotektanlar tasarlanırken bu bilgi dikkate alınmalıdır (Yuling Sun vd., 2022).

Bu AFGP'ler ayrıntılı olarak tarif edilecek ilk antifriz polipeptidleri olmasına rağmen, etki mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir. AFP'lerin birkaçının yapı-işlev ilişkilerini anlamaya yönelik kaydedilen önemli ilerlemeyle çalışmaktadır. Bu ilerleme eksikliği, büyük ölçüde kan plazmasında bulunan sayısız AFGP izoformunun yapısal karmaşıklığından ve yeterli miktarlarda saf malzemenin izole edilmesinde ortaya çıkan zorluklardan kaynaklanmaktadır. Buna ek olarak, hücre hatlarının kullanılması yoluyla

saf AFGP üretme girişimleri henüz başarıya ulaşmamıştır. Son yapılan çalışmalarda buz kristallerinin büyümesini teşvik etme olgusu evrensel değildir. Yalnızca hiperaktif AFP'ler (hypAFP' ler) bazal buz düzleminin büyümesini teşvik edebilirken, orta derecede aktif AFP' ler yapamaz. Bu zorlukların ışığında, kimyasal sentezin, ayrıntılı yapı-fonksiyon çalışmaları için yeterli miktarlarda saf AFGP üretmenin tek geçerli yolu olabileceği görülmektedir. (Feeney, 1994; Ben, 2001; Bush, 1984, 232, 624; Cui vd., 2022; Rao, 1987; Knight, 1993; Drewes,1993; Feeney,1998; Lane, 2000; Harding,1999;Wu, 2001)

Türkiye, birçok hayvan türünün bulunduğu subtropikal bir iklime ve yılın dört mevsiminin görüldüğü zengin coğrafi konuma sahiptir. Sonbahar ve kış aylarında, birçok bölgede sıfırın altındaki sıcaklıklar hakimdir. Anadolu'da bu iklim koşullarında omurgasızlar ve omurgalılar yaşayabilmektedir. Amfibiler bu duruma örnektir. Toprak, su, kaya veya buz blokları altında yaşayan amfibilerin hayatta kalmasını garanti eden faktör, buz kristallerinin oluşumunu ve büyümesini küçülten ya da engelleyen antifrizler olmalıdır. Amfibilerde kriyoprotektanlar dünyanın birçok yerinde birçok araştırmacı tarafından çalışılmış olmasına rağmen, Türk amfibilerinde bu konuda daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır (Yoldaş, 2021).

Anadolu dağ kurbağalarının aktif dönemi genel olarak Mayıs ayından Ekim ayına kadar sürer (Yoldaş, 2021). Ülkemizde ova kurbağası, bataklık kurbağası olarak adlandırılan, *Rana ridibunda* olarak da bilinen *Pelophylax ridibundus*, ilk olarak Orta ve Güney Avrupa ile Batı Asya'da yaygın olarak yayılım gösteren Kazakistan'ın Guryev kentinde tanımlanmıştır. Bern Sözleşmesi'nde (Yaban Hayatı ve Doğal Habitat 2006 Avrupa Sözleşmesi) ve IUCN En Az Önem Arz Eden (LC) Listesi'nde listelenmiştir. (1.İnt.Kyn.). Avrupa ve Asya (uluslararası) gibi geniş alanlarda küresel olarak yayılım gösteren bu tür, ülkemizin Marmara, İç Anadolu, Karadeniz, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde bulunmaktadır Aktivasyon dönemi Şubattan Kasım ayına kadardır. Yayılma aralığı 0*2500 metredir (Atatür ve Göçmen, 2001; Baran, 2006). IUCN Kırmızı Listesinde LC (Least Concern) olarak sınıflandırılmasına rağmen, nüfusu artma eğilimindedir. Anadolu'da (Türkiye) *P. ridibundus*'un dağılımı, morfolojisi, serolojisi ve popülasyon büyüklüğü ile ilgili çalışmalar farklı araştırmacılar tarafından yapılmıştır (Arıkan, 1988; Baran vd., 1992; Atatürk vd., 1999; Kumlutaş vd., 1999; Sinsch ve Schneider, 1999; Kaya ve Erişmiş, 2001; Tosunoğlu vd., 2005; Ayaz

vd., 2007). *Pelophylax ridibundus*' un bazı popölasyonlarındaki düşüşten drenaj ve kentleşme sorumludur. Ayrıca ısı toleransı, sıcaklığa özgü büyüme oranları ve termofilik gibi çeşitli özellikleri ile kirliliğe en dayanıklı amfibilerden biridir (Skelly ve Freidenburg, 2000).

P. Ridibunda kış uykusu döneminde iklim verileri göz önüne alındığında kış koşullarında donma sıcaklıklarına maruz kalmaktadır. Bu koşullara karşın hayatta kalabilme mücadelesi sergileyebilmeleri için stratejiler geliştirmeleri gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu bilgilerden yola çıkılarak *P. Ridibunda* türlerinin donma, dehidrasyon, hipoksi ve benzeri ekstrem koşullar altında ekolojik, biyokimyasal, adaptif ve hayatta kalma stratejileri incelenmiştir. Bu çalışmalardan yola çıkılarak karaciğer, iskelet kası ve kandaki glukoz düzeylerindeki değişimler incelenmiş, vücut SVL'si ve ağırlık değişimi stres öncesi ve sonrası izlenmiş ve kontrol grubu deneyimi ile karşılaştırılmıştır. AFP değerlendirmesi (FR10, FR7 ve Li16) için indüklenen donmuş, hipoksik, susuz ve stres sonrası normalleştirilmiş gruplardaki değişiklikler RTqPCR ile mRNA transkript seviyelerinde ve *P. Ridibunda* 'nın yüksek derecede don şeklinde bir kriyoprotektan olarak glikoz kullanıp kullanmadığı incelendi. Esas olarak, hayvanlarda gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikleri incelemek için dondurucu kış koşullarında hayatta kalma ve ölüm stratejilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

1. Farklı Değişken Sıcaklıklarda Hayatta Kalma

Farklı stress koşullarında hayatta kalmak için organizmalar uyarlamalara sahiptir. Bazıları, aşırı sıcak ve kurak koşullarda, osmotik düzenlemeyi düzenler veya erişilemez olduklarından morfolojik yapılarında değişikliklere neden olarak hayatta kalmalarını sağlarlar veya yeterli su ve oksijen sağlarlar. Kızgınlık döneminde (yaz uyku hali), azalmış metabolik hız, ısı şoku proteini (HSP) kullanımı ve antioksidanlar gibi birçok metabolik adaptasyon rol oynar. Organizmalar ayrıca aşırı soğukta hayatta kalmak için stratejiler geliştirmiştir. (HermesLima ve ZentenoSavín, 2002; Robert, 2003; Kontaş Aşkar vd., 2007; Storey ve Storey, 2011; HermesLima vd., 2015; Liu vd., 2018; Wu vd., 2018).

Soğuğa toleranslı organizmalarda, soğuğa tolerans, belirli bir türün habitatında karşılaştığı sıcaklık ve maruz kalma süresi ile düzenlenir (AddoBediako vd., 2000). Kışın termal koşullar coğrafi faktörlere göre değişir. Ilıman bölgelerde, orman zeminli kurbağalar -5 veya -7 °C kadar düşük sıcaklıklarla karşılaşabilir (MacArthur ve Dandy, 1982; Schmid, 1982). Ayrıca, uzun süreli veya aşırı dondurma, dokular hiç donmasa bile yaralanmaya neden olabilir, (Costanzo vd., 2008) iyon homeostazının ve metabolik fonksiyonun bozulması ve oksidatif stresten kaynaklanan hasar dahil olmak üzere membranlardaki olumsuz lipid faz değişikliklerinden sorumlu olabilir (Lee, 2010; Macmillan ve Sinclair, 2011). Düşük sıcaklıklarda doku perfüzyonunun azalması laktat birikimine, hücre içi pH'ın düşmesine ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına neden olabilir, ancak soğuğa dayanıklı sürüngenler oksidatif stresi önleyebilir (HermesLima ve Zenteno Savín, 2002).

Tropik omurgalılar, özellikle karasal kış uykusuna yatanlar, 0°C'nin altındaki mevsimsel veya sürekli olarak soğuk bölgelerde yaşarlar. Vücut sıvılarının donma/erime dengesinin altında sıvı halde kaldığı hareketli bir durum olan süper soğutma, buz nedeniyle bakteriyel donma riskini sınırlamaya yardımcı olan anatomik ve davranışsal özellikler gibi soğuk travmasına karşı koruma sağlayan fizyolojik tepkiler tarafından yönlendirilir. Donma toleransı, sıcaklık ve zaman koşulları altında strese tepkiler geliştirir (Costanzo ve Lee, 2013).

Aşırı soğutmayı veya donmayı önlemek, donmadan kurtulamayan türler için bulunan iki ana hayatta kalma mekanizmasıdır. Birkaç istisna dışında, bunlar birbirini dışlayan stratejilerdir. Donmadan kaçınma, filogenetik, genetik ve ekolojik çeşitlilik ile geliştirilen temelde yeni bir yaklaşımdır (Sinclair vd., 2003). Başka bir donmadan kaçınma taktiği, soğuktan koruyucu dehidrasyon, küçük ısı salınımı durumlarında aşırı toleransa katkıda bulunan başka bir donmadan kaçınma taktiğidir (Holmstrup vd., 2002). Bazı amfibiler tarafından kullanılabilir, ancak omurgalılarda hala bilinmemektedir (Costanzo ve Lee, 2013).

Bir organizma ister dondan kaçınma ister tolerans stratejileri kullansın, buz çekirdeklerini kontrol etmeleri çok önemlidir. (Costanzo ve Lee, 1995; Costanzo ve Lee, 1996; Lee ve Costanzo, 1998). Dondan kaçınan türler, kışa hazırlanırken beslenmeyi bırakabilir ve bu da genellikle gastrointestinal donmaya neden olabilir (Lee,

2010). Amfibiler özellikle donmaya karşı hassastır çünkü buz, nemli derilerine kolayca nüfuz eder (Layne, 1991). Donmaya dirençli omurgalı kanında biyolojik olarak etkili INP'ler (buz bağlayıcı proteinler) bulunmasa da (Costanzo ve Lee, 1996), bu ajanların plazma zarı olarak hücresel yapılarla ilişkisi henüz incelenmemiştir (Izumi vd., 2006).

Soğuk kış ortamlarındaki soğukkanlı omurgalıların biyolojik çeşitliliği, sıcakkanlı omurgalılarınkinden nispeten daha düşüktür. Abiyotik faktörlerin donma koşullarında etkisiz kalması nedeniyle hayvanlar vücut sıcaklıklarını ve metabolizma hızlarını düşürmek için yetersiz koşullara uyum sağlayamadılar ve yeni kaslar geliştirmek zorunda kaldılar. (Garcia vd., 2018).

Dünyanın ılıman ve kutup bölgelerinde yaşayan karasal sıcaklıklar için kışın sıfırın altındaki sıcaklıklar, doğal yaşam süreçleri hücre içi buzla uyumlu olmadığı için ciddi bir tehdit oluşturuyor. Davranışsal stratejiler, bazı türlerin olumsuz maruziyetten kaçınmasına izin verir. Örneğin, kral kelebekleri Meksika'ya göç eder, çeşitli kurbağa ve kaplumbağa türleri su altında kış uykusuna yatar ve kurbağalar donma noktasının altında kalmak için zeminde bir metre derinliğe kadar inebilir. Bununla birlikte, birçok tür için, kış aylarında sıfırın altındaki sıcaklıklarda hayatta kalmak, soğuğa tahammül edebilmek için fizyolojik ve biyokimyasal adaptasyonlar gerektirir. Vücut sıvılarının donma noktasının (FP) altındaki sıcaklıklarda, su metastatik bir durumdadır ve sıcaklık düştükçe kendi kendine çekirdeklenme artar. Çoğu hayvanın vücut sıvısı FP'si (kriyokoruyucu önlemlerin yokluğunda), kara hayvanları için yaklaşık 05 °C'den, deniz suyuyla enerji dolu (1000 mosmol) adapte olmuş deniz hayvanları için 1,7 °C'ye kadar değişir. Daha düşük sıcaklıklarda hayatta kalmak üzere uyarlanmış donma toleransı içinde, hücre dışı sıvı bölmesindeki buz oluşumu tolere edilir, bu da vücut sıvılarının donma konsantrasyonuyla sonuçlanır, bu da geride hiçbir soğutma bırakmaz ve çekirdeklenmeye karşı kararlı bir hücre içi ortam veya yukarıda ölümcül in vivo buz oluşumu ile sonuçlanarak vücut sıvısının aşırı soğuk noktası (SCP), derin inhibisyonla engellenir (Storey ve Storey, 1988).

Sıfırın altındaki sıcaklıklara maruz kalmanın neden olduğu hücre hasarı iki tiptir: soğuk hasar ve donma. Soğuk algınlığı veya hipotermi, düşük sıcaklığın moleküllerin fiziksel özellikleri ve hız süreçleri üzerindeki etkisine dayanır (Islam ve Schulze-Makuch, 2007). Sıcaklığın zarlardaki lipidlerin yapısı, oryantasyonu ve hareketliliği üzerindeki

etkisi, zarlar arasında difüzyon ve taşınma üzerindeki etkileri, zara bağlı proteinlerin ilişkisi ve zarla ilgili metabolik yolların işlevidir (Hazel vd., 1992); 2) Sıcaklık farkı, protein yapısının daha yüksek seviyelerinin bozulmasına yol açan farklı zayıf bağlanma etkileşimleri sınıflarını etkiler ve hem bireysel protein/enzim fonksiyonunu hem de multienzim fonksiyonunu etkiler (Bock ve Frieden, 1978; Hatley ve Franks, 1986; Toborsky, 1979). Dielektrik geçirgenlik ve iyonik aktivitelerdeki değişiklikler (su için, sıcaklık değişim etkileri ile ayrışma sabitindeki değişiklikler, pKW, sıcaklık düştükçe hücresel pH'ı artırır); ve difüzyon süreçleri, aktif ve taşıyıcı aracılı taşıma, tek tek enzim aktiviteleri ve metabolik yolları dahil olmak üzere çeşitli hız prosesleri ve bozucu hücre fonksiyonları için farklı sıcaklık katsayıları vardır. Genel olarak, düşük sıcaklık yaralanmaları, metabolik regülasyonun, özellikle çok şiddetli veya uzun süreli olduğunda geri dönüşü olmayan ve ölümcül metabolik dengesizliklere yol açan hücresel enerjinin bozulmasından kaynaklanır. Donmadan kaynaklanan yaralanmalar, buz kristallerinin fiziksel hasarını ve yapısal / metabolik saf suyun buza dönüşmesini, donma konsantrasyonunun (yeniden muhafaza edilen sıvı bölmelerindeki konsantrasyonun çözeltiye uzaklaştırılması) sonuçlarını içerir. Bunların her ikisi de hücre içi yapı ve metabolik bölmelere zarar verir ve hücre içi donmayı ölümcül hale getirmek için birleşir. Bu aynı faktörler, donma hücre dışı bölmelerle sınırlı olduğunda da potansiyel olarak zararlıdır. Buzdan yapısal hasar (yeniden kristalleşme gerçekleştiğinde yoğunlaşır), donmamış hücre dışı çözeltinin dakika kanallarında hapsedilmiş hücrelerin distorsiyonunu ve deformasyonunu, hücre-hücre bağlantılarının bozulmasını ve kılcal damarlara verilen hasarı içerir (Mazur, 1984). Hücre dışı buz oluşumu sırasında donma konsantrasyonu, 1) suyun ve çözünen maddelerin hücre zarı boyunca hızlı bir şekilde yeniden dağıtılmasının neden olduğu ozmotik şok, 2) su çıkışının neden olduğu hücre hacminde kritik bir minimum hücre hacmi olduğunda bir azalmaya neden olabilir, zar yapısına zarar verir ve 3) kalan sıvı bölmelerdeki dehidrasyon ve yüksek çözünen seviyeleri (özellikle iyonlar), zar veya protein yapısı/işlevi üzerinde zararlı etkiye sahip alt hücre organizasyonuna sahip olabilir (Franks, 1985; Buchanan ve Storey, 1983; Mazur, 1984).

Hücre dışı donma sırasında ölümcüllüğün anahtar faktörleri hala tartışılmaktadır. Çeşitli hipotezler yapılmıştır. 1) Lovelock (1953); ölümcül yaralanmanın aşırı yüksek seviyelerde üretilen elektrolitlerden kaynaklandığını öne sürmüştür. Donmaya toleranslı hayvanlar ve dondurarak saklanmış hücreler için kanıtlanmış ve hala tartışılmaktadır (Williams, 1970; Mazur, 1984) . 2) Meryman (1974); hücrelerin yalnızca kritik bir

hücre hacmine küçülebileceğini ve daha fazla ozmotik stresin geri dönüşü olmayan şekilde zarar görebileceğini öne sürdü. Hem donmaya toleranslı hayvanlar hem de kriyoprezerve memeli hücreleri suyun % 65'i kadarının buza dönüşmesi sıklıkla gözlemlenen ölümcül sonuçları meydana getirir (Williams, 1970; Meryman, 1974; Zachariassen, 1985; Lee ve Levis, 1985). 3) Mazur (1984); hücre dışı sıvının donmamış fraksiyonunun kilit faktör olduğunu ve hücre dışı çözeltinin bileşimi veya donma sırasında hücre küçülmesinin boyutu olmadığını savunmaktadır.

1.1. Soğuk Sertleştirme

Soğuğa dayanıklılık için adaptasyonlar, düşük sıcaklıkta metabolik regülasyon ve homeostazi sürdürenler ve hücre yapısını/fonksiyonunu iç buz oluşumunun sonuçlarına karşı koruyanlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir (Storey, 1984). Hem donmaya toleranslı hem de donmaya duyarlı türler, olası üşüme yaralanmalarını telafi eden uyarlamalarla düşük sıcaklıklarda homeostazi sürdürme sorunlarına değinmelidir. Bu, hücresel işlemlerin optimal sıcaklık aralığını daha düşük bir ayara kaydırmak ve düşük sıcaklık işlevi için hücrede ATP kullanan, ATP üreten ve pasif işlemler arasındaki metabolik dengeyi sıfırlamak için membran veya protein bileşiminde bazı değişiklikler gerektirebilir. Bununla birlikte, kışı hareketsiz veya diyapoz durumunda geçiren türler için sıfır altı sıcaklıklarda “normal” metabolik fonksiyonları (büyüme, beslenme, üreme) koruyacak kapsamlı telafi edici adaptasyonlara gerek olmayabilir. Aslında, düşük sıcaklığın metabolik süreçler üzerindeki farklı etkileri, düşük sıcaklıkta metabolizmayı kökten değiştirmek için kullanılabilir. Buz oluşumunun zararlı sonuçlarına göre hücre yapısını/işlevini koruyan adaptasyonlar, donma toleransı veya donmadan kaçınma sağlayanlardır (Storey, 1988).

1.2. Donmadan Kaçınma Davranışı

Donmadan kaçınma stratejisini seçen hayvanlar, vücut sıvılarının FP değerinin altında her zaman mevcut olan ölümcül donma tehdidiyle baş etmelidir. Dondurmanın önlenmesi iki mekanizma ile sağlanır: buz çekirdeklenmesinin engellenmesi (yetersiz soğutma) ve FP'nin kolligatif baskılanması (Franks, 1985). Donmadan kaçınmayı destekleyen adaptasyonlar şunları içerir: 1) çevresel buzla aşılıyıcı dondurmadan korunma ve endojen nükleatörlerin mevsimsel olarak aktif çıkarılması veya

maskelenmesi dahil olmak üzere potansiyel buz çekirdeklendiricilerin ortadan kaldırılması (Somme, 1982; Sakagami vd., 1985; Neven vd., 1986); 2) embriyo buz kristallerinin büyümesini engellemek için vücut sıvılarına spesifik termal histerezis (antifriz) proteinlerinin eklenmesi (Duman vd., 1982); 3) kolligatif FP ve SCP depresyonu sağlamak için düşük moleküler ağırlıklı kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonlarının birikmesi [taze ağırlığın% 15 ila% 25'i arasında değişen gliserol seviyeleri nadir değildir (Rickards vd., 1987; Somme, 1982; Zachariassen, 1980; Zachariassen, 1985) ; ve 4) dondurulabilir su içeriğini azaltmak ve kriyoprotektanların etkili konsantrasyonunu yükseltmek için dehidrasyon gözlemlenebilmektedir (Ring, 1980; Rickards vd., 1987).

1.3. Donma Toleransı Davranışı

Storey ve Storey (1988); Doğal iklim koşulları altında canlı hayvanlarda donma toleransı olgusu (Çizelge 1.1), yalnızca hücre dışı suyun donması anlamına gelir. Donma toleransına yol açan uyarlanabilir süreçler, sitoplazmik suyu dondurulamaz hale getirecek şekildedir. Doğal donma toleransında başarı için gerekenler şunları içerir: 1) buz, hücre dışı bölmelerle sınırlandırılmalıdır ve buz kristallerinden kaynaklanan fiziksel hasar en aza indirilmelidir; 2) donma hızı, hücreler üzerindeki ozmotik stresi sınırlamak, iyonların ve diğer çözünebilir metabolitlerin hücre dışı ve hücre içi boşluklar arasında yeniden dağıtılması için zaman tanımak ve hücre zarının kontrollü büzülmesine izin vermek için yavaş ve kontrollü olmalıdır; 3) zararlı bir sınırın ötesinde hücre hacmi azalması ve dehidrasyondan kaçınılmalıdır; ve 4) hücreler, çevreleyen hücre dışı buz tarafından uygulanan uzun süreli iskemi karşısında hayatta kalmalı ve homeostazı sürdürmelidir.

Sıcaklık değişimi çoğunlukla saatte sadece birkaç derecedir, bu nedenle donma oranları sonuç olarak yavaştır. Çevresel buzla aşılabilir dondurma meydana gelebilir. Bir kış boyunca birden fazla donma ve çözülme döngüsü hayatta kalmalıdır. Dondurma aynı zamanda orta dereceli sıfır altı sıcaklıklarda (genellikle -5 ° C), hücrelerin hala metabolik olarak aktif olduğu sıcaklıklarda ve buzun yeniden kristalleşme işleminin kolayca gerçekleştiği sıcaklıklardadır. Bununla birlikte, sabit bir fiziksel ve metabolik durum, donmuş halde bazen haftalarca sürdürülmelidir.

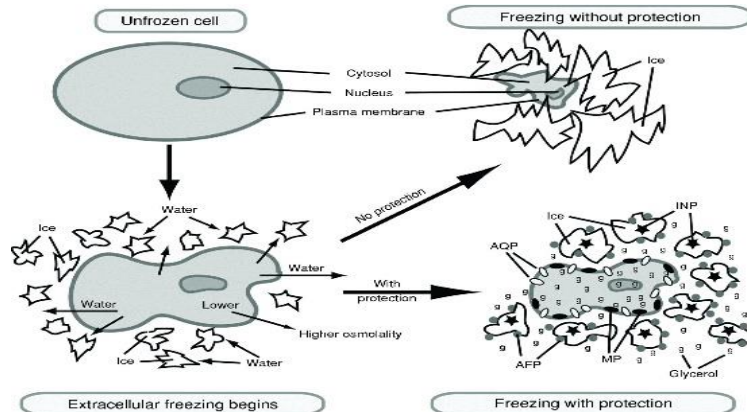
Hücre dışı buz oluşumunu indüklemek ve kontrol etmek için spesifik buz çekirdekleyici proteinlerin kullanımını ve yeniden kristalleşmeyi önlemede ve hücre altı bileşenlerini donma konsantrasyonunun sonuçlarına karşı stabilize etmede termal histerezis proteinlerinin muhtemel rolünü, örneğin düşük birikim -hücre hacmi regülasyonunda ve proteinaceous bileşenlerin stabilizasyonunda kolligatif etki için moleküler ağırlıklı kriyoprotektanlar, membran yapısını stabilize etmek için mekanizmalar ve hücrelerdeki dondurulamayan su içeriğini artıran mekanizmalar; ve metabolik depresyon, iyi bir anaerobiosis kapasitesi gibi sıfır altı ve/veya donmuş durumda canlılığı korumak için hücrel metabolizmada değişiklikler ve düşük sıcaklık fonksiyonuna izin vermek için membran bileşimi ve enzim tipindeki değişiklikler donma toleransına iyi birer örnektir.

Çizelge 1.1: Ektotermik hayvanlarda donma sürecindeki hayatta kalmalarına göre sınıflandırılması (Voituran vd., 2003).

	Gelişmiş Donma Toleransı Olan Türler	Kısmi Donma Toleranslı Türler
Amfibiler	<i>Rana sylvatica</i> (Schmid, 1982) <i>Hyla versicolor</i> (Schmid, 1982) <i>Pseudacris</i> (Schmid, 1982)	<i>Rana temporaria</i> (Pasanen ve Karhapaa, 1997) <i>Rana ridibunda</i> (Voituran, 2003) <i>Hyla regilla</i> (Croes ve Thomas, 2000) <i>Acris creptians</i> (Irwin vd., 1999)
	<i>crucifer</i>	

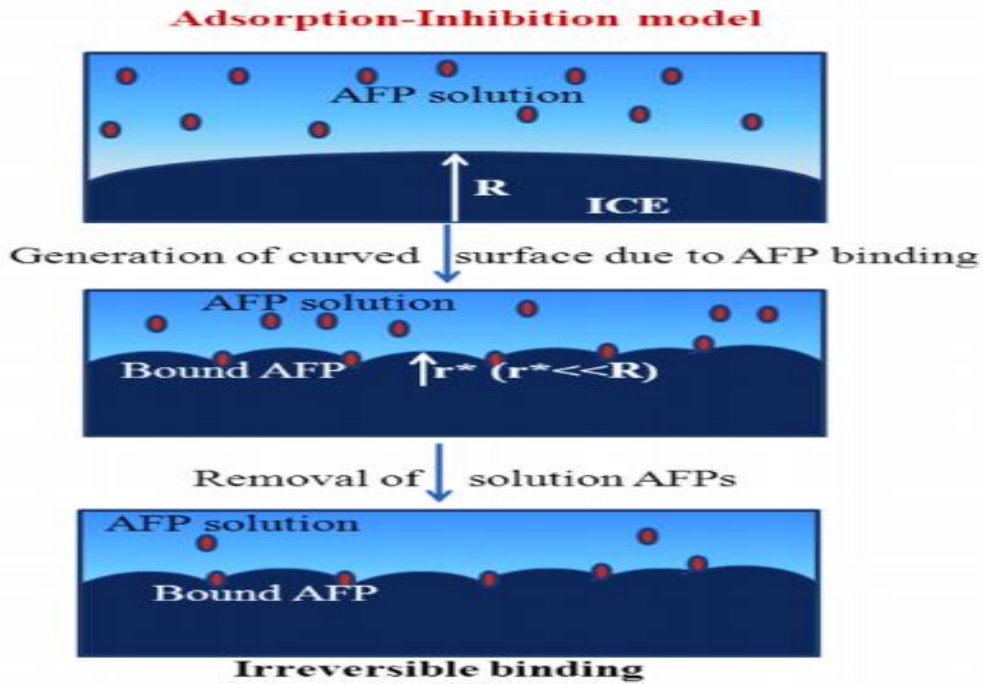
1.3.1. Buz Çekirdeklenmesi

Doku donduğunda ortaya çıkan en önemli patofizyolojik problemlerden biri hücre içi suyun kristalleşmesidir. Hücre içi buz oluşumu, sonuçları genellikle ölümcül olan hücre içi yapılara ve mikro bölmelere zarar verir. Ayrıca, bazı türler hücre içi buzlanmadan kurtulur. (Wharton ve Ferns, 1995; McNally, 2002; Wharton vd., 2009) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: Hücrenin AFP varlığında ve yokluğunda donma maruziyetinin sonuçlarının şematik gösterimi (Storey ve Storey, 2013)

Donmaya toleranslı hayvanlar, dondurma sırasında hücre dışı ve hücre içi boşluklar arasında büyük miktarda su ve kriyoprotektan hareketleri yaşarlar. Doğal donma sırasında, hücre dışı ve organ dışı boşluklardaki buz büyümesi, ozmotik bir dengesizlik oluşturur; hücre dışı sıvıda hiperozmotik koşullar yaratır ve bu, hücrelerden suyu çekerek şiddetli büzölmeye neden olur. Bu, düşük moleküler ağırlıklı karbonhidrat kriyoprotektanların, daha fazla su kaybına karşı ozmotik direnç oluşturan ve hücre hacminin kritik bir minimumun altına düşmesini önlemeye yardımcı olan hücreler tarafından sentezi veya alımıyla karşılanır (Storey, 1988). Su, membranlar boyunca pasif olarak akabilir, ancak yüksek su akışına ihtiyaç duyulan durumlarda, aquaporinler (AQP'ler) adı verilen özel entegre membran proteinleri kullanılır. Bunlar, iyonların ve çoğu çözünen maddenin ilişkili geçişini önlerken suyu seçici olarak iletir (Storey, 2013) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: AFP'lerin buz kristallerine adsorbe olup gelişimini engelleme modeli. (i) AFP adsorbe olmadığında buz disk şeklinde büyümeye eğilimlidir. (ii) AFP'nin adsorbe olduğu bölgede buz gelişimi yavaşlar. (iii) Birçok AFP molekülleri biraraya geldiğinde AFP molekülleri arasında buz oluşumu zorlanır ve buz yüzeyi oluşumu engellenerek sabitlenir. (Jana ve Chakraborty, 2018).

1.3.1.1. AQP

İnsanlarda bugüne kadar 13 AQP izoformu tanımlanmıştır ve bunlardan bazıları, özellikle AQP3 alt grubu, gliserol ve diğer bazı küçük yüklenmemiş çözünen maddeleri (örn. CO₂, amonyak ve üre) de taşıyan akuagliseroporinler olarak işlev görür (Campbell, 2008; Zeidel, 2012). Akuagliseroporinlerin varlığı, çoğu donmaya toleranslı veya donmadan kaçınan böceklerde ve ayrıca donmaya toleranslı hylid kurbağalarda birincil veya tek kriyoprotektan olarak gliserolün yaygın kullanımının bir nedeni olabilir. Bununla birlikte, metabolik olarak, glikojenden sentezleme kolaylığı, üretimindeki minimum enerji maliyeti ve karbon kaybı, katabolize etme potansiyeli ve uyumlu bir çözünen olması gliserolü de destekler. İhtiyaç duyulan yüksek konsantrasyonlarda (genellikle 2 M veya daha fazla) protein yapısını/işlevini bozar (Storey ve Storey, 1991; Storey, 1997; Storey ve Storey, 1988). AQP'lerin tüm hayvanlarda normal su dengesinde önemli rolleri vardır; örneğin, memeli böbreğinde su geri alımı için çok önemlidirler. Amfibilerde, AQP'ler ayrıca özel ventral pelvik deri yamaları aracılığıyla dış ortamdan su alımını ve ayrıca idrar kesesindeki depolardan (özellikle çöl su tutucu türlerde) su alımını kolaylaştırır. AQP'ler birkaç kurbağa türünden dizilenmiştir ve memeli AQP 1, 2 ve 3'ün homologlarını içerir (Krane, 2007; Suzuki ve Tanaka, 2009). Son çalışmalar, gliserolü bir kriyoprotektan olarak biriktiren donmaya toleranslı *Hyla chrysoscelis*'te AQP'leri ve su/gliserol taşınmasını incelemiştir (Goldstein vd., 2010; Mutyam vd., 2011). AQP 1, 2 ve 3 homologları klonlandı ve farklı doku ekspresyonunun yanı sıra dokuz dokuda sıcak ve soğuğa alışmış kurbağalar arasındaki ekspresyon farklılıkları gösterdi (Zimmerman vd., 2007). Özellikle, akuagliseroporin olan AQP 3, soğuğa alışmış kurbağaların karaciğer, akciğer, iskelet kası, bağırsakları, beyni ve mesanesinde güçlü bir şekilde yukarı regüle edildi. İmmünoblotlama, kurbağa dokularındaki üç AQP için benzer protein ekspresyon modellerini gösterdi; AQP 1 test edilen tüm dokularda bulundu, AQP 3 de geniş bir şekilde dağıtıldı ve AQP 2 sadece osmoregülasyon organlarında (renal toplama kanalları ve epidermis) bulundu (Pandey, 2010).

Organların hem su hem de gliserol taşıma kapasitelerinin donmada hayatta kalmaya yardımcı olmak için AQP'lerin yukarı regülasyonu ile artırıldığı fikrini desteklemektedir. AQP'ler ayrıca böceklerde donma toleransının mevsimsel olarak kazanılmasına da katkıda bulunur. *Chilo suppressalis*' in donmaya toleranslı larvaları ile yapılan çalışmalar, donma sırasında gliserol alımı ve yağ vücut hücrelerinden su kaybının, su kanalı inhibitörü cıva klorür varlığında güçlü bir şekilde bastırıldığını

gösterdi ve bu hareketler esas olarak AQP'ler aracılığıyla meydana geldi (İzumi vd., 2006). Yazarlar daha sonra soğuğa maruz kalma ve diyapozun bu türdeki AQP'leri yukarı düzenlemek için etkileşime girdiğini gösterdi (İzumi vd., 2007). Temmuz'dan Ocak'a kadar toplanan *E. solidaginis* larvalarında hem AQP hem de akuagliseroporin benzeri proteinlerin artan bolluğunu ve membran lokalizasyonunu ve Ekim ayında (doğal gliserol üretimi başladığında) akut soğuk veya kuruma tedavilerinin AQP3 benzeri proteini yukarı doğru düzenlediğini gösterdi (Philip ve Lee, 2010). Ek olarak, cıva klorür larvalara uygulandığında donma toleransı azaldı, bu da donma ve çözülme sırasında su ve gliserolün transmembran hareketlerini düzenlemede AQP eylemlerinin önemini gösterir (Philip ve Yi, 2008; Philip ve Lee, 2010). Yapısal olarak ifade edilen bir AQP, soğuğa dayanıklılığın kriyoprotektif dehidrasyon stratejisini kullanan bir tür olan *Belgica antarctica*'den klonlandı (Goto vd., 2011).

1.3.1.2. GLUT

Karaciğer glikojen rezervlerinden glikoz sentezi ciltte buz çekirdeklenmesinin başlamasından 2 ila 5 dakika sonra tetiklenir ve şeker hızla kana aktarılır ve diğer dokular tarafından alınır (Storey, 1988). Bu nedenle, glikozu diğer dokulara taşımak için dağıtım mekanizmalarının oldukça verimli olması gerekir. Omurgalı hücrelerine glikoz alımı, bir glikoz taşıyıcı ailesi (GLUT'lar) aracılığıyla taşıyıcı aracılıdır (Pessin vd., 1992). Çoğu dokuda bunlar, insülinden bağımsız (GLUT1 ve GLUT3) veya bağımlı (GLUT4) taşıyıcılar yoluyla plazmadan hücrelere tek yönlü glikoz hareketine aracılık eder. Bununla birlikte, karaciğer, hepatositlerin fazla olduğunda kandan glikoz almasına (glikojen deposuna beslemek veya biyosentez için kullanmak) veya kan şekeri seviyeleri düştüğünde glikoz salmak için çift yönlü bir taşıyıcıya (GLUT2) sahiptir. *R. sylvatica* ile yapılan çalışmalar, hem karaciğer hem de iskelet kası zarı keseciklerinin glikoz taşıma oranlarının, aynı donmaya toleranslı *Rana pipiens* kurbağalarının dokularına kıyasla sekiz kat daha yüksek olduğunu göstermiştir (King vd., 1993). Karaciğerdeki fark, sitokalsin B bağlanması ile belirlendiği üzere, *R. Sylvatica*'da *Rana pipiens* karaciğer zarlarından beş kat daha fazla GLUT2 taşıyıcı bölgesi ile bağlantılıydı. *R. Sylvatica* karaciğerinin taşıyıcı aracılı glikoz taşıma kapasitesi de mevsimsel olarak değişti ve oranlar, karaciğer plazma membranlarındaki GLUT2 taşıyıcı bölgelerinde 8,5 kat artışla desteklenen yaz ve sonbahar arasında altı kat arttı (King vd., 1993). Ayrıca, 24 saatlik donmuş kurbağalara karşı kontrol kalbi tarafından

diferansiyel gen ekspresyonu için bir cDNA dizisinin taranması, dondurulmuş kurbağalarda GLUT4 transkriptlerinin güçlü bir iki ila üç kat yukarı regülasyonunu gösterdi, bu da GLUT4'ün akut donmaya duyarlı yukarı regülasyonunun da meydana geldiğini düşündürdü. Bu nedenle, ağaç kurbağalarında türlere özgü, mevsimsel ve akut GLUT yükselmesi, donma sırasında hızlı kriyoprotektan dağılımına katkıda bulunur (Storey ve Storey; 2013).

1.3.1.3. INP

INP'ler, donmaya toleranslı bir dizi hayvanda tanımlanmıştır, ancak genel olarak, onlar hakkında hala çok fazla şey bilinmemektedir ve çok az aktif araştırma yapılmaktadır. Bakteriyel INP'ler üzerine yapılan araştırmalar, gıda endüstrisi ve tarım için ticari önemi nedeniyle çok daha ileridir (Margaritis ve Bassi, 1991). Omurgalılar arasında, *R. Sylvatica* üzerinde yapılan çalışmalar, deri üzerindeki aşılamanın bir sonucu olarak nemli bir alt tabaka üzerinde tutulurlarsa, vücut sıvılarının denge FP değerinin ($-0,5^{\circ}\text{C}$) sadece çok az altındaki sıcaklıklarda donmaya başlayabileceklerini göstermiştir (Storey ve Storey, 2013).

R. Sylvatica plazması ayrıca in vitro olarak -6 ila -8°C 'de donmayı tetikleyen ve ısı ve kimyasal işlemlerle denatürasyona duyarlı olan bir INP içerir (Storey vd., 1992; Wolanczyk vd., 1990a; Wolanczyk vd., 1990a). Bu proteinin rolü hala net değildir, bir çekirdek görevi görmek yerine, proteinin, vaskülatür de dahil olmak üzere kurbağanın vücudunun farklı sıvı bölmelerinden buzun yayılmasını yönlendirmeye yardımcı olması mümkündür; bir buz yeniden yapılandırma proteini olarak potansiyel etki açısından yeniden incelenmelidir.(Storey ve Storey, 2013)

1.3.1.4. SCP

Donmaya toleranslı kurbağalar üzerinde yapılan yeni çalışmalar dermal granüler bezlerden salgıların, in vitro deneylerde Ringer çözeltisinin SCP'sini güçlü bir şekilde azaltan buz nükleatörleri içerdiğini gösterdi. SCP'ler kontroller için 18°C (tek başına Ringer solüsyonu), yaz kurbağalarının deri salgıları için 14°C ve kış kurbağalarının

salgıları için 6°C idi (Rexer-Huber, 2011). Deri tarafından salgılanan bu tür proteinler, ortam sıcaklığı sıfırın altındaki değerlere düştüğünde çekirdeklenmeyi tetiklemenin çok etkili ve tutarlı bir yolunu sağlayacaktır. Çekirdekleyicinin doğası bilinmemekle birlikte muhtemelen proteinlidir (Storey ve Storey, 2013).

1.3.1.5. SORBİTOL

Sorbitol, donmaya toleranslı böceklerde gliserol ile ortaklaşa bir kriyoprotektan olarak oldukça sık görülür, ancak farklı birikim ve klirens modellerini takip eder (Storey ve Storey, 1988). Sorbitolü böcek hücrelerinin içine veya dışına taşıyan taşıyıcılar hakkında şu anda hiçbir şey bilinmemektedir. Bununla birlikte, sorbitol, *E. solidaginis*'in hemolenfinde (yani hücrelerden salgılanır) mevcut olduğundan ve hemolimf sorbitol seviyelerinde, tüm vücut sorbitol seviyelerine karşı görece bir azalma olduğundan, sorbitol alımını kolaylaştıran stresler (donma ve dehidrasyon) altında meydana gelmelidir (Wolanczyk, 1990). Memelilerde, böbrekteki böbrek epitel hücreleri (örneğin, iç medüller toplama kanalı hücreleri), birkaç ozmoliti sentezleyerek hiperozmotik strese (hücre küçülmesine neden olan) yanıt verir, sorbitol en önemli olanıdır. Sentez, poliol dehidrojenaz olarak da bilinen aldoz redüktaz tarafından katalize edilir. Stres azaldığında ve hücreler şiştiğinde, bu osmolitler salınır, sorbitol bir sorbitol permeaz yoluyla çıkar (Schuttart, 2002; Lang, 2007). Sorbitol, permeazdan farklı bir taşıyıcı tarafından ve bir glikoz taşıyıcıyla değil, renal iç medüller interstisyel hücrelere alınır (Schuttart, 2002). Orada sorbitol dehidrojenaz yoluyla fruktoza dönüştürülür ve şeker, heksokinaz ile fosforilasyondan sonra yeniden ara metabolizmaya girebilir. Benzer bir ikili sorbitol taşıyıcı sistemi ve bozunmaya karşı sorbitol sentezine yönelik dokuya özgü yeteneklerden oluşan bir sistemin donmaya toleranslı böceklerde de meydana gelip gelmediği, henüz herhangi bir deneysel ilgi görmemiştir. Disakkarit, trehaloz, soğuk sertleştirme sırasında çeşitli böceklerde, bazen yüksek seviyelerde ve bazen de *E. solidaginis* gibi çoklu koruyucu karışımın daha küçük bir bileşeni olarak birikir (Storey ve Storey, 1988). Donmaya toleranslı türlerde ve kriyoprezervasyonda,

trehalozun donma sırasında membran stabilizasyonunda görev yaptığı düşünülmektedir (Anchordoguy vd., 1987).

1.3.1.6. TREHALOZ

Kriyoprotektif dehidrasyon ve/veya anhidrobiyoz geçiren türlerde, trehaloz çok yüksek seviyelerde üretilir ve kuru halde hücreleri ve bunların makromoleküllerini stabilize eden ana susuz koruyucu maddedir; çok yüksek cam geçiş sıcaklığı dahil kimyasal özellikleri, kuru biyolojik sistemlerde kullanımının önemli nedenleri gibi görünmektedir (Crowe, 2001). Böceklerin normal kan şekeri olan trehaloz taşıyıcıları mevcut olmalıdır ve son zamanlarda kuruma toleranslı chironomid, *P. vanderplanki*'den bir trehaloz taşıyıcısı (TRET1) klonlanmıştır (Kikawada, 2007). Daha sonra ortologlar sivrisinek, ipekböceği, bal arısı ve *Drosophila*'da doğrulandı, ancak henüz soğuk dayanıklı bir böcek türünde bir TRET ortologunun mevsimsel veya donma/çözülme ekspresyonu hakkında hiçbir bilgi yoktur (Kanamori vd., 2010; Storey ve Storey, 2013). Protona bağımlı bir trehaloz taşıyıcısı (H-TRET1), kahverengi *Plantopperin Malpighian* tübüllerinde de yeni tanımlandı ve memeli böbrekleri tarafından glikoz ıslahına benzer bir şekilde tübüllerin lümeninden trehalozu emmek için işlev gördüğü düşünülmektedir (Kikuta vd., 2012). Bu, omurgalılarda bulunan glikoz taşıyıcı ailesine benzer şekilde böceklerde muhtemelen bir trehaloz taşıyıcı ailesinin mevcut olduğunu göstermektedir (Storey ve Storey, 2013).

1.3.1.7 Üre

Üre, bir osmt kriyoproteksiyona yardımcı olduğu ve hem bütün hayvanların hem de izole edilmiş kas veya kırmızı kan hücrelerinin donma/çözülme canlılığını artırdığı için geniş çapta birikir (Constanzo vd., 2008a; Constanzo vd., 2008b; Constanzo vd., 2008c). Bununla birlikte, *Pseudacris maculata* ile yapılan bir çalışma, ürenin donmaya toleranslı kurbağalar arasında evrensel bir kriyoprotektan olmadığını göstermektedir (Higgins vd., 2013). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, odun kurbağalarının böbreklerinde ve mesanesinde üre taşıyıcıları tespit edildi (Rosendale vd., 2012). Taşıyıcı bolluğu mevsimsel olarak ve deneysel dehidrasyon ve üre yüklemesi ile değişiklik gösterdi, ancak deneysel dondurma/çözdürmeden etkilenmedi. Üre taşıyıcı ekspresyonu, fizyolojik koşullar üre yeniden emilimini gerektirdiğinde artan ve fazla

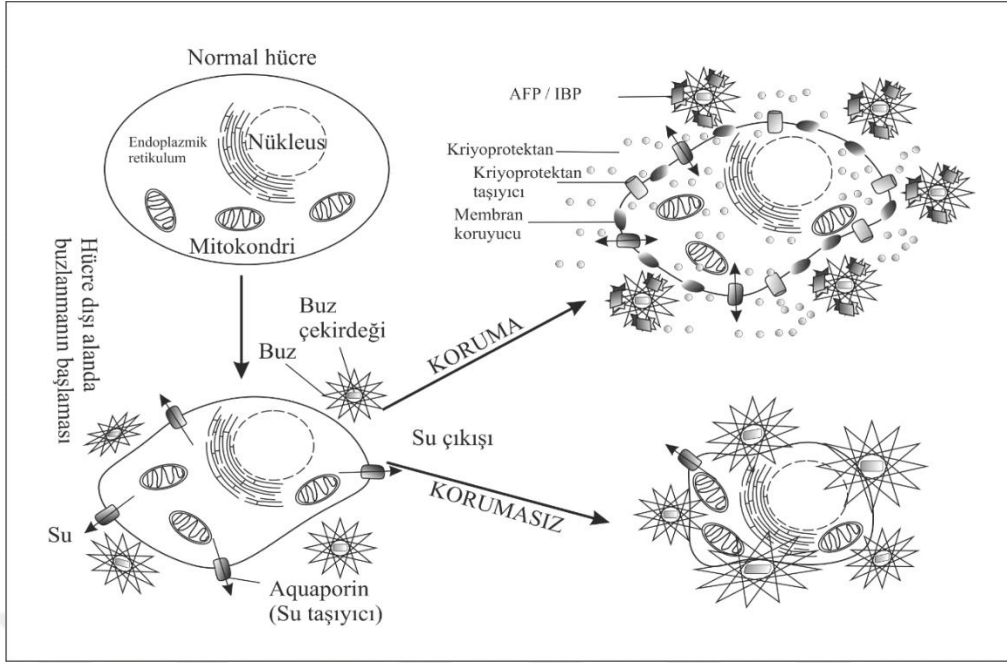
ürenin idrardan atılması gerektiğinde azaldığı bir posttranslasyonel seviyede kontrol ediliyor gibi görünmektedir (Storey ve Storey, 2013).

1.2 Donma ve Normalleşme Döngüsünde Stres ve Mücadele

Tüm vücut donma-çözülme döngüsündeki en iyi bilinen stres, buzun neden verdiği mekanik hasarlardır. Sağlam dokular dondurulduklarında, hücre dışı boşluklarda ve kan damarlarında buz oluşumuyla fizyolojik olarak hasar görebilirler (Pegg, 1987).

Rubinsky vd., (1990), Rubinsky ve Pegg (1988); hücre dışı buz oluşumu ve buz oluşumu sırasında genişlemiş vasküler bölmelerde su birikirken, vasküler lümende buz oluşumuna yönelik bir eğilim keşfettiler. Aktığında büyük iç kanamaya neden olduğunu ve organizmanın ölümüne yol açtığını göstermişlerdir. Bu nedenle, dona dayanıklı organizmaların, donmadan kaynaklanan mekanik hasarı en aza indirecek ve normalizasyon sırasında hasarın onarılmasına izin verecek adaptasyonlara sahip olması gerektiği öne sürülmüştür (McNally, 2002).

Storey ve Storey (1984) ile Costanzo ve Lee (2013); donma meydana geldiğinde solunum, kan dolaşımı ve kalp hızı gibi normal fizyolojik ve fiziksel süreçlerin bozulduğunu bulmuşlardır. Solunum, kalp hızı ve dolaşımın durması iskemiye neden vererek sağkalım için uygun biyokimyasal ve adaptif mekanizmalar gerektirir. Dondurulduktan sonra bir kurbağa diseke edilirse, hücre dışı, deri altı, karın boşluğu benzeri organların buzla doldurulduğu görülebilir (Storey ve Storey, 1988, 1992, 2004, 2013; Bouffard, 2007; Degree ve Mutyam 2013; Sullivan vd., 2015a, Hawkins ve Storey, 2018). Bu buz, önceden mevcut olan hücre dışı suyu ve ozmotik kuvvet tarafından hücre dışına itilen hücre içi suyu içerir. Sonuç olarak, donmuş kurbağanın iç organları önemli ölçüde küçülmüş gibi görünüyor. Ayrıca organın bazı bölgelerinde buzdan kaynaklanan fizyolojik hasarlar da gözlemlenebilir (Kelleher vd., 1987) (Şekil 2.3).



