



**BEYŞEHİR KURBAĞASI (*PELOPHYLAX
CARALITANUS*) ÜZERİNE
KRİYOBİYOLOJİK ARAŞTIRMALAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Muhammed Balı

Danışman

Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

AFYONKARAHİSAR

Şubat 2023

Bu tez çalışması 20.FEN.BIL.17 numaralı proje ile Afyon Kocatepe
Üniversitesi BAPK tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BEYŞEHİR KURBAĞASI (*PELOPHYLAX*
CARALITANUS) ÜZERİNE
KRİYOBİYOLOJİK ARAŞTIRMALAR**

Muhammed BALI

Danışman

Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK
ANABİLİM DALI

Şubat 2023

TEZ ONAY SAYFASI

Muhammed Balı tarafından hazırlanan “Beyşehir Kurbağası (*Pelophylax caralitanus*) Üzerine Kriyobiyolojik Araştırmalar” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 16 / 02 / 2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

Başkan : Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Dr. Öğrt. Grv.Taner YOLDAŞ
Düzce Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar
Uygulama ve Araştırma Merkezi

Üye : Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
..... /..... /..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. İbrahim EROL

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen 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.**

16/02/2023

Muhammed BALI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BEYŞEHİR KURBAĞASI (*PELOPHYLAX CARALITANUS*)

ÜZERİNE

KRİYOBİYOLOJİK ARAŞTIRMALAR

Muhammed Balı

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Uğur Cengiz Erişmiş

Bu araştırmada, Ova kurbağalarından ve Türkiye’de endemik olarak yaşayan *Pelophylax caralitanus* türünün, kış döneminde maruz kaldıkları donma derecesindeki sıcaklıklarda hayatta kalmasını ve bu düşük sıcaklık maruziyetine karşı hayatta kalma stratejisi araştırılmıştır. Bu araştırmada, *P. caralitanus* türüne ait bireylerin dehidrasyon, donma ve anoksi koşullarıyla karşılaştığında; kriyoprotektan olarak görev yapan glikozun kan, karaciğer ve iskelet kası dokularındaki seviyeleri, karaciğer ve iskelet kası dokularındaki su miktarı, bireylerin soğuk maruziyeti öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarındaki değişiklikler ve amfibilere özgü antifriz proteinlerin (AFP’ler; FR10, Fr47 ve Li16) transkript ekspresyon seviyeleri incelendi.

Soğuk stresi esnasında *P. caralitanus*’un kanında bulunan glikoz seviyesi 2,32 kat ($2,01 \text{ mL}^{-1}$ ’den $4,66 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ’ye) artış göstermiştir. Kanda bulunan glikoz düzeyi, oksijensizlik stresi altında ($1,98 \mu\text{mol mL}^{-1}$) ve dehidratasyon stresi altında ise ($1,28 \mu\text{mol mL}^{-1}$) artış göstererek stres koşullarına karşı cevap verdiği tespit edildi. Donma stresi sonrası karaciğer dokusundaki glikoz seviyesi 6,2 kat, dehidrasyon stresi sonrası 5,01 kat ve anoksia stresi sonrası ise 2,9 kat artış göstermiştir.

Tüm stres ve yeniden normale gruplarındaki bireylerden alınan kan örneklerinde fr47 genin ifadesi yukarı yönde düzenlendiği tespit edildi. Donma grubunda bulunan bireylerde fr47 geninin ifadesi 1,52 kat, çözünme grubunda bulunan bireylerde 1,71 kat, dehidrasyon grubundaki bireylerde 1,37 kat, rehidrasyon grubundaki bireylerde 1,19 kat, anoksia grubundaki bireylerde 0,773 kat, reoksia grubundaki bireylerde ise fr47 geninin ifadesi 0,381 kat yukarı yönde artış göstermiştir.

Çalışmamızın sonucu olarak Afyonkarahisar Eber Gölü ve çevresinden yakalanan endemik *Pelophylax caralitanus* türünün, sert sayılabilecek 0 °C' nin altında kış koşullarında hayatta kalabildiğini ve bu hayatta kalımı sağlayan en büyük etkenin, bir kriyoprotektan olan glikozun ve amfibilere özgü antifriz proteinlerinin (AFP) bireylerde mevcut olmasından dolayı olduğu tespit edilmiştir. AFP'lerin genomik, transkriptomik ve proteomik araştırmalarının biyoinformatiği üstüne yoğunlaşılmasını sayesinde, AFP'lerin buz kristallerine bağlanma ve test etme mekanizmalarının aydınlatılmasının sağlanacaktır. Bu sayede günümüz biyoteknolojisi ve uzay teknolojisi alanında faydalı gelişmeler sağlanacaktır.