Şekil 1.3: Soğuk maruziyetinde korunan ve korunmayan hücreler(Yoldaş, 2021).

Çözülmüş kurbağa bacaklarının kaslarında da hematoma oluşumu bulunur. Ek olarak, koyu ten, sert uzuvlar, hareketsizlik ve opak gözler, donmuş kurbağaların içindeki buzlanmanın fiziksel göstergeleri olarak kabul edilebilir. Donma koşulları altında, organizmalar donma, anoksi ve dehidrasyon streslerine maruz kalırlar. (Layne Jr. ve Lee Jr., 1987; Storey ve Storey, 2001; McNally, 2002).

1.2.1. Dehidrasyon Stresi

Donmaya karşı geliştirilen dondan kaçınma ve dona dayanıklılık davranışlarına ek olarak, üçüncü adaptif strateji olarak kabul edilen donmaya karşı koruma dehidrasyon taktiği, aşırı dehidrasyon (donabilecek hemen hemen tüm suyun kaybı) sırasında kriyoprotektan birikmesi ile makromolekül stabilitesi ile gerçekleşir (Wharton vd., 2003; Holmstrup, 2014; Storey ve Storey, 2017). Vücutta suda çözünen madde miktarı yüksek değilse, iç buhar basıncı, dış buzla temas eden havanın buhar basıncından daha yüksek olacak ve dış hava sıcaklığı azaldıkça bu fark artacaktır. Donmayı önleyen böcekler buharlaşma ve solunum yoluyla kan lenfini dış ortama bırakırlar. (Zachariassen ve Kristiansen, 2000; Duman ve Newton 2020). Bazı omurgasızlar tarafından bu strateji kullanılmaktadır. (Holmstrup ve Westh, 1994; Holmstrup ve Zachariassen, 1996; Wharton vd., 2003; Pedersen ve Holmstrup, 2003; Elnitsky vd., 2008; Duman, 2015; Duman ve Newton, 2020). Bazı amfibiler tarafınca

kullanılabileceği öngörülse de omurgalıların bu adaptasyonu kullandığı bilinmemektedir (Costanzo ve Lee, 2013; Green, 2017).

Donmanın iki ana sonucu fizyolojik dehidrasyon ve anoksidir. (Zhenhong, 2004; Storey ve Storey, 2013; Lung, 2019). Kış hazırlığı dönemlerinde donma toleranslı türler, biriktirilecek ozmolitlerin daha konsantre hale gelmesi için kısmi dehidrasyon gerçekleştirir (Costanzo vd., 2015). Bu fiziksel dehidrasyon, suyun hücre dışı boşlukta birikmesine ve zararsız buz formlarına dönüştürmesine olanak verir. (Storey ve Storey, 2004; Costanzo ve Lee, 2008; 2013; Costanzo vd., 2015; Niu vd., 2021). Bir organizmanın hücre ve dokularından çekilerek buza dönüşen su, sağkalım adaptasyonu oluşturur (Costanzo vd., 1993b; Storey ve Storey, 2017; Al-attar, 2020).

Donmaya toleranslı organizmaların donmaya karşı hiperglisemik tepkisi, dehidrasyon veya anoksi için de gösterilir. *Rana pipiens* karaciğer glikoz seviyesini 24 kat arttırarak dehidrasyon stres koşuluna yanıt oluşturmuştur (Churchill ve Storey, 1993; 1995). 5 °C'deki dehidrasyon maruziyeti koşullarında *R. sylvatica* ve *P. Crucifer* türlerinde, dehidrasyon esnasında toplam vücut suyunun P-60'ının kaybedilmiş olduğu ve hayvanların karaciğer, kalp ve iskelet kasındaki glikoz seviyesi donma koşullarına maruz kaldıkları oranlarla hemen hemen aynı sonuçlanmıştır. (Churchill ve Storey, 1993; Layne ve Jones, 2001; Storey, 2004; Costanzo ve Lee, 2013; Storey ve Storey, 2017; Amaral vd., 2018).

1.2.2. Anoksi Stresi

Donmaya dirençli organizmalar, diğer stres etkileri gibi, anoksi ve iskeminin etkilerini önlemek veya tersine çevirmek için mekanizmalar gerektirir. Özellikle uzun süreli donmalarda, dolaşımın bozulması sonucu oksijenden fakir hücreler besin ve oksijenden mahrum kalır, atık ürünleri uzaklaştıramaz, hormonları ve diğer sinyalleri iletemez, bu da biyolojik iletişimin bozulmasına yol açar. (Storey vd., 1992; Rubinsky vd., 1994a; 1994b; Storey ve Storey, 2017).

Anoksik stres koşulları altında hücreler, asidoz oluşumunu kolay ve yalın hale getirerek, anoksik koşullara özgü gen / protein regülasyonunu aktive eder ve anaerobik adenosin trifosfat (ATP) üretirler.. (Sullivan, 2011; Sullivan vd., 2015b; Lung, 2019; Al-attar,

2020). Donmaya dayanıklı kurbağa dokularındaki glikoz ve laktat seviyelerinin hipoksik ve/veya anaerobik koşullar altında artar. Tüm bu işlemlerde hücreler ihtiyaç duydukları enerjiyi anaerobik endojen yakıt olarak kullanılabilecekleri glikojeni dönüştürerek sağlarlar. (Sullivan ve Storey, 2012; Storey ve Storey, 2017).

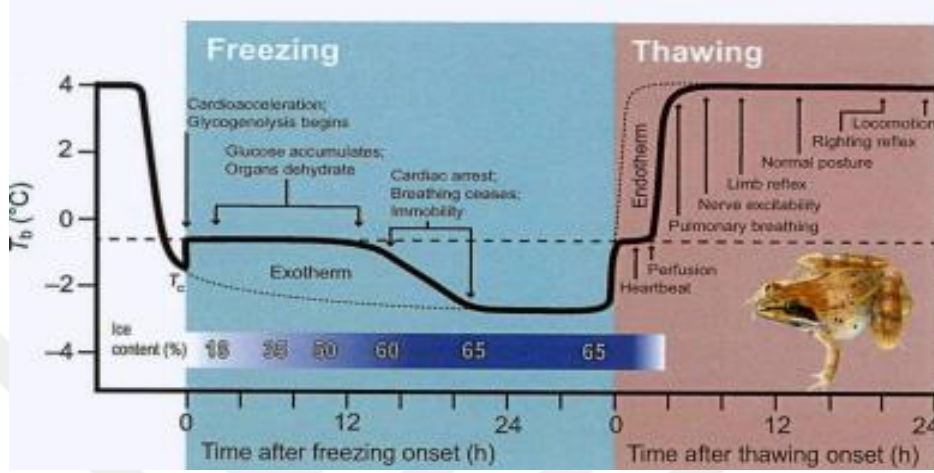
Donma sonrası normalizasyon sırasındaki diğer bir faktör, reaktif oksijen türlerine (süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi ROS) maruz kalmaya neden olan oksijenin sisteme hızlı invazyonudur. Hücrelerin lipid katmanlarına, proteinlerine ve DNA'sına ciddi şekilde zarar vermektedir. (Hermes-Lima vd., 2001; 2015; Storey ve Storey, 2004; Lung, 2019). Son derece donmaya dayanıklı *R. sylvatica*, bu streslerle başa çıkmak için iki antioksidan müdaafa stratejisi geliştirmektedir. (Hermes-Lima vd., 2001, Storey ve Storey, 2004). İlk savunma mekanizması antioksidan savunmadır, ana antioksidan enzimleri; glutatyon S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve süperoksit dismutaz organlardaki aktivitenin korunmasını sağlamaktadır (Joannis ve Storey, 1996; Hermes-Lima ve Zenteno-Savín, 2002; Storey ve Storey, 2004; 2017).

1.2.3. Metabolit Biriktirme

Metabolitlerin yüksek konsantrasyonda biriktirilmesi, dondurma, hipoksi ve dehidrasyon koşulları altında kullanılan en önemli stratejilerden biridir. Donma noktası tükenmesi, ozmolariteyi arttırmak için bir kriyostat olarak hücre içinde ve çevresinde metabolitlerin birikmesinden kaynaklanır. Farklı kurbağa türlerinde kriyoprotektanlar kullanılmasına rağmen, glikoz genellikle en yaygın olanıdır (Layne ve Jones, 2001; Edwards vd., 2004; Costanzo vd., 2013; Higgins ve Swanson, 2013; Lung, 2019; Roy ve Goswami, 2019; Katlı ve Katlı, 2020).

Kış kurbağaları, kan şekerinde karaciğerdeki glikojen ile donma ve çözülme dinamiklerini yansıtan değişiklikler sergiler. Dondurulmamış tüm kurbağalarda (~7 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) plazma glukoz seviyeleri de düşük olmasına rağmen, hem donmuş hem de çözülmüş kış kurbağalarındaki seviyeler bireylerde kurbağalara göre daha yüksekti. İlkbahar kurbağalarında çözüldükten sonra kan şekeri seviyeleri önemli ölçüde düşerken, kış kurbağalarında buz çözüldükten sonra karaciğer, kalp, beyin ve kaslarda

şeker seviyelerinde artış görüldü. Seviyeler donmuş kurbağalarda donmamış kurbağalara göre 5-80 kat daha yüksektir, gerçek seviyeler organa göre değişir (Storey ve Storey, 1988) (Şekil 1.4). Tatlı su kaplumbağalarında benzer bir mekanizma tanımlanmıştır. *Chrysemys clipart*, yeryüzündeki ilk kış boyunca kan şekerini 3 kat, gliserol miktarını 3 kat ve amino asit seviyelerini 2,25 kat artırdı (Costanzo vd.,2000).



Şekil 1.4: *R. sylvatica*'nın 4 ve -2,5°C sıcaklıklarında donma ve çözünme döngüsü (Costanzo ve Lee, 2013).

Buz oluşturan (ISP), çekirdeklenme (INP) veya antifriz (AFP) proteinleri olarak adlandırılan belirli proteinler, donma sıcaklıklarında buzun kristalleşmesini indüklemeye, şekillendirmeye veya önlemeye yardımcı olur ve donma sıcaklıklarının daha düşük seviyelere ulaşmasını önler (Duman, 2001). Antifriz proteini (AFP) genellikle dona dayanıklı türlerde bulunur (Duman, 2001; Yu vd., 2010). Ana işlevleri, büyük yapılı buz kristallerine dönüşürken doku hasarını önlemek için küçük buz kristalleri kullanmaktır. Buz kristallerine bağlanırlar ve donma noktasını bloke ederler (Martino ve Zaritzky, 1989; Gupta ve Deswal, 2014; Olijve vd., 2016). Çalışmada, karaciğer proteini 'deki değişiklikleri değerlendirmek için sıvı kromatografi (LC), tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) ve izometrik peptit haritalama (iTRAQ™) teknikleri birlikte kullanılmıştır. Yaz ve kış koşulları altında üç farklı proteinin mevsimsel koşullara göre oldukça değişken olduğu gösterilmiştir. Dondurucu koruyucu proteinler, ısı şoku proteinleri (HSP'ler) ve antioksidanlar dahil olmak üzere çeşitli proteinler, kış koşullarında kurbağa karaciğerlerinde yüksek seviyelerde gözlemlendi ve artan hücre biyolojisi, protein sentezi ve mitokondriyal fonksiyon ile ilişkili protein seviyeleri azaldı (Kiss vd., 2011). Kurbağa *Dryophytes chrysoscelis*'te, RNASeq teknolojisi kullanılarak karaciğer transkriptomlarından üşüme ve donma için 159.556 transkript analiz edildi, ardından gen seviyesinde değerlendirme yapıldı, bu da 3582

farklı genin tanımlandığı, ekspresyon ve 132 diferansiyel olarak düzenlenmiş genin olduğu sonucuna vardı. Glukoz sentezinde rol oynayan glukoz6fosfatazın arttığı ve gliserol kinazın azaldığı bildirilmiştir. Isı şoku proteinleri, DNA onarımı ve proteazom ubikuitin yolağında yer alan genlerin ekspresyonunun arttığı, hücre hasarından sorumlu genlerin ekspresyonunun azaldığı belirlendi (Amaral vd., 2020).

Hücrelerin donma sırasında korunan ve korunmayan durumları; donma, hücre dışı sıvıdaki dış buzla, bakteri gibi belirli ajanlar veya özel buz proteinleri (ISP'ler) tarafından cilt temasıyla başlatılır. Ortamdaki çözünür metabolitlerin buza girmesi engellenir, böylece hücre dışı sıvının ozmolaritesi artar. Hücrelerden su akarken hücre ve organların hacmi azalır. Şiddetli damlalar, buz hücre sitoplazmasına itebilir veya çözüldükten sonra hücre yapısının normalleşmemesi nedeniyle kalıcı hasara neden olabilir. AFP kristal büyümesini düzenleyerek yeniden kristalleşmeyi engellemektedir. Diğer kriyoprotektanlar hücre hacmini güvenli bir minimuma indirmek için birlikte hareket ederler. Membran taşıyıcıları, aquaporinler, aquagliseroporinler, glikoz ve üre taşıyıcıları, su ve kriyoprotektanların dağılımında yer alır (Storey ve Storey, 2017).

Özetle, bu stratejiler (iç organların dehidrasyonu, hücre içi buz oluşumunu önlemek için metabolitlerin birikmesi, donma bölgeleri ve oluşum mekanizmalarının incelenmesi, normalleşme sırasında oksidatif stresin ortadan kaldırılması, anoksik koşullara tepki,) Dondurulmuş hayvanın tamamının donmasını önleyerek sağ kalımlarını sağlar. Böylece bu özel tropik hayvanlar, zorlu iklim koşullarına rağmen bulundukları habitatta hayatta kalmaya devam edebilirler (Yoldaş, 2021).

1.3. Donma Toleransı Adaptasyonları

Göç, kış uykusu, dondan kaçınma ve dona dayanıklılık mekanizmaları geliştirme, dondurucu kış koşullarında temel hayatta kalma stratejileridir. Soğuğa mağruziyet toleransı geliştiren türlerde; buz kristalleri nedeniyle hassas dokularda fizyolojik hasar, suyun hücrelerden hücre dışı buz kütlelerine çıkışı nedeniyle fiziksel dehidrasyon, kanın donmasıyla birlikte, oksijen, besinlerin ve kan yoluyla gerçekleşen sinyal yollarının durması, akciğerlerin, kalbin ve plazmanın donmasından kaynaklanan iskemi ve anoksi, nöral sinyalleri iletememe ve önemli süreçlerin durması, stresli durumların ortadan kalktığına ortaya çıkan oksijenli kanın, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve ozmotik

basıncın ani perfüzyonu ve hücreler arası erimiş suyun hızla hücrelere dönmek istemesi sonuçlu ozmotik tazyik şeklinde problemlerle karşı karşıya kaldıklarında, lizizden sonra normal hücresel fonksiyonu yeniden kazanmak için biyokimyasal ve ekofizyolojik adaptasyonlar şeklinde çoklu adaptif mekanizmalara sahip olmaları gerekir. Donma hasarı direnci, sonuçları sebebiyle oluşan birçok zorluklardan dolayı en az tercih edilen bir adapte modelidir. Birçok hayvan türü vücut sıvılarının donmasını tolere edemeyerek farklı adaptasyon stratejileri kullanır. (Storey ve Storey, 2005; 2017; Sullivan, 2011).

1.3.1. Hipometabolizma

Metabolik hızın inhibisyonu ile ortaya çıkan hipometabolik durum, çeşitli çevresel streslere yanıt olarak birçok organizma tarafından kullanılan ortak bir yanıt yoludur. Metabolik hızda keskin bir düşüş (% 130'a kadar) birçok tür için önemli bir özelliktir ve hibernasyon (kış uykusu), öfori (yaz uykusu), diyapoz, anaerobik, anhidrobiyoz ve donma toleransı gibi birçok özelliğe sahiptir. Tüm bu durumlar sağkalım mücadelesidir (Kart Gür vd., 2009; Storey and Storey, 2011; 2017; Geiser, 2013; 2020; Kart Gür ve Gür, 2015). Memelilerin bazıları, vücut sıcaklıklarını yüksek tutabilmek için gerekli enerji ve metabolizma hızını sağlamak zorundadırlar, kullanacakları besin kaynağına erişememeleri durumlarında metabolizma hızlarını düşürerek hayatta kalabilmek için kış uykusuna yatarlar (Wang, 1989; Storey ve Storey, 2009; 2017; Geiser, 2013; 2020; Kart Gür vd., 2014, Woods vd., 2019).

Epigenetik ve transkripsiyonel düzenleme, mikroRNA düzenlemesi, hücre sinyalleme ve yüksek enerjili metabolik olayların baskılanması, hücre döngüsü düzenlemesi ve anti-apoptotik mekanizmalar metabolizma düşüşünü kontrol eden faktörlerdir (Storey ve Storey, 2007; 2011; Al-attar, 2020; Zhang vd., 2020; Niu vd., 2021). Doğal hipometabolizma, ATP kullanan birçok hücre içi sürecin baskılanmasını gerektirir. Bu inhibisyon genellikle hücre döngüsü, moleküler adaptasyon, enzim aktivitesi, biyokimyasal yollardaki değişiklikler, membran iyon kanalı taşıma süreçleri, protein ve RNA sentezini içerir. (Hand, 1996; Hochachka vd., 1996; Storey ve Storey, 2017; Mattice, 2018). Bu baskılama stratejileri, hücresel düzeyde ATP tüketimini önemli ölçüde azaltabilir ve yeni homeostaza izin verir. Hipotermik koşullar altında birçok tür için ana strateji, hipometabolik bir aşamaya girmektir. Organizmaların indirgenmiş bir metabolik duruma metabolizmaları, yalnızca dinlenme metabolizma hızı %1'den %30'a

düştüğünde başlar ve bu durum devam ederse, yaşam sürelerini duruma bağlı olarak uzatırlar (Jackson, 2002). Bir çalışmada *Lacerta vivipara* kertenkelesinde -2.5°C'de maruziyetin başlangıcında oksijen tüketimi ve karbondioksit emisyonları normal koşullara göre azalmış ve bu oranlar 56 saat sonra %0 olarak bulunmuştur (Costanzo vd., 1995a; Voituron vd., 2002a; 2002b; 2006; Rey vd., 2008). Yılın 9-10 ayı kurak alanlarda ve yeraltında yaşayan birçok kurbağa ve sulara yaşayan türü de metabolizmalarında azalma gösterir. Güçlü metabolizma engelleyici özellikler, dona dayanıklı türlerin kışın hayatta kalmasını sağlamaktadır (Sinclair vd., 2013). Kurbağaların donma, hipoksi ve dehidrasyona karşı metabolik tepkileri benzerdir (Storey ve Storey, 2009; 2013; 2017; 2019; Costanzo ve Lee, 2013; Costanzo vd., 2015; MacDonald ve Storey, 1999; MacDonald vd., 2009).

Aşırı çevresel stres altında hayvanların hayatta kalması genellikle iki ana stratejiyi içerir: (a) hücre makromoleküllerini stabilize eden ve/veya koruyan koruma mekanizmalarının kullanılması ve (b) enerji kullanımının hem en aza indirildiği hem de önemli hayati işlevleri desteklemek için yeniden önceliklendirildiği bir hipometabolik duruma giriş (Storey ve Storey, 2004b; 2007). Makromoleküllerin korunması çok önemlidir, çünkü hipometabolizmanın temel unsurlarından biri, yüksek enerji-pahalı fonksiyonların güçlü baskılanmasıdır, transkripsiyon ve translasyon iki anahtar hedeftir. Sonuç olarak, organizmalar hasarlı makromoleküllerin onarımı veya yeniden sentezi için sınırlı kapasiteye sahiptir ve bu nedenle koruma stratejileri, hücresel bileşenlerin işlev ömrünü büyük ölçüde uzatmak için çok önemlidir. Bu işlevde iki grup protein belirgindir: şaperonlar ve antioksidanlar. Her ikisi de hücresel stres tepkisinin bileşenleridir, donmaya toleranslı hayvanlar dahil olmak üzere strese toleranslı organizmaların doğal adaptif stratejilerinin parçaları olarak yaygın şekilde bulunurlar (Kültz, 2005; Storey ve Storey, 1992; 2010a; 2011).

1.3.1.1. Antioksidan Savunma

Antioksidan savunmaların ve metal bağlayıcı proteinlerin (özellikle demir bağlayıcı proteinlerin) yukarı regülasyonu, stres altındaki organizmalar için hücre korumasının ayrılmaz ve korunmuş bir parçası ve aynı zamanda hipometabolik durumlarda uzun vadeli hayatta kalmanın temel bir unsuru olduğunu kanıtlamaktadır (Storey ve Storey, 2007).

Donmaya toleranslı hayvanlar için ek bir endişe, donma-çözülme döngüleri boyunca oksijen miktarı fazlalığıdır. Doku oksijenasyonundaki hızlı yükselmeler, oldukça zararlı olabilecekleri birçok sistemde ROS üretimi ile ilişkilidir (örneğin, inme veya kalp krizi sonrası reperfüzyon aşaması). Bu nedenle, doğal olarak geniş oksijen çeşitliliği gösteren hayvanlar (örneğin, anoksiye toleranslı kaplumbağalar ve kış uykusuna yatan memeliler) sıklıkla ya yüksek yapısal antioksidan savunmaları geliştirmiş ya da mevsimsel antioksidan artışına maruz kalmıştır (Higgins ve Swanson, 2013). Proteinli antioksidan savunmalar çeşitli şekillerde meydana gelir. SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPox), süperoksit, hidrojen peroksit ve makromoleküller, özellikle lipidler üzerinde gelişebilen çeşitli peroksil radikalleri dahil olmak üzere ROS'un yok edilmesiyle doğrudan ilgilenir (Hermes Lima, 2005). Glutatyon-S-transferaz (GST), çeşitli ksenobiyotikleri ve lipid peroksidasyonunun aldehidik ürünlerini nötralize eder, bunları atılım için ayarlamak üzere indirgenmiş glutatyon (GSH) ile birleştirerek ROS oluşumunu tetikler. Demir ve bakır bağlayan proteinler de antioksidan savunmaya katkıda bulunur. Fenton reaksiyonunda yüksek reaktif hidroksil radikallerinin ve lipid radikallerinin oluşumunu katalize etmek için hidrojen peroksit ve lipid peroksitler ile reaksiyona girdikleri için hücrelerde serbest demir ve bakır iyonları (Fe^{2+} ve Cu^{+}) tehlikelidir (Hermes Lima, 2004). Bu nedenle, bu metal iyonlarının serbest seviyeleri, nakil sırasında (transferrin ve seruloplazmin), hücre içi depolama proteinlerine (ferritin ve metalotiyonin) veya bunları fonksiyonel proteinlerde (örn. Hemoglobin, hemosiyanin, sitokromlar) kilitleyerek kan proteinlerine bağlanarak her zaman sıkı bir şekilde kontrol edilir. Proteinlerin antioksidan şemsiyesi, aynı zamanda, düşük moleküler ağırlıklı antioksidanların sentezi ve rejenerasyonunda yer alan çoklu enzimleri de kapsar; örneğin, glutatyon redüktaz (GR), (GR) reaksiyonu için gerekli NADPH'yi üretmek için glikoz6-fosfat dehidrojenazın katılımıyla oksitlenmiş glutatyonu (GSSG) indirgenmiş forma (GSH) dönüştürür. Birçok çalışma, bu proteinli antioksidanların stres yanıtında ve hipometabolik durumlarda hayvanların hayatta kalmasında rol oynadığını göstermiştir (Kültz, 2005; Higgins ve Swanson, 2002; Freire vd., 2011; Storey ve Storey, 2007; 2010b; 2012; 2013).

Donmaya toleranslı omurgalılar arasında, gen taraması, yumurtadan çıkan kaplumbağaların hem anoksiye hem de donmaya maruz kalmasına yanıt olarak demirtransferrin komplekslerinin hücrelere alınmasından sorumlu olan transferrin

reseptörünün yanı sıra ferritin H ve L zincirlerinin yukarı regülasyonunu gösterdi (Storey, 2006). Benzer şekilde, ferritin hafif zinciri ve metalotiyonin, ağaç kurbağasının kalbindeki donmaya yanıt veren genler için DNA dizisi ekranlarında varsayımsal olarak yukarı regüle edildi (Storey, 2004). Bu proteinler ayrıca, anoksi toleransı ve memelilerde kış uykusu dahil olmak üzere metabolik hız depresyonunun çeşitli hayvan modellerinde yukarı doğru düzenlenir (Storey ve Storey, 2007). Ağır metal bağlayıcı proteinler ile böceklerin soğuğa dayanıklılığı arasındaki bağlantılar da keşfedilmiştir. (Storey ve Storey, 2010b). Böceklerle yapılan çalışmalar, soğuk (-4°C), ısı (37°C) ve diğer streslere yanıt olarak transferrin transkriptlerinde iki ila dört kat artışlar göstermiştir (Lee vd., 2006). Donmaya toleranslı türlerde, kışın metal katalizli ROS oluşumuna bağlı hasar riskini azaltmak için metallerin güçlendirilmiş bağlanması özellikle önemli olabilir çünkü vücut sıvılarının donma konsantrasyonu (vücut suyunun% 65'i veya daha fazlası buza döndüğünde) kalan vücut sıvılarında yaklaşık üç kat serbest metal konsantrasyonları bulundurur. Ayrıca, demir hapsetme, hayvanlarda doğuştan gelen bağışıklığın bilinen bir parçasıdır; bir demir kaynağı reddedilerek mikrobiyal büyüme engellenir (Cherayil, 2011). Bu nedenle, ferritin demir depolama proteininin ve / veya diğer demir bağlama veya taşıma proteinlerinin (örneğin, transferrin) kış boyunca yukarı regülasyonu, hayvanların enfeksiyona yeterince yanıt veremediği bir zamanda (yani donmuş veya diyapozda) demir bağlayıcı proteinlerin birden fazla hipometabolizma formunda (örneğin, hazırda bekletme, östivasyon ve anaerobiyoz) artmasının bir başka önemli nedeni olabilir, çünkü uyku hali, doğuştan gelen veya uyarlanabilir bağışıklık sistemleri tarafından etkili savunmalar yerleştirmek için elverişli olmayabilir (Storey ve Storey, 2007). Ayrıca, antioksidan etki, birçok dondurarak sakınan böceklerde bulunan yüksek sisteinli AFP'lerin ikincil bir işlevi olabilir (Zachariassen, 2004). Bazı böceklerin lipoprotein buz nükleatörleri ayrıca metal bağlamada güçlü bir etkiye sahip olabilir ve donma nöbetleri sırasında detoksifikasyona katkıda bulunabilir (Trautsch vd., 2011). Antioksidan enzim aktiviteleri, donmaya toleranslı omurgalılarda da modüle edilir, bu da kışın donmanın hayatta kalmasında önemli bir rol oynadığını düşündürür. Sonbaharda toplanan ağaç kurbağalarında, 24 saat donmaya maruz kalma, test edilen beş organın hepsinde GPox aktivitesinde% 20 ila% 150'lik bir artışı tetikledi ancak SOD, katalaz, GST ve GR'yi etkilemedi (Joanisse ve Storey, 1996). Bununla birlikte, katalaz haricinde, ağaç kurbağası dokularındaki antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve GSH konsantrasyonları, su altında kış uykusuna yatan donmaya tahammülsüz *R. Pipiens* aynı dokularından çok daha yüksekti. Bu,

sonbaharda soğukta sertleştirme sırasında yapısal veya mevsimsel olarak indüklenen yüksek antioksidan savunmalarının, ağaç kurbağalarında doğal kışın donma yaşamasına katkıda bulunduğunu göstermektedir (Dinkelacker vd., 2005).

1.3.1.2. Şaperonlar

Şaperon proteinleri, hücrel proteomun işlevselliğini korumak için gereklidir. Katlanmamış proteinlerin (naif veya denatüre) toplanmasını önlemek için tek başlarına veya ortak proteinlerle birlikte hareket ederler, saf proteinlerin katlanmasını veya yanlış katlanmış proteinlerin yeniden katlanmasını kolaylaştırır ve protein montajını yönlendirir (Gething ve Sambrook, 1992; Feder ve Hofmann, 1999). Hücrelerde yapısal olarak çeşitli şaperonlar bulunur, bazıları stres koşulları altında daha fazla düzenlenir ve diğerleri stres altında indüklenir. HSP'ler en iyi bilinen şaperonlardır, ancak aynı zamanda endoplazmik retikulumda, bazı buz kristallerinde lokalize fonksiyonlara sahip glikozla düzenlenen proteinlerdir (GRP'ler). HSP aileleri ilk olarak moleküler kütleleri ile tanımlandı: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 ve küçük Hsps (sHsps) (boyutlar 30 kDa) (Gething, 1992; Galindo, 2010).

İndüklenebilir HSP'ler birçok stres türüne (ör. ısı, düşük oksijen, UV radyasyonu, ağır metaller, vb.) yanıt verir, ancak tarihsel olarak, soğuk veya donmaya maruz kalmanın HSP ekspresyonu üzerindeki etkilerine dair çok az çalışma yapılmıştır. Bununla birlikte, maya ile yapılan yakın tarihli bir çalışma, donma toleransı verilmesinde şaperonların rolü için güçlü destek sağlamaktadır (Mutyam vd., 2011). HSP'ler sonbaharda soğukta sertleşmenin bir parçası olarak yükselebilir veya mevsimsel diyapoza girebilir veya anoksi/iskemi gibi donmanın bileşen streslerine yanıt verebilirler. Örneğin, ağaç kurbağalarına karşı yazın karaciğer proteinlerindeki mevsimsel değişimin bir kütle spektrometresi analizi, donmaya maruz kalmadan bağımsız olarak kış hayvanlarında HSP70'in hem aynı kökenli hem de uyarılabilir formlarının 1.3 kat daha yüksek bir içeriğini gösterdi (Kiss vd., 2011). Şaperonlar, birçok böcekte diyapoz girişinin bir parçası olarak indüklenir (Clark ve Worland, 2004; Moribe, 2010; Rinehart, 2007; 2010). Şaperonların kışın donmada hayatta kalması için önemli işlevleri spesifik olarak tanımlanmamıştır, ancak muhtemelen bu proteinlerin diğer stres durumlarındaki eylemleriyle paraleldir. Kışı geçiren türlerde proteinleri yeniden modifiye etmek için şaperon eylemi gerektirebilecek hücrel proteoma zorlukları, geniş bir sıcaklık aralığına maruz kalmayı, hızlı sıcaklık değişimini (özellikle gelgit türleri veya

ağaçlarda/çalılarda kışı geçiren böcekler için), donma-çözülme döngülerini içerebilir (Kayukawa ve Ishikawa, 2009). Genel olarak, bu iki türden elde edilen bilgiler, hücre hacminde (ve dolayısıyla hücre iskeleti yapısında) her zaman büyük değişikliklere neden olan bir donma/çözülme olayının, çözülmeden sonra hücre iskeleti filamentleri ağını uygun şekilde yeniden yapılandırmak için şaperon yardımına ihtiyaç duyabileceğini göstermektedir (Storey ve Storey, 2013).

1.3.1.3. Hipometabolizma Genlerinin Düzenlenmesi

Proteomun seçilmiş kısımlarının yeniden yapılandırılması, dondurucu hayatta kalma için çok önemlidir; örneğin, böceğin soğuğa dayanıklılığı üzerine yapılan ilk çalışmaların çoğu, glikojen fosforilaz ve poliolsentezi için gerekli çeşitli enzimlerin aktivitelerinde mevsimsel ve/veya soğuğa bağlı artışları belgelemiştir (Storey, 1991; 1997).

Storey ve Storey (2013); başarılı birdonma sağkalımı için çok önemli olan, organizmalar soğukken ve/veya donmuşken ihtiyaç duyulmayan ve ATP'nin yalnızca anaerobik glikolizden üretildiği donmuş durumda çalıştıramayacak kadar enerjinin pahalı olduğu birçok hücre fonksiyonunun koordineli bir şekilde bastırılmasıdır. Hücrelerin, organizmalar donduğunda veya diyapoz veya torpor durumuna geçtiğinde proteinleri ve mRNA transkriptlerini geniş çapta bozması mantıksız olacaktır çünkü hayvanlar yeniden ısındığında ve/veya çözülduğünde bunlara hemen tekrar ihtiyaç duyulacaktır. Bu, özellikle hücresel bileşenlere tahakkuk eden herhangi bir hasarı veya son ürünlerin (örneğin laktat ve GSH konjugatları) birikmesini tersine çevirmeye katkıda bulunan proteinler veya süreçler ve ayrıca aerobik yaşama sorunsuz bir geçiş için gerekli süreçlerdir (örn. metabolik yakıt olarak lipid kullanımına dahil olan enzimler). Bu nedenle, hem metabolik fonksiyonların bastırılmasını hem de çeşitli hücre işlemlerinin farklı düzenlenmesini sağlayan tersine çevrilebilir mekanizmalara ihtiyaç vardır. Yüksek enerji gerektiren ATP, hücre işlevleri, transkripsiyon, translasyon, hücre bölünmesi, gelişimi ve büyümesi gibi zorlu, hayati süreçlerde yüksek oranlarda kullanılmaktadır. Stres koşullarında bu hayati süreçler için gerekli olan ATP mekanizmalarının kolayca tersinir ve hızlı üretimini sağlayan mekanizmalara ihtiyaç duyulmaktadır. İki kontrol mekanizması özellikle ilgi çekicidir. Birincisi, mikroRNA'nın eylemleri aracılığıyla düzenlenen mRNA transkriptlerinin tersine

çevrilebilir depolanmasıdır. İkincisi,metabolizmadaki değişiklikleri koordine etmek için en yaygın olarak kullanılan metabolik kontrol mekanizması olarak bilinen tersinir protein fosforilasyonudur. Protein kodlamayan RNA türleri, boyutlarına (mikro 18–23 nt, küçük 20–200 nt ve uzun> 200 nt) ve/veya eylemlerine (örn. Antisens ve küçük müdahale) göre tanınır ve sınıflandırılır (Mercer vd., 2009; Qureshi ve Mehler, 2012). Özellikle, mRNA transkriptlerinin posttranskripsiyonel düzenlenmesinde mikroRNA'ların rolünün çok önemli olduğu kanıtlanmıştır, biyotik ve abiyotik streslere, çoklu hastalık durumlarına organizmal yanıtlar verilmesinde hücrel metabolizmanın sağlanmasında işlevleri bilinmektedir. Her bir hayvan genomunda, tüm genlerin yaklaşık % 1 ila % 2'sini kapsayan yüzlerce miRNA kodlanmıştır ve protein kodlayan genlerin % 60'ından fazlasının, miRNA bağlanması için hedefler olduğu hesaplamalı olarak tahmin edilmektedir (Ebert ve Sharp, 2012). mRNA ve microRNA arasındaki etkileşimler, gen ekspresyonunun regülasyonu için muazzam bir kapsam sunar, çünkü her bir mikroRNA türü birden fazla farklı mRNA transkriptine bağlanmakla kalmaz, aynı zamanda her tip mRNA transkripti birden fazla mikroRNA türü tarafından hedeflenebilir (Maziere ve Enright, 2007).

Düşük sıcaklık ve donma dahil olmak üzere abiyotik strese verilen yanıtlarda mikroRNA'nın rolü araştırmaları bitkiler üzerinde hızla ilerlemekte olup son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, hayvan donma toleransında mikroRNA'nın rolünü araştırdı (Barakat, 2012; Storey ve Storey, 2013). Çalışmaların ortak sonucu, metabolik hızı indükleyen streslere yanıt olarak çoklu mikroRNA türlerinin seviyelerinde bir artış bulundu. Enerji tüketen protein sentezinin baskılandığı hipometabolizma dönemleri ve çekirdekte SUMO aracılı transkripsiyon inhibisyonu, polisom ayrışması dahil diğer formlar sırasında depolanmış granüllerdeki mRNA transkriptlerinin baskılanmasını ve sekestrasyonunu destekler. Sitoplazmada ve ribozomda tersinir fosforilasyon stres duyarlılığının bastırılmasıyla ilişkilendirildi (Biggar ve Storey, 2012; Storey ve Storey, 2010a).

miRNA seviyelerindeki donmaya duyarlı değişiklikler, donma toleransının dört hayvan modeli türünde araştırılmıştır: *R. sylvatica*, *C. picta*, *E. solidaginis* ve *L. littorea* (Biggar vd., 2009; 2012; Courteau vd., 2012; Lyons vd., 2013, Shaffer vd., 2013). Donma stresi sırasında ağaç kurbağalarının karaciğerinde 1.5 kat arttı ve miR-21, iskelet kasında konrollere göre 1.3 kat artmıştır (Biggar vd., 2009).

Dicer proteini, stresli hücrelerde gelişmiş olgun miRNA üretiminin, seçilen mRNA transkriptlerinin daha fazla depolanmasına yol açtığını, anoksi veya donma koşulları altında global translasyon baskılamasına katkıda bulunduğunu gösterir. Gerçekte, mikroRNA etkisinin moleküler mekanizmalar da geniş ölçüde kolaylıkla uygulanabilir, koordine edilebilir, uyarılabilir ve tersine çevrilebilir olması gerektiği tahminiyle oldukça uyumludur (Storey ve Storey, 2007).

Storey ve Storey (2013), Metabolizmanın tersine çevrilebilir protein fosforilasyon kontrolü, protein kinazlar tarafından proteinler üzerindeki serin, treonin veya tirozin kalıntılarına kovalent olarak bağlı fosfatın eklenmesi veya protein fosfatazlar tarafından fosfatın uzaklaştırılması yoluyla tersine çevrilebilir fosforilasyon, enzimler tarafından yanıtları koordine etmek için iyi belgelenmiş bir mekanizmadır. Hücrelere uygulanan strese ve gerektiğinde hipometabolik duruma geçişe aracılık eden işlevsel proteinler, protein kinaz veya protein fosfataz etkisi yoluyla, hedef proteinler ve enzimler, aktiviteleri, kinetik özellikleri, alt birimlerin birleşmesi veya ayrılması, diğer proteinlerle etkileşimleri veya bunların hücre altı bölmeleri için önemli sonuçlara yol açabilecek konformasyonel değişikliklere uğrar. Tersinir fosforilasyon, birçok metabolik enzimin ve fonksiyonel proteinin (örn., Ribozomal başlatma ve uzama faktörleri) aktivitelerini ve özelliklerini kontrol etmek ve değiştirmek için çok önemli bir düzenleyici mekanizma olmakla kalmaz, aynı zamanda transkripsiyon faktörlerinin etkisini de düzenler (bu nedenle, donma-çözülme sırasında belirli genlerin yukarı regülasyonu) ve çoğu hücresel sinyalleme kademesinin açma/kapama aktivitesini kontrol eder. Donma toleransı ile ilgili olarak, çok sayıda tersinir fosforilasyon kontrolü örneği belgelenmiştir

Soğuğa maruz kalmanın, glikojen fosforilazı aktive ettiği, hem protein miktarını hem de aktif fosforile edilmiş durumda enzim yüzdesini artırdığı bilinmektedir (Storey ve Storey, 1988; 1991). Ağaç kurbağası karaciğeri tarafından kriyoprotektan olarak hızlı donma kaynaklı glikoz üretimini düzenler. Protein fosforilasyonu, hem glikojen fosforilaz aktivasyonuna hem de glikojen sentazın zıt inhibisyonuna aracılık ederek, karaciğer glikozunu sadece kontrollerde ~ 5 mmol / L'den dondurulmuş kurbağalarda > 200 mmol / L'ye yükseltmekle kalmayan, aynı zamanda devasa bir glikojenolize neden olur (Storey ve Storey, 1988; Russell ve Storey, 1995). Glikojen sentazın

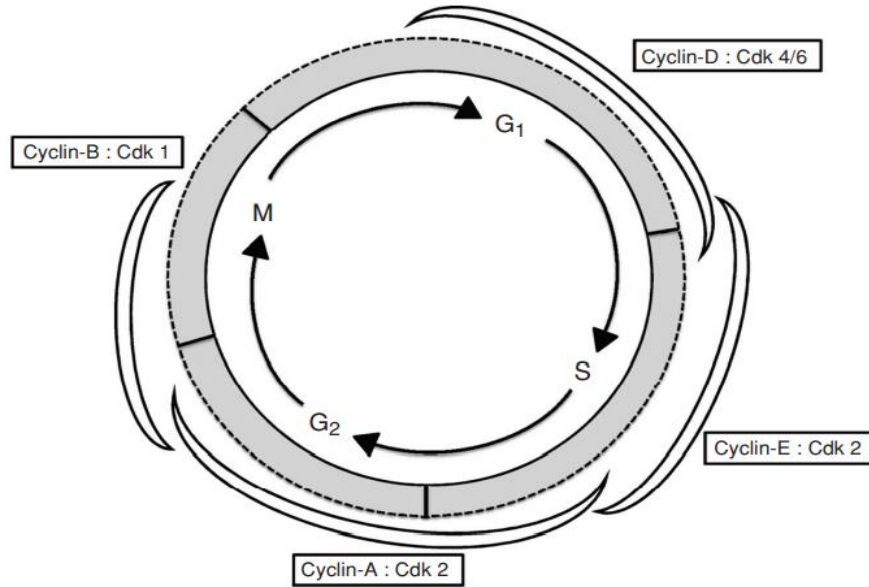
baskılanmasına, bu kinazı aktive eden ve karşılığında glikojen sentazı fosforile etmesine ve inaktive etmesine izin veren glikojen sentaz kinaz 3'ün güçlü bir donma ile uyarılan defosforilasyonuna aracılık etmektedir (Dieni vd., 2012).

Hücre döngüsü düzenlemesi hücre çoğalması, yalnızca DNA kopyalanmasını değil, aynı zamanda diğer birçok makromolekülün (proteinler, zarlar, vb.) sentezini de içeren enerji bakımından maliyetli bir süreçtir. Hücre döngüsünün inhibisyonu, organizmalar besin veya oksijen sınırlaması veya diğer çevresel stres biçimleri yaşadığında rutin olarak meydana gelir (Douglas ve Haddad, 2003; Kostal vd., 2009; Padilla ve Ladage, 2012; Podrabsky ve Culpepper, 2012; Wu ve Storey, 2012). Düşük oksijenle ilişkili hücre döngüsü, özellikle tümör büyümesiyle ilgili olduğu için, önemli tıbbi ilgi vardır, ancak genel olarak, iyi gelişmiş anoksiye veya donma toleransına sahip türlerde hücre döngüsü kontrolü hakkında az bilgi vardır (Biggar ve Storey, 2009). Proteomun seçilmiş kısımlarının yeniden yapılandırılması, dondurucu hayatta kalma için açıkça çok önemlidir. Hücrelerin, organizmalar donduğunda veya diyapoz veya torpor durumuna geçtiğinde proteinleri ve mRNA transkriptlerini geniş çapta bozması mantıksız olacaktır çünkü hayvanlar yeniden ısındığında ve/veya çözüldüğünde bunlara hemen tekrar ihtiyaç duyulacaktır (Storey ve Storey, 2013).

Ağaç kurbağası karaciğeri tarafından kriyoprotektan olarak hızlı donma kaynaklı glikoz üretimini düzenler. Protein fosforilasyonu, hem glikojen fosforilaz aktivasyonuna hem de glikojen sentazın zıt inhibisyonuna aracılık ederek, karaciğer glikozunu sadece kontrollerde ~ 5 mmol / L'den dondurulmuş kurbağalarda > 200 mmol / L'ye yükseltmekle kalmayan, aynı zamanda devasa bir glikojenolize neden olur (Russell ve Storey, 1995). Karaciğer glikoz-6-fosfataz aktivitesindeki hızlı bir artış, glikoz üretimi için aynı derecede önemli olabilir (Storey ve Storey, 2013).

Hücre içi sinyal yolu, hücre dışı sinyallere yanıt olarak hücrelerin davranışında rol oynar. Büyüme ve üremeyi düzenlemeye ek olarak, tehlikeli stres ve hücre dışı donma altında hücre içi olayları kontrol etmede de rol oynarlar. (Storey ve Storey, 2001; 2017, McNally, 2002) (Şekil 1.5). Hipoplaziye aracılık etmek, hücre sağkalımını desteklemek ve yara iyileşmesine yardımcı olmak için iki ana sinyal yolunun donmaya tepki verdiği bilinmektedir (Storey ve Storey, 2017). Hücrenin "enerji sensörü", AMP ile aktive olan protein kinaz (adenosin monofosfat) (AMPK), dondurma sırasında hücre içi ATP

seviyelerinin enzimatik düzenlenmesinde rol oynar. AMPK'nin donmadaki rolü, asetil-CoA karboksilazı (ACC) inhibe etmek ve karbonhidratların yağ asidine karşı enerji ihtiyacını bastırmaktır. (Rider vd., 2006).



Şekil 1.5. Her aşamayı düzenleyen Cdk ve siklin çiftlerini gösteren hücre döngüsünün dört aşaması. Siklin: Cdk kompleksinin kinaz aktivitesi, her fazın ilerlemesini ve tamamlanmasını düzenleyen substratları aktive eder (Storey ve Storey; 2013).

Protein kinaz B'nin dondurma ile ilişkili başka bir potansiyel bileşen olduğu gösterilmiştir. Protein kinaz B, glikoz metabolizması, protein sentezi, hücre döngüsü ve anti-apoptoz gibi birçok metabolik süreci düzenler. Protein kinaz B'nin, *R.Sylvatica* ile hipoksik ve dehidrasyon deneylerinde çok aktif olduğu bildirilmiştir. (Zhang vd., 2011; 2020; Tan vd., 2013). Protein kinaz B'nin kurbaçalarda donma stresinde rol oynadığı bilinen fr10, fr 7 ve li16 genlerine bağlanan proteinlerin sentezinden sorumlu olduğu tartışılmaktadır. Donma sırasında hepatositlerin apoptoza girmesini önleyen protein kinaz B, karaciğer donma sırasında hayati fonksiyonların devamlılığını sağlamaktadır (Dieni ve Storey, 2009; 2011 ; Dieni vd., 2012; Tan vd., 2013; Storey ve Storey, 2017).

1.3.2. Kriyoprotektan Biriktirme

Buz kristali büyümesini kontrol etmek, petrol sahaları, rüzgar türbinleri, kaldırımlar ve donmuş gıda ürünleri gibi birçok ortam için önemli teknolojik etkileri olan büyük bir bilimsel zorluktur (Cochet ve Widehem, 2000; Zeng vd., 2006; Koop ve Zobrist, 2009; Hassas-Roudsari ve Goff, 2012; Perfeldt vd., 2014; Tonelli vd., 2015). Suyun buza

kristalleşmesi ve çözüldükten sonra buzun yeniden kristalleşmesi pek çok organizma için hücre ölümünün başlıca nedenlerinden biridir (Chaytor vd., 2012; Briard vd., 2016; Huebinger vd., 2016). Sıfırın altındaki sıcaklıklarda yaşayan soğuğa adapte olmuş organizmalar, bu strese, makromoleküler çözüm geliştirdiler. Suyun donma noktasını topluca düşüren ve donma ve donma altındaki habitatlarda çeşitli organizmaların hayatta kalmasını sağlayan antifriz proteinleri üretirler (DeVries, 1971; DeVries ve Wohlschlag, 1969). Antikoagülan proteinlerin, buz yüzeyini algılayan ve geri dönüşümsüz olarak bağlanan ve böylece daha fazla buz kristali büyümesini önleyen adsorpsiyon inhibisyonu yoluyla hareket ettiği düşünülmektedir (Raymond ve DeVries, 1977). Bu nedenle buz büyümesi, adsorbe edilen AF(G)P'ler ve buz arasındaki bölgelerle sınırlandırılır. Bu etki sonunda kristal büyümesinin durmasına ve Kelvin etkisi olarak bilinen bir fenomen olan donma noktasında bir azalmaya yol açacaktır (Kristiansen ve Zachariassen, 2005).

Düşük moleküler ağırlıklı antifrizlerin sentezi ve biriktirilmesi, soğuğa dayanıklılıktaki en önemli uyarlamalardandır. Storey ve diğerleri. (1997); Kriyoprotektanlar iki gruba ayrılabilir. Birinci grubun bileşikler, hücre zarları (teraloz ve prolin gibi) ile etkileşime girer ve omurgasızlar tarafından yaygın olarak kullanılır. Bu bileşikler, donma kaynaklı hücre kütlesi azalması sırasında zarın iki katmanlı yapısının stabilizasyonunu destekler. Diğer grup, düşük moleküler ağırlıklı kriyoprotektanları içerir. Bu moleküller ortamda yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunda, hücre içi su kaybını sınırlamak ve hücre kütlesinin en az korunmasını sağlamak için bir topoloji oluştururlar. Çoğu durumda, toplam vücut suyunun kütlesi azaltılarak buza dönüştürülür ve kriyotolerant organizmalar, donma sırasında hücrelerinde yeterli kriyoprotektan biriktirir (Storey vd., 1992; 2021).

Antifriz ajanları olarak işlev gören, doğal olarak oluşan düşük moleküler ağırlıklı moleküllerin yüksek konsantrasyonlarının birikmesi, dış sıcaklıklara karşı direncin ortak bir özelliğidir. Karasal omurgasızlar genellikle dondan kaçınma veya direnç stratejileri olarak büyük miktarlarda gliserol ve/veya diğer polihidrik alkollerini biriktirir. (Storey ve Storey, 2012; 2020). Çalışmalar, birçok farklı molekülün antifriz maddesi olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Örneğin, gliserol, soğuğa dayanıklı böceklerde çok yaygın bir antifriz maddesidir. Böcekler tarafından terrarose ve sakaroz formundaki disakkaritler ve sorbitol, ribitol, eritrol, etilen glikol formundaki diğer polihidrik alkoller

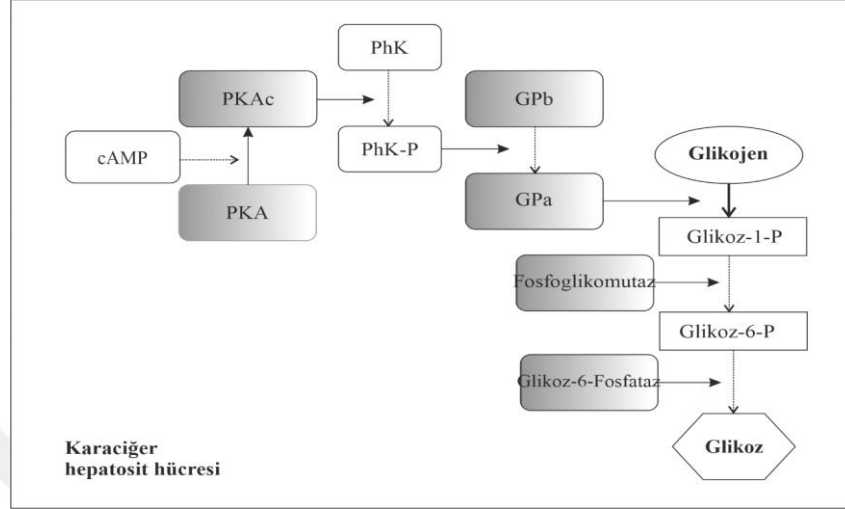
kullanılır. (McNally, 2002; Storey ve Storey, 2005; Alexander I. Zhmakin, 2009; Lin, 2009). Kaplumbağa *Chrysems colla marginata* gibi donmaya toleranslı bazı hayvanların donma üzerine hücre içi amino asit seviyelerini arttırdığı bulunmuştur (Churchill ve Storey, 1993).

Glikoz, gliserol ve üre, kriyojenik amfibiler tarafından en yaygın olarak kullanılan antifriz maddeleridir (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). Glikojen, glikoz radikallerinin yüksek oranda dallanmış bir polimeridir ve omurgalılarda karbonhidratların başlıca depolama şeklidir. Omurgalılarda önemli bir enerji kaynağı olarak hizmet etmenin yanı sıra, karaciğer glikojeni ayrıca kriyojenik organizmalarda önemli bir koruyucu donma kaynağı olarak hizmet eder. (Wassersug vd., 1993, Bollen vd., 1998, Storey ve Storey, 2004; Dieni vd., 2012; Sinclair vd., 2013). *R.Sylvatica*'da donma sırasında aktive olan glikoz ana kriyoprotektan maddedir (Mattice, 2018; Costanzo, 2019; Hawkins vd., 2019; Storey ve Storey, 2019; 2020).

1.3.2.1. Glikoz

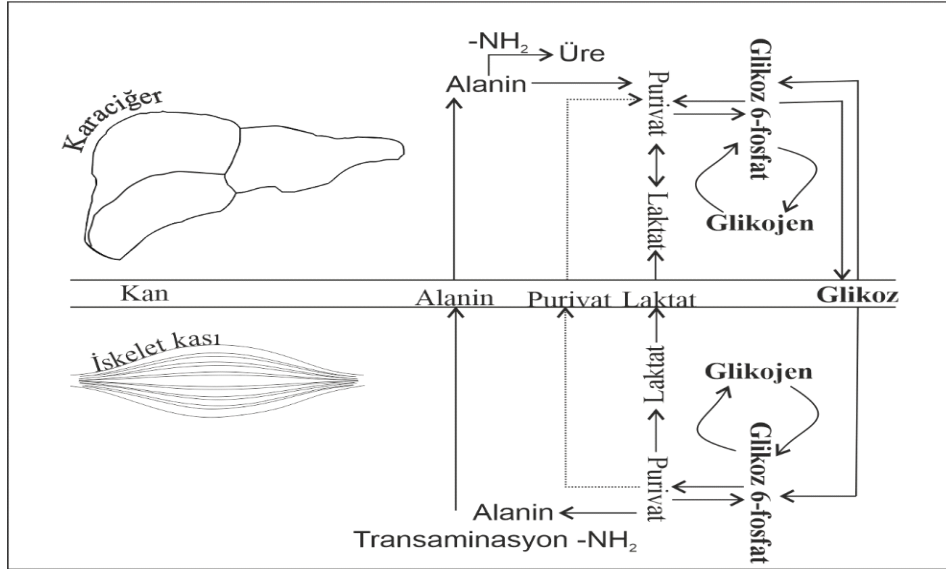
Glikoz, ekolojik olarak yüksek derecede soğuğa toleranslı türlerde önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde ve sadece kısa süreli donları tolere edebilen türlerde daha az ölçüde üretilir. (Costanzo vd., 2013; Amaral, 2014; Larson vd., 2014). Metabolizmada enerji üretimi için hammaddeler; karbonhidratlar, lipidler ve proteinlerdir. Bu metabolitlerin parçalanması ve işlenmesi ile enerji çeşitli şekillerde elde edilebilir. (Şekil 1.6). Bir organizmanın temel enerji kaynaklarının çoğu glikozun parçalanması (glikoliz) yoluyla elde edilir. Kullanılabileceğinden daha fazla glikoz ve benzeri karbonhidratlar glikojene (glikojenez, glikojenez) dönüştürülür ve bunlar karaciğer ve kas dokusunda depolanır. Gerektiğinde depolanan bu glikojen hızla glikoza çevrilir (glikoliz, glikojenoliz) (Şekil 1.7).

glikolizi aktive eder, buna yanıt olarak fosfoglukomutaz ve glukoz6fosfataz enzimlerinin aktivasyonu ile glukoz üretimi gerçekleşir (Crerar vd., 1988; Storey ve Storey, 2004; Amaral, 2014; Amaral vd., 2020) (Şekil 1.8).



Şekil 1.8., Hücrelerin glikojenden glikoz oluşturduğu glikojenoliz işlemi (Yoldaş,2021).

Donma meydana geldikçe ve buz biriktikçe kriyoprotektan dağılımı azaldığından, bu enzimatik yolun aktivitesi, glikozun dondurmanın erken safhalarında kana ve dokulara verilmesine izin vermek için hızlıdır (Lee vd., 1992; Storey ve Storey, 2005; Roy ve Goswami,2019). *R. sylvatica*'nın donma direncinin başarısı, kısmi don oluşumunun neden olduğu glisemik tepkiye bağlıdır. Glikojen fosforilaz aktivitesinin neden olduğu hızlı glikojenoliz nedeniyle, karaciğerde glikojenden üretilen glikoz, dolaşımı tamamen durdurulmadan vücuttaki diğer dokulara hızla taşınmaktadır. (Storey ve Storey, 1984; Storey 2004; Hawkins vd., 2019; Lung, 2019; Gupta vd., 2020) (Şekil 1.9).



Şekil 1.9: Karaciğer, kas ve kan dokusunda glikoz döngüsü ve taşıma yolağı. (Yoldaş, 2021)

Plazma zarındaki glikoz taşıma seviyesi, glikoz iletimi nedeniyle artar, böylece sadece glikoz salım hızı değil, aynı zamanda diğer organlar tarafından glikoz alımı da artmaktadır. (Storey ve Storey, 1988; King ve ark, 1995; Roy ve Goswami, 2019; Amaral vd., 2020). Zarlar ve proteinler üzerinde bir antifriz maddesi olarak işlev gören glikoz, buz seviyelerini düşürür ve hücre kurumasını kontrol eder. (Crerar vd., 1988; Costanzo vd., 2013, Lung vd., 2019). Konsantrasyona bağlı olarak, glikoz hücresel, doku ve biyolojik seviyelerde donma direncini artırır. Karaciğer glikojenolizine, glikojenoliz hızına, doku donma hızı ve diğer faktörlere bağlı olarak donmuş dokudaki glikoz konsantrasyonu belirlenmektedir (Costanzo vd., 1993b; Costanzo, 2019; Amaral vd., 2020).

1.3.2.2. Gliserol

Gliserol genellikle soğuk böcek kontrol stratejilerinde rol oynayan bir kriyoprotektandır (Storey ve Storey, 2012; Duman ve Newton, 2020), *Salamandrella keyerlingii* ve *Hylid* kurbağaları için bir kriyoprotektan olarak kullanılabilir (Berman vd., 1984; Storey ve Storey, 1985; 1986; Layne ve Lee, 1989). Glikoz gibi, gliserol seviyeleri de yaşa, coğrafi dağılıma, numune alma tarihlerine ve laboratuvar koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterir (Irwin ve Lee, 2003; Layne ve Stapleton, 2009). Gliserol üretimi ve kullanımı hücresel hasar açısından glikoza göre daha uygun görünse de, gliserol üretimi daha fazla ATP tüketimi ve daha karmaşık yollar gerektirir (Storey ve Storey, 2017).

1.3.2.3. Üre

Antifriz molekülü olarak önemli olan üre, pıhtılaşmayı önleyen ve hücre kütlesini azaltan bir metabolittir ve vücut sıvılarının net geçirgenliğini arttırmada önemli bir faktördür. (Costanzo ve Lee, 2008; Costanzo vd., 2013). Bununla birlikte, dona dayanıklı kurbağa üre sentezi, dona karşı doğrudan reaksiyondan nadiren etkilenir. (Costanzo 2005; Costanzo ve Lee, 2008; Hawkins vd., 2019). *R. sylvatica*, soğuğa maruz kaldığında ürede önemli bir artış gösterir. Yaz sonunda, plazma üre seviyeleri 10 mM'den 86 mM'ye yükseldi ve kurbağalar dehidrasyon koşullarına maruz kaldıklarında üre seviyeleri 187 mM'ye ulaştı (Costanzo vd., 2013). Anuranlarda dehidrasyon stresine ortak bir yanıtı ve kurak ortamlarda veya aşırı tuzlu çevre koşullarında üre seviyesinin arttığı bilinmektedir (Hillman vd., 2008; Storey ve Storey, 2017). Kurbağalarda bulundukları ortam su miktarı azaldıkça vücutlarında yavaş yavaş üre birikir ve vücuttan su kaybını geciktirmek için kullanılan yüksek ozmolarite oluşarak su emilimini teşvik eder. (Hillman vd., 2008).

Dryophytes chrysoscelis, donmaya karşı koruyucu olarak gliserol kullanan bilinen dona dayanıklı kurbağalardan biridir. Bununla birlikte, bu kurbağanın bir kriyoprotektan olarak üre kullandığı kanıtlanmıştır. Soğuğa maruz bırakılan hayvanların kas dokusu ve karaciğerindeki üre miktarı deney gruplarına bakılarak en az 2 kat artarak stres yanıtı oluşturmuştur (Amaral vd., 2018).

1.3.2.3 Antifriz Proteinler

Antifriz proteini (AFP) terimi, Antarktika balıklarının kan serumlarının, kolligatif buz erime noktası düşüşünden beklenenden daha düşük sıcaklıklarda donduğu gözleminde geliştirilmiştir (DeVries, 1971). Buzun erime noktası ile donma noktasının ayrılması olarak gözlemlenen bu etki, termal histerez (TH) olarak adlandırılır. TH sıcaklık aralığında buz kristallerinin büyümesi tamamen durdurulur. Mikroskobik buz oluşumu meydana gelebilmesine rağmen, buz kristallerinin makroskopik boyutlara büyümesi engellenir. TH aktivitesinin gözlemlenmesiyle birlikte donmadan kaçınan deniz teleost balıklarında AFP'lerin keşfi, donmadan kaçınma ve TH'nin bağlantılı olduğu önerisine yol açtı. Deniz balıkları, böcekler ve diğer kara eklembacaklıları bu gruba atanmıştır ve buradaki birincil AFP işlevi, sözde donmanın önlenmesidir (Duman, 2015). Bununla

birlikte, AFP'lerin başka bir yönü, donma toleransı sınıfına ait olan bir koruma mekanizması olan daha küçük buz kristallerinin boyutunu kontrol etmek olabilir (Storey ve Storey, 2017). AFP tarafından buzun yeniden kristalleşmesinin engellenmesi, daha büyük buz kristallerinin küçük kan damarlarını tıkama riskini azaltabilir (Cziko vd., 2014).

AFP ilk mikrograflardan bazılarında duyulan merak ve ilgiden doğmuştur (Raymond vd., 1989; Haymet vd., 1998; 1999; Takamichi vd., 2009). Bu tür mikroskobik görüntülerin bazı örnekleri için AFP'nin varlığı, kutup balıklarında ve soğuğa dayanıklı böceklerde gözlemlenen aşırı hayatta kalma stratejilerinin çoğunu açıklayabilir (Smoke, 1980; Dymond ve DeVries, 1977).

AFP, bakteriler, mantarlar, böcekler, hayvanlar ve bitkiler gibi kendilerini vahşi doğada don hasarına karşı koruması gereken çok çeşitli organizmalarda bulunur (Griffith ve Ewart, 1995; Crevel vd., 2002; Bouvet ve Ben, 2003).

Kriyokoruyucu biyosenteze ek olarak, 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda donmaya toleranslı organizmaların hayatta kalması için başka bir strateji, buz oluşumunu kontrol etmek ve engellemektir. Bu işlem sırasında donma süresinin buz oluşturan protein (INP, ice nucleating protein) ve antifriz proteinin (AFP, antifreeze protein veya IBP, ice bağlayıcı protein) sentezi ile düzenlenmektedir (Duman, 1982; 2001; Duman ve Newton, 2020; Niu vd., 2021). Buz kristalleşmesini destekleyen INP'ler, AFP buz kristallerinin elastik yüzeylerine bağlanır ve tehlikeli boyutlara ulaşmasını engellemektedir. INP'ler hücre dışı boşlukta kristalleşmeyi indüklerken, buz tutmayan hücrelerin çevrelerinde ozmolaritede bir artış sağlayarak, bu bölgelerde donma ve aşırı soğuma önlenmiş olmaktadır (McNally, 2002; Lung, 2019; Duman ve Newton, 2020; Storey vd., 2021). INP, buz büyümesini indükleyerek, hücrenin aşırı soğumasını en aza indirir ve kriyojenik sıcaklıklarla sonuçlanan yavaş ve sabit dondurmanın gerçekleşmesine izin vererek hücre kütlesini azaltıp tehlikeli hücre donmasını önlemektedir. (Duman, 2015; Duman ve Newton, 2020; Storey vd., 2021). Sonbaharda böcekler INP'leri sentezleyip depolayabilirken amfibiler depolama yapamaz. INP'ler, çeşitli kriyoprotektif önlemler (örneğin, kriyoprotektif proteinlerin ve birçok kriyoprotektif metabolitlerin artan ekspresyon seviyeleri) sonucunda vücuttaki sıvılar donmaya başlanıldığında indüklenir, yalnızca kriyoprotektifler tarafından

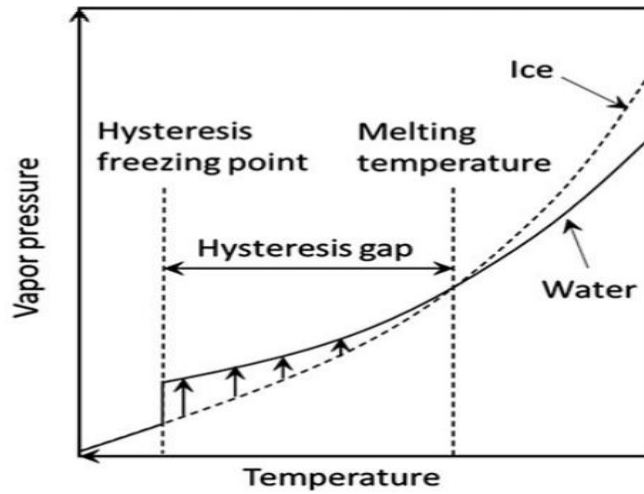
indüklendiğinden, kriyoprotektif kurbağalar için özellikle önemlidir. (Storey ve Storey, 1988; 2013; Zachariassen ve Kristiansen, 2000; Duman, 2001).

Buz büyümesinin ve yeniden kristalleşmenin bir inhibitörü olan AFP, ilk olarak Antarktika okyanus balıkları (*Notothenioidei*) üzerinde yapılan çalışmalarda keşfedildi ve yakın zamanda, birçok balık türü gibi bazı böceklerin donmadan kaçınma stratejileri keşfedildi ve tanımlandı. (Devries, 1971; Smoke, 2001; 2015; Fletcher vd., 2001, Davies 2014). Balık, AFP çalışmalarında en çok çalışılan gruptur ve antikoagülan proteinler (AFP) AFP tip 1, AFP tip 2, AFP tip 3, AFP tip ve antikoagülan glikoprotein (AFGP) olarak sınıflandırılmaktadır (Storey ve Storey, 1988; Duman vd., 1991b, Fletcher vd., 2001). Tropikal ve subtropikal balıkların çoğu, buzlu ortamlarda vücut sıcaklıkları - 0.8°C'ye düştüğünde donma stresini tolere edemez, nototenoidlerinin donması için vücut sıcaklıklarının -2.2°C düşmesi gerekir (Eastman ve Devries, 1986). Antarktika'da bulunan *Team Notothenioidei*, buzulların kapladığı alanda hayatta kalabilen ve yok olma tehlikesinden kaçabilen ender canlılardır. Çalışmalarda, bu koşullar altında hayatta kalmalarının sırrının, glikoprotein yapısındaki antiproliferatif proteinler (AFGP'ler) olduğu anlaşılmıştır ve bu, AFGP'lerin bulunduğu ilk nototenoidlerden biridir (Crevel vd., 2002). AFGP'lerin yapısı *Nototheniidae*'den sonra 2000'li yıllara kadar *Artedidraconidae*, *Batydracanyidae*, *Channichthyidae*, *Muraenolepididae*, *Liparididae*, *Zoarcidae* et *Myctophidae* familyalarında 37 türde tespit edilmiştir (Sidell, 2000).

Tüm AFP'lerin iki özelliği vardır: termal histerezis (erime noktasının altındaki bir çözeltinin donma noktasını düşürme yeteneği) ve buzun daha büyük kristaller halinde yeniden yapılandırılması (Browv vd., 2010). AFP'lerin birincil rolü, hücre dışı buzun çekirdeklenmesini önlemek değil, daha fazla kristal büyümesi, yani yeniden kristalleşme oranını azaltmaktır. AFP'lerin işlevleri arasında, erime noktasını etkilemeden gıdanın donma noktasının düşürülmesi (termal histerezis) (Boonsupthip ve Lee, 2003; Kontogiorgos vd., 2007; Zhang vd., 2008), buz kristali morfolojisinin modifikasyonu (Boonsupthip ve Lee, 2003; Kontogiorgos vd., 2007), buz kristallerinin yeniden kristalleşmesini inhibe ederek (Boonsupthip ve Lee, 2003; Kontogiorgos vd., 2007; Zhang vd., 2008), hücre bütünlüğünü artırarak ve mikrobiyal büyümeyi azaltmak (Boonsupthip ve Lee, 2003). AFP'lerin donma sıcaklığını düşürme, donma-çözülme sırasında yeniden kristalleşmeyi önleme ve buz çekirdeklerinin etkilerini nötralize etme

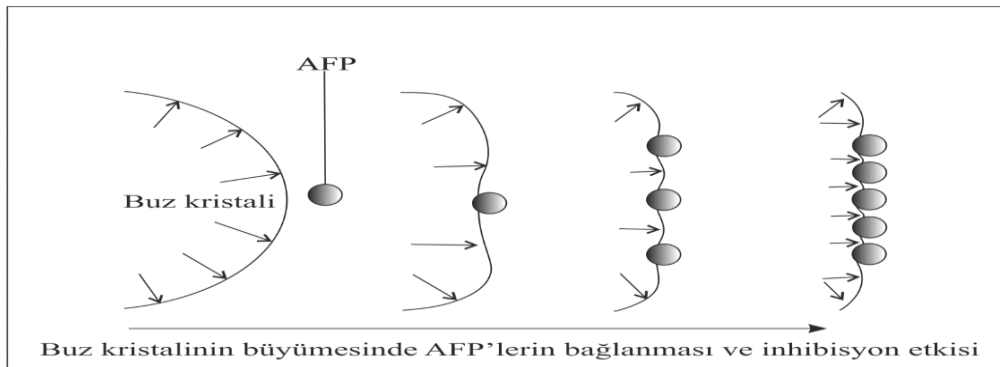
yetenekleri, dondurarak depolama sırasında doğal buz modölatörleri olarak kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır (Griffith ve Ewart, 1995).

Termal histerezis, denge donma noktası ile çözeltideki küçük bir buz kristalinin büyümeye başladığı sıcaklık arasındaki termal fark olarak tanımlanır. AFP bir buz kristalinin yüzeyine bağlandığında, daha fazla kristal büyümesini engeller (Ramløv ve Friis, 2020a) (Şekil 1.10).



Şekil 1.10: Termal Histerizisde sıcaklık azaldıkça basınç artmalıdır (Ramløv ve Friis, 2020).

Kristiansen ve Zachariassen'den (2005), Çok kristalli buz çözeltisinde yeniden kristalleşme meydana gelir. Termodinamik kuvvetler nedeniyle, daha büyük buz kristalleri, çözelti tek bir büyük buz kristali içerene kadar yavaş yavaş daha küçük kristallerin değerine büyür. AFP, bir polikristal çözeltinin buz yüzeyine bağlandığında, yeniden kristalleşmeyi engeller ve kristal boyutunda neredeyse hiç değişikliğe neden olmaz (Şekil 1.11). Organizmalarda buzun yeniden kristalleşmesi, büyük buz kristalleri genişledikçe hücrelere ve dokulara zarar verebilir.



Şekil 1.11: AFP ‘nin buz kristali yüzeyine bağlanması(Tejo vd., 2020; Yoldaş, 2021)

Ramløv ve Friss (2020b), Antifriz proteinlerinin fizikokimyasal özellikleri henüz keşfedilmemiş birçok yolu olan bir alandır. Boyut, aktivite ve sekans gibi temel özellikler, bilinen AFP'lerin çoğu için araştırılır. Buradan boyut ve aktivite arasında pozitif bir korelasyon görülebilir. AFP'lerin farklılıklarından dolayı, her bir tür içinde bile, korelasyon, yüksek sekans özdeşliğine (ancak farklı boyutlara) sahip izoformlar arasında en nettir. Müteakip mutasyon çalışmaları, korelasyonu doğrulamıştır ve artmış bir buz bağlama bölgesinin aktiviteyi arttırdığı gösterilse de, AFP'lerin AFP olmayanlarla kaynaştırılması da aktiviteyi artırır. Birkaç AFP'nin sıcaklık stabilitesi de araştırılmıştır. Bununla birlikte, burada sonuçlar oldukça farklıdır, bazı AFP'ler çok ısıl değişkenlik gösterir ve oda sıcaklığı civarında aktivite kaybetmeye başlar ve bazıları 100 °C'de kısa sürelerle dayanır. Termostabilite, değişen AFP'lerdeki sistein miktarı ile bir dereceye kadar ilişkilidir. AFP'ler genel olarak stabildir ve geniş bir pH aralığında aktiftir, çünkü muhtemelen hiçbir yüklü amino asit buz bağlama mekanizmasına doğrudan dahil değildir. AFP'lerin bağlanma enerjisi ve reaksiyon kinetiği hakkındaki ayrıntılar henüz tam olarak ortaya çıkarılmamıştır. Antifriz proteinleri, büyüklükleri, aktiviteleri, şekilleri ve amino asit bileşimi bakımından çok farklı olan oldukça çeşitli protein grubudur. Bu nedenle sonuçları ve gözlemleri genellemek de zordur. AFP'lerin tek ortak özelliği, buz bağlama bölgesinin alanıyla ilişkilendirilebilen buza bağlanma yetenekleridir.

1.3.2.3.1. Antifreeze Proteinlerinin Biyokimyası

Antarktika balıklarının serumlarında, balıklar için ölümcül olabilecek ozmotik basıncı artırmadan donma sıcaklığını düşüren bir glikoprotein varlığı bulunmuş olup süregelen çalışmalardan bu yana, bu ve benzeri etkili proteinler hakkında birçok rapor yapılmıştır, bazı araştırmalar bu maddelerin genel özellikleri hakkında (Feeney, 1974; Feeney ve Yeh, 1978;1996; Eastman ve DeVries, 1984; Feeney, 1986; Cheng ve DeVries, 1991; Davies ve Hew, 1992; Duman vd., 2004; 2010) ve diğerleri işleyiş mekanizmaları ile ilgili (Ananthanarayanan, 1980;1981;1985; Yang, 1998; Yeh ve Feeney, 1996) çalışmışlardır. Donma sıcaklığını düşürme kabiliyetine sahip iki ana protein ailesi vardır. Genellikle AFGP kısaltması ve benzer özelliklere sahip antifriz proteinleri veya AFP'ler verildiğinde antifriz glikoproteinlerdir. Hem AFGP hem de

AFP'nin yapıları, birkaç on yıldır kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Hem AFGP'de hem de en yaygın olarak bulunan AFP'de (tip I) bulunan ana amino asit alanındır (Ala), her bir aile bu amino asidin yaklaşık% 67'sine sahiptir. Bununla birlikte, yapısal olarak AFGP ve AFP tamamen farklıdır. AFGP molekülünde, en çok bulunan ikinci amino asit treonindir (Thr), Ala-Ala-Thr tekrarlayan tripeptid birimleri halinde düzenlenmiştir. Bazı AFGP türlerinde, bazı treoninlerden sonra Ala'nın yerini alan prolin (Pro) bulunur. Tüm bu proteinler, Thr kalıntılarından uzanan disakkarit gruplarına sahiptir. AFGP moleküllerinde R-heliks içeriği bulunmaz. Gliserolün bir kriyoprotektan olarak önemi, ilk olarak RW Salt tarafından, yüksek seviyelerde gliserol varlığını kış uykusu, diyapoz veya donma durumuyla ilişkilendirdikten sonra fark edildi (Salt, 1957;1959; 1961; Wyatt ve Kalf, 1957; Chino, 1957). Son 30 yıl içinde, kelimenin tam anlamıyla yüzlerce yayın, hem donmaya toleranslı hem de donmayı önleyen böceklerde gliserol veya diğer poliollerin oluşumunu tanımlamıştır (Salt, 1961; Hansen, 1980; Ring, 1980; Summe, 1982; Miller, 1982; Duman vd., 1982; Baust vd., 1982; Zachariassen, 1985; Lee vd., 1986; Storey ve Storey, 1988). Gliserol açık ara en yaygın kriyoprotektandır, ancak sorbitol, mannitol, ribitol, eritritol, treitol ve etilen glikol, trehaloz, sukroz, glikoz ve fruktoz dahil olmak üzere bir dizi şekerle birlikte bulunur (Miller ve Smith, 1975; Hayakawa ve Chino, 1981; Summe, 1982; Gehrken, 1984; Zachariassen, 1985; Hamilton ve ark, 1985; Storey and Storey, 1988). Hayvanın taze ağırlığının% 25'i kadar değişen gliserol içerikleri, birçok türün vücut sıvısında 2 M'yi aşan polioller konsantrasyonları ile bildirilmiştir (Salt, 1961; Ring, 1981; Zachariassen, 1985; Storey and Storey, 1988). Türlerin çoğu yalnızca tek bir polioller üretir, ancak ikili veya hatta çok bileşenli sistemler de oluşur; gliserol artı sorbitol en yaygın eşleşmedir (Storey ve Storey, 1988).

Spektroforometrik enzim tahlilleri, hızları ve duyarlılıkları nedeniyle metabolik biyokimyacılar tarafından tercih edilir (tespit sınırı yaklaşık 5 nmol'dur) ancak bu yolla sadece seçilen kriyoprotektanlar (örn., Gliserol, sorbitol) ölçülebilir (Eggstein ve Kuhlmann, 1974; Bergmeyer vd., 1974; Storey vd., 1981a; Nordin vd., 1984). Bununla birlikte, enzim yöntemleri kullanılarak, çok çeşitli glikolitik ve Krebs döngüsü ara ürünleri, yüksek enerjili bileşikler, amino asitler ve glikojen de aynı perklorik asit ekstraktında ölçülebilir (Lowry ve Passonneau, 1972; Meyer, 1978; Storey vd., 1981a., Storey and Storey, 1983). Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve gaz-sıvı kromatografisinin her biri, tek bir çalışmada çok çeşitli karbonhidratların miktarını

belirleyebilir ve koruyucu olarak trehaloz veya etilen glikol gibi bileşikler kullanan türlerin çalışmaları için özellikle uygundur (Hayakawa ve Chino, 1981; Hendrix vd. , 1981; Furusawa vd., 1982; Chen vd., 1987; Kukal vd., 1988). Bu yöntemlerin dezavantajları, numunelerin kapsamlı bir ön-muameleye tabi tutulması veya türetilmesi gerekliliği ve çalışma başına maliyet ve zamandır. Ek olarak, diğer daha kalitatif teknolojiler kriyoprotektan metabolizması ve işlevi üzerinde çalışmak için yararlıdır. Karbon-13 nükleer manyetik rezonans, canlı bir organizmadaki kriyoprotektanları izleme fırsatı sunar (Buchanan ve Storey, 1983). Son zamanlarda bu noninvaziv teknoloji, bir Arktik tırtılında D-I-13C glikozdan gliserolün sıcaklığa ve zamana bağlı sentezini izlemek için kullanılmıştır (Kukal ve ark, 1988). Karbon-14 radyotraktörleri, akı hızlarının ve karbon dağılımının analizi için de yaygın olarak kullanılmıştır ve poliol sentezinde heksoz monofosfat şantının rolünü analiz etmede anahtar olduklarını kanıtlamışlardır (Wood ve Nordin, 1980; Tsumuki ve Kanehisa, 1981a; Tsumuki vd., 1987). Son olarak, kriyoprotektif işlevi değerlendiren yeni metodolojiden söz edilmeyi hak ediyor. Dondurarak saklama koruyucularının, donma kaynaklı füzyonu veya fosfolipid veziküllerin sızmasını veya enzimlerin donma denatürasyonunu önlemedeki eylemlerinden, hücre altı fraksiyonlarda kriyoprotektanların varlığını değerlendirmek için yararlanılır (Loomis vd., 1988). Bu yaklaşım, hücrelerdeki tüm kriyoprotektif maddelerin tanımlanmasında önemli olacaktır.

Tachibana ve ark (2004), AFGP'lerin DSC analizi, antifriz glikoprotein aktivitesini değerlendirmek için kullanılan diğer görsel yöntemlerle iyi bir uyum içindedir. Ayrıca, AFGP'lerin termal histerezis veya antifriz aktivitesinin, numunelerdeki azalan buz içeriği ile doğrusal olarak arttığı görülmüştür. Buna karşılık, böcek AFP'lerinin aktivitesi katlanarak arttı. DSC, antifriz proteinlerinin spesifik aktivitesini değerlendirmek için diğer yöntemleri tamamlayıcı bir yöntem olmasına rağmen, az sayıda araştırmacı bu tekniği kullanır ve hala büyük ölçüde nanolitre ozmometri ve yeniden kristalleşme inhibisyon deneylerine güvenilmektedir.

Antifriz glikoproteinlerinin (AFGP'ler) yapı-aktivite ilişkileri, kimyasal sentez ve konformasyonel analiz ile karakterize edilmiştir. Sonuçlar, tripeptid ünitesindeki treonil kalıntısı üzerindeki glikosilasyon modunun, antifreez aktivitesi için spesifik yapının oluşumunda birincil öneme sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Tachibana vd., 2004).

1.3.2.3.2. Antifriz Proteinler ve Biyoteknoloji

AFP'nin veya genel olarak buz bağlayıcı proteinlerin yeniden kristalleşmeyi engelleme yeteneği, onları yeniden kristalleşmenin en büyük tehlikelerden biri olduğu kriyoprezervasyonda değerli bir araç haline getirerek büyük ilgi görmektedir (Ramløv ve Friis, 2020a).

Antifriz proteinlerinin ana işlevi, kuşkusuz, buz yüzeyi ile etkileşerek buz büyümesini ve yeniden kristalleşmeyi engelleme yetenekleridir. Bununla birlikte, birkaç çalışma, AF(G)P'lerin organizma için değerli adaptif ikincil fonksiyonlara, en azından bazı durumlarda, yani zarlarla etkileşime, buz yüzeyi ile anti virüse sahip olabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, birçok çalışma, AF(G)P'lerin organizma için, en azından bazı durumlarda, yani, eklem bacaklı istilasına karşı, zarlarla etkileşim için değerli adaptif ikincil fonksiyonlara sahip olabileceğini ve bitki patojenlerini inhibe ettiğini göstermiştir (Ramløv ve Friis, 2020b).

Kriyoprezervasyon, gıda muhafazası, transplantasyon için canlı doku muhafazası, kriyocerrahi, vb. çeşitli tıbbi, araştırma ve endüstriyel uygulamalar için gereklidir. Bununla birlikte, donun neden olduğu hasar, esas olarak, daha büyük kristallerin çekirdeklenmesini ve büyümesini (yani yeniden kristalleşmeyi) teşvik etmek için su moleküllerinin daha küçük buz kristallerinden aktarıldığı buzun yeniden kristalleşmesidir. (Capicciotti vd., 2013; Smoke, 2015). Yeniden kristalleşme, donmuş gıda kalitesinin bozulmasından ve dondurularak korunmuş canlı doku ve hücrelerin canlılığının azalmasına yol açan geri dönüşümsüz hücresel hasardan sorumludur (Capicciotti ve ark, 2013). Bu nedenle, donmadan kaynaklanan hasarı önlemek için kriyoprezervasyonda kriyoprotektanların kullanılması gereklidir. Bu, soğuğa dayanıklı bakteri, balık ve böceklerde bulunan çeşitli proteinleri ve glikoproteinleri içerir. Bu biyolojik kriyoprotektanlar, çok düşük çalışma konsantrasyonlarında dikkate değer bir kriyoproteksiyon sergilemelerine rağmen, aynı zamanda çok az toksisiteye sahiptirler veya hiç toksisiteyi yoktur, bu nedenle kriyojenik uygulamalar için çok daha uygundurlar. (Duman, 2015; Kim vd., 2017).

1.3.2.3.2.1. Kryomedisin İçinde Antifriz Glikoproteinlerin Uygulamaları

Buz büyümesini engelleme kabiliyetine sahip herhangi bir organik bileşiğin birçok potansiyel tıbbi, endüstriyel ve ticari uygulaması vardır. AFGP'lerin tüm bu alanlarda potansiyel kullanımları olmasına rağmen, bu inceleme AFGP'lerin membran stabilizasyonu ve vitrifikasyon uygulamalarını vurgulamaktadır (Ben ve Bouvet, 2003). Bir hücrenin ortam sıcaklığı donma noktasına yakın veya altına düştüğünde meydana gelen birçok karmaşık süreç vardır. Şu anda, donma üzerine üç farklı hücre ölümü tarzının meydana geldiği bilinmektedir. Bunlar fiziksel hücre yırtılması, nekroz ve soğuğa bağlı apoptozdur (Baust, 2002). Her üç işlem de önemli olsa da, dalgalanan hücre hacimleri ve hücre içi buz oluşumundan kaynaklanan hücre yırtılması, kriyoprezervasyonla ilişkili en yaygın hücre ölümüdür (Glander ve Schaller, 1999; Vilalba, 2001) ve sonuç olarak, bu inceleme, membran rüptürünü takiben hücre içi buz oluşumunu takip eden hücre hasarını vurgulayacaktır. Gliserolün kümes spermatozoasının -70°C 'de donmadan hayatta kalmasını sağladığının kazara keşfi nedeniyle, iyileştirilmiş kriyoprotektanlar ve koruma teknikleri geliştirmek için çok fazla çaba harcanmıştır. Tüm hücreler bölümlere ayrılmış sistemler olarak kabul edilir ve buz çekirdeklenme olasılığı, aşırı soğutma derecesi ve hacim ile doğru orantılıdır. Sonuç olarak, sıcaklık düştükçe, hacim daha büyük olduğundan ve kolligatif olarak hareket eden maddelerin (tuzlar, proteinler vb.) konsantrasyonu hücrenin içindekinden daha düşük olduğundan, buz çekirdeklenmesinin hücre dışında meydana gelmesi daha olasıdır. Çekirdeklenme meydana geldikten sonra, hücre dışı buz büyümesi, azalan hücre dışı hacimde çözünen konsantrasyonda bir artışa neden olur. Bu çözünen maddelerin konsantrasyonu arttıkça, hücre dışı ozmotik basınç artar. Bu artışın meydana gelme hızı, aşırı soğutma hızı ile doğru orantılıdır ve hücre, yarı geçirgen hücre zarından su akışını düzenleyerek bu ozmotik akıyı telafi eder. Hücre dışı buz büyüme hızı hızlı olduğunda, hücre zarının kırılması muhtemeldir. Bu kırılma meydana geldiğinde, hücre içi buz oluşumu meydana gelir ve nihayetinde hücre yok edilir. Araştırmacılar, hücrelerin aşamalı olarak dondurulması sırasında oluşan hasardan buzun mu yoksa yüksek tuz konsantrasyonunun mu sorumlu olduğunu tartıştılar. Mazur vd. (1963), aşamalı soğutma sırasında soğutma hızının su taşınması üzerindeki etkisini göstermiş ve bunu hücre sağkalımı ile ilişkilendirmiştir. Sonuçta bu, hücre dışı buz oluşumunun hücreler için zararsız olduğu düşük soğutma oranlarında çözünen hasarın meydana geldiğini belirten "iki faktör hipotezine" yol açar. Tersine, yüksek soğutma hızlarında hücre içi buz oluşumu genellikle öldürücüdür. Her hücre tipinin zar geçirgenliği önemli ölçüde değişebildiğinden, bu, her bir kriyoprotektanın optimum bir

soğutma hızı ile ilişkili olduğu anlamına gelir. Dokular ve organlar gibi çok hücreli sistemlerin kriyoprezervasyonunu çevreleyen sorunlar, birçok hücre tipinin var olduğu ve her birinin optimum koruma gereksinimlerinde farklılık göstereceği göz önüne alındığında, sonsuz derecede daha karmaşıktır. Çünkü hücre dışı buz oluşumu, muhtemelen hücre dışı buz oluşumunu düzenleyen en önemli yetenek olacaktır. Bu nedenle, bu tür sistemlerin etkili kriyoprezervasyonunun, yüksek konsantrasyonda kriyoprotektan gerektirmesine rağmen, "buzsuz" bir soğutma veya vitrifikasyon işlemi yoluyla gerçekleşmesi beklenir. Sonuç olarak, toksisite bir sorun haline gelir çünkü donmadan önce bir dokunun tolere edeceği en yüksek konsantrasyon büyük ölçüde sınırlıdır. Ek olarak, kriyoprotektanlar hücre zarına sudan daha yavaş nüfuz ettiğinden ozmotik bir dengesizlik kaçınılmazdır (Ben ve Bouvet, 2003). Bu nedenle, kriyoprotektanların eklenmesi ve çıkarılması sırasında hücre hacmi dikkatlice düzenlenmelidir.

1.3.2.3.2.2. Antifiriz Glikoproteinler ile Lipit Membran Stabilizasyonu

Rubinsky ve diğerleri (1992), AFGP ve AFP'nin soğutma sırasında dış hücre membran bütünlüğünü geliştirme ve kopmaya karşı koruma kabiliyetine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir (Hinckha vd., 1993). Membran bütünlüğünün arttığını, çünkü AFGP'nin membrandaki iyon akışlarını engellediğini öne sürdüler. Bu nedenle, biyolojik antifrizlerin membrana bağlı iyon kanalları ile doğrudan etkileşime girebileceği sonucuna varıldı. Bu öneri bazı tartışmalara yol açtı (Payne vd., 1994). Birkaç yıl sonra, Hayes vd. (1996), AFGP / AFP'nin soğutma sırasında membran bütünlüğünü arttırdığını doğruladı, ancak lipozom membranı ile spesifik olmayan bir etkileşimle tutarlı alternatif bir mekanizma önerdiler. Bu çalışma, karboksiflorescin (CF) problemleri içeren dört farklı fosfolipid tipinden (tümü fosfatidilkolinden türetilmiş) hazırlanan lipozomlar kullanılarak gerçekleştirildi. Bu deneylerde, lipozomların, AFGP yokluğunda termotropik faz geçişinden soğutulduklarında, yakalanan işaretleyicinin % 50'sine kadar sızdıkları gözlemlendi. Bu geçiş durumu sırasında (tipik olarak 12 ile 41 ° C arasında), lipid membranının hem jel hem de sıvı kristal halleri bir arada bulunur, hidrokarbon zincirlerinin uyumsuzluğuna neden olur ve sonuçta lipid membranının sızmasını kolaylaştırır (Clerc ve Thompson, 1995; Hays vd., 1996). 1 mg/mL'den daha az AFGP varlığında, termotropik faz geçişi boyunca soğutma veya ısınma sırasında hiçbir sızıntı gözlenmedi. Bu olağanüstü özellik, membran T_m'nin doğrudan çökmesine

atfedilmemiştir. İlginç bir şekilde, diğer proteinlerin de sızıntıyı engellediği gösterildi (Wu ve Fletcher, 2000), AFGP'nin, her biri kendi termotropik faz geçişi yoluyla soğutulduğu için lipozomlardan sızıntının önlenmesinde son derece etkili olduğu bulunmuştur (Hays vd., 1996). Bu çalışmalar, çoğu proteinin DEPC membranları ile etkileşime girdiğini ve gerçekte bağlanma üzerine sızıntıyı önlediğini göstermede etkili oldu. Bununla birlikte, bir proteinin lipit çift katmanına bağlanma ve sızıntıyı önleme yeteneği, lipitlerin polar gruplarının doğasının doğrudan bir işlevidir (Ben ve Bouvet, 2003).

1.3.2.3.2.3. Katkı Olarak Antifiriz Glikoproteinler Kullanılarak Vitrifikasyon

Ben ve Bouvet, (2003), Vitrifikasyon, hücrelerin ve dokuların dondurulması için kullanılan yaygın bir tekniktir. Bu işlemde bir numune, çözelti "cam benzeri" bir katıya dönüşürken elde edilen "buzsuz" koşullar altında dondurulur. Bu, buz oluşumundan hücre hasarını önlemek için kullanılabileceği için çekici bir tekniktir. Vitrifikasyonun çekici özelliklerine rağmen bazı sınırlamaları vardır. Örneğin, daha büyük hacimlerle uğraşırken, hücrelerdeki, dokulardaki ve organlardaki ısı transferi, kristalleşme riski olmaksızın vitrifikasyona izin vermez. Sonuç olarak, büyük hacimlerin korunması için genellikle yavaş bir dondurma işlemi (0,5–100 ° C/dak soğutma hızı) uygulanır. Bununla birlikte, vitrifikasyon işleminde, çok hızlı bir soğutma hızı (24-130.000 ° C / dak uygulanır ve bu işlemin konsantrasyonuna, viskozitesine, hacmine ve soğutma hızına bağlı olan camsı bir duruma neden olur (Storey ve Storey, 2013). Bu yüksek soğutma hızı hücresel hasarı en aza indirir de ısınma sırasında yeniden kristalleşme yine de gerçekleşebilir. Yeniden kristalleşmeyi önlemek için mikrodalgalar kullanılarak hızlı ve tekdüze ısınma sağlanabilir (Marsland vd., 1981; Pegg, 2002). Vitrifikasyona özgü iki sorun, kriyoprotektan konsantrasyonunun çok yüksek olması ve bazen hücre için çok toksik olması gerektiğidir. İşlem daha düşük konsantrasyonlarda kriyoprotektanlarla uygulanabilir olsa da, vitrifiye durumuna ulaşmak için daha yüksek bir soğutma hızı kullanılmalıdır. İkinci olarak, camsı halin bir miktar fraksiyonlaşması hala meydana gelir ve bunun meydana gelme derecesi hacme ve soğutma hızına bağlıdır (Arav vd., 2002). Vitrifikasyon büyük hacimler için yararlı olmasa da, küçük hacimlerde iyi çalışır (yani, her protokol optimize edilmeli ve farklı kriyoprotektanlar kullanılmalıdır. En umut verici kriyoprotektan solüsyonlardan bazıları antifiriz glikoproteinleri içerir. Sadece buzı inhibe etmezler) sıfırın altındaki herhangi bir

sıcaklıkta oluşmasına karşın, termotropik faz geçiş durumu sırasında sızıntıyı önlemek için hücre zarı ile etkileşime girerler, böylece aynı anda iki sorunu ele alırlar. Eklenme sonrası başarılı canlanma, doğayı ve konsantrasyonu içeren birçok faktörden etkilenir. Bunlar; kriyoprotektan türü, sıcaklık, kriyoprotektanın eklendiği ve çıkarıldığı hız, soğutma ve ısınma hızı ve depolama sıcaklığıdır.

Bu AFGP katkı maddelerini kullanma fikri ilk olarak domuz oositlerinin korunması için yönlendirmeli soğutmada keşfedildi. Antarktika nototheniid balıklarından elde edilen AFGP'lerin özel kriyoprotektif özelliklere sahip olduğunu, soğuduktan sonra morfolojik bütünlüğü kanıtlar (Rubinsky vd., 1991). Vitrifiye oositlerin soğutma/ısıtma döngüsünde hayatta kalamadığı da gözlemlendi. Daha da önemlisi, birincil hasar bölgesi oolemma idi. Daha sonra, numunenin başarılı bir şekilde vitrifiye edilmesine rağmen, oolemmenin buz çekirdeklenmesi için bir alan görevi gördüğü varsayıldı. Bu problemin üstesinden gelmek için, numuneye AFGP'ler (AFGP 1-8 karışımı) eklenmiştir. Bu, inkübasyon sırasında MI veya MII aşamasına ulaşan her oosit tarafından belirlenen oositlerin% 82 hayatta kalma oranıyla sonuçlandı. Rubinsky ve Eto (1993), AFGP'nin viskoziteye dayalı olarak oosit canlılığını neden artırdığına dair bir açıklama önerdi. AFGP'lerin çözelti viskozitesini artırdığını ve çekirdeklenme olmaksızın "buzsuz" bir durum olasılığını artırdığını iddia ettiler. Bu, sulu çözeltilerde buz çekirdeklenmesi olasılığının çözelti viskozitesi ile ters orantılı olduğu göz önüne alındığında, uygulanabilir bir açıklamadır (Wu vd., 2001). AFGP özellikleri üzerine yapılan kapsamlı bir çalışmanın parçası olarak, değişen miktarlarda AFGP içeren çözeltilerin viskozitesini incelediler ve 1 mg / mL kadar az AFGP içeren çözeltilerin, 20 mg/mL'de oluşan doygunluk ile çözelti viskozitesinde önemli artışlara neden olduğunu bildirdiler. Yazarlar ayrıca bir BSA sulu çözeltisinin viskozitesini ölçtüler ve bu değerleri benzer ağırlıktaki AFGP ile karşılaştırdılar ve AFGP çözeltilerinin BSA çözeltilerinden biraz daha viskoz olduğunu bildirdi. Vitrifikasyon için yaygın olarak kullanılan bir kriyoprotektan 1 M dimetil sülfoksit (DMSO) çözeltisi ile benzer ölçümler, 20 mg/mL AFGP çözeltisinin eşit derecede etkili olduğunu göstermiştir. Bu önemlidir çünkü 20 mg/mL AFGP çözeltisi 1 M DMSO'ya kıyasla 0,005 M'dir. Sonuç olarak, konsantre DMSO çözeltilerinin toksik etkileri, aynı etkiyi yaratmak için 200 kat daha az konsantre olan AFGP çözeltileri kullanılarak ortadan kaldırılabilir. Bu sonuç, AFGP'nin vitrifikasyon yoluyla kriyoprezervasyon sırasında etkili bir ikame olarak işe yarayabileceğini göstermektedir. Düşük sıcaklıkların hücre iskeletini bozması

(Pickering vd., 1990; O'neil vd., 1997) ve *zona pellucida*yı sertleştirmesi (Vincent ve Johnson, 1992) nedeniyle, memeli oositlerinin dondurularak saklanması özellikle zordur, bu da spermin oosite nüfuz etmesini ve döllemesini zorlaştırır. Hem hızlı hem de yavaş soğutma protokollerine sahip fare oositleri kullanılarak sınırlı başarı elde edilmiştir. Vitrikasyon birkaç tür embriyo ile elde edilmiş olmasına rağmen, genellikle değişken sonuçlar elde edilir ve tekrarlanabilirlik bir problemdir. Bu değişkenliğin numunenin devitrifikasyonunun bir sonucu olduğu speküle edilmiştir. DeVries ve diğerleri, (1998), 0.1- ve 1-mg/mL AFGP solüsyonu içeren 6 M DMSO karışımı kullanarak fare oositlerinin vitrifikasyonu üzerinde çalıştılar. Bu işçiler, 1 mg / mL AFGP ile takviye edilmiş 6 M DMSO kullanılarak kriyoprezervasyonun, kriyoprotektan oda sıcaklığında verildiğinde oldukça değişken ve zayıf hayatta kalma oranlarına yol açtığını gösterdi. Bununla birlikte, maruz kalma sıcaklığı düşürüldüğünde, geliştirilmiş canlılık elde edildi. Bunun AFGP'den değil DMSO'nun sitotoksik etkisinden kaynaklandığı öne sürülmüştür.