2023, xiv + 89 sayfa

Anahtar Kelimeler: Donma toleransı, Kriyobiyojoloji, Beyşehir kurbağası, Glikoz, Antifriz proteinler, Biyoinformatik.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

RESEARCH ON THE CRYOBIOLOGY OF THE BEYŞEHİR FROG (*PELOPHYLAX CARALITANUS*)

Muhammed Balı

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

In this study, the survival of plain frogs and *Pelophylax caralitanus*, which is endemic in Turkey, in freezing temperatures during winter and their survival strategy against this low temperature exposure were investigated. In this study, when individuals belonging to the *P. caralitanus* species encountered dehydration, freezing, and anoxia conditions, the levels of glucose acting as a cryoprotectant in the blood, liver, and skeletal muscle tissues, and the amount of water in the liver and skeletal muscle tissues, before cold exposure of individuals Changes in body weights and transcript expression levels of amphibian-specific antifreeze proteins (AFPs; FR10, Fr47, and Li16) were examined.

During cold stress, the glucose level in the blood of *P. caralitanus* increased by a factor of 2.32 (from 2.01 mL⁻¹ to 4.66 mol mL⁻¹). It was determined that the glucose level in the blood increased under anaerobic stress (1.98 mol mL⁻¹) and under dehydration stress (1.28 mol mL⁻¹) and responded to stress conditions. The glucose level in the liver tissue increased 6.2 times after freezing stress, 5.01 times after dehydration stress, and 2.9 times after anoxia stress.

It was determined that the expression of the fr47 gene was upregulated in blood samples taken from individuals in all stress and re-normalization groups. Expression of the fr47

gene in individuals in the freezing group is 1.52 times, in individuals in the thawing group 1.71 times, in individuals in the dehydration group 1.37 times, in individuals in the rehydration group 1.19 times, in individuals in the anoxia group 0.773 times, in individuals in the reoxia group the expression of the fr47 gene It increased 0.381 times upwards. As a result of our study, it was found that the endemic *Pelophylax caralitanus*, which was caught in Afyonkarahisar Eber Lake and its surroundings, can survive in winter conditions below 0 °C, which can be considered harsh, and that the biggest factors that ensure this survival are glucose, a cryoprotectant, and amphibian-specific. It has been determined that antifreeze proteins (AFP) are present in individuals. Concentrating on the bioinformatics of genomic, transcriptomic, and proteomic research of AFPs will help elucidate the mechanisms by which AFPs bind to ice crystals and test them. In this way, beneficial developments will be achieved in the fields of today's biotechnology and space technology.

2023, xiv + 89 pages

Key Words: Freeze tolerance, Cryobiology, Beyşehir frog, Glucose, Antifreeze proteins, Bioinformatics.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarında dolayı ve lisans srecimden bu yana maddi ve manevi her konuda arkamda duran danışmanım Prof. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ'e, araştırma ve laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteğini esirgemeyen Düzce niversitesi Öğr. Gör. Taner YOLDAŞ ve Öğr. Gör. Pınar Ağyar YOLDAŞ'a teşekkür ederim. Tez alışmama 20.FEN.BIL.17 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, hayatımın her döneminde benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen tüm aileme ayrıca teşekkür ederim.

Muhammed BALI

Afyonkarahisar 2023

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÇALIŞMALARI	5
2.1 Ekstrem Sıcaklıklarda Yaşam Sürdürme	5
2.1.1 Donma Durumundan Kaçınma Davranışı	6
2.1.2 Donmayı Tolare Etme	7
2.1.3 Buz Çekirdeklenmesi	8
2.2 Donma Durumu ve Yeniden Normalleşme Süreci	8
2.2.1 Donma Stresi	8
2.2.2 Dehidrasyon Stresi	9
2.2.3 Anoksi Stresi	10
2.2.4 Metabolit Biriktirme	11
2.3 Donma Toleransı Adaptasyonları	13
2.3.1 Hipometabolizma	13
2.3.2 Hipometabolizma Durumunda Yer Alan Gen Düzenlemeleri	14
2.3.2.1 miRNA (Mikro RNA) Genlerinin Düzenlenmesi	15
2.3.2.2 Tersinir Protein Fosforilasyonu	16