Örneğin, yapısal olarak çeşitli AFGP analogları, moleküler etki mekanizmalarını daha da aydınlatmak için problemler olarak kullanılabilir. Alternatif olarak, rasyonel olarak tasarlanmış kimyasal ve biyolojik olarak stabil AFGP analogları (Enaide ve Ben, (2001); Eniade, 2001), membran stabilizasyonunu kolaylaştırmak için ideal moleküller olacaktır çünkü bunlar her hücre membranı türü için özel olarak uyarlanabilir ve büyük ölçekte üretilebilir. Dahası, bu tür analoglar, ultrason ve manyetik rezonans görüntülemedeki son gelişmelerin tümörlerin tamamen yok edilmesine izin verdiği kriyocerrahi adjuvanları olarak uygulamalar bulabilir (Arnott, 1851; Pham, 1999). Geçtiğimiz 10 yıl boyunca, bu tür uygulamalarda AFP'nin rolü kapsamlı bir şekilde araştırılmış, ancak AFGP veya AFGP analogları ile benzer çalışmalar gerçekleştirilmemiştir.

1.3.2.4. Günümüz ve Gelecekte Antifiriz Proteinleri

Doğal olarak oluşan AFP'lerin dondurarak saklama sırasında buz oluşumuyla ilişkili sorunları sınırlamak için kullanılabileceği hipotezi önerildi (Knight vd., 1984). O zamandan beri, memeli hücrelerini dondurarak saklamak için balık AFP'lerinin kullanımı araştırılarak, farklı hücre tiplerinde hücre canlılığı açısından çeşitli pozitif ve negatif sonuçlarla karşılaşılmıştır (Rubinsky vd., 1991, 1992a, 1994; Carpenter ve

Hansen 1992; Pegg 1992; Hansen vd.,1993; Arav vd.,1993; Wang vd.,1994; Mugnano vd.,1995; Chao vd.,1996; Younis vd.,1998; Langeaux vd.,1997). Olumlu çalışmalar, oositlerin ve iki hücre embriyolarının (Rubinsky vd., 1991; 1992b) morula/blastosist aşamasında sığır ve koyun embriyolarının (Arav vd., 1993) dondurularak korunmasını ve şempanze sperminin kriyoproteksiyonunu sağladılar (Younis vd., 1998). Aksine, at embriyolarının (Langeaux vd.,1997) ve gliserolde insan kırmızı kan hücrelerinin (Pegg, 1992) dondurularak korunması sırasında AFP'lerin eklenmesiyle hiçbir fayda gösterilmediğinden, birkaç deney AFP'lerin kriyoprotektif etkisine şüphe uyandırmıştır. Carpenter ve Hansen (1992), daha yüksek AFP tip 5 konsantrasyonlarının, hücre dışı boşluklarda buzun yeniden kristalleşmesini neredeyse tamamen engellediğini, ancak hücrelerle ilişkili olarak yıkıcı buzun oluştuğunu bildirdi. Başka bir çalışma (Hansen vd., 1993), miyelojenöz lösemi hücresinin korunması için DMSO'ya tip I balık AFP'nin eklenmesinin, tüm konsantrasyonlarda hücre iyileşmesini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Başka bir örnekte, hem olumlu hem de olumsuz sonuçlar bildirilmiştir, kırmızı kan hücrelerinin kış pisi balığı tip I AFP ve hidroksietil nişasta kullanılarak dondurularak korunması, düşük AFP konsantrasyonlarında canlılık sonuçlarını iyileştirdiğini, ancak yüksek konsantrasyonlarda etki etmediği savunuldu (Carpenter ve Hansen, 1992; Chao vd.,1996). İnsan kırmızı kan hücrelerinin ve insan hematopoietik kök hücrelerinin donması için kriyoprotektanlar ve ayrıca geçici ısınma yaralanmalarına karşı koruma sağlar (Capicciotti vd., 2015). Bu sentetik bileşikler, hücre, doku ve organ korunması sırasında hücre canlılığını potansiyel olarak iyileştirmek için yeni stratejileri temsil etmektedir.

Çok daha fazla AFP mevcuttur, artı henüz keşfedilmemiş olanlar ve çoğu kriyoprezervasyon sırasında hücre yaşayabilirliğinin teşviki için hiç değerlendirilmemiştir. Tasarlanmış doku ve organların depolanması ve taşınması, doku mühendisliği tedarik zincirinin hayati ve gerekli bir parçasıdır. Doku depolama, deri grefti ikameleri, kan damarları ve diğer mühendislik ürünleri üretmek için çalışan doku mühendisliği şirketleri için hâlihazırda önemli bir engel haline gelmiştir (Alvarez, 2015). Tasarlanmış dokular ve organlar için raf ömrü geliştirmek için önlemler alınmazsa, günümüzde organ sıkıntısı transplantasyonu sınırlandırdığı gibi, depolama kısıtlamalarının da rejeneratif sınırlandıracaktır. Son dönem organ hastalığı, Birleşik Devletler'de yılda 700.000'den fazla ölüme neden oluyor ve nakil bekleme listelerine eklenen hasta sayısı artıyor (Rapor-1, 2015) ve bazı tahminlere göre tüm ABD

ölümlerinin % 30-35'inden fazlası önlenebilir veya bir organ nakli ve daha geniş doku mühendisliği ile geciktirilir (Fahy vd., 2006). Dünya Sağlık Örgütü, organ naklinin küresel talebin % 10' undan daha azını karşıladığını tahmin etmektedir (Rapor-3 2012). Organ bankacılığına olan büyük ihtiyaç yakın zamanda gözden geçirildi (Giwa vd., 2017). Organ bankalarından talep üzerine organları ve dokuları değiştirme yeteneği, her yıl küresel olarak milyonlarca hayatı kurtarabilir veya iyileştirebilir ve kanseri tedavi etmekle aynı düzeyde halk sağlığı faydaları sağlayabilir (Giwa vd., 2017). Organ nakline ek olarak, kanser tedavisi ve tedavi sonrası doğurganlığı, acil hazırlık için kök hücre ve doku stoklarının geliştirilmesini, transplantasyon için uzuvların kurtarılmasını, travma bakımını, doku mühendisliğini ve rejeneratif tıbbi etkiler. Organ bankacılığını çözmek için koordineli federal finansman ve araştırma girişimlerine ihtiyaç vardır ve doğal olarak oluşan AFP'ler veya sentetik analoglar çözüm (ler) in önemli bir parçası olabilir. AFP'nin ekspresyonu, büyük potansiyele sahip olabileceği süt ürünleri üretimi için önemli bir bakteri olan *Lactococcus lactis*'in donma toleransını da artırmıştır (Zhang vd., 2018) ve artmış ozmotik toleransın olduğu *E. coli*'de ayrıca gözlemlenmiştir (Holmberg vd.,1994; Meijer vd., 1996).

AFP'ler, soğuk/donma sırasındaki faydalı etkilerinden dolayı birçok işlenmiş gıdada bir aktif bileşen olarak da kullanılır. Burada, büyük miktarlarda AFP üretme ve izole etme olanakları ve bunlara bağlı maliyetler de tartışılan bazı ana engellerdir. Büyük ölçekli rekombinant protein üretimi alanında çok fazla gelişme vardır ve AFP'lerin sahip olduğu büyük potansiyelle, AFP'lerin gelecekte daha fazla gıdada katkı maddesi olması muhtemeldir (Ramløv and Friss, 2020b).

Prof. Dr. Kelvin GM Brockbank ve diğerleri (2004), AFP'lerin 0 ° C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hücreler ve organlar üzerinde etkileri gösterdiği için, hipotermik dondurulmamış depolamaya ilişkin potansiyel de tartışılmaktadır. Büyük bir potansiyele sahip olmasına rağmen, AFP'lerin kriyoprezervasyonda kullanımını tam olarak anlamak ve kullanmak için hala çok fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Dr. Nicolas von Solms (2020), AFP'lerin gaz hidrat inhibisyonu üzerindeki etkisine ilişkin çalışmaları sunmaktadır. Gaz hidratları, oluşumlarının boru hattının akışını bozduğu petrol ve gaz endüstrisinde bir sorundur. Bölüm, gaz hidratlarının moleküler temelini ve buza benzerliğini ve oluşumunu önlemeye yönelik mevcut önlemleri, küçük

ölçekte gaz hidratlarının oluşumunu ve inhibisyonunu ölçmek için kullanılabilecek yöntemlerle birlikte açıklamaktadır. Çevre açısından bakıldığında, AFP'ler biyolojik olarak parçalanabildikleri ve mevcut inhibitörlerden daha çevre dostu oldukları için gaz hidrat inhibitörleri olarak büyük bir potansiyele sahiptir. Bununla birlikte, ön çalışmalar iyi sonuçlar gösterse de, daha büyük ölçekli deneyler ve nihayetinde gerçek boyuttaki uygulama, gerekli miktarlarda AFP üretiminin büyük maliyeti nedeniyle engellenmektedir. Ayrıca, bu nispeten yeni alan için, hem büyütülmüş deneyler açısından hem de AFP'lere daha derinlemesine bakıldığında, belki de büyük gaz hidrat engelleme kapasitesine sahip AFP varyantlarını bulmak veya tasarlamak için çok fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Prof. Dr. EonSeon Jin vd. (2020), yüzeylerin buzlanmasının büyük bir tehlike ve maliyetli olduğu birçok endüstride potansiyele sahiptir. Farklı kaplama malzemeleri açıklanır ve bunların sonuçları ve bir AFP ile karşılaştırılabilir çalışmalar tartışılır. Bu çok yeni alan (AFP'lerle ilgili olarak) büyük bir potansiyele sahiptir, çünkü birçok endüstri iyi bir buzlanmayı önleyici çözüme ihtiyaç duymaktadır. Şimdiye kadar AFP'ler kullanılarak çok az deney yapıldı. AFP kaplı yüzeylerin gerçek potansiyelini ortaya çıkarmak için hala çok fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Friis ve Ramløv (2020), Mutasyon çalışmalarının amaçları çoktur ve protein saflaştırma olasılıklarının iyileştirilmesini, örneğin flüoresan etiketleme yoluyla füzyon proteinlerinin oluşturulmasını, buz bağlama alanlarının lokalizasyonunu veya amino asit yapılarındaki ince değişikliklerle buz bağlama mekanizmalarının araştırılmasını içerir. Bazı çalışmalar ayrıca AFP'nin gücünü artırmaya veya onları daha soğuğa dayanıklı hale getirmeyi amaçlayan transgenik organizmalar yaratmaya odaklanmıştır. Alan uygun bir tarama yönteminin olmaması nedeniyle engellenmesine rağmen, genetik manipülasyon aracı hala çok değerlidir ve hala cevaplanmamış olan birçok sorunun yanıtlanmasına yardımcı olabilir. Genetik manipülasyon da temel araç olacaktır. Bu birleşik etki, peptidoglikan tabakasının küçük moleküllere geçirgenliğini iyileştirerek ve böylece antibiyotiklerin bakteri hücrelerine nüfuz etmesini geliştirecektir.

AFP'lerin, antifungal ve hidrolitik aktivite ve ayrıca buz bağlama aktivitesi sergilediği gösterilmiştir (Griffith ve Yaish 2004). Bitki AFP'lerinin patojenle ilişkili proteinlerden geliştiğine dair oldukça fazla kanıt vardır (Ramløv ve Friis, 2020b).

AFP'nin IRI yeteneklerinin gelecekte bir gıda katkı maddesi olarak önemli bir rol oynayabileceği konusunda bazı fikir birliği var gibi görünmektedir (Ramløv ve Friss, 2020b). Zhang vd. (2007a, b), dondurulmuş ekmek hamurunda katkı maddesi olarak havuçtan (*Daucus carota* AFP-DcAFP) AFP ile deneyler yaptı. Hipotez, DcAFP'nin hamurda bulunan maya hücrelerinde daha düşük bir ölüm oranı sağlayacak kriyoprezervatif özelliklere sahip olacağı yönündeydi. Çözüldükten sonra kabarmasına izin verildiğinde hamurun hacim genişlemesini ölçtüler. AFP'nin hamur hacmi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir, bu da maya üzerinde kriyoprezervatif bir etkiye işaret eder. Aynı etki, gıda sınıfı bir *Lactococcus lactis* suşu tarafından üretilen bir rekombinant tip I AFP kullanılarak dondurulmuş hamurda da gözlemlendi (Yeh vd., 2009). Maya içeren hamur gibi etin karmaşık matrisi de dondurma ve çözme sırasında zarar görür (Leygonie vd., 2012). Ancak çözdürülmüş et fermente olmamalıdır ve bu nedenle genişleme hacmi yaklaşımı işe yaramaz. Ete donma hasarının bir işareti, esasen yeniden emilemeyen sudur. Genellikle kalitenin düşmesiyle ilişkilendirilir (Leygonie vd., 2012). Dondurucuda artan sürelerden sonra damla kaybını ölçerek dondurmada önce etin AFP ile aşılmasıyla dondurucu hasarının önemli ölçüde azaltılabileceğini belirlenmiştir (Yeh vd., 2009). Kesimden önce AFGP enjekte edilen kuzu etlerinde de aynı etki gözlemlenmiştir (Payne ve Young, 1995). Boonsupthip ve Lee (2003), hem soğutulmuş (6°C) hem de dondurulmuş (12°C ila 18°C) balık kası homojenatına AFP eklenmesinin Ca^{2+} ATP az aktivitesini önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir.

Birçok soğukkanlı türün kış sağkalımı, donmaya, hipoksiye ve dehidrasyona toleransın yanı sıra toplam vücut suyunun yüksek bir yüzdesini hücre dışı buz biçiminde buza dönüştürmeye karşı direnci içerir. Yüksek derecede dona dayanıklı hayvanlar, özellikle *R. sylvatica*, mevsimlik bir yaşam ve ölüm döngüsüne ulaşabilir. Doku ve organlarındaki dondurucu soğuktan buz hasarı ve oksidatif stres olmadan kurtulabilir. Bu stratejinin, bağışlanan insan organlarının taşınması sorununa bir çözüm olduğuna inanılmaktadır (Luu ve Storey, 2018).

R. sylvatica, omurgalı donma toleransının önemli bir modelidir ve mevcut araştırmalar, hayatta kalmayı destekleyen gen ekspresyonunda donma kaynaklı değişikliklere odaklanmaktadır. (Liu vd., 2018; Lung, 2019; Roy ve Goswami, 2019; Hawkins, 2020). *R. sylvatica* karaciğerinden elde edilen cDNA kütüphanesinin incelenmesi, donma ile

indüklenen birkaç gen ortaya çıkardı. Bunlardan bazıları daha önce tanımlanmış proteinlerle ilişkili genlerdir (fibrinojen alfa ve gama alt birimleri, ATP/ADP translokaz ve mitokondriyal doğal olmayan fosfat taşınmasında rol oynayan genler).Yeni keşfedilen amfibilere özgü proteinler; FR10, FR47 ve Li16, her biri farklı dokularda farklı ekspresyon seviyeleri sergileyebilen, membranla ilişkili hidrofobik bölgeler gibi yapısal özellikleri paylaşır. Çeşitli sinyal yollarıyla donma, anoksi ve dehidrasyon streslerinde aktif bir rol oynar. (Cai ve Storey, 1997; McNally, 2002; Storey 2007). Dokuya göre değişmekle birlikte, üç genin de donmadan sorumlu olduğu gösterilmiştir (Sullivan, 2011; Sullivan ve Storey, 2012; Sullivan vd., 2015a; 2015b).

Donmaya toleranslı ağaç kurbağasında donmaya maruz kalma sırasında doğal olarak indüklendiği bilinen transfekte kurbağa proteinlerinin aşırı ekspresyonu ile kültürlenmiş ipekböceği BmN hücrelerine önemli bir donma koruması sağlanabileceğini göstermektedir. Doğal donma toleransı sırasında indüklenen gen ürünlerinin (kurbağa Li16 ve Fr10 dahil) daha fazla analizi, yalnızca donma toleransını destekleyen tüm soğuk adaptasyon yelpazesinin belirlenmesine yardımcı olmakla kalmayacak, aynı zamanda tıbbi organ gelişimi için toleranssız hücrelerin uyarlanmasına yönelik yeni bilgiler sağlayacaktır (Biggard, 2013).

1.3.3. Li16, FR10, FR47

Sullivan (2008), Ağaç kurbağasının toplam vücut suyunun % 65'ine kadar dondurma kabiliyeti, kışın karşılaşılan sıfırın altındaki sıcaklıklara dayanmasını sağlar. Donma ile ilişkili streslerden kurtulmak için kurbağalar, üç yeni genin ekspresyonunu içeren çoklu moleküler adaptasyonlar geliştirdiler. Üç genin (Li16, fr10 ve fr47) de dokuya bağlı bir şekilde donmaya duyarlı olduğu bulundu. Ayrıca hepsi anoksi ve dehidrasyon streslerine yanıt verirler, bu da bu genlerin transkripsiyonunun her üç stres için ortak olan düşük oksijen koşulları tarafından tetiklendiğini düşündürür. Lil6 için dondurmadan sonra protein seviyeleri yükseldi; ancak FR10 ve FR47 genellikle donmadan sonra proteinde hiçbir değişiklik veya azalma göstermedi. Üç genin de transkriptleri, iribaş gelişimi sırasında da saptandı, bu da metamorfoz için olası ek bir rolü işaret etmektedir.

1.3.3.1. FR10

R. sylvatica karaciğer dokusundan cDNA kütüphanesini inceleme kararına dahil edilen fr10 geninin sekanslandığı protein kodlama bölgesinin 57 bp olduğu bulundu. (Cai ve Storey, 1997). Northern blot analizi, tam mRNA dizilerinin ortalama olarak 550 bp'de bulunduğunu gösterdi. Dizi yazılım analizi, açık okuma çerçevesinin bir 90 aa, 10 kDa polipeptidi (FR10 proteini) kodladığını öngördü.. Polipeptit zinciri, 9 kuvvetli bazik amino asitten ve 11 kuvvetli asidik amino asitten türetilir, bu da pH 5,25'lik bir tahmini izoelektrik noktasına sahip olduğunu gösterir. İlk 21 aa'nın Nterminal bölgesi çok hidrofobikken, kalan peptit bölgesinin çok hidrofilik olduğu bulundu. 1997'de BLAST kullanılarak yapılan ilk benzerlik araştırması,

dizinin bilinen bir gen veya protein ile önemli bir benzerliği olmadığını gösterdi. (Genbank U831) (Cai ve Storey, 1997).

Dondurulmuş *R. sylvatica* karaciğerinden bir cDNA kütüphanesi, rekombinant plazmit pBfFR1'e klonlanarak soğuğa dayanıklılıktan sorumlu gen fr10'u tanımlandı. Sekiz hayvan organındaki gen ekspresyonunun RNA blot analizi, donmaya (-2.5 °C'de 2 saat) maruz kalmanın karaciğer ve bağırsakta yüksek transkripsiyonel seviyeleri indüklediğini gösterdi.. Kalp, akciğer, beyin ve mesanede orta derecede arttığı, sadece iskelet kasında değişmediği, böbrek dokusunda da azaldığı bulundu. Ek olarak, diğer üç kriyoprezerve edilmiş gen kaydedilmiştir. Bunlardan ikisi kan pıhtılaşmasında görev alan ve karaciğer tarafından sentezlenen bir plazma proteini olan fibrinojenin alfa ve gama alt birimleri ve son gen ise lateral plazmada yer alan ADP/ATP translokaz (AAT) genidir. ADP / ATP taşınmasından sorumludur. Deney grubu ile karşılaştırıldığında, AAT geninin ekspresyon seviyesi, 8 saatlik donma periyodu boyunca, 5 kat artarken, hayatta kalma süresi boyunca keskin bir şekilde azaldı (Cai ve Storey, 1997; Storey ve Storey, 2001).

1.3.3.2. Li16

Orijinal olarak *R. sylvatica*'dan izole edilen ve donmuş koşullar altında kırılğan olan li16'nın boyutu 6 baz çifti (bp) idi. Bu bölgenin 115 amino asitlik (aa) bir proteini kodladığı belirlendi. Li16 proteininin amino asitlerinin 16'sının kuvvetli bazik ve 11'inin kuvvetli asidik olduğu bulundu ve izoelektrik noktasının pH 8,29 olduğu tahmin edildi

(McNally vd., 2002). Li16 proteininin bilgisayar modellemesi, N-terminal bölgesinin yakınında oldukça hidrofobik olduğunu göstermektedir. Li16 proteininin hesaplanan moleküler hacmi 12.8 kDa'dır, sadece gerçekleştirilen western blot, 15 kDa'ya yakın protein bantlaması göstermiştir. Li16'nın keşfedildiği çalışmada, ne transkript ne de protein sekansı, bilinen genler veya proteinlere önemli benzerlik göstermedikleri için yeni genler ve proteinler olarak kaydedilmedi (Genbank AF175980) (McNally vd., 2002).

Northern blot analizi *R. sylvatica* karaciğer dokusundan izole edilen li16 transkript seviyesinin 2 saatlik dondurmadan sonra deney grubundan 3,7 kat daha yüksek olduğunu gösterdi. Proteinin ekspresyon seviyelerini inceleyen immüno blot analizi, Li16 proteininin de transkript seviyeleri ile birlikte deney grubuna kıyasla 2 kat artmıştır. Karaciğerdeki gen ve protein ekspresyonu, hipoksik maruziyet ile güçlü bir şekilde uyarılır, ancak dehidrasyon stresine daha az duyarlıdır. Li16'nın donma ve hipoksiye güçlü tepkisi ve ayrıca oksijenin yeniden ortaya çıkması için genlerin hızlı düzenlenmesi, Li16 proteininin donma sırasında iskemi ile mücadelede bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (McNally vd., 2002).

1.3.3.3. FR47

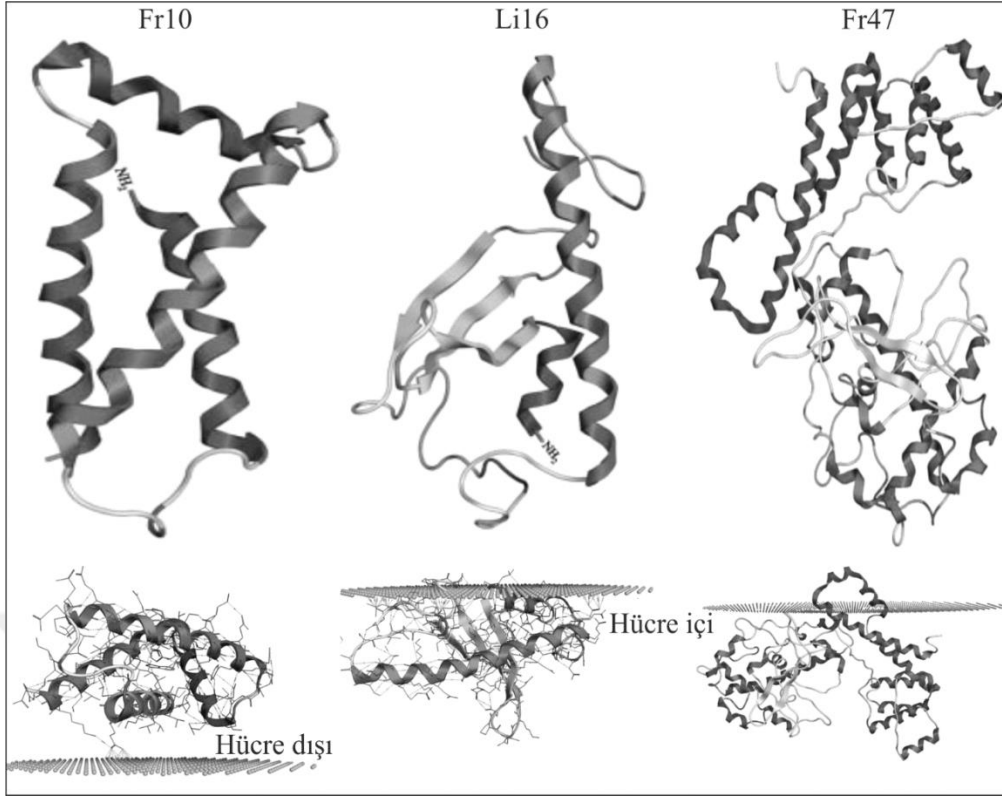
5' RACE ile klonlama ve uzatma yoluyla elde edilen fr47 dizisinin 3678 bp olduğu bulunmuştur Gen Bankası (AY100690) (McNally vd., 2002). Tam nükleotid dizisi bir genel okuma çerçevesi için analiz edildiğinde, 200 ve 2163 bp'de iki olası başlangıç yeri ve 3176 bp'de bir durdurma kodonu saptandı. Teorik olarak, bu bölgeler, sırasıyla 5.7 ve 39.8 kDa moleküler ağırlıklara sahip 390 ve 337 aa uzunluğunda polipeptitler verecek şekilde hesaplanır. Bu gen, sentezlediği proteinin boyutundan dolayı fr47 olarak adlandırılmıştır. Western blot analizi, protein ürününün ortalama 7 kDa olduğunu belirledi, bu nedenle 200 bp'de ilk kodondan ekspresyon belirgindi. Varsayılan FR47 proteininin bilgisayar modeli analizi, aa dizisinin 350 ve 370 pozisyonları arasındaki C-terminal bölgelerinin oldukça hidrofobik olduğunun bulunduğunu ortaya çıkardı. Böyle bir hidrofobik bölge, proteinin bir transmembran karakterizasyonunu sağlayabilir (Sullivan, 2011, Sullivan vd., 2015a). Fr47 geninin, *R. sylvatica*, *P. crossifer* ve *H. versicolor* gibi dona karşı oldukça dayanıklı kurbağalarda bulunduğu, ancak dona dayanıklı türlerde bulunmadığı bildirilmiştir. *Scaphiopus. kanepii*. ve *R. sylvatica* ile

yapılan çalışmada, Northern blot analizi, 2 saatlik donmada transkripsiyonda 5.1 kat, 2 saatlik hipoksiye maruz kalmada 6 kat ve dehidrasyondan sonra 2.7 katlık bir artış gösterdi. AntiFR47 antikoru ile yapılan bir immünoblot çalışması, donma ve çözülme sırasında artan protein seviyesi ve hipoksi veya dehidrasyona maruz kalma ile hafif bir düşüş gösterdi (McNally vd., 2002).

1.3.3.4. FR10, Li16 ve FR47 Proteinlerinin Biyoinformatiği

Bu argüman kapsamında değerlendirilen ve kriyojenik toleransla ilişkili proteinler olarak belgelenen FR10, Li16 ve FR47 proteinleri için veriler toparlandı. İlgili genlerle ilişkili nükleotid dizileri, NCBI web sitesinden (2.Int. Kyn) elde edildi. GenBank erişim numaraları FR10, Li16 ve FR47 için sırasıyla U831.1, AF175980.2, AY100690.1'dir. Literatürden elde edilen 3D protein yapısı ve membran geçiş modeli de modifiye edilmiş ve Şekil 2.12'de gösterilmiştir (Biggar vd., 2013; Sullivan vd., 2015a; 2015b). FR10 proteinini kodlayan fr10 geni, 57 bp olarak tanımlandı. Bu dizinin ara bölgesi 231, bir protein kodlama bölgesi olarak tanımlandı. FR10 proteini, NCBI veri tabanına AAC6028.1 protein tanımlayıcısı ile kaydedildi ve 90 amino asitten oluştuğu belirlendi. Bu amino asit dizisi, "mkvllalvvlv iaigleagv vkrdaqdpqlq qitdifqgis ktlqekfana eipsqtqelg akiqahgeti sasiqkwice mvalskekls" simgeleriyle gösterilir. UniProt veri tabanında Q91335 erişim numarası olarak kaydedilen proteinin amino asit dizisindeki 118 arasındaki bölgenin, bir sinyal peptid bölgesi içerdiği kabul edilir. Bu bölge işleme bölgesidir, sinyalin N-terminalini içerir ve genellikle olgun proteinden çıkarılmış olan bölgedir. Sinyal peptitleri, zarı bir kez geçen proteinlerde bulunur, sentezlenen proteinler hücre dışı veya ektoplazmik olabilir.

Li16 geninin mRNA dizisi 29 bp'den oluşmaktadır. Nükleotid dizisinin 3350 bölgesi, protein kodlama bölgesi olarak belirlendi ve bu bölgenin 115 amino asitlik bir dizi oluşturduğu belirlendi. 115 amino asitten oluşan Li16 geni, NCBI veri tabanında AAG33070.2 protein tanımlayıcısı ile kayıtlıdır. İlgili kayıt numarasından yola çıkarak, amino asit dizileri "maivlsalla ivliqvvepn skndrlrchs ctspackir nevecrsgqd tcqrthmpit dpsgtenrnn yyastsegii vlerlcttkk rcenakkrml srmsvdcqg" sembolleri ile temsil edilir. Q9DG71 erişim kodu ile UniProt veri tabanında incelenen Li16 proteinindeki 115 amino asit dizisinin 119. bölgesi, bir sinyal peptid bölgesi olarak tanımlandı.



Şekil 1.12: FR10, Li16 ve FR47 proteinlerinin 3B yapıları ve hücre zarı etkileşim modelleri.

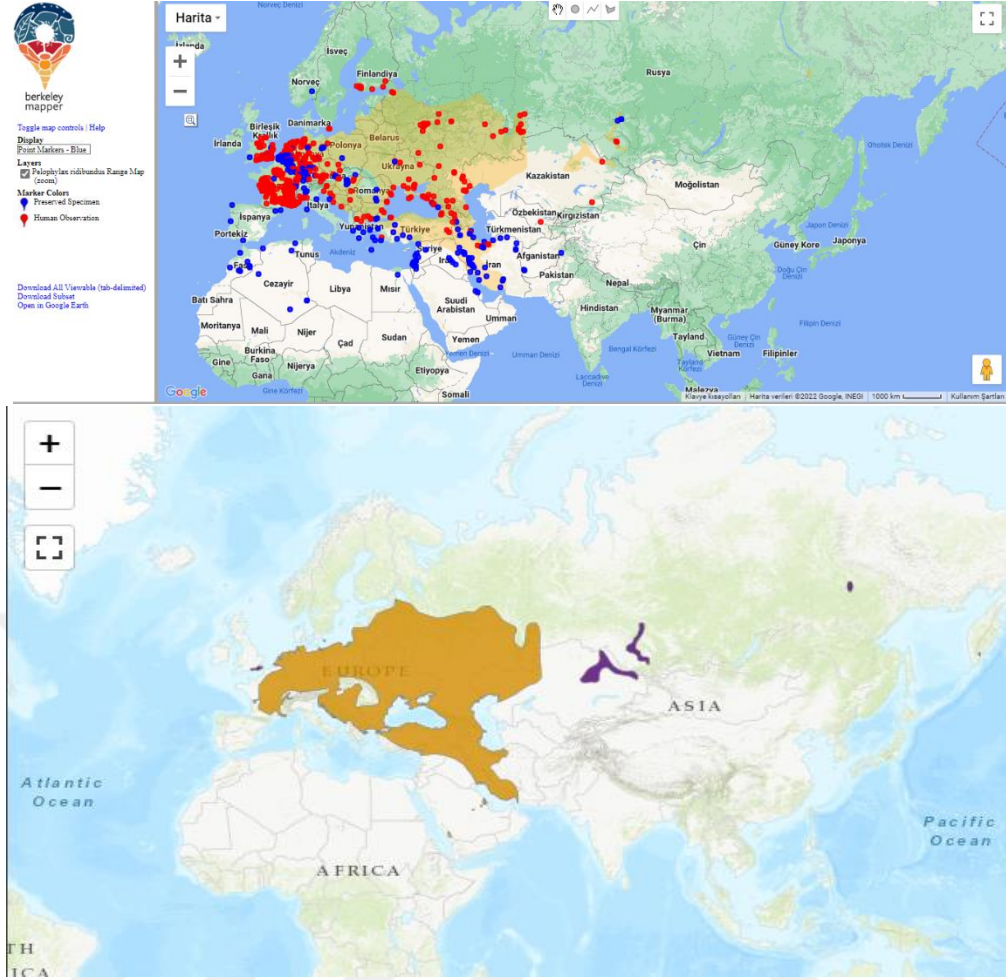
Donma toleransında rol oynayan başka bir protein olan FR47 proteini, üçünün en büyüğüdür. Western blot analizine göre protein kodlayan gen fr47'nin ortalama 7 kDa olan bölgesi 3678 bp olarak tespit edildi. Nükleotid dizisinde 200-3176 arasındaki bölge protein kodlama bölgesi olarak tanımlanmış ve bu bölgeden 390 amino asitlik bir peptit dizisi sentezlenmiştir. İlgili aminoasit dizisi “mgvmgsiqme miqnkwkhag ghiadgliit sqwlpptfet qisqvqltky lnamvnytii aslelwrrdq kfinltqcaf stlsyhiqvn rareelqsgn yhtwlkyfkg ldlentwfev pgreieceeq wcagrnfniym vegievmckl ivmpllvged ppefwypeiy ghyadtqdrtd hdlcllkhs nickfqrmpv hignrfmeig pqhiclitnd ndtmrslrnt apfsgcimnv kvfkwlndtf ifesdadktf nrewavdnlt dttpfvisle pllqvlkese ilrkyiethe hylrnnllsa iidkgklihl ssqikeetth hwydvfsgws ptatktfswi fspilililg laivtvincc iyarikrrvk rlkrfstew” sembolleri ile gösterilmiştir. UniProt veri tabanında Q8JGN erişim numarasıyla kayıtlı FR47 proteininin amino asit dizisinin incelenmesi üzerine, 39375 orta bölgesinin yoğun C terminal bölgeleriyle güçlü bir şekilde hidrofobik olduğu belirlendi ve bu bilgilere dayanarak, protein bir zar ötesi sarmaldır.

Amfibiyeenlerde donma stresinde rol oynadığı bilinen bu proteinler ile ilgili resmi bir çalışma yapılmamıştır. Donma stresine yanıt olarak protein seviyeleri, farklı dokulardaki koşullara göre değişir. Bu varyasyonların nedeni belirsizliğini koruyor.

Ayrıca bu proteinlerin en önemli özelliği olan buz kristalleri ve buzun şekli ile ilişkisi üzerine çalışmalar sürdürülmektedir. Buz bağlama bölgeleri ve buz oluşum stratejileri de tam olarak anlaşılmamıştır. Bu alandaki ileri çalışmalar, hayvan donma tolerans stratejilerini daha iyi anlamaya yardımcı olacaktır.

1.3.2.4. *P.Ridibunda*

Amphibia takımının bir üyesi olan amfibi *Pelophylax ridibundus* (Anura; Ranidae), Batı Palearktik'te tanımlanan en eski su kurbağalarından biridir (Kuru, 2004). Biyocoğrafik olarak, *P. ridibundus* Kazakistan'ın (Berezovikov vd., 2001), Çin (Fei vd., 1999) ve Sibirya'nın en doğu bölgelerinde (Berezovikov vd., 2001), İran (Mohammadi vd., 2015), güneyde Suudi Arabistan (Schatti ve Gasperetti, 1999), Avrupa'da Bahreyn ve Nil, kuzeyde Fransa, İngiltere, İspanya, İsviçre ve Belçika, Litvanya ve Estonya (Arnold, 2003; Kuzmin vd., 2009) da bulundu. *P.ridibunda* Türkiye'de de yaygın olarak yayılış göstermektedir (Arıkan vd., 1998; Sinsch ve Schneider, 1999; Akın vd., 2010). 1999 yılında yapılan bir ön araştırma (REF), Avrasya bataklık kurbağalarının belirli coğrafi bölgelerde bol olduğunu göstermiştir (Kaya ve Erimiş 2001) (Şekil 1.13). *Rana ridibunda* olarak da bilinen *Pelophylax ridibundus*, Bern Sözleşmesi (Avrupa Koruma Sözleşmesi (European Wildlife and Natural Habitat 2006) ve IUCN Least Concern (LC) Listesinde yer almaktadır. (1. İnt Kayn). Ancak üç yıllık takip döneminde *P.ridibunda* popülasyonunun giderek azaldığı belirlenmiştir (Erişmiş, 2011).



Şekil 1.13: Ridibunda dağılım haritası (3. İnt. Kyn)

P. ridibunda yakın zamanda *Rana ridibunda* olarak biliniyordu. Rana cinsinin koruma statüsünden dolayı bu isim *P. Ridibundus* olarak tanımlanmıştır (Frost, 2013). Eskiden *R. ridibunda* olarak sınıflandırılan Yunan göl kurbağası, yakın zamanda üç türe ayrıldı: *R. ridibunda*, *R. epeirotica* ve *R. balcanica* (Schneider vd., 1985; Schneider vd., 1993). Ancak her iki ismin de farklı araştırmacılar tarafından kullanılmaya devam ettiği bilinmektedir (Canpolat, 2018).

Rana ridibunda son derece fırsatçı bir amfibidir. Karışık ve yaprak döken ormanlarda, ağaçlık savanlarda, savanlarda, yarı çöllerde ve çöl bölgelerinde yaşar. Yarı suda yaşayan kurbağalar, su birikintileri ve sığ göletlerden büyük dağ göllerine, nehirlere ve akarsulara kadar akan ve durgun suda çeşitli habitatlarda yaşar. Suyun yüksek tuzluluğunu tolere eder (tuzluluk binde 0,98,3 kısım). Genel olarak bataklık kurbağaları, zengin otsu bitki örtüsüne sahip sıcak, açık alanları tercih eder. *P.ridibunda* ıslak yerleri

kuru yerlere tercih eder. Ancak akarsu vadileri ve kanalları kullanılarak başarılı bir şekilde kolonize olmuşlardır (Başoğlu ve Abstract, 1973).

P. ridibundus'ta boy ve ağırlık, boy gradyanına göre değişmekte olup, ağırlık artışı ile boy arasında pozitif bir ilişki gözlemlenmiştir. *P. ridibundus*'un ortalama boyu 8.62 mm, ortalama ağırlığı 23.65 gr ve ortalama vücut kitle indeksi değerleri 0.6 gr/mm olarak hesaplandı (Pallas, 1771). Kutrup vd., 2011, Erkekler ve dişiler için vücut uzunluğu, yaş ve büyüme oranları arasında benzer korelasyonlar vardır. Cinsel olgunluğa 3 ve yaşında ulaştıklarını ve maksimum yaşlarının erkeklerde ve dişilerde sırasıyla 8 ve 11 yıldır, farklı bölgelerde yaşayan *Pelophylax ridibundus*'un iki popülasyonunun, Dörtöl (6 m rakım) ve Karagöl'ün (180 m rakım) vücut büyüklüğü ve yaş yapısındaki farklılıkları tahmin etmeye çalışılmıştır. Karagöl'de erkekler 28 ile 27 yaşları arasındayken, Dörtöl'da erkekler için yaş dağılımı 11, kadınlar için yaş dağılımı 37'dir. Cinsel dimorfizm sadece Dörtöl popülasyonunda gözlemlendi ve dişilerin erkeklerden daha büyük olduğunu buldular. FU erkeklerde (28.1 mm) kadınlara (33.5 mm) göre daha kısa bulundu. VU'ya paralel olarak farklı erkek ve dişiler arasında ölçümler yapıldı, ancak A.A.1.PK erkeklerde (3.09 mm) kadınlara (2.85 mm) göre daha kalın tespit edildi. Vücut uzunluğu erkekler dişilerden daha küçüktür. SVL, kadınlarda 5599 mm (7.6 ± 13.37) ve erkeklerde 3883 mm (6.58 ± 11.09) arasında değişiyordu. Erkek SVL'si yaşla önemli ölçüde ilişkiliydi, ancak kadın SVL'si ile yaş arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Suya çok bağımlıdırlar, bu nedenle arka ayaklarının parmakları arasında yüzmeyi kolaylaştırmak için iyi gelişmiş bir yüzme ağı bulunur. Renkleri genellikle mavimsi-gri, açık kahverengi veya arkalarında açık noktalar bulunan koyu renktedir. Bazı durumlarda, sırtın ortasından aşağıya doğru inen parlak renkli bir şerit görülebilir. Ventral yüzey soluk beyaz veya sarımsıdır; Genel olarak Beyşehir, Eğridir ve Akşehir civarındaki insanların karınlarında turuncu-kırmızı benekler bulunur. Bu türün erkeklerinde ağzın hemen arkasında bir çift ses kesesi bulunur. Ön ayaklar dişilerden daha güçlüdür ve üreme mevsimi boyunca ilk ayak parmaklarının tabanında bir çıkıntı bulunur. Avı tutmak için kullanılan kamış yaprakları hafifçe içe doğru eğilir ve iki sıra halinde iç burun delikleri arasında bulunur. *Rana* türlerinden ülkemizde bulunanların aksine, gözlerinin arkasında geçici bir şerit yoktur. Timpanik membranlar belirgindir.

Sırt kıvrımları iyi gelişmiş, derileri az miktarda pürüzlüdür (Özeti ve Yılmaz, 1994; Demirsoy, 2003).

Sık ağaçlıklı havuzlarda ve hızlı akan sularda yaşar. Özellikle alçak ovaların sularında görülür. Bazen akan sularda da bulunur. Besinleri böceklerden oluşur. Dağlık alanlarda nadir olmakla birlikte 2500 m. yüksekte yer almaktadır (Atatür ve Göçmen, 2001; Baran, 2006). Mayıs-Haziran aylarında çiftleşirler. Dış döllenme, erkek dişiye koltuk altından tutmak için ön ayaklarını kullandığında meydana gelir. Bir dişi, genellikle su bitkileri arasında, birden fazla yuvaya yaklaşık 5.000 ila 10.000 yumurta bırakır. Larva aşaması sıcaklığa bağlı olarak 3 ay sürer, 3 yıl sonra cinsel olarak olgunlaşırlar (Demirsoy, 1997). Bu tür subtropiklerde yıl boyunca aktiftir, ancak şiddetli kışları olan bölgelerde soğukkanlı hayvanlar (Poikilotherm) oldukları için kış uykusuna yatarlar. Bu süre zarfında suyun dibindeki çamurda yaşadılar (Özeti ve Yılmaz, 1994).

1.3.2.4.1. Türkiye’de *P. Ridibunda*

Anadolu’da (Türkiye) *P. ridibundus*’un dağılımı, morfolojisi, serolojisi ve popülasyon büyüklüğü üzerine çalışmalar çeşitli araştırmacılar tarafından yapılmıştır (Arıkan 1988, Baran vd., 1992; Atatür vd., 1999; Kumlutaş vd., 1999, Sinsch ve Schneider, 1999; Kaya ve Erişmiş, 2001, Tosunoğlu vd., 2005; Ayaz vd., 2007). *R. ridibunda* *P. ridibundus*, Türkiyedeki en yaygın iki yaşamlı türlerinden biridir (Yılmaz vd., 2005). Türkiye’de de popülerdir, Türkiye’de evcilleştirilmiş bir türdür (Başoğlu, 1973). Türkiye’de insanlar tarafından yenmese de yurt dışına ihraç edilen bir türdür. (Güner, 2018).

Pelophylax adı, yeşil (su) eski Dünya kurbağası ile kahverengi kurbağayı ayırt etmek için Fitzinger (1843) tarafından verildi. Rana şubeleri geçici olarak 33 gruba ayrılmıştır (Dubois, 1992). Anadolu su kurbağasının [cins: *Pelophylax* (*Rana*)] çok yüksek genetik, filogenetik ve ekolojik çeşitliliğe sahip, henüz tanımlanmamış bir tür kompleksi içerdiği bilinmektedir (Fitzinger, 1843). Bu grup geçmişte çok hızlı ve karmaşık yollarla yayılmıştır ve bu süreç boyunca değişen derecelerde moleküler ve organizmal farklılaşma meydana gelmiştir (Plötner, 2005). 7 evrimleşme haritası belirlenmiş olup ayrım karışıktır (Akın vd., 2010). Kaya ve Erişmiş (2001), Akören Gölü’ndeki (Afyon) ova kurbağalarının popülasyon ölçekli çalışmalarında yakalananların desenleri bildirmiş

olup, *P.ridibunda* alt türlerine dahil ettiler. Kurbağaların karyotip analizi, popülasyonlar arasındaki farklılıklara rağmen, özellikle *Rana* cinsinde kromozom sayısının $2n = 26$ olduğunu belirlemiştir (Kuramoto, 1990). *Rana* cinsinin farklı tür ve alt türlerinin farklı popülasyonlarındaki karyotipik farklılıklar daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Mevcut belirsiz durumdan dolayı *Caralitanus* hariç tüm hatları geçici olarak "*Grup Pelophylax ridibundus*" olarak kabul edilmiştir (Green, 1985; Napoli vd., 2009; Canpolat vd., 2018).

1.3.2.4.2. Anadolu Dağ Kurbağalarının Karşılaştığı Tehditler

Denizlerle çevrili ve su kaynakları bakımından zengin bir Asya ülkesi olan Türkiye, başta göller olmak üzere birçok benzer pestisit ve kirliliğe neden olan biyotik ve abiyotik faktörlere sahiptir (Erişmiş vd., 2013). Çevre sorunlarının ve doğal dengenin büyük önem taşıdığı günümüzde (Baran, 2006; Urhan vd., 2006); Avrupa ve Asya kıtaları arasında yer alan, farklı habitatlara sahip her yönden zengin olan ülkemizde yaşayan hayvanları tanıtmak ve halkı bilgilendirmek haklı olarak gereklidir (Erder ve Froghi, 1973).

P.Ridibunda böcek ve sivrisinek larvalarını yemesiyle, bazı ülkelerde yemek olarak yenen özellikle arka uzuvlarıyla ve laboratuvarlarda denek olarak kullanılmasıyla faydalanılabilmektedir (Yılmaz, 1993; Urhan vd., 2006). Bu tür çeşitli ülkelerde yarı yoğun olarak üretilmekte ve ekonomik katkı sağlamaktadır. Ancak ülkemizde doğadan toplama dışında bir üretim yoktur. Hızlı kentleşme, doğal organizmaların çeşitli nedenlerden (atık, yangın, endüstriyel ve kimyasal atıklar, toksik atıklar, vb.) etkilenmesi ve bir de bilinçsiz toplanması türün azalımına ya da yok olmasına neden olur. (Başoğlu, 1973).

Günümüzde biyoçeşitlilikteki küresel düşüş, çevre kirliliği nedeniyle artan bir hızla devam etmektedir. Kirlilikten etkilenen organizmalardan biri de amfibilerdir. Amfibiler, larva ve yetişkin evrelerinde sucul ekosistemlerdeki kirleticilerden ağır ve kronik olarak etkilenirler (Natale vd., 2000). Morfolojik anormallikler (visseral ödem, eksen anomalileri ve kuyruk deformiteleri) ile birlikte büyüme geriliği ve mortalite artışı, özellikle yaşam döngüsünün erken evrelerinde kimyasal kontaminasyona maruz kalan canlı organizmalarda gözlemlenebilir. (Erişmiş vd., 2013) İnsan faaliyetleri sonucu

doğal ortama giren zirai kimyasallar veya gübreler (amonyum sülfat gibi) Anadolu dağ kurbağalarının sağ kalımını zorlamakta ve popülasyonun hayatta kalması için büyük bir tehlike oluşturur (Karaca, 2015). İnsan faaliyetleri ile doğrudan ve dolaylı olarak birçok doğal alana ulaşan mikroplastikler, son yıllarda keşfedilen doğal tehditler arasında önemli bir faktördür. Hem karasal hem de su yaşamını temsil eden kurbağalarda mikroplastik kirliliği incelenerek *R. macrocnemis* ve *P. ridibunda* yavrularında polietilen teraftalat, naylon ve poliakriliklerin baskın mikroplastik kirleticiler olduğu kaydedilmiştir (Karaoğlu ve Gül, 2020).