2.3.3 Hücre Siklusunun Kontrolü	16
2.3.4 Hücre Sinyal İletiminin Düzenlenmesi	17
2.3.5 Antioksidan Savunma	18
2.3.6 Kriyoprotektan Birikimi	19
2.3.6.1 Glikoz	21
2.3.6.2 Gliserol	23
2.3.6.3 Üre	24
2.3.7 Antifreeze Proteinleri	24
2.3.7.1 Antifreeze Proteinleri ve Biyoteknolojide Kullanımı	28
2.3.7.2 Li16	28
2.3.7.3 Fr10	29
2.3.7.4 Fr47	30
2.4 <i>Pelophylax Caralitanus</i>	31
2.4.1 Beyşehir Kurbağasının Ülkemizdeki Yayılış Alanı	32
3. MATERYAL ve METOD	33
3.1 Saha Çalışmaları ve Deney Grupları	33
3.2. Deney Koşulları	36
3.2.1 Donma Stresi ve Çözünme Grubu	37
3.2.2 Dehidrasyon Stresi ve Rehidratasyon Grubu	39
3.2.3 Anoksi Stresi ve Reoksi Grubu	40
3.3 Kurbağalardan Doku Örneklerinin Alınması	40
3.4 Vücut Ağırlıklarının ve Dokulardaki Su Miktarlarının Ölçümü	41
3.5 Dokulardan Glikoz Seviyesinin Belirlenmesi	42
3.6 Antifriz Proteinlerinin Gen İfadeleri	43
3.6.1 Dokulardan Total RNA İzolasyonu ve Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	43

3.6.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları	45
3.6.3 Değerlendirme	47
3.6.3.1 $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ Metodu ile Hesaplama	47
3.7 İstatistiksel olarak hesaplama	58
4. BULGULAR	49
4.1 Sahadan Örnek Toplama Çalışması	49
4.2 Soğuk Stresi ve Bireyleri Hayatta Kalma Stratejisi	50
4.3 Bireylerdeki Ağırlık Değişimleri ve Dokularındaki Nem Miktarı	52
4.4 Glikoz Ölçümleri	54
4.5 Gen İfadesi Sonuçları	57
4.5.1 Antifreeze Proteinlerini İfade Eden Genlerin Düzenlenmesi	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	61
5.1 Donma Stresi Durumu ve Yeniden Normal Hale Gelinmede Bireylerin Fizyolojik Tepkileri	62
5.2 Bireylerin Vücut Ağırlıkları ve Dokularında Bulunan Su Miktarları	63
5.3 Kriyoprotektan Olarak Görev Alan Glikoz Seviyesi	63
5.4 Amfibilerde Bulunan Antifreeze Proteinleri ve Gen Ekspresyon Seviyeleri	64
5.5 Sonuç	66
6. KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	89

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µg	mikrogram
µl	mikrolitre
µmol	mikromolar
°C	Santigrat derece
ΔC _τ	Ct değerleri arasındaki fark
ΔΔC _τ	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
AMP	Adenozin monofosfat
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
KOH	Potasyum hidroksit
LC	Asgari Endişe
LC MS	Sıvı kromatografisi Kütle Spektrometre
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MS/MS	Tandem kütle spektrometresi
NT	Nesli Tehdit Altına Girmeye Yakın
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PhK	Glikojen fosforilaz kinaz
PKA	Protein kinaz A

Kısaltmalar (Devam)

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



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Hücrenin AFP varlığında ve yokluğunda donma maruziyetinin sonuçlarının şematik gösterimi	8
Şekil 2.2 Soğuk stresinde korunan ve korunmayan hücreler.....	9
Şekil 2.3 <i>R. macrocnemis</i> 'in 4 ile -2,5°C arasındaki donma ve çözünme döngüsünün şematik gösterimi	12
Şekil 2.4 C dk ve siklin çiftlerini gösteren hücre döngüsünün aşamaları	18
Şekil 2.5 Glikojen metabolizmasının kontrolü ve glikoz homeostazının moleküler mekanizmaları	21
Şekil 2.6 Omurgalı metabolizmasının özeti	21
Şekil 2.7 Glikojenoliz süreci	22
Şekil 2.8 Karaciğer, kas ve kan dokusunda glikoz döngüsü ve taşınma süreci	23
Şekil 2.9 Termal Histerizis tablosu	26
Şekil 2.10 AFP 'nin buz kristali yüzeyine bağlanması	27
Şekil 3.1 Beyşehir kurbağasının toplanma bölgesinin harita görüntüsü	34
Şekil 4.1 Ağustos Ayı günlük sıcaklık verileri	49
Şekil 4.2 Eylül Ayı günlük sıcaklık verileri	49
Şekil 4.3 Donma stresi altındaki bireyin datalogger verileri	52
Şekil 4.4 <i>P.caralitanus</i> ' un stres koşulları uygulanmadan önceki ve stres koşulları uygulandıktan sonraki vücut ağırlığındaki değişim.....	53
Şekil 4.5 <i>P.caralitanus</i> ' un stres koşulları uygulanmadan önceki ve stres koşulları uygulandıktan sonraki dokulardaki su miktarlarındaki değişim.....	54
Şekil 4.6 Stres grupları ve kontrol grubu kanlarında bulunan glikoz miktarları	55
Şekil 4.7 Stres grupları ve kontrol grubu karaciğerlerinde bulunan glikoz miktarları..	56
Şekil 4.8 Stres grupları ve kontrol grubu kas dokusunda bulunan glikoz miktarları	56