Vahşi doğada yaşayan organizmalar, özellikle amfibiler, genellikle insan etkisinden dolayı hayatta kalmakta büyük zorluk çekerler ve tehdit altındadırlar (Wake, 1991). Erişmiş vd. (2019), Öte yandan, kurbağaların doğal ortamlarında yaşayabileceği tehditler de vardır. Kış aylarında metabolizma bozulduğunda, vücudun bağışıklık sistemi hastalığa neden olan mikroorganizmalarla ve aşırı çevresel streslerle savaşılabılır. Ancak cilt tarafından salgılanan birçok peptidi içeren kurbağa salgıları, doğal antibakteriyel aktivite yoluyla onları bir dereceye kadar koruyabilir. Amfibilerin küresel olarak azalmasına yönelik bir diğer etkili tehdit, amfibilerin ölümcül bir hastalığı olan ve ülkemizde de yaygın olarak görülen *chytridiomycosis*'tir.

Türkiye'de Anadolu dağ kurbağasının dona karşı toleransı ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamasına rağmen dona karşı dayanıklılıkta önemli rol oynayan kan parametreleri araştırılmıştır, eritrosit büyüklüklerinin yükseltiye bağlı ters orantılı olarak değişmesi *P. ridibundus* karşılaştırması ile desteklemiştir (Arıkan vd., 2001). Buna göre genellikle düşük rakımlarda bulunan *P. 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 (Arserim ve Mermer, 2008).

Schmid (1982), Storey ve Storey (1988), tarafından yapılan çalışmalarda hibernasyon sırasında donmaya ve kış uykusunun yarattığı strese karşı doğal bir tolerans olduğu gösterilmiştir. Donma ve çözülme metabolik hasara ve homeostaziye neden olur. Hücre zarları ve organeller gibi hassas yapılarda mekanik/ozmotik hasara neden olduğu gösterilmiştir. Aşırı soğukta, canlı organizmalar kriyoprotektanlarla donmaya karşı korunur. Oksidatif stres, kriyoprotektanlar ve antioksidanlar soğuk şokuna direnmek

için yeterli olmadığında ortaya çıkar. Stres, ROS'ta bir artışa neden olur ve DNA replikasyonu sırasında yan ürün olarak oluşan serbest radikal ajanlar da DNA hasarına neden olur (Williams ve Jeffrey, 2000; Onur vd., 2009; Erişmiş vd., 2013; Erişmiş ve Yoldaş, 2021). Genel olarak, çevre kirliliğini izlemek için Türkiye'de amfibiye'nlerin DNA hasarı üzerine çalışmalar yapılmıştır (Erişmiş ve diğerleri, 2013; Erişmiş, 2019).

Organizmalar, hücre ve dokularının zarar görmesini engelleyen belirli koruyucu maddelere sahiptir. Aşırı sıcak ve soğuk koşullarda soğuk ve ultraviyole ışıklı antifriz proteinleri soğuk ortamlarda kullanılır, canlıları don etkilerinden korur ve hayatta kalmalarını sağlarlar (Storey ve Storey, 1988; 2007; 2013; Duman vd., 1991, Duman 2001).

Voituran vd., (2005), *Rana dorsae*, *P. ridibunda* ve *P. esculenta*'nın donma olayları sırasında hayatta kalma ve bazı fizyolojik tepkileri üzerine yaptıkları bir çalışmada, *P. ridibunda*'nın normalde su altında kış uykusuna yattığını bulmuşlardır. Suda çözünmüş oksijen kullanan aşırı kalabalık kurbağaların donmaya karşı özel sistemler geliştirdiğini bildiriyorlar. Bu kriyokoruyucu etki, esas olarak, hücre hacmini en aza indiren ve makromolekülleri stabilize eden glikoz gibi düşük moleküler ağırlıklı kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonu ile elde edilir (Sullivan ve diğerleri, 2012).

Voituran et al. (2009), *Rana*'nın da geçici olarak dona dayanıklı olduğunu ancak *Rana arvalis*'in dona dayanıklı bir anur olduğunu belirtmiştir. *R. Sylvatica*'nın, glikoz dışarıdan yüklendiğinde hızlı donmaya maruz kaldığında bile donma hasarına karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. -2.5 °C ve 5°C'de hızlı dondurmaya maruz bırakılan deney grupları arasında glukoz enjeksiyon grubunun kontrol grubuna göre daha uzun süre hayatta kaldığı tespit edildi. Biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler, don toleransına yönelik en önemli uyarlamalardır. Bunların en önemlileri, yüksek konsantrasyonlarda depolanan düşük moleküler ağırlıklı kriyoprotektanlardır (polioller veya şekerler). *Hyla* cinsinin türlerinde, kriyoprotektan glikozdur. Dondurularak uyarılan hayvanlarda, kandaki ve merkezi organlardaki glikoz seviyeleri 5 mM'den 300 mM'ye yükselmiştir (Costanzo vd.,1991; Shao ve, 2002).

Ayrıca ülkemizde yayılış gösteren *Pelophylax ridibundus* türünde donmaya karşı aktif rol oynayan kriyokoruma molekülleri ve moleküler mekanizmalar hakkında detaylı bir

Çalışma henüz yapılmamıştır. Bibliyografik alışmamızda donmayı doğal olarak bloke eden FR10, FR47, Li16 genlerinin ekspresyonu ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır. *R. Makrocnemis* türlerinin donmaya, hipoksiye ve dehidrasyona maruz kalması üzerine kriyoprotektan olarak glikozun etkisi araştırılmış (Yoldaş ve Erişmiş, 2021) ve Türkiye’de ilk olarak FR10, FR47, Li16 genlerinin ekspresyon seviyeleri *R. Makrocnemis* türlerinin, Yoldaş (2021), tarafından pozitif kolerasyon gösterdiği bulunmuştur.

Bu tezde tartışılan Anadolu dağ kurbağalarından *P. ridibunda*, kış uykusu sırasında donma sıcaklıklarına maruz kalmaktadır ve yaz ve kış döngülerinde kalıcı olmaları, donmaya tepki olarak var olduklarını düşündürmektedir. Glikoz molekülleri, kriyojenik koşullar altında kan, karaciğer ve iskelet kasındaki glikoz seviyelerinin değişmesi ve Anadolu dağ kurbağalarında amfibilere özgü AFP’lerin (FR10, Li16 ve FR47) durumu ve bu AFP’leri kullanmaları halinde donma, anoksi ve dehidrasyona neden olur. Yanıt olarak, kas ve karaciğer dokularındaki transkripsiyonel ekspresyon düzeylerinin durumu ile ilgili soruların yanıtları araştırıldı. Bu çalışmada gerçekleştirilen transkript ifade düzeyi çalışmalarında qRT-PCR tekniği kullanılmıştır. Literatürde FR10, Li16 ve FR47 proteinlerinin ve genlerinin ekspresyon çalışmalarında Northern blot ve RT-PCR teknikleri kullanılmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Saha Çalışmaları ve Deney Grupları

Literatürlere göre bu türün üreme mevsimi rakıma bağlı olarak mayıs başından haziran ortasına kadar sürer (Maxwell, 1962), ancak üreme sezonunun İzmir yakınlarında deniz seviyesinde yapılan yürüyüşle Şubat sonu ve Şubat başında başladığı tespit edilmiştir (Çaydam, 1974). Türün yumurta ve larvalarına Mayıs ayında yapılan arazi gezisinde rastlanmamıştır. Saha çalışmalarında ortalama hava sıcaklığı 20°C olarak belirlenmiştir (Bağlu, 1973). Literatüre göre, bu türün üreme mevsimi rakıma bağlı olarak Mayıs ayının ilk gününden Haziran ortasına kadar sürer. (Maxwell, 1962). Deneyde kullanılacak *P. ridibundus* türü için arazi çalışmalarımız Temmuz, Ağustos ve Eylül aylarında Afyonkarahisar ilinin uygun bölgelerinde (Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5) cinsiyet ayrımı dikkate alınmadan 28 yetişkin hayvan kepçeleme yöntemiyle toplandı (*P. ridibunda* için ortalama erişkin SVL 70.48-95.52 kaydedildi). Bu örnekler, gündüz ve gece (bir el feneri kullanılarak) arazi gezilerimiz sırasında toplanmıştır. Göl ve çevresinde bulunanlar ince ağ kepçeyle, karada bulunanlar ise el ile yakalandı. Islak pamuğu nefes alabilen bir bez torbaya koyarak numunelerin canlılıkları korundu.

T.C. tarafından Yürütülen saha çalışmaları ve laboratuvar çalışmaları T.C Tarım ve Orman Bakanlığı Milli Parklar ve Doğa Koruma Müdürlüğü'nün 2126211288.0 sayılı etik kurulu izni ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.1. Arazi çalışmalarından alınmış resimler.

Yakalanan hayvanlar, uygun nem ve havalandırma ile önceden etiketlenmiş steril plastik kutularda laboratuvar ortamına alındı. Laboratuvara getirilen numuneler, deneysel çalışma öncesinde en az 3 hafta beslenmeden +5°C'de tamamen karanlıkta tutulur (Şekil 2.2). Bu soğuk iklim koşulu, hayvanların soğuğa hazırlanmasını sağlar ve gerekli metabolik olayları tetikler. Hayvanların içerisinde bir kısmı kontrol grubu olarak belirlenmiş ve kontrol çalışmaları için doğrudan çevreden alınan örnekler kullanılmıştır (Sullivan 2011, Sullivan ve Storey 2012, Sullivan vd. 2015a).



Şekil 2.2: Laboratuvara getirilen numuneler, deneysel çalışma öncesinde en az 3 hafta beslenmeden +5°C'de tamamen karanlıkta tutulur.

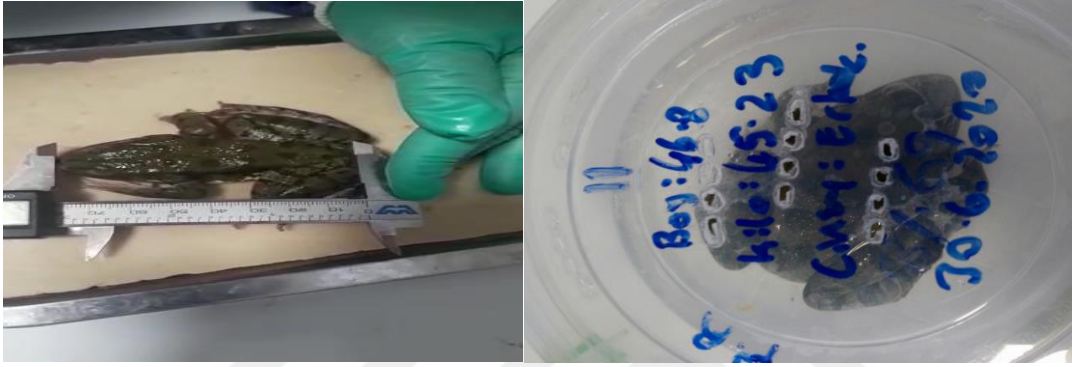
Kış evrelerinin doğal yaşam alanlarını maruz bıraktığı donma, hipoksik ve anoksik koşulları laboratuvar ortamında oluşturulmuştur. Bu çerçevede hayvanlar 3 birincil stres grubu, 3 normal grup ve 1 kontrol grubu olmak üzere 7 gruba ayrıldı (Çizelge 2.1). Her grupta 4 hayvan (n=4) bulunmaktadır. Bu stres, normalizasyon ve kontrol gruplarındaki hayvanlardan maruziyet süresinin sonunda fiziksel, biyokimyasal ve moleküler inceleme için numune alındı.

Çizelge 2.1: *P.Ridibundus* türleri için planlanan maruziyet grupları tablosu.

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

2.2. Deney Koşulları

Bu çalışmada üç ana strese maruz kalma (donma, anoksi, dehidrasyon), bu stresler sonrası normalleşme (çözülme, reoksijenasyon, rehidrasyon) ve bir kontrol grubundan oluşturulmuştur. Her grup en az 4 hayvan içeriyordu. Deney koşullarından önce tüm hayvanlarda SVL ve vücut ağırlığı ölçümleri yapıldı (Şekil 2.3). Kontrol grubu ise 5°C'de normal hava ve nem koşullarına maruz bırakılan hayvanlardan oluşturuldu.



Şekil 2.3: Hayvanların deneysel koşullara maruz bırakmadan önce SVL ölçümleri yapılması.

2.2.1. Donma ve Çözünme

Dondurmak için, kurbağalar, alt kısmı nemli kağıt havlularla kaplı hava geçirmez plastik bir kaba aktarıldı ve -2.5 °C'ye ayarlanmış bir inkübatöre yerleştirildi (Şekil 2.4). Bir saat soğutma ve ekzotermik bir noktanın oluşmasını (dış kristalleşme, kurbağa derisi üzerinde hafif bir buzlanma) bekledikten sonra, 24 saatlik donmaya maruz kalma süresi başlatıldı.



Şekil 2.4: Donma koşullarının oluşturulması için -2.5 °C' ye ayarlanmış inkübatör.

Kurbağanın vücut ısısı, karnına bağlı bir termokupl kullanılarak veri kaydediciye kayıt edildi (Cai ve Storey, 1997; Voituron vd., 2003; Sullivan ve Storey, 2012). Ancak kurbağaların hareketliliği sebebiyle karna bağlanan termokupllardan yanlış veri alınması sebebiyle termokupllar sırtlarına sabitlenmiştir (Şekil 2.5). Çözülme grubu oluşturmak için önce başka bir dondurma grubu oluşturulmuş ve 24 saat sonra inkübatörden çıkarılan grubun tekrar vital aktivitelerini yapıp yapamayacağı kaydedilmiştir (Costanzo vd., 1993a; Cai ve Storey, 1997; Sullivan ve Storey, 2012).



Şekil 2.5: Donma stresi hazırlık sürecinde hayvanlara sabitlenen termokupl.

2.2.2. Anoksi ve Reoksi

Oksijen stresinin incelenebilmesi için, kontrol ortamından alınan hayvan grupları plastik veya cam şişelere (50 mL nitrojene doymuş dH₂O içeren) yerleştirildi. İlk 30 dakika buzlu suya batırılmış şişeye N₂ (azot) gazı verildi, ardından 15 dakika ilave gaz verilerek ve şişeyi parafilm ile kapattık. Şişeler 5°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra numuneler alındı. (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Anoksi deneyi.

Başka bir grup, anoksik grupla aynı işlemlere maruz bırakıldıktan sonra, 1 cm yüksekliğinde dH₂O olan kaplara örnekleme yapılmadan yerleştirildi, 5°C'ye kaldırılarak ve normal nefes almasına izin verildi. 24 saat sonra refleksler test edildi ve örneklendi (McNally, 2002; McNally vd., 2003; Sullivan vd., 2015b) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Anoksia işlemlerine maruz kaldıktan sonra normal nefes almalarına izin verilen örnekler.

2.2.3. Dehidrasyon ve Rehidrasyon

Kontrol ortamından alınan bir grup, silika jel içeren bir desikatöre yerleştirildi ve kuruması için 5°C'de 40 saat inkübe edildi. Susuz kalmış hayvanlardan saat başına vücutlarının yaklaşık %1'i oranında hesaplanan su kaybı için numune alındı (Şekil 2.8). Bir grupta, dehidrasyondan sonra 1 cm yüksekliğindeki bir şişeye yerleştirildi ve rehidrasyon için 5°C'de 24 saat boyunca dH₂O seviyeleri olan bir şişede tutuldu (McNally, 2002; McNally vd., 2003; Sullivan ve Storey, 2012; Sullivan vd., 2015b).



Şekil 2.8: Dehidrasyon ve Rehidrasyon deneyi.

2.3. Kurbağalardan Doku Örnekleri Alınması

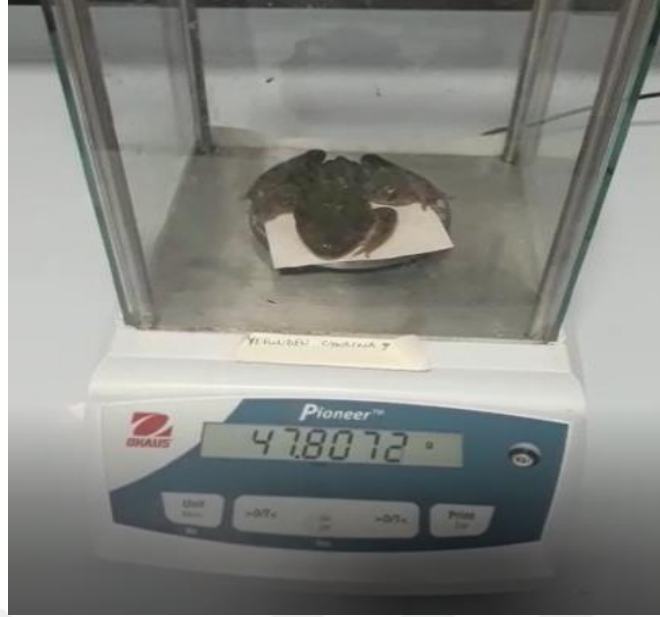
Deney süresinin sonunda tüm hayvanların bulundukları ortama MS 222 (12 µg/L; pH 7.0) eklenerek anestezi uygulandı. Heparatize tüplere anestezi uygulanan hayvanın ventriküllerinden kan alındı. Toplanan kan örneği 5°C'de 10.000 rpm'de 5 dakika süreyle saklandı. Serumlar santrifüjleme işlemi ile elde edilerek biyokimyasal parametrelerinin belirlenmesinde kullanılmak için -80 °C'de saklandı (Costanzo ve Lee, 1993; Voituren vd., 2002a). Sonuçlarda değerlendirilebilmesi için kan alındıktan sonra, hayvanlara çift kesi (double-pithing) ile ötenazi uygulandı ve hızla buz üzerinde disekte edildi. İlk olarak, hayvanlardan karaciğer ve kas dokusu alınarak, sıvı nitrojen içinde dondurularak akabinde -80 °C'ye konuldu (Cai ve Storey, 1997; McNally vd., 2002). Alınan örnekler gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için kullanılacağından, RNA'nın nükleazlardan etkilenmeden dondurulması gerekir. Elde edilen kas ve karaciğer doku numunelerinin birbirini takip eden iki bölümü disekte edildi. Bunlardan biri dokulardaki glikoz miktarını belirlemek için, diğeri ise su miktarını belirlemek için kullanıldı. Bu örnekler gen ekspresyon seviyelerini belirlemek için kullanılacağından, RNA'nın nükleazlardan etkilenmeden dondurulması gerekir. Hayvandan alınan kas ve karaciğer doku örneklerinden iki ardışık kesit disekte edildi, bunlardan biri dokulardaki glikoz miktarını belirlemek için, biri de su miktarını belirlemek için kullanıldı (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: Kan ve dokudan örnek alınarak etiketli tüplere ve sıvı nitrojen tankına aktarımı.

2.4. Vücut Ağırlığı Ve Doku Su İçeriğinin Ölçülmesi

Vücut ağırlığındaki değişimi incelemek için deney grubundaki her bir hayvan farklı renkte bir lastik bant ile işaretlenmiş ve deney koşullarına maruz bırakılmadan hemen önce ve işlem sonunda vücut ağırlıkları kaydedilmiştir (Costanzo vd., 1993a; Voituron vd.,2005).

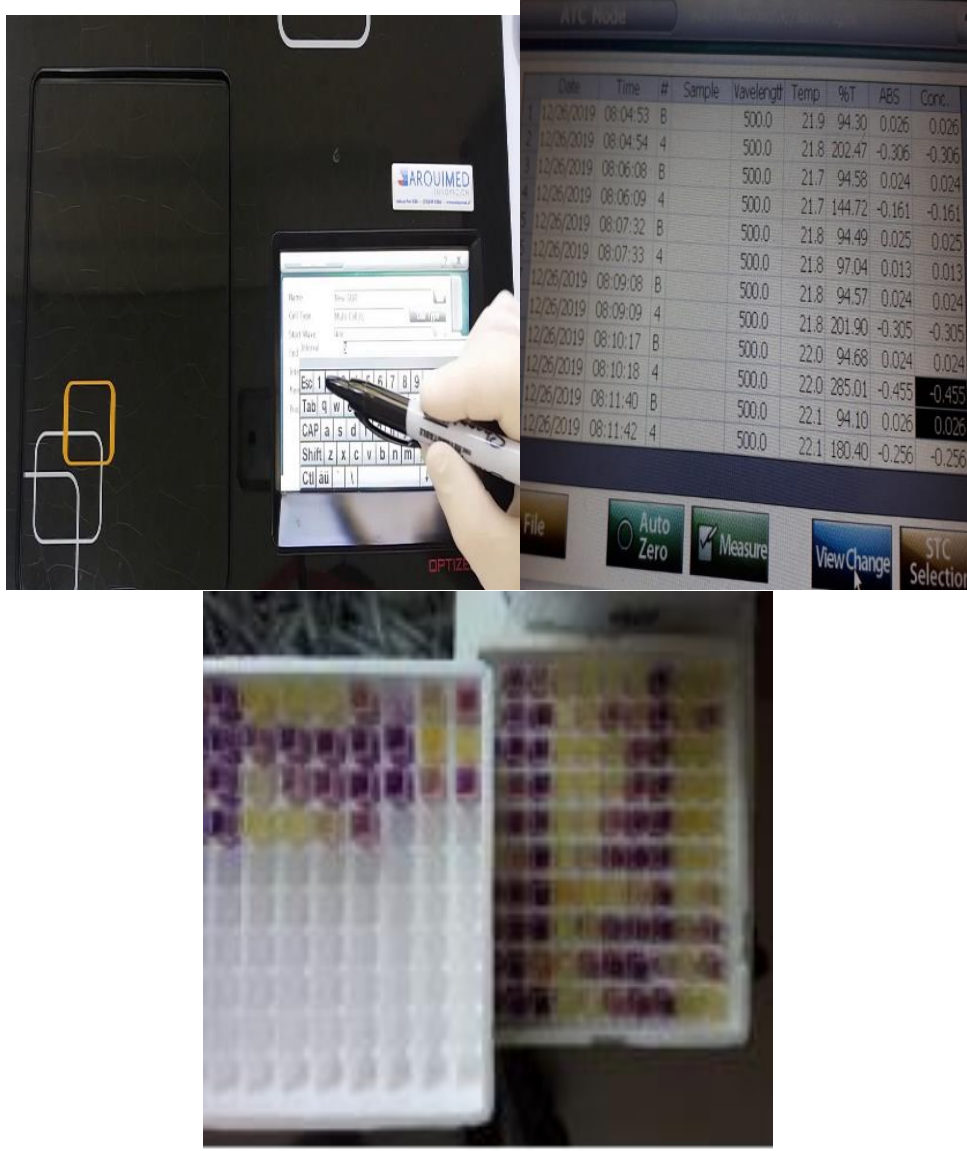


Şekil 2.10: Hassas terazi ile soğuğa maruziyet sonrası ağırlık ölçümü.

Çeşitli stresli koşullarında karaciğer ve iskelet kası dokusunun su kaybını belirlemek için, vücut ağırlığı ölçümü sonrasında, iskelet kası dokusu ve karaciğerlerinden alınan örnekler tartıldı. Doku, 105 °C'de iki günlük inkübasyondan sonra yeniden tartıldı ve su içeriği, taze ve kuru doku arasındaki net kütle farkı hesapları yapıldı (Voituron vd., 2003; Costanzo, 2005).

2.5. Glikoz Miktar Tayini

Glikoz düzeylerini belirlemek için kan ve doku örnekleri kullanılır. Kan örneğinin santrifüj edilmesinden sonra elde edilen plazma, glikoz ölçümlerinde kullanılmak üzere yeni bir tüpe yerleştirilirdi. Glikoz ölçümlerinde kullanılabilmek üzere doku örnekleri hazırlanmasında 80-100 mg doku eksize edildi ve yüzey nemi uzaklaştırılmıştır. Doku ağırlıkları hassas bir terazi kullanılarak kaydedildi (0,0001 g doğrulukla, Ohaus PA22C). Dokular, 10 hacim buz soğukluğunda, perklorik asit (ağırlık/hacim %7) içinde homojenleştirici (Heidolph Silentcrusher M) kullanılarak homojenleştirildi. Akabinde protein çöktmesi için 2.000 x g'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant ayrıldı ve KOH tamponu ile nötralize edildi. Nötr doku ekstraktları ve plazma örneklerinde, glukoz oksidaz yöntemiyle çalışan bir ölçüm kiti (Biolabo, #87109) kullanılarak spektrofotometre (Optizen Pop V Model UV) ile glukoz miktarı belirlendi (Şekil 2.11) (Storey ve Storey, 1984; Cai ve Storey, 1997; Voituron vd., 2002a; 2003; Amaral vd., 2018).



Şekil 2.11: Kan, karaciğer ve kas dokularından alınan örneklerle yapılan glikoz ölçümü.

2.6. Antifriz Proteinlerinin Gen Ekspresyonları

Gen analizi kapsamında mRNA, gen ekspresyon çalışmaları, bu proteinlerin ekspresyon seviyeleri ve stres koşullarında artmış protein gen ekspresyon seviyeleri baz alınarak antifriz proteinlerin (Fr47, Fr10 ve Li16) varlığına karar verildi. . Toplam RNA izolasyonu, cDNA ekstraksiyonu, RTqPCR çalışması ve veri değerlendirme sırasına göre iş akışı gerçekleştirilmiştir (Yoldaş, 2021).

2.6.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi Eldesi

Moleküler araştırmanın yürütüldüğü oda, bir UV ışık kaynağı ile önceden sterilize edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm plastik kaplar ve solüsyonlar %0,1 (v/v) dietilpirokarbonat (DEPC) ile yıkanmış ve etanol dışındaki solüsyonlar ve cam eşyalar otoklavlanmıştır. Deneyde kullanılacak dokular için steril ependorf tüpler etiketlenerek hazırlandı. Karaciğer dokularından ve iskelet kası dokularından 10-20 mg doku tartılara her bir örnek 200 µl PBS, 10 µl β-merkaptoetanol, 500 µl LIZIS buffer ve 60 mg zirkon boncuk ekleyerek homojenizasyon yapıldı. Mikropipeti ependorf tüpün tamamen dibine daldırmadan yeniden etiketlenmiş yeni ependorf tüplere alarak 3 dakika kadar oda sıcaklığında inkübe edildi. Üzerine 500µl Buffer P ekleyerek her bir ependorf tüp vorteksledi, oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi. Karışıma 200 µl kloroform-izoamil alkol karışımı ilave edildi, ependorf elle ters-düz çevrilerek iyice karıştırıldı ve 2 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Karışım 4°C’de 12000×g de 15 dk kadar santrifüj edilerek santrifüj sonrası faz oluşumları gözlemlendi. Yeni steril etiketlenmiş ependorf tüplere yaklaşık 600 µl üst faz aktarıldı. Üzerlerine yaklaşık 1.25 kat % 96’lık ETOH (yaklaşık 750 µl) eklendi ve tekrardan hafif hareketlerle elimizde, bulutsu bir renk elde edilene kadar, alt-üst yapıldı. Spin kolon tüpleri etiketlenerek 700 µl olacak şekilde lizat eklendi. Oda sıcaklığında 12000×g de 20 sn santrifüj edilerek tüpe geçen sıvı dökülüp kolon tekrar tüpe yerleştirildi. 700 µl wash buffer 1 solusyonu eklendi. Oda sıcaklığında 12000×g de 20 sn santrifüj edilerek tüpteki sıvı döküldü ve kolon tüpe yerleştirildi. 600 µl wash buffer 2 solusyonu eklenerek oda sıcaklığında 12000×g de 20 sn santrifüj edildi. Tüpteki sıvı dökülerek kolon tüpe yerleştirildi. Tekrar 600 µl wash buffer 2 solusyonu eklenerek oda sıcaklığında 12000×g de 20 sn santrifüj edildi ve tüpteki sıvı dökülerek kolon tüpe yerleştirildi. Spin kolon boş bir biçimde 1 dakika max hızda santrifüj edildi ve spin atılarak kolonlar 1,5 ml’lik etiketlenmiş steril ependorf tüplere yerleştirildi. 65- 70 °C de bekletilmiş 50-100 µl DEPC’li su eklenerek 12000× g’de 1dk santrifüj edildi. Spin kolon atılarak ependorf tüp -20 de muhafaza edildi (Şekil 2.12).



Şekil 2.12: RNA ekstraksiyonu resimleri.

mRNA'lar ile PCR yapabilmek ve bunları uzun süreli stabilitesini kaybetmeden saklayabilmek için cDNA'ya dönüştürülmelidir. cDNA çalışması için, total RNA izolatları DEPC distile su ile $\sim 1 \mu\text{g}'\text{ye}$ seyreltilerek cDNA sentezinden sonra her tüpte yaklaşık olarak aynı miktarda cDNA elde edilmiştir. Reaksiyon tüpleri, ticari olarak temin edilebilen cDNA sentez kiti malzemeleri kullanılarak kit yöntemine göre hazırlandı. (A.B.T.TM cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity)). Ters Transkriptaz Reaksiyonu için: 2 μl ortalama 10X reaksiyon tamponu, 1 μl ortalama dNTP karışımı, 2 μl ortalama heksamer, 1 μl ortalama ters transkriptaz, 0.5 μl ortalama RNaz İnhibitörü, 3.5 μl ortalama RNaz içermeyen su, 10 μl RNA (OligodT 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' içeren) hacimleri ayarlanarak son hacim 20 μl ayarlandı. PCR'dan önce strip tüplere spin vorteks yapıldı. UV ile sterilize edilmiş ortamda konvensiyonel PCR cihazına (Prime Thermal Cycler) örnekler yerleştirilerek

10 dk 25 °C, 120 dk 37 °C, 5 dk 85 °C’de inkübe edildi ve cDNA eldesi aşamasının son basamağında 1 dakikada hızla buz üzerinde soğutularak işlem tamamlandı. (Şekil 2.13).



Şekil 2.13: cDNA eldesi basamakları resimleri.

Nanodrop kullanarak, cDNA ekstraksiyonundan hemen sonra ve ssDNA'nın (tek sarmallı DNA) kantitatif ve kalitatif ölçümleri ile elde edilen cDNA'dan seri dilüsyonlar hazırlanılarak RT-qPCR işlemi için -20 / -80 °koşullarına alındı. (Sullivan ve Storey, 2012; Sullivan vd., 2015b) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: Nanodrop ölçümleri.

2.6.2. Ters Transkriptaz PCR Çalışması

Ters transkriptaz araştırması laboratuvarımızda RT-PCR cihazı (Bioneer Exicicycler 96) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.. Elde edilen cDNA, hedef genin primerleri kullanılarak PCR'a tabi tutuldu. Ters Transkriptaz PCR Çalışması 2X Magic SYBR Mix protokolüne göre gerçekleştirildi (Çizelge 2.3). Amplifikasyon sırasında hedef gen mevcutsa, cihaz radyasyonu algılayacaktır. ve Ct (eşik)/Cq (kantitatif) değerleri elde edilir. fr47, fr10, li16 hedef genleri ve housekeeping (normalizasyon, endojen kontrol geni) geni *α -tubulin*'in ekspresyon seviyelerini belirlemek için her numune üzerinde ayrı PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

Her çalışma için, 2 μ l seyreltilmiş cDNA numunesi (Çizelge 2.4), 0,4 μ l Forward primer, 0,4 μ l Reverse primer, 10 μ l 2X Magic SYBR Mix ve son hacim RNaz içermeyen su konularak 20 μ l'ye ayarlanarak, spin vorteks (Bioneer, Kore) cihazında homojenize edildi. Daha sonra RT-PCR kit protokolünde belirtilen sıcaklık, süre ve döngü sayısına göre PCR amplifikasyonu yapıldı. Bu adımlar, her bir gen bölgesi için uygun primerlerle tekrarlandı. (Sullivan 2011) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15: RT-PCR aşamaları.

Çizelge 2.3: RT-q PCR reaksiyon karışım oranı ve döngü koşulları

RT-qPCR Reaksiyon karışımı		RT-qPCR Koşulları	
2X Magic SYBR Mix	10 µl	1. Aktivasyon	95 °C’de 5 dk.
Revers primer*	0,4 µl	2. Denatüreasyon	95 °C’de 10 sn.
Forward primer*	0,4 µl	3. Bağlanma-Uzama	55-60 °C’de 15sn
cDNA	2 µl	Okuma	72 °C’de 20 sn
DEPC	x µl	4. 2 ve 3. Basamaklarda	35-40 döngü
Son hacim	20 µl	5. Melting Curve	72 °C 2 dk

Çizelge 2.4: fr47,li16,fr10 ve α-tubulin.

Gen	F primer	R primer	RefSeq No
fr47	TCCACCA GCTTCTCT GTACC	GAGTCAGGATCTGGAATGG A	AY100690
li16	TAGAATG TCGCAGT GGTCAG	TTGTCGCCTCCTGGTGATGG	AF175980
fr10	AGATTGG CAGAGAA CCTCAG	AGTGCCACGGATCGCAGGA A	U44831
α-tubulin	GCCTCATT GTCCACC ATGAA	GTGTCGGTACTGGATCTGGC	

2.6.3. Değerlendirme

Gen ekspresyonu çalışmalarının sonuçlarının değerlendirmesi için bağıl nicel yöntem kullanıldı. fr47, fr10 ve li16 hedef genlerinin ekspresyon seviyelerinde α-tubulin gen normalizasyonu gerçekleştirilerek amplifiye edilen örneğin Ct/Cq sonucu kullanılarak değerlendirildi (Yoldaş, 2021). Bu değerlendirme de Delta-Delta Ct Metodu (Yaklaşım metodu, $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) uygulandı (Livak ve Schmittgen, 2001). Verilerin yorumlanmasında REST yazılımı kullanıldı (Relative Expression Software Tool – Multiple Condition solver REST-MCS ©- version 2) (Yoldaş, 2021).

2.6.3.1. $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ Metodu

Bu yöntem, ilgili gen ekspresyon çalışmaları için sıkça kullanılan basit bir yöntemdir, hem hedef genin hem de referans genin %100'e yakın verimlilikle amplifiye edildiğini varsayar. Uygulamadan önce, hedef ve referans genlerin amplifikasyon verimliliği belirlenerek hipotez doğrulanmalıdır. (Livak ve Schmittgen, 2001).

İlk olarak hedefin Ct değerleri test numunesi için gen ve kontrol numunesi, referans genininkine normalize edilir. İkinci olarak, test örneğinin ΔCt değeri, kontrol ΔCt değerine normalleştirilir. Son olarak, ifade oranı hesaplanır (Yoldaş, 2021).

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

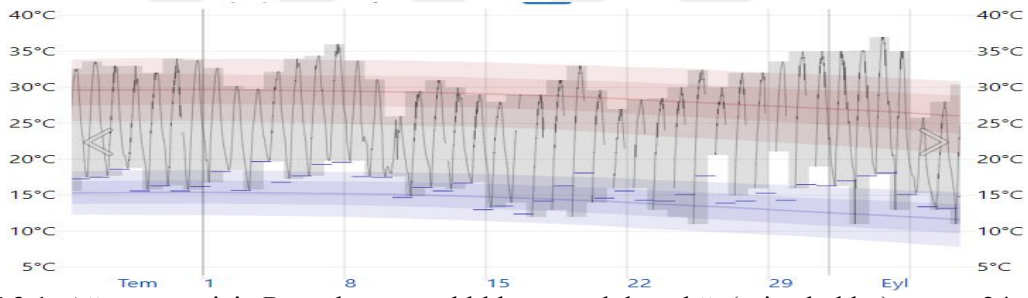
2.7. İstatiksel Analiz

Çalışmadaki veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak belirlenerek değerlendirildi. Kurbağaların stres öncesi ve sonrası ağırlıklarını karşılaştırmak için Wilcoxon Signed Ranks testi kullanıldı. Stresin ve normal koşulların kan şekeri, iskelet kası ve karaciğer üzerindeki etkileri, varyans analizi (ANOVA) ile analiz edildi ve gruplar arasındaki ortalama fark, Tukey HSD post hoc test karşılaştırması ile değerlendirildi. Sonuçlar bölümünde yüzde olarak ifade edilen dokudaki su miktarı, yüzde verisi arksin/kareköküne dönüştürüldükten sonra ANOVA-TukeyHSD tarafından yapılmıştır. İstatistiksel analizde kullanılan bağıl gen ekspresyon analizindeki normalize ekspresyon oranı ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) değerlerinin taban 2 logaritması alınarak veriler elde edilmiştir. Kontrol ve deney grubu arasındaki farklılık Student's t-testi ile anlamlılığı doğrulanmıştır (Yoldaş, 2021).

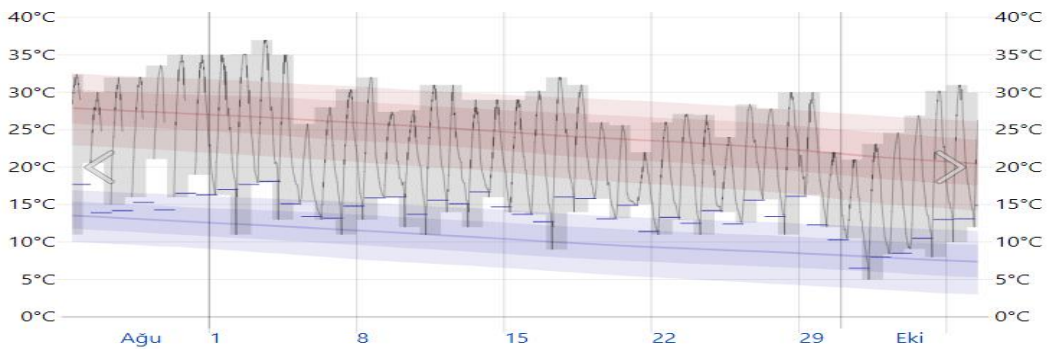
3. BULGULAR

3.1. Saha Çalışmaları

P.Ridibunda türü arazi çalışmaları Afyonkarahisar ilinde ortalama hava ve canlıların popülasyon artış dönemleri dikkate alınarak Ağustos ve Eylül ayı içerisinde gerçekleştirildi. Arazi çalışması yapılan biyotoplardaki ortalama hava ve su ortamlarının fiziksel verileri weatherspark sitesinden alınan cerilerle belirlendi (Şekil 3.1, Şekil 3.2). Bataklık kurbağası olarak da bilinen *P.ridibunda*, hem besin kaynaklarına yakınlığı hem de nem ihtiyacı açısından olduğu kadar, türlere karşı kamuflaj ve gizlenme stratejileri açısından da oldukça başarılıdır. Dönem sonrası kışa, üreme ve nüfus artışına hazırlanmaları için, kanatlı ve uçamayan böcek popülasyonlarının zengin olduğu suya yakın alanları tercih ederler.



Şekil 3.1: Ağustos ayı için Raporlanan sıcaklıkların günlük aralığı (gri çubuklar) ve son 24 saatlik yüksekler (kırmızı işaretler) ve düşükler (mavi işaretler), günlük ortalama yüksekler (açık kırmızı çizgi) ve düşük (açık mavi çizgi) sıcaklıkların 25'likten 75'lik yüzdelik aralığına ve 10'luktan 90'lık yüzdelik aralığı üzerine yerleştirilmiş hali (4.İnt. Kyn.)



Şekil 3.2: Eylül ayı için raporlanan sıcaklıkların günlük aralığı (gri çubuklar) ve son 24 saatlik yüksekler (kırmızı işaretler) ve düşükler (mavi işaretler), günlük ortalama yüksekler (açık kırmızı çizgi) ve düşük (açık mavi çizgi) sıcaklıkların 25'likten 75'lik yüzdelik aralığına ve 10'luktan 90'lık yüzdelik aralığı üzerine yerleştirilmiş hali (5.İnt. Kyn.)

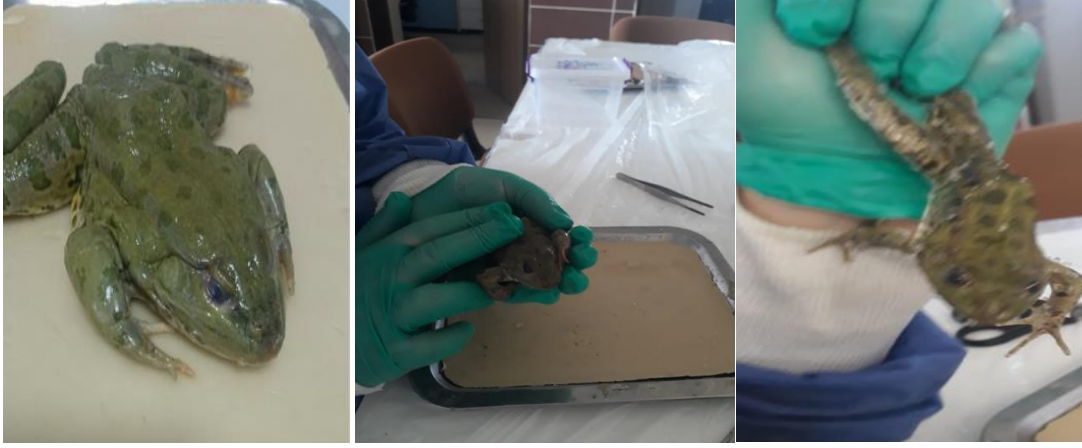
3.2. Donma ve Hayatta Kalma

P. Ridibunda'nın donma koşulları altında hayatta kalma stratejisi, laboratuvar ortamında gerçekleştirilen deneylerle araştırıldı. Bu durumda her tür (N=28) 7 gözlem koşuluna (n=4) maruz bırakılmıştır. Gözlem koşulları altındaki tüm hayvanlar, gözlem koşullarından hemen sonra hayatta kaldı. Özellikle yumurta taşıyan ergin dişiler diğer dişilere göre çok daha fazla yaşam mücadelesi verirler. Tüm maruziyetlerden sonra *P. Ridibunda*'da hayati fonksiyonların hızlı iyileşmesi, bu türün dona dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Afyon ilinin farklı bölgelerinden toplanan *P. Ridibunda* donma grupları $-2,5^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat kültüre alınmıştır. Donmaya maruz kaldıktan hemen sonra, kurbağalar koyu cilt, sert uzuvlar, hareketsizlik ve opak gözlerle kendini gösteren donma belirtileri gösterdi (Şekil 3.3). Dondurulduktan sonra çözündürme işlemine tabi tutulan hayvanlarda, göğüs derisinden ilk kalp artışının görülmesi ortalama 20 dakika sürmüştür. İskelet kası refleks süresi 30-40 dakikadır. Erime işlemi sırasında, kalp atışının ilk belirtileriyle birlikte zamanla gözlerdeki bulanıklık ortadan kalkmış, önce parmaklarda titreme gibi refleks hareketler, ardından hemen ekstremitelerde refleksler izlenmiştir. Çözülen hayvanların hareketlilik kazanmaları için gereken süre yaklaşık 42 dakika olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.3- Şekil 3.4).

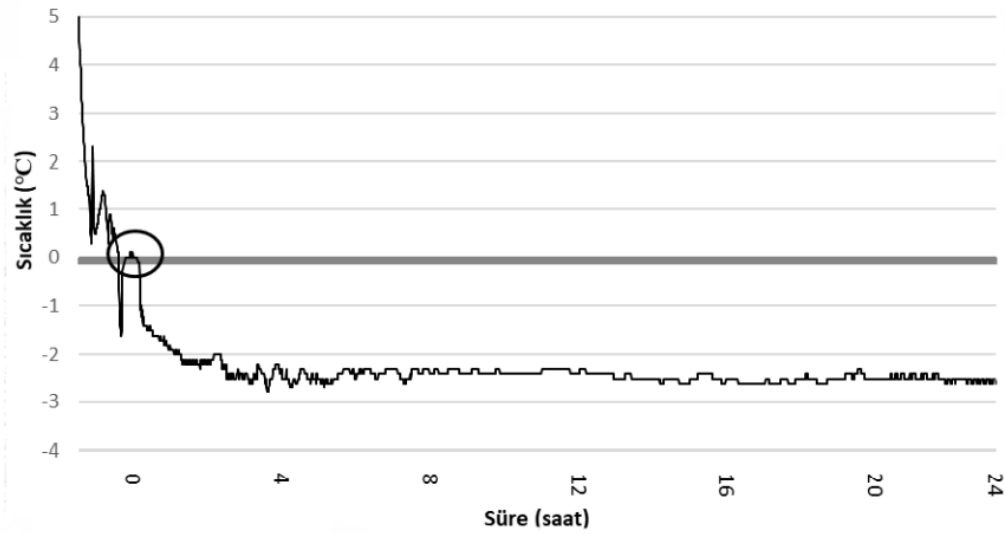


Şekil 3.3: Donma sonrası kurbağaların genel görünüşü.



Şekil 3.4: Donma Çözünme sürecinde *P.Ridibunda*.

Soğuğa maruz kalma sırasında hayvanların abdomen ve sırt bölgesinde hareketsiz hale getirilen sıcaklık kayıtları incelenirken, hayvanlarda ani tetiklenen metabolik hızlanma ve kriyoprotektan üretiminin zirve yaptığı ekzotermik sıcak noktaların (dış kristaller) oluşumunun bundan ortalama 90 dakika sonra meydana geldiği kaydedildi. Bu noktada test ortamında vücut sıcaklığı olan 5°C'den 0.2°C'ye ani bir düşüş görülebilir ancak bundan sonra vücut sıcaklığı dış sıcaklığa direnmeye başlar. Belli bir noktadan sonra vücut ısısı -0.7-1.5 arasına düşer ve sonuç her zaman ortam sıcaklığının üzerinde olur. İlk 8 saatte $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'lik vücut ısısı dalgalanmaları gözlemlenmiştir, bu da metabolik olayların ve antifriz mekanizmalarının devam ettiğini gösterir. 8 saat sonrasında vücut sıcaklığı, dış ortam sıcaklığına ($-2,5^{\circ}\text{C}$) daha yakın ve stabildir (Şekil 3.4).

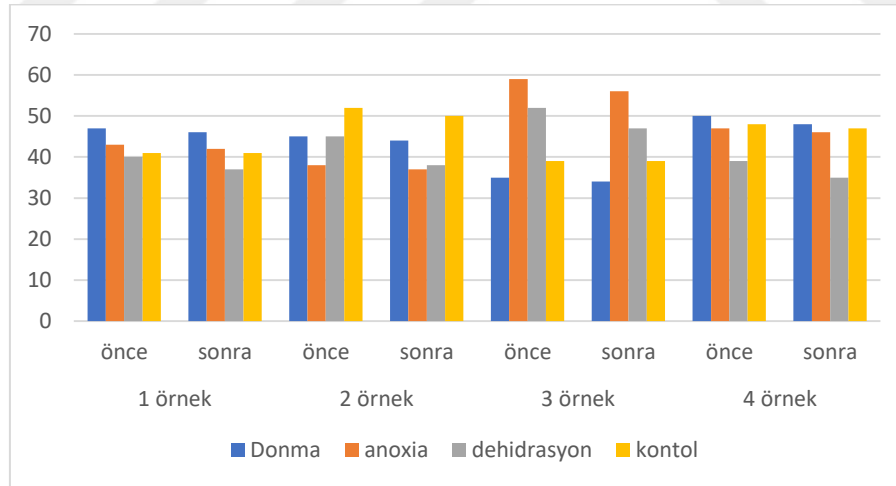


Şekil 3.5: Donma sırasında datalogger verilerinin kayıtlarına ait bir örnek. İşaretli bölge ekzotermik noktasının gerçekleştiğini göstermekte ve yaklaşık 90. dakikaya denk gelir.

Dondurulduktan sonra, örnek alınan kurbağaların iç organları, karın boşluğunda ve mesanesinde buz birikimi gözlemlendi. Bu, donma sırasında dokudaki suyun hücrelerden ayrıldığını ve hücre içi donmayı önlemek için hücreler arası boşluğa girdiğini gösterir.