Şekil 4.9 Kandan ölçülen antifreeze genlerinin ifade seviyelerindeki değişim	58
Şekil 4.10 Kas dokusundan ölçülen antifreeze genlerinin ifade seviyelerindeki değişim	59
Şekil 4.11 Karaciğer dokusundan ölçülen antifreeze genlerinin ifade seviyelerindeki değişim	60



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Doğal iklim koşulları altında canlı hayvanlarda donma toleransı olgusu.....	7
Çizelge 2.2. <i>Pelophylax caralitanus</i> ' un taksonomisi	31
Çizelge 3.1 <i>P. caralitanus</i> türü için kullanılan maruziyet grupları çizelgesi	36
Çizelge 3.2 RT-qPCR reaksiyon karışım oranları ve real time PCR döngü koşulları	46
Çizelge 3.3 α -tubulin, <i>fr47</i> , <i>li 16</i> ve <i>fr10</i> gen bölgelerine ait primerler.....	47
Çizelge 4.1 Vücut ağırlıkları ve taze dokudaki su miktarları	54

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 2.1 <i>P.caralitanus</i> yayılış alanı	32
Resim 3.1 Metamorfozunu tamamlamış yavru bireylerin toplama alanları	34
Resim 3.2 Yetişkin bireylerin toplama alanları	35
Resim 3.3 Saha çalışmalarında toplanan <i>P. caralitanus</i> türüne ait bireyler	35
Resim 3.4 Tüm bireylerin deney koşullarına maruz bırakılmadan önce SVL ölçümlerinin yapılması	37
Resim 3.5 Tüm bireylerin deney koşullarına maruz bırakılmadan önce boş kutuların dara ağırlığı alınarak net ağırlık ölçümünün yapılması	37
Resim 3.6 Donma stresi için hazırlık ve devamında donma stresinin başlatılması	39
Resim 3.7 Dehidrasyon stresi için hazırlık ve devamında dehidrasyon stresinin başlatılması	39
Resim 3.8 Anoksi stresinin uygulanması	40
Resim 3.9 Stres koşullarına maruz kalmış hayvanlardan kan ve doku örneklerinin alınması	41
Resim 3.10 Stres koşullarına maruz kalmış hayvanlardan alınan kan, karaciğer ve kas dokularından yapılan glikoz tayini	43
Resim 3.11 Total RNA izolasyonu basamağına ait görüntüler	44
Resim 3.12 Ters transkriptaz ve cDNA sentezine ait görüntüler	45
Resim 3.13 RT-qPCR çalışmasına ait görüntüler	46
Resim 4.1 Donma stresi sonrası gözlerin opaklaşması ve çözülme durumu	50
Resim 4.2 Donma stresi sonrası bireylerde strese bağlı değişikliklerin görüntüleri	51

1. GİRİŞ

Dünya, üzerindeki farklı bölgelerde, çok çeşitli iklim koşullarına ev sahipliği yapmaktadır. Aynı zamanda tek bir bölge, yıl içerisinde farklı zamanlarda, farklı iklim koşulları sergileyebilir. Farklı bölgelerdeki değişen bu iklim koşullarında yaşayan canlılar, buldukları çevresel koşullarda yaşayabilmek için farklılaşan bu koşullara uyum sağlarlar. Bazı durumlarda ise canlılar, yıllık mevsimsel değişimlere bağlı olarak, yaşamları için daha elverişli olan bölgelere göç edebilir. Göç hareketi; kuş, memeli, balık, sürüngen, amfibi, böcek ve deniz omurgasızları gibi birçok farklı sınıfa ait türlerde bağımsız olarak evrimleşmiştir (Thomas Alerstam, 2003). Yıl içerisinde değişen mevsimsel koşullara bağlı olarak göç eden bazı türlerin aksine göç etmeyen türler, yıl içerisinde değişen bu ortam koşullarında hayatta kalabilmek amacıyla farklı uyum mekanizmalar geliştirmiştir.