3.3. Dokudaki Nem İçeriği ve Ağırlık Değişimi

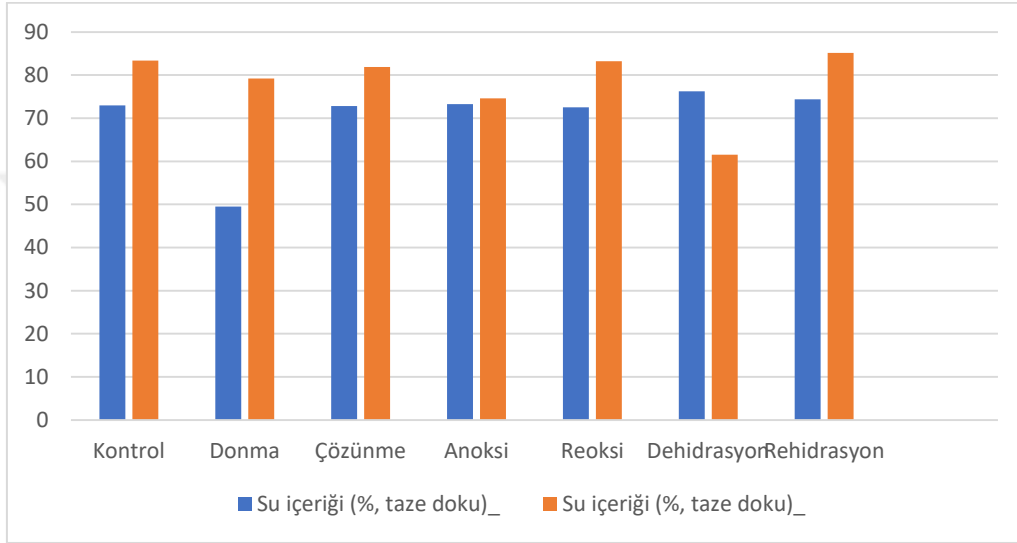
Dondurma, anoxi, dehidrasyon stres ve kontrol gruplarının öncesi ve sonrası kurbağaların ağırlıkları ölçülerek kıyaslandı. (Şekil 3.5). Donma mağruziyet grubundaki hayvanların mağruziyet öncesi ortalama ağırlıkları 44,25 gramdan 43,11 grama düşmüş olup % 2,58 azalmıştır, anoxia mağruziyet grubundaki hayvanların mağruziyet öncesi ortalama ağırlıkları 46,75 gramdan 45,26 grama düşmüş olup % 3,1 azalmıştır, dehidrasyon mağruziyet grubundaki hayvanların mağruziyet öncesi ortalama ağırlıkları 44,20 gramdan 39,25 grama düşmüş olup % 11,19 azalmıştır. En çok düşüş dehidrasyon grubunda görülmüştür. Arazi çalışmasından ilk getirildiklerinde tartılan tüm kurbağaların metabolizma hazırlama esnasındaki kilo kayıplarında kontrol gruplarıyla kıyaslandığında yaklaşık olarak 1 gramdır.



Şekil 3.6: *P. ridibunda*'nın stres koşulları öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarındaki değişim

Donma ve donma stresi altında karaciğer ve kas dokularının dehidrasyonunun nasıl gerçekleştiğini incelemek için deney koşullarında hayvanlardan alınan dokulardaki su miktarı ölçülmüştür. Deney gruplarının sonuçları ile kontrol gruplarının sonuçları karşılaştırıldığında, farklı dokulardaki su miktarı, farklı stres koşulları altında önemli farklılıklar göstermiştir. Ayrıca normalize edilmiş grupların kontrol gruplarından önemli ölçüde farklı olmaması, dokuların normal koşullara döndükten sonra eski şekline

döndüğünü düşündürmektedir (Şekil 3.6-3.7) (Çizelge 3.1).Karaciğer dokusundaki su içeriği, kontrol gruplarına göre kıyaslandığında, donma maruziyetinde %23,43 azaldı, anaoksi maruziyetinde %0,28 arttı, dehidrasyon maruziyetinde %3,25 artmıştır. Donma mağruziyeti dışında diğer gruplardaki, organların yüzde su oranları kontrol grubuna yakın olduğu gözlemlenmedi. İskelet kasındaki su içeriği, kontrol gruplarına göre kıyaslandığında, donma maruziyetinde %4,16 azaldı, anaoksi maruziyetinde %8,74 azaldı, dehidrasyon maruziyetinde % 21,85 azalmıştır.



Şekil 3.7: *P.Ridibunda*'nın iskelet kası ve karaciğer dokusu su miktarı.

Çizelge 3.1: Tablodaki veriler her grup (n=4) için ortalama $\pm$ s.e.m olarak verilmiştir. Vücut ağırlığı verilerinin olduğu satırlar (önce ve sonra) Wilcoxon Signed-Ranks Test ile karşılaştırılmıştır (P<0.05).

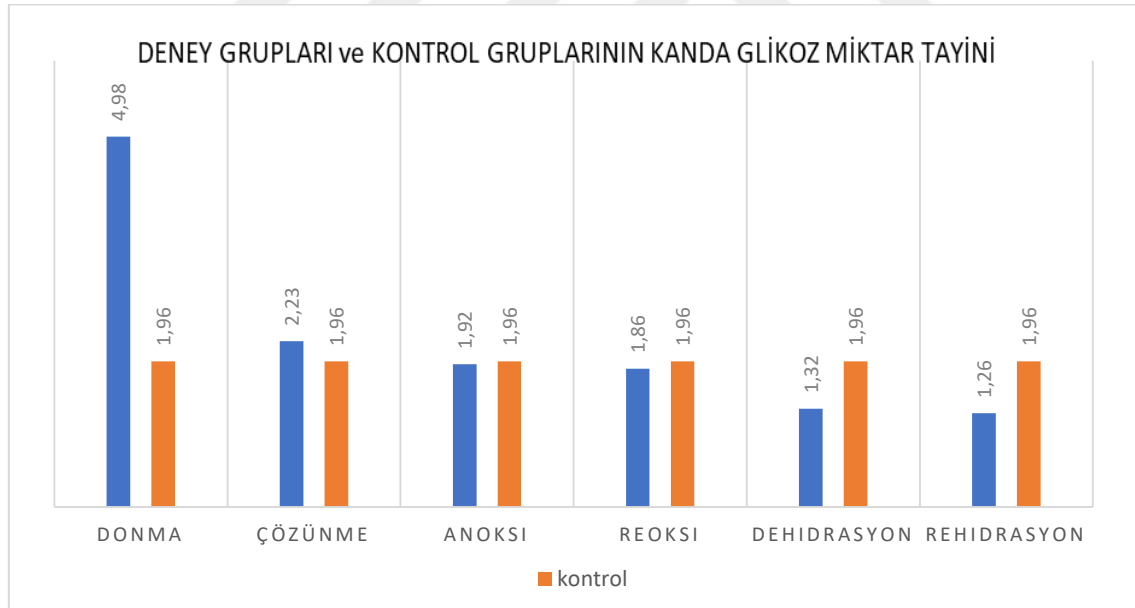
Gruplar	Vücut ağırlığı (g) örnek ortalaması			Su içeriği (% , taze doku)	
	Önce	Sonra	P	Karaciğer	İskelet kası
Kontrol	45	44,25	0,068	72,96	83,37
Donma	44,25	43	0,068	49,53	79,21
Çözünme	39,43	39,22	0,068	72,84	81,87
Anoksi	46,75	45,25	0,068	73,24	74,63
Reoksi	50,4	49,98	0,465	72,56	83,24
Dehidrasyon	43,96	39,26	0,068	76,21	61,52
Rehidrasyon	40,26	40,21	0,066	74,4	85,13

3.4. Glikoz Tayini

Anadolu dağ kurbağalarında donmaya maruz kalma, anoksi ve dehidratasyon stresinden sonra normale dönmenin kan glukoz düzeyleri, karaciğer ve iskelet kası üzerindeki etkilerini araştırmak için ölçümler yapılmıştır. Glukoz seviyeleri taze doku üzerinde test edildi ve hesaplamada kuru kütle düzeltilmesi kullanılmamıştır.

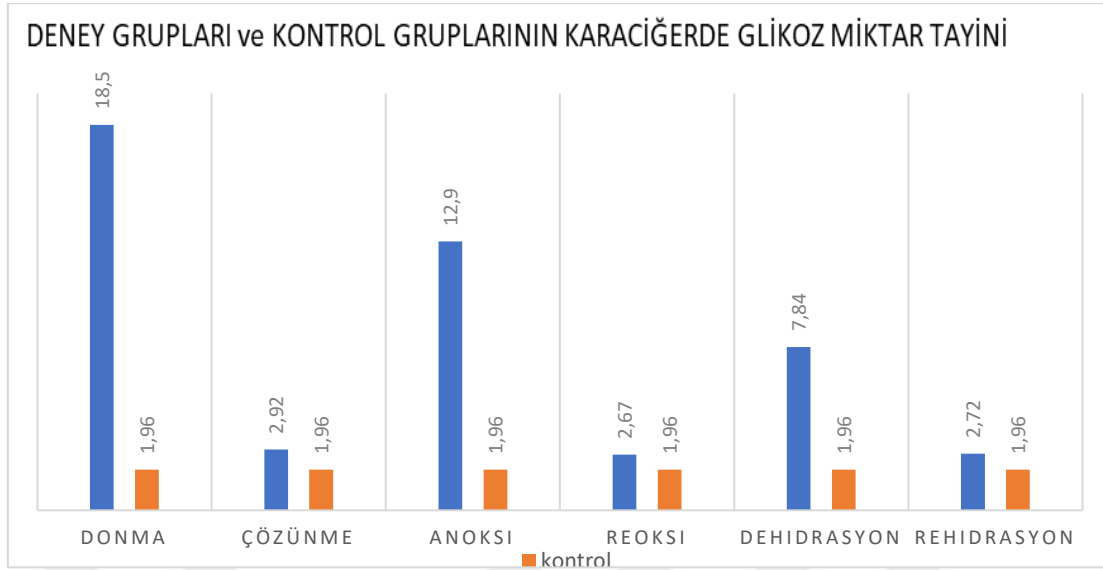
3.4.1. *P. Ridibunda* Glikoz Konsantrasyonları

Donma sırasında *P. Ridibunda* kan glukoz seviyesinde 2,54 kat ($1,96$ 'den $4,98 \mu\text{mol mL}^{-1}$ 'ye), olarak artış kaydedilmiştir. Kan glukoz seviyesi, anoksi ($1,92 \mu\text{mol mL}^{-1}$) ve dehidratasyon ($1,32 \mu\text{mol mL}^{-1}$) streslerine cevap olarak artış gösterdi, fakat bu artışlar istatistik olarak anlamlı değildi. ($P < 0,05$). Donma, anoksi ve dehidrate gruplarında artan glukoz düzeylerinin, normalize gruplarla karşılaştırılması yapıp tekrar kontrol grubunun glukoz düzeylerine yaklaştığı belirlendi. Donma normalleşmesi olan çözünme grubunda $2,23 \mu\text{mol mL}^{-1}$, anoksi normalleşmesi reoksi grubunda $1,86 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ve dehidratasyon normalleşmesi rehidratasyon koşullarında $1,26 \mu\text{mol mL}^{-1}$ glukoz konsantrasyonları saptandı (Şekil 3.8).

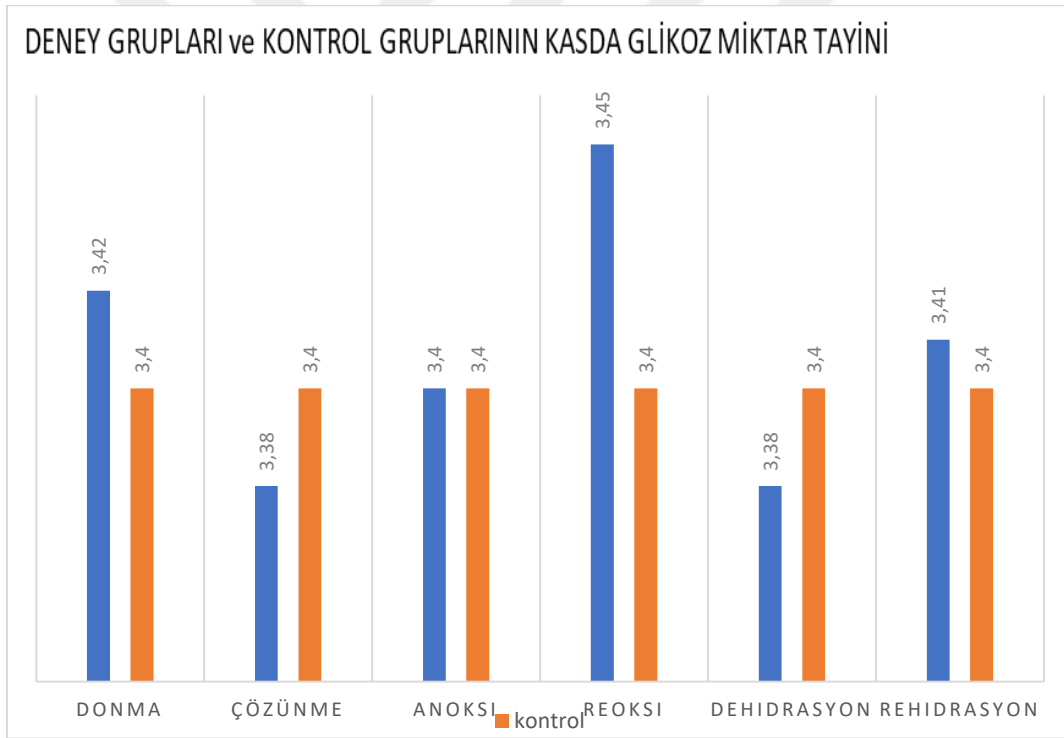


Şekil 3. 8: Stres koşulları altında kan glukoz seviyesi.

Karaciğer dokusunda glukoz düzeylerinde donma, anoksi ve dehidratasyon gruplarında sırasıyla 6,5 kat (ortalama $18,4 \mu\text{mol g}^{-1}$), 4,63 kat (ortalama $12,9 \mu\text{mol g}^{-1}$) ve 2,8 kat (ortalama $7,84 \mu\text{mol g}^{-1}$) olarak artış tespit edildi. Çözünme, reoksia ve rehidratasyon gruplarından elde edilen veriler kontrol grubundan önemli ölçüde farklı değildi (Şekil 3.9) ($P > 0,05$).



Şekil 3.9: Stres koşulları altında karaciğer glikoz seviyesi.



Şekil 3.10: Stres koşulları altında kas glikoz seviyesi.

Kas dokusunda glikoz düzeylerinde tüm ölçüm sonuçları anlamlı değildi ve sonuçlar kontrol grubuna (ortalama $3,4\mu\text{mol g}^{-1}$) çok yakın olarak gözlemlendi. (Şekil 3.10) ($P>0,05$)

3.5. Gen Ekspresyon Sonuçları

Amfibilere özgü antifriz protein genlerinin (fr47, li16, fr10) *P.Ridibunda* türünde karaciğer ve iskelet kası dokularındaki ekspresyon seviyeleri RT-qPCR tekniği ile belirlenerek, gerçekleştirilen total RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve PCR işlemlerinden elde edilen bulgular detaylı olarak anlatılmıştır.

3.5.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentez Sonucu

Toplam RNA'yı izole etmek için izoamil-alkol bazlı RNA izolasyon tamponu ve spin kolon yöntemi kullanıldı. Elde edilen toplam RNA'ların miktarı ve kalitesi Thermo MultiscanGo nanodrop cihazı kullanılarak (260/280) kontrol edildi. Karaciğer dokularında ~545 ng/μl ile 4132 ng/μl arasında değişen miktarlarda total RNA, kas dokusunda ~165 ng/μl ile 1286 ng/μl arasında elde edildi. Elde edilen total RNA lar eşit miktarda cDNA eldesi için en düşük örneğe göre ~165 ng/μl olacak şekilde seyreltilti. cDNA eldesi işlemi sonrası 742-891 ng/μl cDNA sentezi yapıldı. RT-qPCR da kullanılmak üzere uygun seyreltmeler gerçekleştirildi.

3.5.2. RT-qPCR Sonuçları

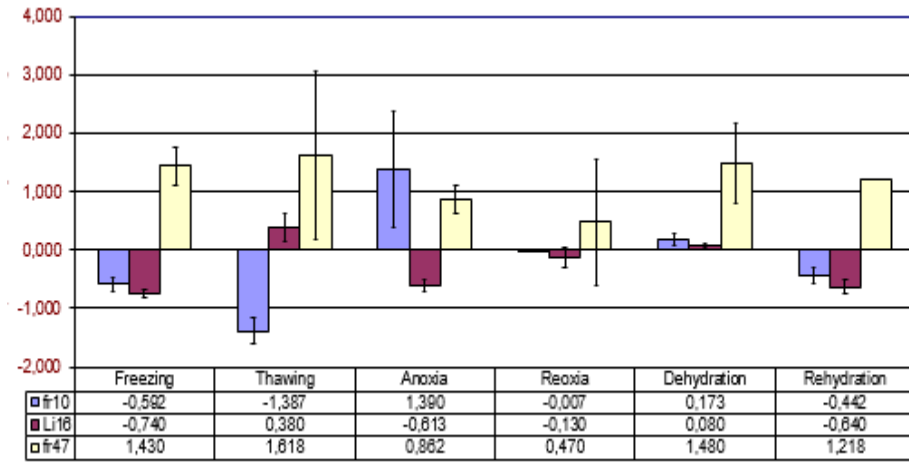
α -tubulin geni referans gen (housekeeping) olarak, amfibilere has antifriz proteinlerin (fr10, li16 ve fr47) mRNA ekspresyon seviyeleri tespitinde kullanılmıştır. Hedef genlerin kontrol genlerine göre yukarı / aşağı regülasyonunun hesaplanması için RT-qPCR işlemleri sonrası elde edilen Ct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu uygulanmıştır. (Relative Expression Software Tool – Multiple Condition solver REST-MCS[®] - version 2). $\Delta\Delta C_t$ değerleri Log₂ dönüşümü yapıldıktan sonra ANOVA ve Tukey-HSD posthoc testi yapılarak gen ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılıklar anlaşıldı.

3.5.2.1. *P.Ridibunda* Antifriz Proteinleri

Çalışmada gen regülasyonu incelendiğinde donma, anoksi, dehidrasyon streslerinde ve stres normalleşme sonrası çözünme, deoksi ve rehidrasyon gruplarında genel bir azalma

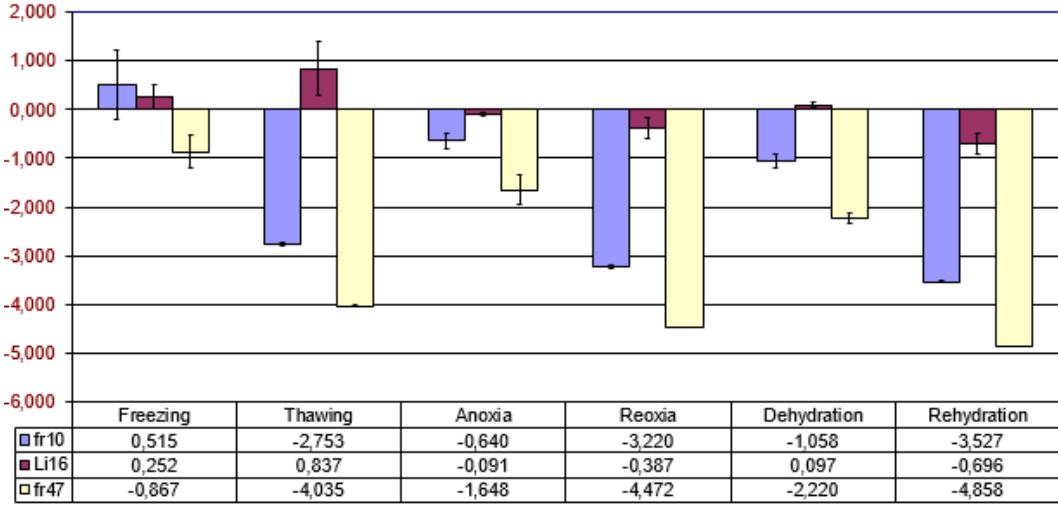
olduğu ancak bazı durumlarda hayvanları bu streslerin zararlı etkilerinden korumak için gen ekspresyon seviyelerinin yukarı regüle edildiği belirlendi.

Kandan alınan örneklerde tüm stres ve normalleşme gruplarında fr47 geni artmıştır. Soğuğa mağruziyette 1,430 kat, soğuğa mağruziyet normalleşmesi çözünme grubunda 1,618 kat, anoksi stresinde 0,862, anoksia normalleşmesi reoksia grubunda 0,47 kat, dehidrasyon mağruziyetinde 1,480, dehidrasyon normalleşmesi olan rehidrasyon grubunda 1,218 kat artmıştır. Donma sonrası normalleşme çözünme grubunda Li16 geni 0,380 dehidrasyon stresinde 0,173 kat artmış olup diğer durumlarda aşağı regülasyon göstermiştir. Fr10 geni anoksia stresinde 1,39, dehidrasyon stresinde 0,173 kat artmış olup diğer durumlarda aşağı regüle olmuştur (Şekil 3.11).



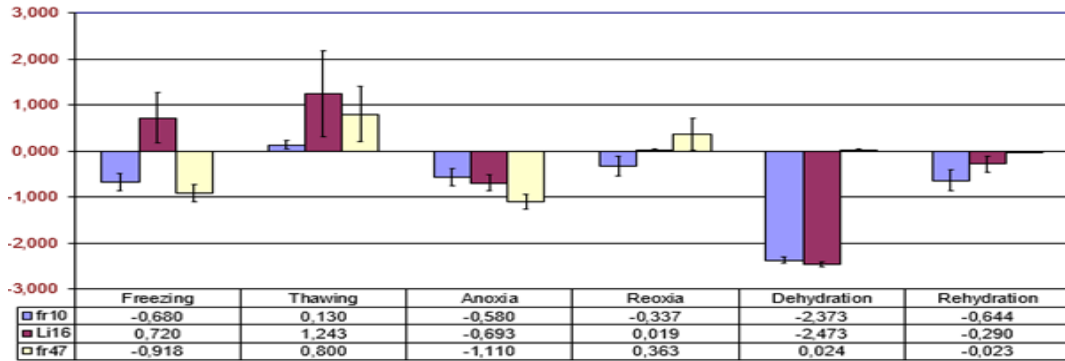
Şekil 3.11: Kan rt-PCR.

P.Ridibunda kas dokusu örnekleriyle yapılan çalışmada gen regülasyonları incelendiğinde Fr 47 geni, tüm mağruziyet ve normalleşme gruplarında aşağı regüle olmuştur. Li 16 geni, soğuğa mağruziyet grubunda 0,252 kat, soğuk mağruziyeti normalleşmesi çözünme grubunda 0,837 kat, dehidrasyon mağruziyetinde ise 0,097 kat artmış olup diğer mağruziyet ve normalleşme gruplarında aşağı yönlü regüle olmuştur. Fr10 geni soğuğa mağruziyet grubunda 0,515 kat artmış olup diğer gruplarda aşağı yönlü regüle olmuştur (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: Kas rt-PCR.

P.Ridibunda karaciğer dokusu örnekleriyle yapılan çalışmada gen regülasyonları incelendiğinde, Fr47 geni soğuğa mağruziyet normalleşmesi çözünme grubunda 0,8, anoksi normalleşmesi reoksia grubunda 0,36 kat artmış olup diğer gruplarda aşağı yönlü regüle olmuştur. Li16 geni donma stresinde 0,72, soğuğa mağruziyet normalleşmesi çözünme grubunda 1,24 kat artmış olup diğer gruplarda aşağı yönlü regüle olmuştur. Fr10 geni soğuğa mağruziyet normalleşmesi çözünme grubunda 0,130 kat artmış olup diğer gruplarda aşağı yönlü regüle olmuştur. (Şekil 3.13).



Şekil 3.13: Karaciğer rt-PCR.

4. TARTIŞMA

Yeryüzündeki her tür, biyotik ve abiyotik stresler karşısında hayatta kalma ve üreme kapasitelerini optimize edebilen bir dizi biyokimyasal ve fizyolojik stratejiye sahiptir. Hayvanlar alemindeki en şaşırtıcı hayatta kalma stratejilerinden biri, sayısız omurgasız ve birkaç omurgalı türünün, hücre içi donmaya direnirken vücutlarının hücre dışı sıvı boşluklarında buz oluşumuna dayanma kapasitesi olan donma toleransıdır. Bu, mevsimsel olarak soğuk iklimlerde yaşayan birçok karasal ektoterm kışın hayatta kalması için çok önemli bir uyarlamadır (Storey ve Storey 1996; 2017 Storey vd., 2021).

Ozmotik yaralanmayı ve mekanik yaralanmayı kısıtlamak için araştırmacılar, kriyoprezervasyon süreçleri için kriyoprotektanlar (CPA) geliştirmeye kararlıdır. CPA'lar, donma ve/veya çözülmeden kaynaklanan hasarı önleyebilen veya azaltabilen bir ajan sınıfıdır. (Liu vd., 2021) En eski CPA'lar, sıfırın altındaki sıcaklıkların aşırı soğuk koşullarında hayatta kalmalarını sağlayan kutup balıklarında bulunan özel proteinlerden, yani antifriz proteinlerinden (AFP'ler) meydana geldi (Devries ve Wohlschlag, 1969). Daha sonra böceklerde (Duman ve ark, 2004; Pentelute ve ark, 2008), bakterilerde (Yamashita vd., 2002), bitkilerde (Sharma vd., 2012) ve benzerlerinde farklı AFP'ler bulunmuştur.

Omurgalılar arasında, donma toleransı en çok yüksek enlemlerde veya rakımlarda yaşayan amfibiler arasında yaygındır. Birkaç kurbağa türü ve iki Sibiry semender türünün günler, haftalar veya aylarca donmaya karşı dayanıklı olduğu bilinmektedir (Storey ve Storey, 1996). Bu çalışmada çok fazla çalışılmış olan fakat Türkiye’de henüz 2021’ de (Erişmiş ve Yoldaş, 2021; Yoldaş, 2021) çalışılmaya başlanılmış antifriz gen bölgelerinin Anadolu’nun fırsatçı amfibisi *P. ridibunda*’da, varlığının tespitleri amaçlanmıştır. Kış döneminin uzun sürdüğü ve dondurucu hava koşullarını barındıran ülkemizde *P. ridibunda*’nın nasıl hayatta kalabildiği incelenmiştir. Kış aylarında tüm vücut donmasını tolere ettiği bilinen *Rana sylvatica*, incelenen birincil omurgalı modelidir (Storey ve Storey, 1986; 1992). Bu yarı arktik kurbağalar, kısmen kış uykusundan önce biriken yüksek kriyoprotektan, üre ve büyük bir hepatik glikojenden harekete geçirilen glikoz nedeniyle -16°C’ye kadar düşük sıcaklıklara kadar donmadan

hayatta kaldı (Costanzo, 2014). Afyonkarahisar iklimi göz önüne alındığında kış dönemi sıcaklıklar -12°C ' ye kadar düşmektedir. *P. ridibunda*'nın bu bölgede sıkça görüldüğünü de göz önünde bulundurursak donmayı tolere ederek bunun için birçok adaptasyon geliştirdiği göz önüne alınmalıdır. Bazı ormanlık kurbağaların sergilediği güçlü donma toleransı, donma sırasında karaciğerdeki glikojenden harekete geçirilen yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanlar, glikoz ve/veya gliserol biriktirme yetenekleriyle ilişkilidir. Bu bileşikler, vücut sıvılarının denge donma/erime noktasını birlikte düşürerek ve dolayısıyla buz oluşumunu azaltarak aynı zamanda zarların ve makromoleküllerin bütünlüğünü koruyarak donma hasarını sınırlar (Storey ve Storey, 1988; Costanzo ve Lee, 2013).

Çalışmamız gösterdi ki; *P. Ridibunda* türlerindeki kan glikoz seviyesinde donma maruziyeti grubunda, karaciğer dokusunda bulunan glikoz düzeylerinde tüm stres (donma, anoksi ve dehidrasyon) gruplarında sırasıyla artış tespit edildi. *P. ridibunda*'nın streslerde vücut kütlelerinin düştüğü kaydedilerek, metabolizma hazırlık sürecinde de ortalama olarak 1 gram düşüş tüm kontroller için tespit edilmiştir. Karaciğer doku su içeriği, donma maruziyetinde azalmış olup anoksi ve dehidrasyonda önemsenecek seviyelerde artmıştır. Kas dokusu su içeriği, tüm stres gruplarında azalmış olup, dehidrasyon grubundaki azalış önemsenecek seviyededir. Kurbağaların donma tolerans ifadesi genleri *fr47*, *li16* ve *fr10* genleri Anadolu'da bol yayılım gösteren *P.Ridibunda*'da varlıkları tespit edildi ve özellikle kandaki tüm stres gruplarında artış gösteren *fr47* geni ve kan, kas, karaciğer doku örneklerinde donma maruziyetinde yukarı yönlü regüle olan *fr16* geni dikkat çekiciydi.

Laboratuvarda yaptığımız tüm donma, anoksi ve dehidrasyon stres koşullarında hayatta kalan ve tüm stres koşullarından sonra daha hareketli olan *P. ridibunda*, Anadolu dağ kurbağalarının kriyobiolojisinde glikozun önemli bir adaptasyon olduğunu gösterdi. Normalleşme grupları, çözünme, rehidrasyon ve reoksi gruplarındaki glikoz seviyeleri kontrol gruplarıyla benzer seviyelere inmiş olup, glikozun çevresel streslerde kurbağalar için önemini bir kez daha vurguladı. Amfibilere özgü tanımlanmış olan *Fr47*, *Fr10* ve *Li16* gen ekspresyon seviyeleri, stres koşullarında farklı ekspresyon seviyeleri göstermiştir. Karaciğer ve kas dokusunda *li16* geninin donma maruziyetinde artışı, donma streslerinde amfibiler için özellikle koruyucu olduğunu kanıtlamıştır. *Fr47*

geninin ise karaciğerde, tüm stres ve normalleşme koşullarındaki yukarı yönlü regülasyonu *P. ridibunda*'nın karaciğerinde bu genin varlığını göstermiştir.

4.1. Donma ve Çözölmeye Karşı Fizyolojik Tepkiler

Kriyoprezervasyon tıp biliminde, gıda muhafazasında ve diğör birçok alanda kilit bir teknoloji olmuştur. Dondurma işleminde, buz kristallerinin oluşumu donmuş numunelerde önemli hasara neden olabilir. Hasarı azaltmak için, buz hacmini azaltmak, buz boyutunu küçöltmek, uygun buz şekillendirme ve hücre koruması için kriyoprezervasyon süreçlerine birçok kriyoprotektan geliştirilmiş ve eklenmiştir. (Liu vd., 2021). Antifriz mekanizmaları, buz yüzeyinde moleköler adsorpsiyon, buza hidrojen bağlanması, buz yüzeyini bükme, donma noktasını düşörmek, buzun yeniden kristalleşmesini engellemek, hücre zarlarını korumak, hücrelerin dehidrasyonunu azaltmak ve azaltmak için buz kristalleri arasındaki hidrojen bağlarını kırmayı içerir. CPA'lar sinerjik olarak çalışan kriyoprezervasyon özellikleri ile birlikte kullanılabilir (Liu vd., 2021). Hücre dışı ve organ dışı boşluklarda buz oluşumu, dokulara oksijen iletimini keser. Bu nedenle, hücreler fermente olabilen yakıtlara (örneğin, glikoz, glikogen), son ürün olarak laktat birikimi, ATP seviyelerinde ve enerji yükünde yavaş ama istikrarlı bir düşöşe dayanıklılık ve gerekli bir enerji yükü dahil olmak üzere “hayatta kalma modu” stratejilerini kullanmalıdır .

Antifriz proteinleri (AFP'ler), organizmaların donma ve alt donma ortamlarında hayatta kalmasını sağlayan benzersiz bir protein sınıfıdır (Chen, 2022). AFP'ler, güçlü buz yeniden kristalleşme engelleme (IRI) aktivitesine sahiptir, çünkü AFP'ler buz yüzeyinde adsorbe edilebilir ve buz kristalleri arasındaki su akışını engeller. Bu nedenle buzun büyümesini sınırlandırır (Davies, 2014). IRI aktivitesi, organizmaların ölümcöl olmaktan ziyade daha küçük buzdan kaynaklanan hasarı tolere etmesine izin verir. Ek olarak, AFP'ler, çözeltinin donma noktasını önemli ölçüde azaltabilen termal histerezis (TH) aktivitesine sahiptir (Knight, 2000). TH aktivitesi, organizmaların sıfırın altındaki sıcaklıklarda donmasını ve buzdan zarar görmesini önleyebilir (Liu vd., 2021).

Buz yüzeylerinde AFP adsorpsiyonu için önerilen üç mekanizma vardır. İlk hipotez, AFP üzerindeki hidroksillerin ilk olarak buz yüzeyine bağlandığı ve birkaç hidrojen bağı oluşturduğu hidrojen bağının oluşumudur (Geng vd., 2017). Daha sonra,

hidroksiller buz üzerindeki oksijen atomlarının yerlerini işgal ederek daha fazla hidrojen bağı oluşumuna yol açar. İkinci hipotez hidrofobik etki ile ilgilidir. AFP'nin hidrofobik alanları etrafındaki sınırlı su molekülleri, hidrofobik alanlardan uzaklaşabilir ve entropi artışıyla birlikte AFP bağlanmasını buza yönlendirebilir. Üçüncü mekanizma, AFP'nin buz bağlama bölgesi (IBS) çevresinde buz benzeri klatrat sularının olacağı, sabitlenmiş klatrat hipotezi olarak adlandırılır (Hakim vd., 2013). Buz benzeri klatratlı sular, buz yüzeyindeki silikit su tabakaları gibi benzer fiziksel özelliklere sahiptir. Buz benzeri klatrat tabakası ve yarı sıvı tabaka, donma sırasında birleşerek AFP'yi buza bağlayacaktır (Davies, 2014).

Laboratuvar koşullarımızda Contanzo (2014)' ün de gözlemlediği gibi vücut sıcaklığı -1°C'ye yaklaştığında başladı. 24 saatlik -2°C maruziyeti sonrasında ilk 20 dakikada çözünmeye başlayan canlılar, 90 dakika sonrasında normal nörodavranışlar sergilediler. Donma koşulları için metabolizma hazırlık evresinde yarı uyku durumunda olan hayvanlar donma çözünme stresi sonrasındaki normalleşme sürecinde metabolik hazırlık dönemine ve hatta normal süreç davranışlarına göre daha hareketliydiler. Tüm bu durumlar göz önüne alındığında Anadolu'da bulunan *P. ridibunda* türünün donma stresine karşı yüksek bir adaptasyon gösterdiği bulunmuştur.

4.2. Dokulardaki Su Miktarı ve Vücut Ağırlığı

Antifriz glikoproteinlerin buz yüzeylerine bağlandığı ve büyüme engelleyici gösterilmiştir (Brown ve Feeney, 1985). Son on yılda, bunun gerçekleştiği mekanizmanın aydınlatılmasına büyük önem verildi, ancak bu çabalara rağmen mekanizma hala tam olarak anlaşılmış değildir. Makroskopik düzeyde, antifrizin büyüyen buz kristallerinin yüzeyine bağlanarak, adsorbsiyon önleyici bir süreç olduğu düşünülmektedir (Ananthanarayanan vd., 1989; Wilson, 1993). Bu aşamada, bitişik antifriz molekülleri arasındaki buz yüzeylerinde büyüme meydana gelir ve bu yüzeyler yüksek yüzey eğriliği ile büyür. Bu dışbükey yüzeye su moleküllerinin eklenmesinin yüksek enerji maliyeti nedeniyle, erime noktası sabit kalırken dengede olmayan bir donma noktası düşüşü gözlemlendi. Bu, Kelvin Etkisi olarak adlandırılır, erime ve donma noktaları arasındaki fark, termal histerisis (TH) olarak tanımlanır (Bouvet ve Ben, 2003). Donma esnasında veya dondurma koşullarının altında, hücre dışı boşluklardaki buz oluşumu, çözünen maddeleri matrisin dışına iterek, kalan hücre dışı

sıvının geçirgenliğinin artmasına neden olur (Storey ve Storey, 2027). Bağlanan su fraksiyonunda bir artış (yani çözücüler, makromoleküller, yüzeyler ve diğer hücresel yapılarla onu çözülmez hale getirecek şekilde ilişkilendirilen) bazı ektotermelerde mevsimsel soğuk sertleşmenin önemli bir yönüdür (Storey vd., 1981; Layne ve Lee, 1989; Layne, 1995).

Bağlı su fraksiyonunu artırmanın bir etkisi, ölümcül buz içeriğinin elde edildiği noktayı bastırmaktır. *Rana sylvatica* daha ılıman koşullardaki (Ohio, ABD) kurbağa türleriyle karşılaştırılmış olup olağan üstü donma toleransı yüksek oranda barındırdığı su fraksiyonu ile açıklanmıştır: % 26'ya karşı %15 (Costanzo, 2013). Toplam vücut suyunun %65-70'e kadarının hücre dışı buza dönüşmesiyle haftalar/aylarca hayatta kalırlar, suyun çoğu hücrelerden çekilir, böylece hücre ve organ hacimleri önemli ölçüde azalır (Storey vd., 2021).

Çalışmamızda kullandığımız *P. ridibunda* karaciğer dokularındaki su içeriğinin donma maruziyetinde azalıp, anoksi ve dehidrasyon gruplarında önemsiz bir miktar arttığı görülmüş olup donma maruziyetindeki azalış, istatistiki verilere göre anlamlıdır. Kas dokularındaki su miktarları ise tüm stres gruplarında azalmış olup, istatistiki verilere göre anlamlıdır.

Yoldaş (2021), Anadolu dağ kurbağaları, *R. macrocnemis* ile yaptığı araştırmada karaciğer dokusundaki su miktarı donma koşulunda yaklaşık %11,3 azaldığını kontrole ve diğer gruplara göre anlamlı farklılık oluşturduğunu, kas dokusunda ise anoksi ve dehidrasyon koşullarında kontrol ve diğer gruplara göre anlamlı azalışlar sergilediğini, *R. holtzi* türünde yaptığı çalışmada donma koşullarında sadece karaciğer dokusunda kontrole göre %10,4 ile anlamlı azalma gerçekleştiğini, iskelet kası su miktarlarında da anoksi ve dehidrasyon gruplarında anlamlı azalmalar kaydetmiştir. Churchill ve Storey (1993); Costanzo vd. (1993a); (2013); (2015); Dieni ve Storey (2014), *R. sylvatica*'da yaptıkları araştırmalarda dehidrasyon ve donma stres maruziyetlerinde karaciğer dokusunun ~%25 kas dokusunun ~%50 oranlarında su kaybettiğini göstermişler durumun açıklamasını karaciğerlerdeki yüksek glikojeneze bağlayarak hiperhidrasyon gözlemlemişlerdir. Amaral (2018), *D. chrysoscelis* ile yaptığı çalışmada soğuğa maruziyet durumunda karaciğerin %36 oranında su kaybettiğini gözlemlemiştir. Voituron (2003); (2005), *P. lessonae*, *P. ridibundus* ve melezleri *P. esculentus* ile

yaptığı çalışmasında karaciğer ve kas dokusunda anlamlı bir su azalış oranı gözlemlememiştir.

Donmanın, soğuk iklim bölgelerinde yaşamlarını sürdürebilen amfibi türlerinde su oranının azalması hücrede bulunan suların dokular arasındaki boşluklara kaymasını ve donma sırasında fizyolojik dehidrasyonun kanıtıdır. İskelet kasında, donma ve anoksi maruziyelerindeki su konsantrasyonunun azalması hücreler içerisindeki suyun dış ortama gidememesi bu sebeple su kaybının olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Organlardaki doku hasarlarının en aza indirgenmesi için hücre başlangıcındaki su miktarı hücreler arasındaki boşluklara salınarak küçülmeler meydana gelir. Su ve oksijen eksikliği, iskelet kasındaki su içeriğini azaltır ve bu şekilde hücreler dehidrasyon ve anoksi maruziyeti esnasında adaptasyon göstererek metabolizmada azalmayı tetikler. Donmuş kurbağa dokularında soğuğa maruziyet esnasında, hipoksi ve iskemiye bağlı olarak solunum ve dolaşım durması görülebilir. Bu sebeple, her hücre anaerobik enerji yoluyla oksijensiz yaşamaya çalışmaktadır. Kurbağalarda donma sırasında hücre dışı boşluklarda buz oluşumu hayvanlar için ozmotik bir sorun teşkil eder. Buz kristalleri çözünen madde içermediğinden ve genişlediğinden, buz miktarı arttıkça hücre dışı buza dönüşmeyen sıvının geçirgenliği de artar, hücre üzerindeki hiperozmotik basınç nedeniyle hücrelerde dehidrasyona ve hücre hacminin küçülmesine neden olur (Storey ve Storey, 2013; Yoldaş, 2021).

Yaptığımız laboratuvar çalışmalarında *P. ridibunda* türünün soğuğa maruziyet, anoksi ve dehidrasyon stres koşullarında ağırlıkları aşağı yönlü regüle olmuş olup en çok ağırlık kaybı dehidrasyon stres koşulunda meydana gelmiştir. Stres sonrası normalleşme süreçleri olan, çözünme, rehidrasyon ve reoksi grupları için ağırlığın normale dönmeye başladığı izlenmiş olup metabolizma hazırlık süreci sonrasında tüm deney gruplarının ~1 g kilo kaybı gözlenmiştir. Fakat bu azalış, istatistiksel olarak anlamsızdı. Sonuçlarımız daha önce yapılan çalışmalarla örtüşmekte olup Yoldaş (2021), doktora tezinde Anadolu dağ kurbağalarından *R. macrocnemis* ve *R. holtzi* türlerinin soğuğa maruziyet, anoksi ve dehidrasyon streslerinde vücut ağırlıklarının azaldığını ve en çok ağırlığın dehidrasyon koşullarında gözlemlendiğini, ancak istatistiksel olarak anlam ifade etmediğini bulmuştur aynı zamanda Costanzo (2015), *R. sylvatica* ile yaptığı çalışmalarda aynı sonuçlara ulaşmıştır, Amaral (2018), ise *D. chrysoscelis* ile yaptığı çalışmalarda ne soğuk ne de sıcak koşullardaki vücut ağırlığı değişikliklerinin önemli olmadığını göstermiştir. Tüm bu kilo kaybı durumu buz çekirdeklerinin büyümesinin engellenmesi

için dokulardaki su kaybına işaretler ve stres koşullarında geliştirilen bir adaptasyon sonucuna ulaşılmasına rağmen dokuların dehidrasyonu kriyoprotektif etkiyi açıklamada yetersizdir.

4.3. Kriyoprotektan Olarak Glikozun Durumu

Soğuk alıştırma, donmaya toleranslı türleri yalnızca düşük sıcaklıklara değil aynı zamanda iç buz oluşumunun zorluklarına da dayanacak şekilde hazırlayan gen ekspresyonunda, enzim aktivitesinde ve lipid membranların yapısında değişikliklere neden olur (Costanzo ve Lee,2013; Storey ve Storey,2017). Kurbağanın enerjik ve ozmotik durumu gibi diğer faktörler kriyoprotektan birikimini belirleyebilir (Costanzo ve Lee,2005).

Laboratuvarımızda yaptığımız çalışmalarda *P. ridibunda* türü kan dokusunda tüm stres gruplarında glikoz seviyesi artmış olup, genel artış soğuğa maruziyet grubunda (2,54 kat) görülmüş, fakat istatistiksel olarak anlamsızdır. Karaciğer dokusunda tüm stres gruplarında anlamlı bir artış (soğuğa maruziyet: 6,5 kat, anoksia: 4,63 kat ve dehidrasyon: 2,8 kat) görülmüştür. Kas dokusunda ise tüm stres gruplarında glikoz seviyeleri kontrol gruplarıyla eşdeğere yakın olup anlamsızdı. Çalışmamızla aynı türü çalışan araştırmacılar, Bataklık kurbağası *Pelophylax ridibunda*'nın, vücudunun %58'inin donmaya dayanabileceği belirledi. Dondurulduktan sonra kan gliserol ve laktat seviyelerindeki artışa rağmen glikoz seviyesinde artış tespit edilemedi. *Pelophylax* suşları ile yapılan başka bir çalışmada, donmuş koşullarda *P. lessonae* ve *P. esculentus*'un kan şekerinde sınırlı artışlar gösterdiği (sırasıyla 3. kat ve 2.9 kat) bildirilmiştir (Voituron vd., 2003; 2005; Valbona, 2013). Bu çalışma, suda yaşayan kurbağaların bir dereceye kadar donmayı tolere edebildiğini, ancak kriyoprotektan birikim seviyelerinin donmaya dayanıklı türlerden düşük olduğunu düşündürmüştür (Yoldaş, 2021). Farklılık sebeplerinin, denek olarak kullanılan tüm *P. ridibunda* türlerinin farklı bölgelerden toplanmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamıza benzer araştırma sonuçları, Steiner vd., (2000), *R. schneideri*'nin -2 °C'de donarken öldüğünü, *L. catesbeianus*'un ise aynı koşullarda sağ kaldığı tespit edilmiş ve donma esnasında, *L. catesbeianus*'un glikoz seviyesinin üç kat artışı gözlemlenmiştir.

Yoldaş (2021), *R. macrocnemis*'de kan dokusunda glikoz seviyesi 3,3 kat artmış, *R. holtzi*'de 4,5 kat artmış anoksi ve dehidrasyon koşullarında önemli bir değişiklik saptanmamıştır. *D. chrysoscelis*' in plazma, karaciğer ve kasında glikoz konsantrasyonunda bir artışa neden olurken, hepatik glikojen konsantrasyonu %50'ye düşürüldü ve kas glikojeninde hiçbir değişiklik gözlenmedi. Kas ve karaciğerdeki glikoz seviyeleri, Indiana'dan diğer türler için daha önce bildirilenden daha düşüktü (Irwin ve Lee 2003). Aksine, bu çalışmada plazma glikoz seviyeleri, kardeş tür *D. Versicolor* için daha önce bildirilen değerlerden daha yüksekti (Storey ve Storey 1985; Layne 1999; Layne ve Jones 2001; Layne ve Stapleton 2008).

R. sylvatica'nın glikoz içeriğinin, dondurma koşulları altında birçok dokuda arttığı bildirilmiştir. Alaska ve Ohio'da donma toleransı yüksek olan *R. sylvatica* popülasyonları üzerinde yapılan bir çalışmada, her iki bölgeden kurbağaların kan - glikoz seviyeleri, 48 saatlik dondurmadan sonra $\sim 220 \mu\text{mol ml}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Churchill ve Storey, 1993; Sullivan, 2011; Costanzo vd., 2013;2015). Glikoz seviyelerinde çözüldükten sonra donma ve ardından azalma ile güçlü bir artış sergiledi. Dondurulmuş kurbağalardaki konsantrasyonlar, dondurulmamış kurbağalardakilerden 54 ila 80 kat daha yüksektir ve değişimler organlara göre değişmektedir (Costanzo vd., 2014). *R. sylvatica* türündeki glikoz ölçümleriyle diğer sonuçlar kıyaslandığında aradaki büyük fark kısmen donma konsantrasyonundan kaynaklansa da yorumlama değeri sınırlıdır. Çalışmalar arasındaki doku glikoz seviyelerindeki farklılıklar, muhtemelen kriyoprotektan birikimini (Costanzo ve Lee, 1993) belirleyen ilk glikojen depolarındaki değişikliklerin yanı sıra soğutma parametrelerindeki ve örnekleme noktasındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

4.4. Amfibi Antifiriz Proteinleri

4.4.1. Li16 Gen Ekspresyonu

Çalışmamızda amfibiye özgü gen bölgesi olan li16 gen bölgesi karaciğerde, soğuğa maruziyet sonrası çözünmede (0,380 kat) ve dehidrasyon (0,080 kat) grubunda yukarı yönlü regülasyon göstermiştir. Kanda, soğuğa maruziyette (0,720 kat), soğuğa maruziyet sonrası çözünme (1,243 kat) yukarı yönlü regülasyon göstermiştir. Kasta, soğuğa maruziyet (0,252 kat) ve soğuğa maruziyet sonrası çözünmede (0,837 kat)

yukarı yönlü regülasyon göstermiştir. Li16'nın işlevi bilinmemekle birlikte, soğuk periferik membran proteinlerinin yukarı yönlü regülasyonu önceden belirlenmiştir (Tominaga vd., 2005). Bu proteinler tipik olarak onarım proteinlerini (ozmotik stresli ilişkili proteinler, proteoliz ile ilişkili proteinler ve fonksiyonları bilinmeyen birçok protein) kapsar. Bu sebeple, li16'nın zar ile ilişkili bir rolü olması muhtemeldir. Li16'nın yapı tahmini ve çözücü erişebilirlik analizi, olası bir zar geçiş bölgesini düşündüren nerminus yakınında güçlü bir hidrofobiklik göstermektedir, bu durum bize hücre içi lokalizasyonunda görev aldığına güçlü bir göstergesidir (Biggard, 2013).

Yapılan diğer çalışmalarda, Yoldaş (2021), *R. macrocnemis* karaciğer dokusunda donma koşuluna yanıt olarak yaklaşık 3,5 kat artmış, kas dokusundaki li16 ekspresyon seviyesi donma grubunda 1,65 kat ($P > 0,05$) artarken çözünme grubunda 2,37 kat artmıştır. Donma ve ilişkili stresler ile normalleşme koşullarında *R. holtzi* karaciğer dokusunda soğuğa maruziyet stresinde, kas dokusunda soğuğa maruziyet ve dehidrasyon streslerinde artmıştır. Sullivan (2011), li16'nın soğuğa maruziyet gruplarında test edilen on iki dokunun hepsinde bulundu ve daha da önemlisi transkript seviyeleri donma sırasında testislerde yedide 86 kat arttı. Sullivan ve Storey (2012), soğuğa maruziyette li16 geni kas ve karaciğerde 1,5 kat artmış, anoksi ve dehidrasyon streslerinde aşağı yönlü regülasyon göstermiş olup beyin, böbrek ve kalp dokularında önemli artışlar kaydedilmiştir. McNally vd. (2002), tarafından yapılan önceki çalışmalardan bu yana bu sonuçlar ilginçtir. Northern Blot kullanan transkript seviyeleri üzerinde Li16 ekspresyonunu sadece karaciğer, kalp ve bağırsakta bulmuş, beyinde, akciğerde, böbrekte veya kasta transkript tespit edilmemiştir. Bu, Northern Blot yönteminin daha düşük hassasiyetinin bir sonucu olabilir. Bununla birlikte, li16 seviyelerinin her iki çalışmada da incelendiği iki doku (kalp ve karaciğer), donma üzerine transkripsiyonda önemli artışlar gösterme konusunda hemfikirli.

Dondurulan ilk organ olan deri, donma başlangıcını iç organları uyarmak için bir algılama ve sinyalleme işlevine sahip olacak şekilde kritiktir. (Wu vd., 2008). Belki de bir kriyoprotektan olmanın yanı sıra, li 16, yaklaşan donma durumunda çekirdek organları uyaran sinyal yolunda hareket eder. Çalışmamız sonucunda da görüldüğü gibi donma stresi sonrasındaki normalleşme süreci olan çözünme gruplardaki gen ekspresyon seviyesi bunun yanıtıdır. Li 16 yapısının bir analizi, proteinin amino asit lösün açısından zengin amino asit kalıntılarından 5 ile 14 arasında çalışan bir nükleer

dışa aktarma sinyaliyle sahip olduğunu gösterdi (La Cour vd., 2004). Daha fazla biyoinformatik araştırma, Li16'nın bir sinyal peptidi içerdiğini ve bir salgılama yolunun parçası olduğunu da öngördü (Emanuelsson, 2000). Donmaya yanıt veren hemen hemen tüm genlerin, anoksi veya dehidrasyon sinyallerine de yanıt verdiği gösterilmiştir (Storey, 2004). Li16 transkripsiyonunun hem anoksi hem de dehidrasyon stresleri altında arttığı üç doku, muhtemelen ağaç kurbağasının hayatta kalması ve iyileşmesi için en önemli organlardır. Dehidrasyon stresi altında kalp, suyun kolligatif tutulması için gerekli olan glikoz içeren, gittikçe artan viskoz kan dolaşımının devam etmesi için gereklidir, böbrek iyon dengesinden sorumludur ve beyin dehidrasyon tepkisini koordine eder (Churchill ve Storey, 1994). Anoksi altında, kalp, 5 °C'de kalp atış hızını 5 kata kadar düşürerek sürekli oksijensiz dönemlere uyum sağlamalı, böbrek biriken bir laktat nedeniyle giderek asidik hale gelen kandaki asit-baz dengesini korumalıdır ve yine beyin, anoksiye karşı tüm vücut tepkilerini koordine etmelidir (Herbert ve Jackson, 1985; Jackson ve Ultsch, 1982; Ultsch ve Jackson, 1982). Bu sonuçlar McNally ve diğerleri tarafından yapılan Li16 çalışmasına karşılık gelir. (2002), Tüm bu durumlar göz önüne alındığında çalışmamızda da tespit edilen Li16'nın arttığı organlarda düşük miktarlıda olsa dehidrasyonda artış izlenmiştir.

McNally ve diğerleri (2002), izole edilmiş ağaç kurbağası hepatositlerinin, ikinci haberci sıklık 3', 5' guanozin monofosfat (cGMP) ile inkübasyon yoluyla Li16'yı transkribe etmek için indüklenebileceğini gösterdi. cGMP üretimi en yaygın olarak, çözünür guanilil siklazın (sGC) hem kısmına bağlanan endojen nitrik oksit (NO) tarafından tetiklenir. Bu da GTP'den cGMP'yi sentezleyen enzimi aktive eder, katalitik aktivitesini arttırır ve cGMP seviyelerini yükseltir (Fiscus, 2002). cGMP, bir serin / treonin kinaz olan cGMP bağımlı protein kinazı (PKG) etkinleştirmeye devam eder (Lincoln vd., 2001). cGMP'nin eylemleri karmaşık ve çeşitli olmasına rağmen, cGMP sinyal yolunun iyi bilinen bir rolü, vasküler düz kasın gevşemesine aracılık etmektir. Bu, PKG yolağının neden olduğu hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonundaki azalmanın bir sonucudur (Rastaldo vd., 2007). Bu, iskemik koşullar altında meydana gelenler gibi kan akışındaki değişiklikleri düzenlemede cGMP'nin bir rolünü ifade eder. Birkaç çalışma, iskemi ve/veya anoksi koşulları altında cGMP seviyelerinde bir artış olduğunu göstermiştir. Örneğin Depre ve Hue (1994), 10 dakikalık akışsız iskemi ve anoksinin, izole edilmiş çalışan sıçan kalplerinde miyokardiyal cGMP içeriğinde belirgin bir artışa (yaklaşık %30-50) neden olduğunu bulmuştur. Anoksinin bir sonucu olarak gen

ekspresyonunun cGMP aracılı bir sinyalleme yolağı tarafından uyarıldığı görüldüğü yumuşakçalarda cGMP ve anoksi arasındaki bir bağlantının başka bir kanıtı görülmektedir. Gerçekte, Larade ve Storey (2002), tarafından test edilen her *L. littorea* anoksiye duyarlı gen, diğer ikinci habercilere çok az tepki gösterirken veya hiç tepki göstermezken cGMP tarafından yukarı regüle edilmiştir. Dehidrasyona gelince, *Dictyostelium discoideum*'daki hızlı hücre küçülmesinin, 2.5 dakikalık bir gecikme ile hem hücresel hem de hücre dışı cGMP'nin yükselmesine neden olduğu gösterilmiştir. Toplam cGMP seviyeleri, 10 ile 15 dakika arasında bir zirveye ulaşılan kadar yükselmeye devam etti ve bu noktada toplam cGMP kademeli olarak azaldı (Oyama, 1996). Bu nedenle, anoksi veya dehidrasyon stresinin bir sonucu olarak cGMP'de bir yükselme, artmış Li16 transkripsiyonu ve cGMP inkübasyonu arasında bağlantılıdır (Sullivan, 2011).

Tüm bu durumlar göz önüne alındığında donmadan sonra çözünme de her stres ortamında artan Li16'nın sinyal yolağındaki işlevi kaçınılmazdır. Donmadan sonra hayati fonksiyonların yerine getirilmesi için sinyal sağladığı ve bu durumda arttığı yaptığımız tez sonucu bulgularlada bir kere daha kanırlanmıştır.

4.4.2. fr10 Gen Ekspresyonu

Çalışmamızda amfibiye özgü gen bölgesi olan Fr10 gen bölgesi karaciğerde, anoksia (1,390 kat) ve dehidrasyon (0,173 kat) maruziyetlerinde artmış, kasta, soğuğa maruziyette (0,515 kat) artmış, karaciğerde, soğuğa maruziyet sonrası çözünme grubunda (0,130 kat) artmıştır.

Literatürdeki benzer çalışmalara baktığımızda doku ve strese bağlı olarak fr10 gen ekspresyonunda farklılık gözlemlendi. FR10 proteininin gen ekspresyon çalışmalarının yapıldığı ilk çalışma, zamanın bir fonksiyonu olarak fr10 geninin ekspresyonunun zamansal fonksiyonlarını araştırdı. *R. sylvatica*, 1 saatlik dondurmadan sonra karaciğer dokusundaki replikasyon seviyesinde 2 katlık bir artış, 2 saatlik dondurmadan sonra 3.5 katlık bir artış ve 2 saatlik çözündürmeden sonra kontrol grubu seviyesine tekrar düşüş gösterdi. Karaciğerdeki gen ekspresyonu, 5°C'de dehidrasyon ile arttı, ancak hipoksik maruziyet ile azaldı. Bu durum, genin doğal dondurma sırasında hücre hacmi düzenleyici sinyallere in vivo yanıt verebildiğini gösterir. FR10 proteininin tanımlandığı

bu çalışmada, donma stresinin, kalp, akciğer, beyin ve mesanede orta düzeyde indüksiyona neden olmuş, kas dokusunda değişiklik olmadığı ve böbrek dokusunda azalma olmadığı belirtildi. Karaciğerdeki transkript seviyeleri anoksia stresine maruz kalma ile azalırken, dehidrasyona yanıt olarak yükseldi (Cai ve Storey 1997).

Sullivan (2011), karaciğerde, fr10 transkript seviyeleri donmaya maruz kaldıktan 4 saat sonra 2.1 ± 0.34 kat arttı, kas, biraz daha yüksek ekspresyon seviyeleriyle benzer bir tepki gösterdi, 4 saat dondurulduktan sonra kontrol değerlerine göre 2.57 ± 0.4 kat ve 24 saat dondurulduğunda 2.9 ± 0.3 kat artış gösterdi. Her iki donma zaman noktası da fr10 transkripsiyonda hemen hemen aynı artışlar sergilediğinden, diğer dokulardaki mRNA seviyelerinin analizi yalnızca kontrol ve 24 saatlik dondurulmuş kurbağalarda analiz edildi. Diğer ağaç kurbağası dokularındaki transkript seviyeleri de, kontrollere kıyasla 24 saatlik dondurmadan sonra 10 ilave dokudan 7'sinde yükseldiği için donma üzerine fr10'nun yukarı regülasyonunu doğruladı. Dondurmaya duyarlı yukarı düzenleme, fr10 mRNA seviyelerinin sırasıyla 3.72 ± 0.55 ve 3.67 ± 0.32 kat arttığı testislerde ve kalpte en yüksek seviyedeydi. Dehidrasyona yanıtlar dokuya bağlı olarak büyük ölçüde değişmiştir. İki doku, susuz kalmış kurbağalarda fr10 ekspresyonunda önemli artışlar gösterdi; kalp ve beyindeki transkript seviyeleri, kontrol değerlerine kıyasla sırasıyla 1.57 ± 0.15 ve 1.54 ± 0.08 kat artmıştır. Fr10'un test edilen tüm dokularda evrensel olarak ifade edildiği ve çoğu zaman genin donmaya yanıt olarak yukarı regüle edildiği belirlenmiştir.

Fr10'un tahmin edilen yapısı, yüksek oranda hidrofobik bir çekirdeğe sahip bir proteini gösterdi. Bu çalışma aynı zamanda hücre dışı ortamda FR10 proteininin varlığını keşfetti ve biyoinformatik analizi ayrıca PSORT II tarafından hücre dışı bir lokalizasyonu öngördü. Bu bulgu, donma toleransında Fr10 için olası bir hücre dışı işlevi göstermektedir. Şaşırtıcı bir şekilde, Fr10'un yapısal analizimiz, proteinin tip IV AFP'lere oldukça benzer olduğunu göstermektedir (Biggard, 2013). Yapılan zamansal çalışmalarda meydana gelen ekspresyon seviyesi değişkenliğinin sebebi Fr10'un yapısı gereği stres altında hayatta kalabilmek için buz bağlayıcı proteinlerle fonksiyonel bağ kurması olabileceği gibi hücre dışı ortama geçişi sebepli sinyal aktivitesine de işaret göstermektedir.

Hem Fr10 hem de LS-12'nin önceden var olan ebeveyn apolipoprotein genlerinden bağımsız olarak evrimleştiği varsayılabilir. İlginç bir şekilde, insan apolipoproteinleri için benzer sarmal yapılar mevcuttur (Biggard, 2013).

Yaygın dağılımın ve bunun donma boyunca varlığının kombinasyonu, organların siproteksiyonunda fr10'un anahtar bir fonksiyonunu savunur. Bu rolün ne olabileceğine dair bir ipucu, N-terminal bölgesinde bir nükleer ihraç sinyali (NES) gösteren tahmin edilen protein dizisi tarafından ortaya çıkarılır. Bu 13 amino asit dizisi, LALWLVAISGL, insan immün yetmezlik virüsü tip 1 - Rev (HIV-1 Rev)'de meydana gelen NES'e benzer; LPPLERLTL (Sorokin ve diğerleri, 2007) ve protein kinaz A inhibitör proteini (PKI); LALKLAGLDI (Wen ve diğerleri, 1995). Toplamda en az 75 proteinin, transkripsiyon faktörleri ve yüklerini doğrudan veya bir adaptör aracılığıyla düzenleyen hücre döngüsü dahil olmak üzere hidrofobik bir NES (La Cour ve diğerleri, 2003) içerdiği tespit edilmiş olup bu durum sitoplazmaya taşınmasını sağlar (Sorokin et al. al, 2007). Protein içeren en iyi karakterize edilmiş üç NES; HIV-1 Rev, PKI ve hnRNP A1'in hepsinin, ilişkili moleküllerin ihracatına aracılık etmek için çekirdek ve sitoplazma arasında gidip geldiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, ilişkili molekülün ne olabileceği konusunda farklılık gösterirler. HIV-1 Rev (Fischer vd., 1995) ve heterojen nükleer ribonükleoprotein A1 (hnRNP A1) (Michael ve ark, 1995) proteinleri, RNA'nın çekirdekten dışa aktarılmasına dahil olurken, PKI, proteinin katalitik alt birimini ihraç eder. (Fantozzi ve diğerleri, 1994). NES dizilerinin hiçbirisi aynı olmamakla birlikte, benzer bir amino asit hizalamasını paylaşırlar. Daha spesifik olarak, çok sayıda lösün ve izolösün kalıntısının yerini paylaşırlar. Wen vd. tarafından yapılan çalışmaya göre (1995), PKI'nın nükleer enerjiyi az kullandığı bilinip olarak, nükleer ihracat işlevi için kritik olan hidrofobik kalıntılar lösün ve izolösindir. Bu nedenle, FR10'daki NES ile PKI ve HIV-1 Rev arasındaki yüksek benzerlik derecesine dayanarak, FR10'nun, RNA'yı ihraç eden Crml yardımıyla sitoplazmaya taşıyan nükleer ihraç fonksiyonuna sahip olduğu varsayılabilir. Donma sırasında ortaya çıkan önemli yukarı regülasyon, belki de hareketini kolaylaştırdığı varsayılan RNA'nın kriyoproteksiyonu içerdiğini gösterir. Maya -iki hibrit ekranlar veya kütle spektrometrisi kullanılarak yapılan daha fazla çalışma, bu sonuçları doğrulayabilir. Dondurma ve çözme sırasında FR10 protein seviyelerinin analizi donma, fr10 transkripsiyonunda önemli bir artışa neden olmasına rağmen, bu mRNA'nın hemen bir protein ürününe dönüştürülmediği görülmektedir. FR10 ekspresyonunun kontrolünün en azından kısmen transkripsiyon sonrası

gerçekleştiğini gösterir. Hücreler stres durumları altındayken, yaygın bir yanıt, enerji açısından pahalı süreçleri hızla durdurma, protein sentezi en önemlisidir. Bununla birlikte, transkriptleri bekleyen çok sayıda mRNA transkriptini (hem yapmak hem de indirmek için enerji pahalı olan transkriptler) imha etmek yerine, transkriptler bunun yerine korundukları stres granüllerinde saklanabilir (Sullivan, 2011). Stres granülleri (SG), spesifik mRNA transkriptlerinin stres süresi boyunca sekestre edildiği sitoplazmik bölgelerdir. Bir ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 alfa (eIF-2a) kinaz ailesinin ifadesini aktive eden belirli tipteki çevresel streslere yanıt olarak oluşurlar. Bu kinazlar eIF-2a'yı serin 51 üzerinde fosforile ederek protein çevirisinin durmasına neden olur (Kimball, 1999). Bunun nedeni, eIF-2a'nın diğer iki alt birimle birlikte (3 ve y, üçlü kompleks eIF2-GTP-tRNAMet'in bir parçası olan eIF-2'yi oluşturmasıdır). Bu kompleks, tRNAMet'i küçük ribozomal alt birim üzerine aktarmak için gereklidir, protein çevirisini başlatır. eIF-2a'nın fosforilasyonu, eIF-2p'den ayrışmasını önler, böylece eIF2-GTP-tRNAMet üçlü kompleksini şarj etmek için gereken GDP-GTP değişimini önler (Kedersha ve Anderson, 2002). EIF2-GTP'nin azaltılmış seviyesi - tRNAMet, RNA bağlayıcı proteinler T-hücresi dahili antijen-1 (TIA-1) ve TIA-1 ile ilgili proteinin (TIAR) küçük ribozomal alt birimine bağlanmasına izin vererek polisom ayrılmasını teşvik eder. Bu daha sonra stres adı verilen ayrı alanlara organize olur. TIA-1 proteinlerinin prion benzeri C-terminallerinin oto-agregasyonunun neden olduğu granüller (Kedersha ve Anderson, 2002). Hu protein R (HuR) gibi mRNA stabilitesini destekleyen diğer RNA bağlayıcı proteinler ve dengesizleştiriciler Tristetraprolin (TTP) gibi bilinmeyen mekanizmalarla mRNA'da SG'ye alınır (Kedersha ve Anderson, 2002). Gerilim granülleri ilk olarak, RNA'ya ek olarak küçük ısı şok proteinlerinin (HSP'ler) (Nover vd., 1983) depolandığı ısı şoklu domates hücrelerinde tanımlanmıştır (Nover vd., 1989). Burada stres granüllerinin içeriklerinin seçici olduğu keşfedildi, çünkü bunlar temizlik genlerini kodlayan mRNA'lar içeriyordu, ancak yeni sentezlenmiş ısı şoku mRNA'larını hariç tutuyorlardı (Nover vd., 1989). Sitoplazmik mRNA'nın çoğunu translasyon mekanizmasından ayırarak, stres granülleri stres koşulları altında ihtiyaç duyulan transkriptlerin seçici translasyonunu teşvik edebilir. HSP'ler, ısı şokunun neden olduğu stres granüllerinde bulunurken, diğer streslere yanıt olarak oluşan stres granüllerinin bileşenleri değildirler. Bu stresler eritrosit farklılaşması sırasında davranışa sahiptir (Williams, 2001; Harding vd., 2000; Kimball, 2001; Han vd., 2001; Lu vd., 2001). mRNA, stres granüllerinde transkripsiyonel olarak inaktifken, hücre stresten kurtulduktan sonra çevrilebilir. Bu nedenle, FR10 durumunda, donmaya

yanıt olarak transkripsiyon artırılırken, bu mRNA transkriptlerinin, çözölme sırasında kurbağalar iyileşene kadar stres granüllerinde tutulması mümkündür. Bu nedenle, FR10 protein seviyelerine karşı mRNA'dan elde edilen mevcut analizden çıkarılabilecek en iyi sonuç, mRNA transkriptlerinin transkripsiyonunun posttranskripsiyonel olarak kontrol edilmesi gerektiğidir (yani, genin transkripsiyonuna karşı mRNA'nın translasyonunun bağlantısı kesilmiştir) (Sullivan, 2011).

Ayrıca böbrek, tuz ve su dengesini koruyarak anoksi sırasında görülen değışen kan basıncını düzenler ve kırmızı kulaklı sürgölü kaplumbağada hipoksiye yanıt olarak salınan eritropoetin gibi hormonlar üretir (Milton ve diğeri, 2006). Bu nedenle, fr10'un anoksik koşullardan en çok etkilenen organların korunmasında yer alması mümkündür.

Susuz kalmaya yanıt olarak, ağaç kurbağası karaciğeri glikojenolizini uyarır ve kana ve diğeri organlara yüksek konsantrasyonlarda glikoz ihraç eder (Churchill ve Storey, 1993). Yüksek glikoz, dehidrasyon sırasında hücre suyunun kolligatif tutulmasında rol oynar (Churchill ve Storey, 1995).

Kurbağa, maruz kalan yüzey alanını ve dolayısıyla buharlaşma kaybını azaltan bir duruş varsaydığından kurbağanın kasları büyük ölçüde hareketsizdir (Heatwole vd., 1969), hayvanlar düşük bir sıcaklıkta zamanla susuz kaldıkça oksijen tüketimi yaklaşık %25 azalır (Wu vd., 2008). Bu arada kalp, beyin, böbrek viskoz kana karşı, beyin dehidrasyon davranışını koordine etmeli, böbrek iyon dengesini korumalı ve karaciğeri glikoz üretmelidir. Buna uygun olarak, bu dokulardaki fr10 seviyeleri, kontrol koşullarını (karaciğeri ve böbrek) sürdürdü veya önemli ölçüde arttı (beyin ve kalp).

Tahta kurbağası metamorfozu boyunca transkript seviyelerinin analizi fr10'un potansiyel rolünü daha fazla araştırmak için, ifade seviyeleri, ağaç kurbağasının metamorfozu boyunca izlendi (Gosner, 1960). Fr10 ifadesi metamorfoz aşamasına özgü gibi göründü, ancak ortaya çıkan net bir genel eğilim yoktu.(Sullivan, 2011). Bu durum laboratuvar da yaptığımız çalışmalarda juvenil kurbağa örneklerinin ve yumurta bulunduran diğeri kurbağaların donma çözünmeden sonra diğeriğine göre daha dayanıklı ve daha hareketli olduğunun sebebi olarak tespit edildi. Bu nedenle fr10, donma korumasına ek bir rol oynamalıdır. Proteinin farklı yaşam aşamalarında veya farklı

organlarda farklı stres gruplarında artış ve azalış göstermesi fizyolojik koşullarda birden fazla işlevi olduğunu gösterdi.

4.4.3. fr47 Gen Ekspresyonu

fr47, donmaya toleranslı anuranların (*Rana sylvatica*, *Pseudacris crucifer*, *Hyla versicolor*) karaciğerlerinde bulunan 390 amino asitli bir proteini kodlar, ancak donmaya karşı toleranssız türlerde (*Rana pipiens*, *Scaphiopus couchii*) bulunmaz. Karaciğer, kurbağalar donduğunda buzun nüfuz ettiği son organlardan biri olan çekirdek bir organdır, ancak ciltte buz oluşumu başladıktan sonra 5 dakikadan daha kısa bir sürede glikojenoliz aktivasyonu ile metabolik olarak yanıt verir (Rubinsky, 1994; Storey ve Storey, 1985). Bu nedenle, bir periferik donma sinyali ile karaciğer tarafından kriyoprotektif tepkilerin aktivasyonu arasında sinirsel veya hormonal bir bağlantı vardır ve muhtemelen aynı zamanda donma kaynaklı fr47 ekspresyonunu da düzenler. Fr47 transkript seviyelerine bir PKC yolu aracılık eder. Önceki bütün hayvan çalışmaları, dondurma sırasında ağaç kurbağası karaciğerinde PKC yolunun bir aktivasyonunu göstermiştir, ancak bu çalışmadan önce, varsayılan PKC aracılı eylemler tanımlanmamıştı (Holden ve Storey, 1996; Storey ve Storey, 1996) Transkript seviyeleri dondurma sırasında önemli ölçüde artar ve FR47 proteini, dondurma sırasında ve çözündürmenin ilk saatlerinde karaciğerde birikir. Bir doku eksplant sistemi kullanan in vitro çalışmalar, fr47 gen düzenlemesinde PKC sinyal transdüksiyon yolunu içerir. Fr47 geni aynı zamanda anoksi ve dehidrasyon streslerine (dondurmanın bileşenleri olan) yanıt verir, ancak FR47 proteini bu stresler altında birikmez. Bu, yalnızca dondurma sırasında FR47 üretimi ile sonuçlanır (McNally 2013).

Çalışmamızda, kas dokusu örnekleriyle yapılan çalışmada gen regülasyonları incelendiğinde Fr 47 geni, tüm maruziyet ve normalleşme gruplarında aşağı regüle olmuştur. Karaciğerden alınan örneklerde tüm stres ve normalleşme gruplarında fr47 geni artmıştır. Fr47 geni kan doku örneklerinde soğuğa mağruziyet normalleşmesi çözünme grubunda 0,8 anoksi normalleşmesi reoksia grubunda 0,36 kat artmış olup diğer gruplarda aşağı yönlü regüle olmuştur. Benzer bir çalışmada *R. macrocnemis* karaciğer dokusundaki gen ekspresyon seviyesi tüm stres koşullarında artış göstermiştir (Yoldaş, 2021)

R. sylvatica kullanılarak gen ve protein ekspresyonu üzerindeki düzenleyici etkiler araştırıldı. Northern blot analizi, transkript seviyelerinin 24 saatlik dondurma (5,1 kat), 24 saatlik anoksiye maruz kalma (6.4 kat) veya toplam vücut suyunun %20'sinin kaybı (2.7 kat) sonrasında arttığını gösterdi. Anti-FR47 antikoruna ile immüno-blotlama, protein seviyelerinin donma ve çözülme sırasında arttığını, ancak anoksi veya dehidrasyona maruz kalma sırasında biraz azaldığını gösterdi. Bu sonuçlar, (i) FR47 fonksiyonunun donmada hayatta kalma için önemli olduğunu ve (ii) protein seviyesindeki kontrolün transkripsiyon sonrası uygulanabileceğini göstermektedir. Son olarak, karaciğer dilimlerinin in vitro inkübasyonları yoluyla fr47 gen ekspresyonunu düzenleyen, varsayılan sinyal transdüksiyon yollarının değerlendirilmesi, bir protein kinaz C aracılı yolun dahil olduğunu göstermiştir(McNally 2013).

FR47 protein ekspresyon seviyelerinin, anoksi veya dehidrasyon sağkalımı için hayati olmadığı görülmektedir. Ayrıca, transkriptler ve protein arasında gözlemlenen ekspresyon seviyelerindeki uyumsuz değişiklik, FR47 ekspresyonunun kontrolünün, en azından kısmen, transkripsiyon sonrası olduğunu gösterir, hücreler doğrudan donmaya yanıt vermiyor ve glikoz sentezinin bunun yerine protein kinaz A'yı glikojenolizi başlatmak üzere uyaran sinirsel/hormonal bir tetikleyiciye yanıt verdiği gösterildi (Storey ve Storey, 1996).

Çalışma sonucumuz diğer çalışmalarla birleştirildiğinde Fr47 geninin , daimi olarak karaciğerde hormonal bir tetikleyici olduğu ve donma ve buna bağlı streslere karşı ekspresyon seviyelerinin artmasında rol oynadığını göstermiştir. Hayati organların distalindeki iskelet kası dokularında stresli koşullar altında transkript seviyesinin düştüğü bulunarak, azalmaların metabolizmanın azalmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

5.SONUÇ

Tüm canlılar biyotik ve abiyotik faktörler sebebiyle zarar görebilmekte olup bunlara karşı hayatta kalabilmek için çeşitli sağkalım mekanizmaları geliştirirler. Bu faktörlerden bazıları çevresel olup geliştirilen stratejilerle daha güçlü varyatlar meydana gelir. Ektoderm canlılar soğuk kış koşullarında donmadan hayatta kalmak için ya göç yolunu ya da hibernasyon durumunu tercih ederler. Hibernasyonu tercih eden canlılarda sağkalım için kriyoprotektan biriktirerek donma, anoksi ve dehidrasyon stresleri sonrasında canlılıklarını koruyabilmektedirler. Dört mevsim görülen ülkemizin bazı bölümlerinde kış şartları canlılar için ağır ve zorlayıcı geçmektedir. Çalışma konumuz Anadolu dağ kurbağalarında bu etkileşim mekanizmaları bulunmuş olup daha geniş çaplı incelenerek biyoteknolojiye uyarlanması önem teşkil etmektedir.

Kriyoprezervasyon, hücreleri, dokuları, ve organları aşırı düşük sıcaklıklarda koruma yöntemini ifade eder. Modern biyoloji, tıp, fizyoloji ve benzerleri kriyoprezervasyondan ayrılamaz (. Lee ve D. Kim 2018; Fabbri vd., 2012; Arav vd., 2017; Yang vd., 2019; Liu vd., 2021). Kriyoprezervasyon, hücrelerin uzun zamanlı korunarak, donma stresi sonrası normalleşme döngüsünde hayati önem taşımaktadır. Prathalingam vd. (2006), AFP'nin donmuş hücreleri buz kristalleri ile yönlendirdiğini, bunun da artan sperm ozmotik direnci ile sonuçlandığını ve sığır sperminin doğurganlığını iyileştirdiğini buldu. Yunus vd. (1998), *Pantroglydotes* spermini antifriz peptitleri ile tedavi ettiler, burada sperm motilitesi, plazma membran bütünlüğü ve akrozom bütünlüğü çözüldükten sonra önemli ölçüde arttı. Embriyoların kriyoprezervasyonu, nesli tükenmekte olan hayvanların elit germplazmasını korumanın güvenli ve etkili bir

yöntemidir (Liu vd., 2007). Tüm bunların sonucunda hızlı yayılış gösteren *P.Ridibunda* kurbağımızda bulunan AFP gen bölgelerinin kriyoprezervasyon için kaçınılmaz bir fırsat olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Embriyonun dondurulması sürecinde ozmotik şok, hücre içi buz kristali oluşumu ve kriyoprotektan toksisitesi embriyonik hücre hasarına yol açan başlıca faktörlerdir (Liu vd., 2021). Dondurma işlemi sırasında embriyo hasarını en aza indirmek, embriyo kriyoprezervasyonunun verimliliğini artırmanın anahtar rolüdür. Çalışmamız esnasında yurmurta bulunduran dişi kurbağaların tüm streslerle yoğun bir şekilde mücadelesi göz önünde alındığında *P.Ridibunda* dişi kurbağalarının yumurtalarının barındırdığı AFP oranları ve biyokimyasal yapıları araştırılarak genomik uyarlamalarla biyoteknoloji alanında kullanılabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Embriyonun dondurulması sürecinde ozmotik şok, hücre içi buz kristali oluşumu ve kriyoprotektan toksisitesi embriyonik hücre hasarına yol açan başlıca faktörlerdir (Tomalty vd., 2017). Dondurma işlemi sırasında embriyo hasarını en aza indirmek, embriyo kriyoprezervasyonunun verimliliğini artırmanın anahtar rolüdür. yavaş dondurma aparatının kullanılması, embriyoları kademeli olarak soğutur ve yüksek canlılık ile stabil bir dondurma etkisi üretir. Buna karşılık, vitrifikasyon basit bir işlem, kısa süre ve düşük maliyet gerektirir. Bugüne kadar, yavaş soğutmadan oluşan geleneksel yöntem ve hızlı soğutmadan oluşan vitrifikasyon dahil olmak üzere başlıca iki kriyoprezervasyon yöntemi vardır. Kontrollü yavaş dondurma şunları gerektirir. Özellikle in vitro embriyo kriyo muhafazasının donma süresi, dondurulmuş in vitro embriyoların seçim kriterleri ve antifriz proteinlerin kullanımı ile ilgili olarak bu iki yöntemin koyun embriyolarında uygulanmasına ilişkin birkaç rapor bulunmaktadır. Kontrollü yavaş dondurma ve vitrifikasyon, embriyo kriyoprezervasyonu için yaygın olarak kullanılır. Bu nedenle, bu çalışma, in vitro koyun embriyoları için uygun bir dondurma yöntemini keşfetmek için bu iki dondurma yönteminin in vitro embriyolar üzerindeki etkilerini karşılaştırmayı amaçlamıştır . Üretimi artırmak için çiftlik hayvanlarının embriyolarını korumak için geleneksel veya yavaş dondurma yöntemi kullanılır (.Scatena vd., 2001). Ancak, yavaş dondurma yöntemine kıyasla vitrifikasyon daha ucuz, daha basit, daha hızlı ve en sık kullanılan embriyo kriyoprezervasyon yöntemidir (Phillips vd., 2016). Rall ve Fahy (1985), kriyoprezervasyon yönteminin sıçan ve sığırların embriyo kriyoprezervasyonunda uygulandığını bildirmiştir. Son zamanlarda vitrifiye dondurulmuş koyun embriyosu teknolojisinin kullanımı da artmıştır. Bettencourt vd. (2009), Portekiz merinos koyunu embriyolarının korunması

için kontrollü yavaş dondurma, geleneksel vitrifikasyon ve OPS vitrifikasyon yöntemlerini karşılaştırmış ve vitrifikasyon veya yavaş dondurma yöntemiyle embriyo hayatta kalma ve gebelik oranlarında hiçbir fark gözlemlememiştir (Li vd., 2020) *P.Ridibunda*'dan alınarak yukarı yönlü regüle olan AFP gen bölgelerinin donma süresi diğer türlere göre bakıldığında daha yavaş ve daha uzundur sürelidir. Bu gen bölgesi modifiyesi ile yavaş dondurma, geleneksel vitrifikasyon ve OPS vitrifikasyonun tüm olumlu yönlerinin artırılabilceği düşünülmektedir.

Donmaya toleranslı hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, mitokondrinin oksijen kaynağının çok uzun süreli kesintilerine nasıl tepki verdiği ve ihtiyaç duyulan yeniden ayarlamalar hakkında bilgi vermektedir (Storey vd., 2021). Anoksia maruziyetinde sağkalım mekanizmaları *P.Ridibunda* türünde çok rahat geçmiş hatta normalleşme döngülerinde oldukça hareketli olmaları bu türün önemini vurgulamaktadır. ve mitokondrial oluşan hasarlara verdikleri yanıtların sebepleri araştırılmalıdır. Bu yönlü genetik uygulamalar uzay çağı için bir başlangıca neden olabilecek niteliktedir.

AFP, nadir ve ticari olarak önemli bitki germplazmasının dondurularak saklanması potansiyel olarak bir kriyoprotektan olarak kullanılabilir (Kim ve Park, 2021). Kriyoprezervasyon, hem germplazm muhafazası hem de virüssüz bitkilerin üretimi için yeni bir araç olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Valk ve Valkonen, 2008). Fakat tüm bunlara rağmen istenilen kesin sonuçlar alınamamakla birlikte farklı AFP arayışları denenmekte olup *P.Ridibunda* AFP bölgeleri henüz hiç denenmemiştir

Gıda endüstrisinde, kriyoprezervasyon genellikle ürünlerin raf ömrünü uzatmak için kullanılır. Ancak donma ve çözülme işlemleri doku ve hücrelerde geri dönüşü olmayan hasarlara neden olarak gıdaların lezzetini ve beslenmesini etkiler. DMSO ve PVA gibi bazı klasik CPA'lar, insanlar için zehirli olmaları nedeniyle gıdaların dondurularak saklanması için uygun değildir. Şu anda, gıdada kullanılan CPA'ların çoğu AFP'lerdir. Örneğin, Du vd. (2020), aynalı sazana AFP ekledi. Çoklu donma çözülme döngülerinden sonra, aynalı sazın etinin kalitesi kontrol grubunkinden önemli ölçüde daha iyiydi. Kaleda vd. (2018), erime işlemi sırasında dondurmanın şeklinin nispeten değişmeden kaldığı dondurmanın dokusunu ve tadını (daha yumuşak) iyileştirmek için AFP'yi kullandı. Şarkı vd. salatalık, havuç ve kabak gibi sebzelerde AFP uygulandı. Chen vd. (2022), kriyojenik işleme, gıda endüstrisinde işleme ve koruma için en yaygın

kullanılan tekniklerden biridir ve geleneksel donma önleyici maddeler, yeniden kristalleşme veya çözülme sırasında oluşan buz kristallerinin neden olduğu mekanik stres hasarını düzenleyemez. Bu çalışmada, önemli buz yeniden kristalleşme engelleme kabiliyetine, termal histerezis aktivitesine sahip olan ve buz çekirdeklenmesini değiştiren, böylece hücre dışı buz kristali morfolojisini ve yeniden kristalleşmeyi düzenleyen yeni bir rekombinant kar piresi antifriz peptidinin (rsfAFP) ekspres sistemini başarıyla geliştirdik. rsfAFP'nin *Streptococcus thermophilus*'un hayatta kalma oranını, asit üretme kabiliyetini, donma stabilitesini ve hücresel metabolizma aktivitesini geliştirdiğini gösterdik. Ayrıca, rsfAFP'nin, hücrelerin dış katmanını kaplamak için zar ve buz kristalleri ile etkileşime girerek, donma stresi altında *S. thermophilus*'un fizyolojik işlevlerini koruyan yoğun bir koruyucu katman oluşturduğunu gösterdik. Bu bulgular, rsfAFP'nin laktik asit bakterilerinin dondurularak saklanması veya diğer dondurulmuş gıdalar için etkili bir antifriz maddesi olarak kullanılmasının bilimsel temelini sağlar. Önemli buz yeniden kristalleşme engelleme kabiliyetine, termal histerezis aktivitesine sahip olan ve buz çekirdeklenmesini değiştiren, böylece hücre dışı buz kristali morfolojisini ve yeniden kristalleşmeyi düzenleyen yeni bir rekombinant kar piresi antifriz peptidinin (rsfAFP) ekspres sistemini başarıyla geliştirdik. rsfAFP'nin *Streptococcus thermophilus*'un hayatta kalma oranını, asit üretme kabiliyetini, donma stabilitesini ve hücresel metabolizma aktivitesini geliştirdiğini gösterdik. Ayrıca, rsfAFP'nin, hücrelerin dış katmanını kaplamak için zar ve buz kristalleri ile etkileşime girerek, donma stresi altında *S. thermophilus*'un fizyolojik işlevlerini koruyan yoğun bir koruyucu katman oluşturduğunu gösterdik. Bu bulgular, rsfAFP'nin laktik asit bakterilerinin dondurularak saklanması veya diğer dondurulmuş gıdalar için etkili bir antifriz maddesi olarak kullanılmasının bilimsel temelini sağlar. Sonuçlar ne kadar başarılı olsada hala gelişmeye açık olan gıda kriyoprezervasyonu için yeni AFP arayışları sürmektedir.

Bazı AFP'ler, kötü dokuları yok etmek için düşük sıcaklık kullanan minimal invaziv bir cerrahi teknik olan kriyocerrahide kullanılır. AFP 10 mg/L olduğunda, düşük sıcaklıklarda hücrelerde keskin iğne benzeri buz kristalleri üretilebilir ve kanser hücrelerini yok edebilir (Koushafar ve. Rubinsky, 1997). Flounder antifriz peptidi, Copen hagen sıçanlarının kriyocerrahide bir adjuvan olarak hareket edebilir ve bu da etkinliğini artırabilir (Muldrew vd., 2001)]. Ek olarak, kriyocerrahide düşük konsantrasyonlarda AFP, canlı dokular için kriyoprezervasyon komplikasyonlarını

azaltabilir (li vd., 2021). Bu bulgular, kriyo cerrahisinin gelişimini destekleyebilir ve tümör hücrelerini öldürmek için yeni fikirler sağlayabilir.

Yoldaş (2021), bazı uluslararası araştırma enstitüleri ve özel şirketler de insan dondurma konusunda yoğun araştırmalar yürütüyor. Bazı hastaların uygun bir prosedürde yüksek antifriz maddesi verilerek klinik ölümden hemen sonra -196 °C'de donduğu bilinmektedir. Ancak teorik olarak vitrifikasyondan (tam dehidrasyon) sonra sinir hücreleri de dahil olmak üzere beynin ciddi şekilde hasar gördüğü ve gelecekte canlandırılmayacağı iddia edilmektedir. Ek olarak, doku koruma üzerine yoğun araştırmaların umut verici olduğu görülmüştür, ancak yasal ve etik açıdan insanlara kriyoniklerin uygulanması askıya alınmıştır.

Sonuç olarak AFP yaklaşık 60 yıldır araştırılmasına rağmen halen tam olarak biyokimyasının çözülmemiş olması bunun yanı sıra AFP eldesi için kullanılan canlıların çeşitlilik içermemesi sebebiyle üzerinde daha fazla durulması gereken bir konudur. Türkiye'nin biyoçeşitliliğinin genişliği ve dört mevsimin yaşanması canlı habitatlarının kendilerini koruma mekanizmaları geliştirmesi için oldukça uygun bir alandır. Bu konuda daha detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır. Canlıların biriktirdiği kriyoprotektanların kullandıkları protein ve gen bölgelerinin araştırılması, sıcaklık faktörlerinden ne kadar ve nasıl etkilendiği araştırmaları devam ederek AFP'lerin keşifleri biyokimyalarının aydınlatılması ve biyoteknolojik bir çok alana modifiyeleri oldukça önemlidir.

6. KAYNAKLAR

- Abraham N M, Liu L, Jutras B L, Murfin K, Acar A, Yarovsky T O, vd., (2017), A Tick Antivirulence Protein Potentiates Antibiotics against *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, 1–14.
- Ahmet, A., Osuga, D., Feeney, R., & Yeh, Y. (1974, January). Diffusion-Coefficients Of Antifreeze Glycoproteins From Antarctic Fishes. In Abstracts Of Papers Of The American Chemical Society (Pp. 2-2). 1155 16th St, Nw, Washington, Dc 20036: American Chemical Soc.
- Akın, Ç., Bilgin, C. C., & Bilgin, M. (2010). Discordance between ventral colour and mtDNA haplotype in the water frog *Rana (ridibunda) caralitana*, 1988 Arkan. *Amphibia-Reptilia*, 31(1), 9-20.
- 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.
- 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, 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.
- 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, A. F., Imboden, M., Wielscher, M., Rezwan, F. I., Minelli, C., Garcia-Aymerich, J., ... & Jarvis, D. L. (2020). Role of DNA methylation in the association of lung function with body mass index: a two-step epigenetic Mendelian randomisation study. *BMC pulmonary medicine*, 20(1), 1-8.
- Amaral, F. G. D., & Cipolla-Neto, J. (2018). A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Archives of endocrinology and metabolism*, 62, 472-479.
- Ananthanarayanan, V. S. (1989). Antifreeze proteins: structural diversity and mechanism of action. *Life Chem. Rep*, 7(1), 1-32.
- Anchordoguy, T. J., Rudolph, A. S., Carpenter, J. F., & Crowe, J. H. (1987). Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 24(4), 324-331.
- Arav, A., Rubinsky, B., Fletcher, G., & Seren, E. (1993). Cryogenic protection of oocytes with antifreeze proteins. *Molecular reproduction and development*, 36(4), 488-493.
- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., & Gacitua, H. (2002). New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and cellular endocrinology*, 187(1-2), 77-81.
- 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.
- Arıkan, H. (1988). On a new form *Rana ridibunda* (Anura: Ranidae) from Turkey. *İstanbul Univ. Fen Fak. Mec*, 53, 81-87.
- Arıkan, H., Çevik, İ. E., Kaya, U., & Mermer, A. (2001). Anadolu Dağ Kurbağalarında Eritrosit Ölçümleri.
- Arıkan, H., Atatür, M. K., Çevik, İ. E., & Kumlutaş, Y. (1999). A serological investigation of *Lacerta viridis* (Laurenti, 1768)(Sauria: Lacertidae) populations in Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 23(3), 227-230.
- Arıkan, H., OLGUN, K., ÇEVİK, İ. E., & TOK, C. V. (1998). A Taxonomical Study on the *Rana ridibunda* PALLAS, 1771 (Anura: Ranidae) Population from İvriz-Ereğli (Konya). *Turkish Journal of Zoology*, 22(3), 181-157.

- Arnott, J. (1851). *On the treatment of cancer by the regulated application of an anaesthetic temperature*. J. Churchill.
- 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.
- Arserim, S. K., & Mermer, A. (2008). Hematology of the Uludağ Frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 in Uludağ National Park (Bursa, Turkey). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 25(1), 39-46.
- Atatür, M. K., & Göçmen, B. (2001). Kuzey Kıbrıs' ın Kurbağa ve Sürüngenleri Amphibians and Reptiles of Northern Cyprus. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi*, (170).
- ATATÜR, M. K., Arıkan, H., & Çevik, I. E. (1999). Erythrocyte sizes of some anurans from Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 23(2), 111-114.
- Barakat, R., Cordero, Y., Coteron, J., Luaces, M., & Montejo, R. (2012). Exercise during pregnancy improves maternal glucose screen at 24–28 weeks: a randomised controlled trial. *British Journal of Sports Medicine*, 46(9), 656-661.
- Baran, İ. Y., & Kumlutaş, İ. Y., & Kete, R. (1992). Türkiye Ova Kurbağası *Rana ridibunda* Stok Tesbiti (Anura, Ranidae). *Turkish Journal of Zoology*, 16, 289-299.
- Başoğlu M, Özeti N, (1973), Türkiye amfibileri = The amphibians of Turkey, Ege Üniversitesi Basımevi, 155s, İzmir.
- Başoğlu, M. (1973). Sea turtles and the species found along the coast of neighboring countries. *Türk Biyoloji Dergisi*, 23, 12-21.
- Başoğlu, M., Özeti, N., & Yılmaz, I. (1973). Amphibians of Turkey. *Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi, İzmir*, 50, 1-155.
- Baust, E., Schöning, J., & Wachholz, W. (1982). Status and possibilities of the high temperature reactor. *Atw. Atomwirtschaft, Atomtechnik*, 27(1), 22-27.
- Baust, J. M. (2002). Molecular mechanisms of cellular demise associated with cryopreservation failure. *Cell Preservation Technology*, 1(1), 17-31.
- Belik, A. A., Iikubo, S., Kodama, K., Igawa, N., Shamoto, S. I., Niitaka, S., & Takayama-Muromachi, E. (2006). Neutron powder diffraction study on the crystal and magnetic structures of BiCoO₃. *Chemistry of materials*, 18(3), 798-803.
- Ben, R. N. (2001). Antifreeze glycoproteins—preventing the growth of ice. *ChemBioChem*, 2(3), 161-166.

- Berezovikov, N. N., Duisebayeva, T. N., Khromov, V. A., & Starikov, S. V. (2001). New data on the distribution of *Rana ridibunda* at the southeastern and east of Kazakhstan. *Problems of Herpetology, Pushchino, 2001*, 26-28.
- Bergmeyer, H. U., & Bernt, E. (1974). UV-assay with pyruvate and NADH. In *Methods of enzymatic analysis* (pp. 574-579). Academic Press.
- 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, 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, 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.
- 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.
- 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, 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, 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., & Storey, K. B. (2012). Evidence for cell cycle suppression and microRNA regulation of cyclin D1 during anoxia exposure in turtles. *Cell cycle*, 11(9), 1705-1713.
- Biggar, K. K., & Storey, K. B. (2015). Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals. *The Journal of experimental biology*, 218(9), 1281-1289.
- 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(3), 317-321.

- Bock, P. E., & Frieden, C. (1978). Another look at the cold lability of enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 3(2), 100-103.
- Bollen M, Keppens S, Stalmans W, (1998). Specific Features of Glycogen Metabolism In The Liver, *Biochemical Journal J.*, 336, 19–31.
- Bollen, M., Keppens, S., & Stalmans, W. (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochemical Journal*, 336(1), 19-31.
- Boonsupthip, W., & Lee, T. C. (2003). Application of antifreeze protein for food preservation: effect of type III antifreeze protein for preservation of gel-forming of frozen and chilled actomyosin. *Journal of food science*, 68(5), 1804-1809.
- Boonsupthip, W., & Lee, T. C. (2003). Ice crystal kinetics. *The Encyclopedia of Agricultural, food, and Biological Engineering (EAFE)*, 509e516.
- 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.
- Bouvet, V., & Ben, R. N. (2003). Antifreeze glycoproteins. *Cell biochemistry and biophysics*, 39(2), 133-144.
- Briard, J. G., Poisson, J. S., Turner, T. R., Capicciotti, C. J., Acker, J. P., & Ben, R. N. (2016). Small molecule ice recrystallization inhibitors mitigate red blood cell lysis during freezing, transient warming and thawing. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
- Brockbank, K. G., & Song, Y. C. (2004). Morphological analyses of ice-free and frozen cryopreserved heart valve explants. *The Journal of heart valve disease*, 13(2), 297-301.
- Brown, R. A., Yeh, Y., Burcham, T. S., & Feeney, R. E. (1985). Direct evidence for antifreeze glycoprotein adsorption onto an ice surface. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 24(7), 1265-1270.
- Buchanan, G. W., & Storey, K. B. (1983). In vivo detection of cryoprotectants and lipids in overwintering larvae using carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian journal of biochemistry and cell biology*, 61(12), 1260-1264.
- Buchanan, G. W., & Storey, K. B. (1983). In vivo detection of cryoprotectants and lipids in overwintering larvae using carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian journal of biochemistry and cell biology*, 61(12), 1260-1264.

- Bush, C. A., Ralapati, S., Matson, G. M., Yamasaki, R. B., Osuga, D. T., Yeh, Y., & Feeney, R. E. (1984). Conformation of the antifreeze glycoprotein of polar fish. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 232(2), 624-631.
- Busquets-Garcia, A., Gomis-González, M., Salgado-Mendialdúa, V., Galera-López, L., Puighermanal, E., Martín-García, E., ... & Ozaita, A. (2018). Hippocampal protein kinase C signaling mediates the short-term memory impairment induced by delta9-tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology*, 43(5), 1021-1031.
- 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.
- Campbell, E. M., Ball, A., Hoppler, S., & Bowman, A. S. (2008). Invertebrate aquaporins: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 178(8), 935-955.
- Canpolat, M., Per, H., Gumus, H., Elmali, F., & Kumandas, S. (2018). Investigating the prevalence of febrile convulsion in Kayseri, Turkey: An assessment of the risk factors for recurrence of febrile convulsion and for development of epilepsy. *Seizure*, 55, 36-47.
- Capicciotti, C. J., Doshi, M., & Ben, R. N. (2013). Ice recrystallization inhibitors: from biological antifreezes to small molecules. *Recent developments in the study of recrystallization*, 177, 224.
- Capicciotti, C. J., Kurach, J. D., Turner, T. R., Mancini, R. S., Acker, J. P., & Ben, R. N. (2015). Small molecule ice recrystallization inhibitors enable freezing of human red blood cells with reduced glycerol concentrations. *Scientific reports*, 5(1), 1-10.
- Carpenter, J. F., & Hansen, T. N. (1992). Antifreeze protein modulates cell survival during cryopreservation: mediation through influence on ice crystal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19), 8953-8957.
- Chao, C. C., Hu, S., Molitor, T. W., Shaskan, E. G., & Peterson, P. K. (1992). Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *The Journal of Immunology*, 149(8), 2736-2741.
- Chaytor, J. L., Tokarew, J. M., Wu, L. K., Leclère, M., Tam, R. Y., Capicciotti, C. J., ... & Ben, R. N. (2012). Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. *Glycobiology*, 22(1), 123-133.
- Chen, X., Wu, J., Cai, X., & Wang, S. (2021). Production, structure–function relationships, mechanisms, and applications of antifreeze peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 542-562.

- Cheng, C. C., & DeVries, A. L. (1991). The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the freezing avoidance of cold-water fish. In *Life under extreme conditions* (pp. 1-14). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Cherayil, B. J. (2011). The role of iron in the immune response to bacterial infection. *Immunologic research*, 50(1), 1-9.
- Chino, H. (1957). Conversion of glycogen to sorbitol and glycerol in the diapause egg of the Bombyx silkworm. *Nature*, 180(4586), 606-607.
- Cho, Y. M., Youn, B. S., Lee, H., Lee, N., Min, S. S., Kwak, S. H., & Park, K. S. (2006). Plasma retinol-binding protein-4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes care*, 29(11), 2457-2461.
- 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.
- 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(6), R1324-R1332.
- Clark, P. L. (2004). Protein folding in the cell: reshaping the folding funnel. *Trends in biochemical sciences*, 29(10), 527-534.
- Clarke, A., Doherty, N., DeVries, A. L., & Eastman, J. T. (1984). Lipid content and composition of three species of Antarctic fish in relation to buoyancy. *Polar Biology*, 3(2), 77-83.
- Clerc, S. G., & Thompson, T. E. (1995). Permeability of dimyristoyl phosphatidylcholine/dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer membranes with coexisting gel and liquid-crystalline phases. *Biophysical journal*, 68(6), 2333-2341.
- Cochet, N., & Widehem, P. (2000). Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(2), 153-161.

- Costanzo J P. (2005). Cryoprotection By Urea In A Terrestrially Hibernating Frog, *Journal of Experimental Biology*, 208, 4079–4089.
- 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.
- 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, 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, Grenot C, Lee R E. (1995a).upercooling, 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. (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. (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. (2013). Avoidance and Tolerance of Freezing In Ectothermic Vertebrates, *Journal of Experimental Biology*, 216, 1961–1967.
- 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, 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, 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, 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., & Lee Jr, R. E. (2013). Avoidance and tolerance of freezing in ectothermic vertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 216(11), 1961-1967.
- Courteau, L. A., & Storey, K. B. (2012). Differential expression of microRNA species in a freeze tolerant insect, *Eurosta solidaginis*. *Cryobiology*, 65(3), 210-214.
- 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.
- Crevel, R. W. R., Fedyk, J. K., & Spurgeon, M. J. (2002). Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 40(7), 899-903.
- Croes S A, Thomas R E. (2000). Freeze tolerance and cryoprotectant synthesis of the Pacific Tree Frog *Hyla regilla*, *Copeia*, 863–868.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Oliver, A. E., Tsvetkova, N., Wolkers, W., & Tablin, F. (2001). The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*, 43(2), 89-105.
- Cziko, P. A., DeVries, A. L., Evans, C. W., & Cheng, C. H. C. (2014). Antifreeze protein-induced superheating of ice inside Antarctic notothenioid fishes inhibits melting during summer warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(40), 14583-14588.
- 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.
- Davies, P. L. (2022). Reflections on antifreeze proteins and their evolution. *Biochemistry and Cell Biology*, (ja).
- Degree T, Mutyam V. (2013). Aquaglyceroporin Expression and Regulation in Erythrocytes From Freeze Tolerant Cope ' S Gray Treefrog *Hyla Chrysoscelis*.
- Demirsoy, A. (1997). Yaşamın Temel Kuralları (Omurgalılar/Anamniyota). *Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü*, 684.
- Demirsoy, E., Arbatli, H., Korkut, A. K., Yagan, N., & Sonmez, B. (2003). A new technique for abdominal heart transplantation in rats. *Journal of Cardiovascular Surgery*, 44(6), 747.

- Depré, C., & Hue, L. (1994). Cyclic GMP in the perfused rat heart Effect of ischaemia, anoxia and nitric oxide synthase inhibitor. *FEBS letters*, 345(2-3), 241-245.
- Devries A L.1(1971). Glycoproteins As Biological Antifreeze Agents In Antarctic Fishes, *Science*, 172, 1152–1155.
- Devries, A. L. (1971). Glycoproteins as biological antifreeze agents in Antarctic fishes. *Science*, 172(3988), 1152-1155.
- DeVries, A. L., & Wohlschlag, D. E. (1969). Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*, 163(3871), 1073-1075.
- 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. (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, 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.
- Dieni, C. A., & Storey, K. B. (2009). Creatine kinase regulation by reversible phosphorylation in frog muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 152(4), 405-412.
- Dieni, C. A., & Storey, K. B. (2011). Regulation of hexokinase by reversible phosphorylation in skeletal muscle of a freeze-tolerant frog. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 159(4), 236-243.
- 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.
- 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(3), 543-551.
- Dinkelacker, S. A., Costanzo, J. P., & Lee, R. E. (2005). Anoxia tolerance and freeze tolerance in hatchling turtles. *Journal of Comparative Physiology B*, 175(3), 209-217.

- Douglas, R. M., & Haddad, G. G. (2003). Invited review: effect of oxygen deprivation on cell cycle activity: a profile of delay and arrest. *Journal of Applied Physiology*, 94(5), 2068–2083.
- Drewes, J. A., & Rowlen, K. L. (1993). Evidence for a gamma-turn motif in antifreeze glycopeptides. *Biophysical journal*, 65(3), 985–991.
- Duman J G. (1982). Insect Antifreezes And Ice-Nucleating Agents, *Cryobiology*, 19, 613–627.
- 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.
- 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.
- Eastman J T, Devries A L. (1986). Renal Glomerular Evolution In Antarctic Notothenioid Fishes, *Journal of Fish Biology*, 29, 649–662.
- Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2012). Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*, 149(3), 515–524.
- 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.
- Eggstein, M., & Kuhlmann, E. (1974). Triglycerides and glycerol determination after alkaline hydrolysis. In *Methods of enzymatic analysis* (pp. 1825–1831). Academic Press.
- Ekpo, M. D., Xie, J., Hu, Y., Liu, X., Liu, F., Xiang, J., & Tan, S. (2022). Antifreeze Proteins: Novel Applications and Navigation towards Their Clinical Application in Cryobanking. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2639.

- 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.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., & Von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of molecular biology*, 300(4), 1005-1016.
- Eniade, A. A. (2001). *Part A: Synthetic studies of C-linked analogs of N-acetylglucosamine-1-phosphate. Part B: Synthesis of C-linked analogs of antifreeze glycoproteins and their in vitro assessment*. State University of New York at Binghamton.
- Eniade, A., & Ben, R. N. (2001). Fully convergent solid phase synthesis of antifreeze glycoprotein analogues. *Biomacromolecules*, 2(2), 557-561.
- Erişmiş, U. C. (2011). Abundance, demography and population structure of *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) in 26-August National Park (Turkey). *North-Western Journal of Zoology*, 7(1).
- Erişmiş, U. C., Cığerci, İ. H., & Konuk, M. (2013). Evaluation of DNA damage in Eurasian Marsh Frogs (*Pelophylax ridibundus*) by Comet Assay for determination of possible pollution in the different lakes in Central Anatolia, Turkey. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 90(6), 660-665.
- Erişmiş, U. C., Yoldaş, T., & Cevdet, U. (2019). Investigation of prevalence of co-infection by *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Ranavirus* in endemic Beyşehir Frog (*Pelophylax caralitanus*). *Acta Aquatica Turcica*, 15(2), 239-246.
- 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.
- Erişmiş, U. C. (2019). Evaluation of DNA damage by Comet Assay in populations of endemic Beyşehir frog *Pelophylax caralitanus* (Arıkan, 1988). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 36(2), 109-114.
- Eto, T. K., & Rubinsky, B. (1993). Antifreeze glycoproteins increase solution viscosity. *Biochemical and biophysical research communications*, 197(2), 927-931.
- Eto, T. K., & Rubinsky, B. (1996). Bioheat transfer. *Introduction to Bioengineering*, (5).
- Fantozzi, D. A., Harootunian, A. T., Wen, W., Taylor, S. S., Feramisco, J. R., Tsien, R. Y., & Meinkoth, J. L. (1994). Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase

- enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 269(4), 2676-2686.
- Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*, 61(1), 243-282.
- Feeney, R. E., & Yeh, Y. (1978). Antifreeze proteins from fish bloods. *Advances in protein chemistry*, 32, 191-282.
- Feeney, R. E., & Yeh, Y. (1998). Antifreeze proteins: current status and possible food uses. *Trends in Food Science & Technology*, 9(3), 102-106.
- Feeney, R. E., Burcham, T. S., & Yeh, Y. (1986). Antifreeze glycoproteins from polar fish blood. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 15, 59-78.
- Ferreira, A. L. A., Correa, C. R., Freire, C. M. M., Moreira, P. L., Berchieri-Ronchi, C. B., Reis, R. A. S., & Nogueira, C. R. (2011). Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. *Rev Bras Clin Med*, 9(1), 54-61.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattajt, L. W., & Lührmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, 82(3), 475-483.
- Fiscus, R. R. (2002). Involvement of cyclic GMP and protein kinase G in the regulation of apoptosis and survival in neural cells. *Neurosignals*, 11(4), 175-190.
- Fitzinger, L. J. (1843). *Systema reptilium* (Vol. 1). Braumüller et Seidel.
- 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., Davies, P. L., & Hew, C. L. (1992). Genetic engineering of freeze-resistant Atlantic salmon. In *Transgenic fish* (pp. 190-208).
- Frank, R. H. (1985). The demand for unobservable and other nonpositional goods. *The American Economic Review*, 75(1), 101-116.
- Friis, D. S., & Ramløv, H. (2020). Physicochemical Properties of Antifreeze Proteins. In *Antifreeze Proteins Volume 2* (pp. 43-67). Springer, Cham.
- Frost, C., Wang, J., Nepal, S., Schuster, A., Barrett, Y. C., Mosqueda-Garcia, R., ... & LaCreta, F. (2013). Apixaban, an oral, direct factor X a inhibitor: Single dose safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and food effect in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(2), 476-487.

- Furusawa, K., Yamashita, K., & Konno, K. (1982). Adsorption of monodisperse polystyrene onto porous glass. I. preference adsorption and displacement of high-molecular-weight species. *Journal of Colloid and Interface Science*, 86(1), 35-42.
- Galindo, B. A., Troilo, G., Cólus, I. M. S., Martinez, C. B., & Sofia, S. H. (2010). Genotoxic effects of aluminum on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 212(1), 419-428.
- 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.
- Gehrken, U. (1984). Winter survival of an adult bark beetle *Ips acuminatus* Gyll. *Journal of insect physiology*, 30(5), 421-429.
- 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.
- Geng, A., Yang, H., Chen, J., & Hong, Y. (2017). Review of carbon storage function of harvested wood products and the potential of wood substitution in greenhouse gas mitigation. *Forest Policy and Economics*, 85, 192-200.
- Gething, M. J., & Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, 355(6355), 33-45.
- Giwa, S., Lewis, J. K., Alvarez, L., Langer, R., Roth, A. E., Church, G. M., & Toner, M. (2017). The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. *Nature biotechnology*, 35(6), 530-542.
- Glander, H. J., & Schaller, J. (1999). Localisation of enzymes in live spermatozoa by CellProbe™ reagents (preliminary results). *Andrologia*, 31(1), 37-42.
- Glander, H. J., Schaller, J., Rohwedder, A., & Henkel, R. (1999). Adhesion molecules of spermatozoa mediate likely sperm-oocyte interactions. *Reproduktionsmedizin*, 15(4), 231-239.
- Goff, J., Chagué-Goff, C., Nichol, S., Jaffe, B., & Dominey-Howes, D. (2012). Progress in palaeotsunami research. *Sedimentary Geology*, 243, 70-88.
- Goldstein, S. (1960). Degradation of pollen by phycomycetes. *Ecology*, 41(3), 543-545.
- González Alvarez, R. (2015). Evaluación de la calidad del servicio percibida en entidades bancarias a través de la escala Servqual. *Ciencia e ingeniería neogranadina*, 25(1), 113-135.

- Goto, S. G., Philip, B. N., Teets, N. M., Kawarasaki, Y., Lee Jr, R. E., & Denlinger, D. L. (2011). Functional characterization of an aquaporin in the Antarctic midge *Belgica antarctica*. *Journal of Insect Physiology*, 57(8), 1106-1114.
- 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, Ewart K V V. (1995). Antifreeze Proteins and Their Potential Use In Frozen Foods, *Biotechnology Advances*, 13, 375–402.
- Griffith M, Yaish M W F. (2004). Antifreeze Proteins In Overwintering Plants: A Tale of Two Activities, *Trends in Plant Science*, 9, 399–405.
- Griffith, M., & Ewart, K. V. (1995). Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnology advances*, 13(3), 375-402.
- Griffith, M., & Yaish, M. W. (2004). Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in plant science*, 9(8), 399-405.
- 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.
- Gupta R, Deswal R. (2014). Antifreeze Proteins Enable Plants To Survive In Freezing Conditions, *Journal of Biosciences*, 39, 931–944.
- Güner, U. Su Kurbağasında İribaşlarında (*Rana ridibunda Pallas*, 1771) Dört Ağır Metal (Pb, Co, Ba, Cr) Tuzunun Akut Toksisitesinin Araştırılması. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 3(2), 79-86.
- 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.
- Hamilton, R. L., Mullins, D. E., & Orcutt, D. M. (1985). Freezing-tolerance in the woodroach *Cryptocercus punctulatus* (Scudder). *Experientia*, 41(12), 1535-1537.
- Han, J., Yang, Y., He, M., & Men, J. (2001). Effect of zinc on the activities of ATPase of erythrocyte membrane. *Wei Sheng yan jiu= Journal of Hygiene Research*, 30(1), 47-49.
- Hand S C. (1996). Downregulation of Cellular Metabolism During Environmental Stress: Mechanisms and Implications, *Annual Review of Physiology*, 58, 539–563.
- Hansen, T. N., & Carpenter, J. F. (1993). Calorimetric determination of inhibition of ice crystal growth by antifreeze protein in hydroxyethyl starch solutions. *Biophysical journal*, 64(6), 1843-1850.

- Harper J V., Brooks G. (2005). The mammalian cell cycle: an overview., *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 296, 113–153.
- Hatley, R. H., Franks, F., & Day, H. (1986). Subzero-temperature preservation of reactive fluids in the undercooled state: II. The effect on the oxidation of ascorbic acid of freeze concentration and undercooling. *Biophysical chemistry*, 24(2), 187-192.
- Hawkins L J. (2020). The Molecular Biology of Dehydration Tolerance : Regulation of Gene Expression and Function in *Xenopus laevis*, Carleton University, PhD. Thesis, Ottawa.
- 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., & Storey, K. B. (2020). Advances and applications of environmental stress adaptation research. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 240, 110623.
- 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., 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.
- Hayakawa, Y., & Chino, H. (1981). Temperature-dependent interconversion between glycogen and trehalose in diapausing pupae of *Philosamia cynthia ricini* and *pryeri*. *Insect Biochemistry*, 11(1), 43-47.
- Haymet, A. D. J., Ward, L. G., & Harding, M. M. (1999). Winter flounder “antifreeze” proteins: synthesis and ice growth inhibition of analogues that probe the relative importance of hydrophobic and hydrogen-bonding interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 121(5), 941-948.

- Haymet, A. D. J., Ward, L. G., Harding, M. M., & Knight, C. A. (1998). Valine substituted winter flounder antifreeze': preservation of ice growth hysteresis. *FEBS letters*, 430(3), 301-306.
- Hazel, J. R., McKinley, S. J., & Williams, E. E. (1992). Thermal adaptation in biological membranes: interacting effects of temperature and pH. *Journal of Comparative Physiology B*, 162(7), 593-601.
- Hendrix, D. L., Lee Jr, R. E., Baust, J. G., & James, H. (1981). Separation of carbohydrates and polyols by a radially compressed high-performance liquid chromatographic silica column modified with tetrathylepenpentamine. *Journal of Chromatography A*, 210(1), 45-53.
- Herbert, C. V., & Jackson, D. C. (1985). Temperature effects on the responses to prolonged submergence in the turtle *Chrysemys picta bellii*. II. Metabolic rate, blood acid-base and ionic changes, and cardiovascular function in aerated and anoxic water. *Physiological Zoology*, 58(6), 670-681.
- Herbert, M. A., Jackson, D. A., & Van Themaat, R. V. (1982). Final findings on the response of *Eucalyptus grandis* to fertilising at De Kaap, Eastern Transvaal. *South African Forestry Journal*, 122(1), 53-58.
- 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.
- 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., & 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(4), 537-556.
- Hew, C. L., Davies, P. L., & Fletcher, G. (1992). Antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon. *Molecular marine biology and biotechnology*, 1(4-5), 309-317.

- Hew, C. L., Fletcher, G. L., & Ananthanarayanan, V. S. (1980). Antifreeze proteins from the shorthorn sculpin, *Myoxocephalus scorpius*: isolation and characterization. *Canadian Journal of Biochemistry*, 58(5), 377-383.
- HEW, C. L., JOSHI, S., WANG, N. C., KAO, M. H., & Ananthanarayanan, V. S. (1985). Structures of shorthorn sculpin antifreeze polypeptides. *European journal of biochemistry*, 151(1), 167-172.
- 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.
- 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(2), 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.
- 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.
- 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.
- Holmberg, N., Lilius, G., & Bülow, L. (1994). Artificial antifreeze proteins can improve NaCl tolerance when expressed in *E. coli*. *FEBS letters*, 349(3), 354-358.
- 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.
- Huebinger, J., Han, H. M., Hofnagel, O., Vetter, I. R., Bastiaens, P. I., & Grabenbauer, M. (2016). Direct measurement of water states in cryopreserved cells reveals tolerance toward ice crystallization. *Biophysical journal*, 110(4), 840-849.

- 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.
- 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(16), 2859-2867.
- Islam, M. R., & Schulze-Makuch, D. (2007). Adaptations to environmental extremes by multicellular organisms. *International Journal of Astrobiology*, 6(3), 199-215.
- Izumi, F., & Momma, K. (2007). Three-dimensional visualization in powder diffraction. In *Solid State Phenomena* (Vol. 130, pp. 15-20). Trans Tech Publications Ltd.
- Izumi, Y., Ohta, N., Hisata, K., Raabe, T., & Matsuzaki, F. (2006). Drosophila Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nature cell biology*, 8(6), 586-593.
- Jackson D C. (2002). Hibernating Without Oxygen: Physiological Adaptations of The Painted Turtle, *Journal of Physiology* .
- Jana, B., Chakraborty, M., Mandal, T., & Kule, M. (2018, May). An Overview on Security Issues in Modern Cryptographic Techniques. In *Proceedings of 3rd International Conference on Internet of Things and Connected Technologies (ICIOTCT)* (pp. 26-27).
- 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.
- 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(3), R545-R553.
- Joanisse, D., & Storey, K. (1996). Oxidative stress and antioxidants in overwintering larvae of cold-hardy goldenrod gall insects. *The Journal of experimental biology*, 199(7), 1483-1491.
- 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.

- Karaca, B. (2015). *Amonyum sülfat'ın Uludağ Kurbağası (Rana macrocnemis) larvaları üzerindeki akut toksikolojik, morfolojik ve histopatolojik etkileri* (Master's thesis, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı).
- 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.
- 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, 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 Araştırmalı Dergisi, 43, 189–198.
- 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.
- 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.
- Kaya, U., & Erişmiş, U. C. (2001). Marsh frogs, *Rana ridibunda* in Lake Akören-26 August National Park (Afyon): A preliminary study of population size and a taxonomical evaluation. *Turkish Journal of Zoology*, 25(1), 31-34.
- Kayukawa, T., & Ishikawa, Y. (2009). Chaperonin contributes to cold hardiness of the onion maggot *Delia antiqua* through repression of depolymerization of actin at low temperatures. *PLoS One*, 4(12), e8277.
- Kedersha, N. A., & Anderson, P. (2002). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochemical Society Transactions*, 30(6), 963-969.
- 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.

- Kikawada, T., Saito, A., Kanamori, Y., Nakahara, Y., Iwata, K. I., Tanaka, D., ... & Okuda, T. (2007). Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(28), 11585-11590.
- Kikuta, S., Hagiwara-Komoda, Y., Noda, H., & Kikawada, T. (2012). A novel member of the trehalose transporter family functions as an H⁺-dependent trehalose transporter in the reabsorption of trehalose in Malpighian tubules. *Frontiers in Physiology*, 3, 290.
- Kim, H. J., Lee, J. H., Hur, Y. B., Lee, C. W., Park, S. H., & Koo, B. W. (2017). Marine antifreeze proteins: structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. *Marine drugs*, 15(2), 27.
- Kim, H. R., Kim, K., Yoo, B., & Byun, E. H. (2020). Cytoprotective Effect from Cisplatin by Treatment with Gryllus Bimaculatus Extract in Macrophage. *한국식품영양과학회/학술대회/발표집*, 373-373.
- Kimball, S. R. (2001). Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells. *Signaling Pathways for Translation*, 155-184.
- 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.
- King, R. B. (1993). Microgeographic, historical, and size-correlated variation in water snake diet composition. *Journal of Herpetology*, 27(1), 90-94.
- 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.
- 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(12), 8406-8414.
- Knight, C. A., De Vries, A. L., & Oolman, L. D. (1984). Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice. *Nature*, 308(5956), 295-296.
- Knight, C. A., Driggers, E., & DeVries, A. L. (1993). Adsorption to ice of fish antifreeze glycopeptides 7 and 8. *Biophysical journal*, 64(1), 252-259.
- Kontaş Aşkar T, Ergün N, Turunç V. (2007) Heat Shock Proteins and Their Physiological Roles, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 13, 109–114.

- Kontogiorgos, V., Regand, A., Yada, R. Y., & Goff, H. D. (2007). Isolation and characterization of ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat grass extract for recrystallization inhibition in frozen foods. *Journal of food Biochemistry*, 31(2), 139-160.
- Koop, T., & Zobrist, B. (2009). Parameterizations for ice nucleation in biological and atmospheric systems. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(46), 10839-10850.
- 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.
- Košťál, V., & Tollarova-Borovanska, M. (2009). The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus*. *PloS one*, 4(2), e4546.
- Kovarova, M., Benhabbour, S. R., Massud, I., Spagnuolo, R. A., Skinner, B., Baker, C. E., & Garcia, J. V. (2018). Ultra-long-acting removable drug delivery system for HIV treatment and prevention. *Nature communications*, 9(1), 1-11.
- Krane, C. M., & Goldstein, D. L. (2007). Comparative functional analysis of aquaporins/glyceroporins in mammals and anurans. *Mammalian Genome*, 18(6), 452-462.
- Kristiansen, E., & Zachariassen, K. E. (2005). The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. *Cryobiology*, 51(3), 262-280.
- Kukal, O., Serianni, A. S., & Duman, J. G. (1988). Glycerol metabolism in a freeze-tolerant arctic insect: an in vivo ¹³C NMR study. *Journal of Comparative Physiology B*, 158(2), 175-183.
- Kumlutaş, Y., Tosunoğlu, M., & Göçmen, B. (1999). Morphological investigation of *Rana ridibunda* (Anura: Ranidae) populations in the Black Sea region. *Turkish Journal of Zoology*, 23(7), 801-806.
- Kuramoto, T., Fukugita, M., Kohyama, Y., & Kubodera, K. (1990). Neutrino-induced reaction cross sections at intermediate energies for chlorine and water detectors. *Nuclear Physics A*, 512(4), 711-736.
- Kuru, M. (2004). Omurgalı Hayvanlar. *Palme Yayıncılık*, Ankara, 841 s.
- Kutrup, B., Olgun, K., & Gül, S. (2011). Body size and age structure of *Pelophylax ridibundus* populations from two different altitudes in Turkey. *Amphibia-Reptilia*, 32(2), 287-292.

- Kuzmin, Y. V. (2009). Radiocarbon and the Old World archaeology: shaping a chronological framework. *Radiocarbon*, 51(1), 149-172.
- Kültz D. (2005). Molecular and Evolutionary Basis of the Cellular Stress Response, *Annual Review of Physiology*, 67, 225–257.
- Lacour, J., & Hebbe-Viton, V. (2003). Recent developments in chiral anion mediated asymmetric chemistry. *Chemical Society Reviews*, 32(6), 373-382.
- Lacour, J., & Hebbe-Viton, V. (2003). Recent developments in chiral anion mediated asymmetric chemistry. *Chemical Society Reviews*, 32(6), 373-382.
- Lane, J. F. (2000). *Pierre Bourdieu: A critical introduction*. Pluto Press.
- Lang, L. (2007). FDA issues statement on diethylene glycol and melamine food contamination. *Gastroenterology*, 133(1), 5-6.
- 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, Jones A L. (2001). Freeze Tolerance In tThe Gray Treefrog: Cryoprotectant Mobilization and Organ Dehydration, *Journal of Experimental Zoology*, 290, 1–5.
- 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, 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.
- Layne Jr, J. R., & Jones, A. L. (2001). Freeze tolerance in the gray treefrog: cryoprotectant mobilization and organ dehydration. *Journal of Experimental Zoology*, 290(1), 1-5.
- Layne Jr, J. R., & Leszczynski, C. F. (2008). Cold hardiness and postfreeze metabolism in caterpillars of *Hypercompe scribonia* (Arctiidae: Lepidoptera). *Environmental entomology*, 37(5), 1069-1073.
- Lee Durrell, G. (1986). State of the Ark Atlas.

- 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.
- Leygonie, C., Britz, T. J., & Hoffman, L. C. (2012). Impact of freezing and thawing on the quality of meat. *Meat science*, 91(2), 93-98.
- 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.
- Li, X., Cui, K., Xiu, M., Zhou, C., Li, L., Zhang, J., ... & Yu, J. (2022). In situ growth of WO₃/BiVO₄ nanoflowers onto cellulose fibers to construct photoelectrochemical/colorimetric lab-on-paper devices for the ultrasensitive detection of AFP. *Journal of Materials Chemistry B*.
- Lin C. (2009). Studies on the Effect of Cryopreservation on Gene Expression in Zebrafish Blastomeres Studies on the effect of cryopreservation on gene expression in zebrafish blastomeres by, .
- Lin, C. (2009). Lin. C., Yang, L., Tanasa, B., Hutt, K., Ju, BG, Ohgi, K., Zhang, J., Rose, DW, Fu, XD, and Glass, CK, 1069-1083.
- 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, .
- Liu, J., Khanam, Z., Ahmed, S., Wang, T., Wang, H., & Song, S. (2021). Flexible antifreeze zn-ion hybrid supercapacitor based on gel electrolyte with graphene electrodes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(14), 16454-16468.
- Liu, X., Pan, Y., Liu, F., He, Y., Zhu, Q., Liu, Z., ... & Tan, S. (2021). A review of the material characteristics, antifreeze mechanisms, and applications of cryoprotectants (CPAs). *Journal of Nanomaterials*, 2021.
- Liu, X., Peng, H., Xie, J., Hu, Y., Liu, F., Wang, X., ... & Tan, S. (2021). Methods in biosynthesis and characterization of the antifreeze protein (AFP) for potential blood cryopreservation. *Journal of Nanomaterials*, 2021.
- 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.

- Loomis, S. H., Carpenter, J. F., & Crowe, J. H. (1988). Identification of strombine and taurine as cryoprotectants in the intertidal bivalve *Mytilus edulis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 943(2), 113-118.
- Lovelock, J. E. (1953). The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochimica et biophysica acta*, 11, 28-36.
- Lovelock, J. E. (1953). The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochimica et biophysica acta*, 10, 414-426.
- Lowry, O., & Passonneau, J. (1972). Typical fluorimetric procedures for metabolic assays. *A flexible system for enzymatic analysis*, 194, 199.
- 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.
- Lung, S. C., & Chye, M. L. (2019). Arabidopsis acyl-CoA-binding proteins regulate the synthesis of lipid signals. *New Phytologist*, 223(1), 113-117.
- Lung, Z. D., & Storey, K. B. (2022). DNA damage and repair responses to freezing and anoxia stresses in wood frogs, *Rana sylvatica*. *Journal of Thermal Biology*, 103274.
- Luu B E, Storey K B. (2018). Solving Donor Organ Shortage with Insights from Freeze Tolerance in Nature, *BioEssays*, 40, 1800092.
- Luu, B. E., & Storey, K. B. (2018). Solving Donor Organ Shortage with Insights from Freeze Tolerance in Nature: Activating endogenous antioxidant systems with non-coding RNA to precondition donor organs. *BioEssays*, 40(10), 1800092.
- Lyons, M. E. (Ed.). (2013). Electroactive Polymer Electrochemistry: Part 1: *Fundamentals*.
- MacArthur, D. L., & Dandy, J. W. T. (1982). Physiological aspects of overwintering in the boreal chorus frog (*Pseudacris triseriata maculata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 72(1), 137-141.
- 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.
- 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.
- MacMillan, H. A., & Sinclair, B. J. (2011). The role of the gut in insect chilling injury: cold-induced disruption of osmoregulation in the fall field cricket, *Gryllus pennsylvanicus*. *Journal of Experimental Biology*, 214(5), 726-734.

- Margaritis, A., & Bassi, A. S. (1991). Principles and biotechnological applications of bacterial ice nucleation. *Critical reviews in biotechnology*, 11(3), 277-295.
- Markstrom, E., Svensson, E., Shao, R., Svanberg, B., & Billig, H. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis--dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, 123(1), 23-30.
- 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.
- Mattice, J. J. L. (2018). *Regulation of glutathione-based antioxidant defenses in response to dehydration stress in the African Clawed frog, Xenopus laevis* (Doctoral dissertation, Carleton University).
- Maziere, P., & Enright, A. J. (2007). Prediction of microRNA targets. *Drug discovery today*, 12(11-12), 452-458.
- Mazur, P. (1963). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *The Journal of general physiology*, 47(2), 347-369.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology-cell physiology*, 247(3), C125-C142.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology-cell physiology*, 247(3), C125-C142.
- 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, 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.
- 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, R. J. (2002). Anxiety sensitivity and panic disorder. *Biological psychiatry*, 52(10), 938-946.

- Meijer, L. (1996). Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in cell biology*, 6(10), 393-397.
- Mercer, T. R., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature reviews genetics*, 10(3), 155-159.
- Meryman, H. T. (1974). Freezing injury and its prevention in living cells.
- 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.
- Miller, L. K. (1982). Intersensory perception and sensory Integration. Richard D. Walk & Herbert L. Pick Jr.,(Eds.). New York: Plenum Press, 1981. Pp. xii+ 415. *Applied Psycholinguistics*, 3(1), 86-90.
- Miller, L. K., & Smith, J. S. (1975). Production of threitol and sorbitol by an adult insect: association with freezing tolerance. *Nature*, 258(5535), 519-520.
- Milton, D. L. (2006). Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2-3), 61-71.
- Mohammadi, Z., Khajeh, A., Ghorbani, F., & Kami, H. G. (2015). A biosystematic study of new records of the marsh frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771)(Amphibia: Ranidae) from the southeast of Iran. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 8(2), 178-182.
- Mook-Kanamori, D. O., Steegers, E. A., Eilers, P. H., Raat, H., Hofman, A., & Jaddoe, V. W. (2010). Risk factors and outcomes associated with first-trimester fetal growth restriction. *Jama*, 303(6), 527-534.
- Moribe, K., Maruyama, S., Inoue, Y., Suzuki, T., Fukami, T., Tomono, K., ... & Yamamoto, K. (2010). Ascorbyl dipalmitate/PEG-lipid nanoparticles as a novel carrier for hydrophobic drugs. *International journal of pharmaceutics*, 387(1-2), 236-243.
- Mugnano, J. A., Wang, T., Layne Jr, J. R., De Vries, A. L., & Lee, R. E. (1995). Antifreeze glycoproteins promote lethal intracellular freezing of rat cardiomyocytes at high subzero temperatures. *Cryobiology*, 32, 556-557.
- Mutyam, V., Puccetti, M. V., Frisbie, J., Goldstein, D. L., & Krane, C. M. (2011). Dynamic regulation of aquaglyceroporin expression in erythrocyte cultures from cold-and warm-acclimated Cope's gray treefrog, *Hyla chrysoscelis*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 315(7), 424-437.
- Napoli, C., & Ignarro, L. J. (2009). Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Archives of pharmacal research*, 32(8), 1103-1108.

- Neven, L. G., Duman, J. G., Beals, J. M., & Castellino, F. J. (1986). Overwintering adaptations of the stag beetle, *Ceruchus piceus*: removal of ice nucleators in the winter to promote supercooling. *Journal of Comparative Physiology B*, 156(5), 707-716.
- 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.
- Niu, L., Meng, Y., Chen, S., Li, X., Zeng, Q., Lou, F., & Hou, Y. (2018). Off-design performance analysis of cryogenic turbo-expander based on mathematic prediction and experiment research. *Applied Thermal Engineering*, 138, 873-887.
- Nordin, J. H., Cui, Z., & Yin, C. M. (1984). Cold-induced glycerol accumulation by *Ostrinia nubilalis* larvae is developmentally regulated. *Journal of Insect Physiology*, 30(7), 563-566.
- Ogushi, Y., Tsuzuki, A., Sato, M., Mochida, H., Okada, R., Suzuki, M., ... & Tanaka, S. (2010). The water-absorption region of ventral skin of several semiterrestrial and aquatic anuran amphibians identified by aquaporins. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 299(5), R1150-R1162.
- 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.
- O'Neil, L., Paynter, S. J., Fuller, B. J., & Shaw, R. W. (1997). Vitrification of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. *Cryobiology*, 34(3), 295-301.
- O'neil, L., Paynter, S. J., Fuller, B. J., Shaw, R. W., & DeVries, A. L. (1998). Vittrification of mature mouse oocytes in a 6 M Me2SO solution supplemented with antifreeze glycoproteins: the effect of temperature. *Cryobiology*, 37(1), 59-66.
- Onur, E., Tuğrul, B., & Bozyiğit, F. (2009). DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 7(2), 61-70.
- Özeti, N., & Yılmaz, İ. (1994). Türkiye amfibileri. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi*, 151, 221.

- Padilla P A, Ladage M L. (2012). Suspended animation, diapause and quiescence: Arresting the cell cycle in *C. elegans*, *Cell Cycle*, 11, 1672–1679.
- Padilla, P. A., & Ladage, M. L. (2012). Suspended animation, diapause and quiescence: arresting the cell cycle in *C. elegans*. *Cell cycle*, 11(9), 1672-1679.
- Pallas, D. I. (1971). Eine Differenzierung unter den himmlischen Ordnungen (ikonographische Analyse).
- Pandey, S., Wu, L., Guru, S. M., & Buyya, R. (2010, April). A particle swarm optimization-based heuristic for scheduling workflow applications in cloud computing environments. In *2010 24th IEEE international conference on advanced information networking and applications* (pp. 400-407). IEEE.
- Payne, J. A., Miller, G., Johnson, G. P., & Senter, S. D. (1994). *Castanea pumila* (L.) Mill.: an underused native nut tree. *HortScience*, 29(2), 62-131.
- Payne, S. R., & Young, O. A. (1995). Effects of pre-slaughter administration of antifreeze proteins on frozen meat quality. *Meat Science*, 41(2), 147-155.
- 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.
- Pegg, A. E., & Byers, T. L. (1992). Repair of DNA containing O6-alkylguanine. *The FASEB journal*, 6(6), 2302-2310.
- Pegg, D. E. (2002). The history and principles of cryopreservation. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 20, No. 01, pp. 005-014). Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662.
- Pentelute, B. L., Gates, Z. P., Tereshko, V., Dashnau, J. L., Vanderkooi, J. M., Kossiakoff, A. A., & Kent, S. B. (2008). X-ray structure of snow flea antifreeze protein determined by racemic crystallization of synthetic protein enantiomers. *Journal of the American Chemical Society*, 130(30), 9695-9701.
- Perfeldt, C. M., Chua, P. C., Daraboina, N., Friis, D., Kristiansen, E., Ramløv, H., ... & von Solms, N. (2014). Inhibition of gas hydrate nucleation and growth: efficacy of an

- antifreeze protein from the longhorn beetle *Rhagium mordax*. *Energy & fuels*, 28(6), 3666-3672.
- Pessin, J. E., & Bell, G. I. (1992). Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annual review of physiology*, 54, 911-930.
- Pham, L. D. T. (1999). *Antifreeze protein modified ice crystallization in cryosurgery*. University of California, Berkeley.
- Philip, B. N., & Lee Jr, R. E. (2010). Changes in abundance of aquaporin-like proteins occurs concomitantly with seasonal acquisition of freeze tolerance in the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *Journal of Insect Physiology*, 56(7), 679-685.
- Philip, B. N., Yi, S. X., Elnitsky, M. A., & Lee Jr, R. E. (2008). Aquaporins play a role in desiccation and freeze tolerance in larvae of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *Journal of Experimental Biology*, 211(7), 1114-1119.
- Pincheira-Donoso D, Bauer A M, Meiri S, Uetz P. (2013). Global Taxonomic Diversity of Living Reptiles, *PLoS ONE*, 8, e59741.
- Plötner, J. (2005). *Die westpaläarktischen Wasserfrösche: von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation*. Bielefeld: Laurenti.
- Podrabsky, J. E., & Culpepper, K. M. (2012). Cell cycle regulation during development and dormancy in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Cell Cycle*, 11(9), 1697-1704.
- Qian, B. (2021). Molecular Characterization and mRNA Expression of ISP2 and ISP4 in the Large Yellow Croaker (*Larimichthys Crocea*) Under Acute Cold Stress.
- Qureshi, I. A., & Mehler, M. F. (2012). Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(8), 528-541.
- Ramesh, K. S., Ananthanarayanan, V. S., & Rao, N. A. (1981). Allosteric serine hydroxymethyltransferase from monkey liver: temperature induced conformational transitions. *Journal of Biosciences*, 3(2), 179-190.
- Ramløv, H., & Friis, D. S. (2020). Ice formation in living organisms. In *Antifreeze Proteins Volume 1* (pp. 53-82). Springer, Cham.
- Ramløv, H., & Friis, D. S. (2020). *Antifreeze Proteins Volume 2*. Springer International Publishing.
- Ramløv, H., & Friis, D. S. (Eds.). (2020). *Antifreeze Proteins Volume 1: Environment, Systematics and Evolution*. Springer Nature.

- Rao, S. M., & Reddy, J. K. (1987). Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 8(5), 631-636.
- Rastaldo, R., Pagliaro, P., Cappello, S., Penna, C., Mancardi, D., Westerhof, N., & Losano, G. (2007). Nitric oxide and cardiac function. *Life sciences*, 81(10), 779-793.
- 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, .
- Raymond, J. A. (1989). Freezing resistance in some northern populations of Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(12), 2104-2107.
- Raymond, J. A., Wilson, P., & DeVries, A. L. (1989). Inhibition of growth of nonbasal planes in ice by fish antifreezes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(3), 881-885.
- 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.
- 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(3), 297-309.
- Rinehart, J. P., Li, A., Yocum, G. D., Robich, R. M., Hayward, S. A., & Denlinger, D. L. (2007). Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11130-11137.
- Rinehart, J. P., Robich, R. M., & Denlinger, D. L. (2010). Isolation of diapause-regulated genes from the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis* by suppressive subtractive hybridization. *Journal of Insect Physiology*, 56(6), 603-609.
- 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.

- Rosendale, A. J., Costanzo, J. P., & Lee Jr, R. E. (2012). Seasonal variation and response to osmotic challenge in urea transporter expression in the dehydration-and freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 317(7), 401-409.
- Roy P, Goswami P. (2019). Freeze tolerance in wood frogs, *Journal of Investigative Genomics*, 6, 1–4.
- Roy, P., & Goswami, P. (2019). Freeze tolerance in wood frogs. *J Investig Genomics*, 6(1), 1-4.
- 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, .
- 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, 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, 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.
- Rubinsky, B. (1992). The process of freezing and the mechanism of damage during cryosurgery. In *Cryotherapy in chest medicine* (pp. 7-18). Springer, Paris.
- Rubinsky, B., & Eto, T. K. (1990). Heat transfer during freezing of biological materials. *Annual Review of Heat Transfer*, 3.
- Russell, E. L., & Storey, K. B. (1995). Anoxia and freezing exposures stimulate covalent modification of enzymes of carbohydrate metabolism in *Littorina littorea*. *Journal of Comparative Physiology B*, 165(2), 132-142.
- Sakagami, S. F., Tanno, K., Tsutsui, H., & Honma, K. (1985). The role of cocoons in overwintering of the soybean pod borer *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 240-247.
- Sally, O. Y., 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(3), 327-334.
- Schmid W D. (1982). Survival of Frogs in Low Temperature, *Science*, 215, 697–698.
- Schmid, W. D. (1982). Survival of frogs in low temperature. *Science*, 215(4533), 697-698.

- Schneider, P., & Tschopp, J. (2000). Apoptosis induced by death receptors. *Pharmacochimistry library*, 31, 281-286.
- Schüttert, J. B., Fiedler, G. M., Grupp, C., Blaschke, S., & Grunewald, R. W. (2002). Sorbitol transport in rat renal inner medullary interstitial cells. *Kidney international*, 61(4), 1407-1415.
- Shaffer, L. G., McGowan-Jordan, J., & Schmid, M. (Eds.). (2013). *ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013)*. Karger Medical and Scientific Publishers.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.
- 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.
- 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(2), 292-302.
- Sinsch, U., & Schneider, H. (1999). Taxonomic reassessment of Middle Eastern water frogs: Morphological variation among populations considered as *Rana ridibunda*, *R. bedriagae* or *R. levantina*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 37(2), 67-74.
- Skelly, D. K., & Freidenburg, L. K. (2000). Effects of beaver on the thermal biology of an amphibian. *Ecology Letters*, 3(6), 483-486.
- Solms, M. (2000). Dreaming and REM sleep are controlled by different brain mechanisms. *Behavioral and Brain Sciences*, 23(6), 843-850.
- Sømme, L. (1982). Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 73(4), 519-543.
- Sorokin, A. V., Kim, E. R., & Ovchinnikov, L. P. (2007). Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Moscow)*, 72(13), 1439-1457.

- 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.
- 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. (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. (2004). Strategies for exploration of freeze responsive gene expression: advances in vertebrate freeze tolerance, *Cryobiology*, 48, 134–145.
- Storey K B. (2006). Reptile Freeze Tolerance: Metabolism and Gene Expression, *Cryobiology*, 52, 1–16.
- 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. (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, 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, 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, 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*, 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*, 57.
- 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.
- 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, 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(7), 392-402.
- Storey, J. M., Wu, S., & Storey, K. B. (2021). Mitochondria and the frozen frog. *Antioxidants*, 10(4), 543.

- Storey, K. B., & Storey, J. M. (1996). Natural freezing survival in animals. *Annual review of ecology and systematics*, 365-386.
- 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, 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.
- 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. (2011). *Expression pattern of the novel freeze-responsive genes li16, fr10 and fr47 in the wood frog, Rana sylvatica* (Doctoral dissertation, Carleton University).
- Sullivan, K. T., Piekielek, N. W., Wu, C., Chowdhury, S., Kelly, S. T., Hufnagel, T. C., ... & Zachariah, M. R. (2012). Reactive sintering: An important component in the combustion of nanocomposite thermites. *Combustion and Flame*, 159(1), 2-15.
- Sun, Y., Maltseva, D., Liu, J., Hooker, T., Mailänder, V., Ramløv, H., ... & Meister, K. (2022). Ice Recrystallization Inhibition Is Insufficient to Explain Cryopreservation Abilities of Antifreeze Proteins. *Biomacromolecules*, 23(3), 1214-1220.
- Suzuki, M., & Tanaka, S. (2009). Molecular and cellular regulation of water homeostasis in anuran amphibians by aquaporins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153(3), 231-241.
- Taborsky, G. (1979). Protein alterations at low temperatures: An overview.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Liu, X., Rosales-Corral, S. A., Acuna-Castroviejo, D., & Reiter, R. J. (2013). Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *Journal of pineal research*, 54(2), 127-138.
- 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.
- Tas, R. P., Hendrix, M. M., & Voets, I. K. (2022). Direct evidence for pinning of single, ice-bound antifreeze proteins by subzero nanoscopy. *bioRxiv*.

- 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.
- Valbona A. (2013). Physiological Response to Freezing In Pool Frog *Pelophylax lessonae* (Camerano,1882), p. 1–7.
- 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, 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, 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.
- 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, 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.

- 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.
- 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.
- Wharton, D. A. (2011). Cold tolerance of New Zealand alpine insects. *Journal of Insect Physiology*, 57(8), 1090-1095.
- 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.
- 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.
- 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.
- Yeh, Y., & Feeney, R. E. (1996). Antifreeze proteins: structures and mechanisms of function. *Chemical reviews*, 96(2), 601-618.
- Yeh, Y., Feeney, R. E., McKown, R. L., & Warren, C. J. (1994). Measurement of grain growth in the recrystallization of rapidly frozen solutions of antifreeze glycoproteins. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 34(11), 1495-1504.

- 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.
- Yoldas, T., & Erismis, U. C. (2021). Response of Anatolian mountain frogs (*Rana macrocnemis* and *Rana holtzi*) to freezing, anoxia, and dehydration: Glucose as a cryoprotectant. *Cryobiology*, 98, 96-102.
- Yoldas, T., & Erismis, U. C. (2021). Response of Anatolian mountain frogs (*Rana macrocnemis* and *Rana holtzi*) to freezing, anoxia, and dehydration: Glucose as a cryoprotectant. *Cryobiology*, 98, 96-102.
- Yoldaş, T. (2021). Anadolu dağ kurbağalarının kriyobiyojisi üzerine araştırmalar.
- Yu, H., Zheng, H., Liu, Y., Yang, Q., Li, W., Zhang, Y., & Fu, F. (2021). Antifreeze protein from *Ammopiptanthus nanus* functions in temperature-stress through domain A. *Scientific reports*, 11(1), 1-10.
- 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,
- Zhmakin, A. I. (Ed.). (2009). *Fundamentals of cryobiology: physical phenomena and mathematical models*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.