Farklılaşan iklim koşulları; canlıların morfolojileri, diyetleri, gelişim süreçleri ve üreme davranışları, gibi birtakım faktörler açısından önemli bir etkiye sahiptir. İklimle bağlı olarak değişen sıcaklık, soğukkanlı canlı türleri için oldukça önemli bir etkiye sahiptir. Değişkenlik gösteren bu sıcaklık seviyelerine rağmen birçok omurgasız ve bazı soğukkanlı omurgalı canlı türleri ekstrem sayılabilecek soğuk / sıcak şartlar altında yaşamlarını sürdürmeyi başarabilirler. Bu türler kendilerini ekstrem sıcak koşulların ya da ekstrem soğuk koşulların vereceği zararlardan koruyabilmek adına birtakım stratejiler geliştirmiştir. Geliştirilen bu stratejiler bireyin fizyolojisinde ve davranışlarında birtakım değişikliklere sebep olarak türün neslinin hayatta kalmasını ve evrimsel süreçte neslini devam ettirmesini sağlar (Yoldaş ve Erişmiş 2021).

Sıcak iklimlerde yaşayan ekzotermik canlılarda uzun süreli soğuğa maruz kalma, endotermik hayvanlara göre daha tehlikelidir. Birçok soğukkanlı organizma göç etme yeteneğine sahip olmadığından, donmaya karşı savunma mekanizması geliştirmeye yatkın olmalıdırlar (Gökmen, 2022). Karadaki termofilik kurbağalar vücut sıcaklıklarını ortam sıcaklığına göre artıramazlar, bu nedenle metabolizma hızlarını azaltmak mecburiyetindedirler. (Pincheira Donoso vd., 2013; Green, 2017). Donma sıcaklıklarında yaşayan bireylerin 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 bilinen düşük moleküler ağırlıklı karbonhidratları biriktirir (Ultsch, 2006; Green, 2017). Organizmanın donma noktasını çevresel koşullara göre ayarlamasını sağlamak için vücutta antifriz metabolitleri ve proteinleri biriktirirler (Kelleher vd, 1987; Green, 2017). Doğada donma toleransı söz konusu olduğunda vücut suyunun %50'si ile %65'i oranında hücre dışı buz olarak birikmesinden de anlaşılacağı 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 çözülmesi nedeniyle su hücrelere girmeye çalıştığında oluşan ozmotik basınç şeklinde sıralanmaktadır. (McNally vd., 2003; Sullivan, 2008; Sullivan, 2011 Yoldaş ve Erişmiş 2021, Yoldaş ve Erişmiş 2022).

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). Glikoz ve benzeri bazı karbonhidrat bileşikleri sahip oldukları düşük molekül ağırlıkları sebebiyle organizma tarafından kriyoprotektan görevinde kullanılabilir. Bu karbonhidratların yüksek miktarlardaki konsantrasyonu, tıpkı tuzlanan yolların buzlanmaması gibi koligatif bir direnç mekanizması sağlayarak, hücrenin

hacmindeki zararlı sayılabilecek küçülmeye karşı direnç gösterir. Aynı zamanda hücrenin içinde oluşabilecek olan buzlanmayı engellemek için yine hücrede bulunan bir takım makro moleküllerin stabilizasyonunu sağlar. (Yoldaş, 2021) Deri, iskelet kası gibi vücudun dış yüzeylerinde bulunan bölgelerin donmasıyla birlikte oluşan buz, yavaş yavaş canlının iç organlarına doğru yayılım gösterir. Üretimi canlının karaciğerinde gerçekleşen ve kanla birlikte vücuda dağılan kriyoprotektanlar sayesinde vücutta oluşan buzlanmanın miktarı azaltılır. Çevresel sıcaklığın düşmesiyle birlikte vücutta buzlanmanın oluşumu sebebiyle kanın vücutta dolaşımının sekteye uğraması, karaciğerde üretimi gerçekleşen bu kriyoprotektanların tüm vücuda dağılımında kesintiler meydana getirir. Dolayısıyla çevresel sıcaklığın düşmesinin hemen akabinde karaciğerdeki glikoz miktarı hızla artar ve kan dolaşımı vasıtasıyla tüm vücuda yayılır (Storey ve Storey, 2005).

Antifriz proteini çalışılan canlılar arasında balıklar en fazla seviyede çalışılan takson olup, bu canlıların AFP'leri; AFP tip 1, AFP tip 2, AFP tip 3 ve AFP tip ve antikoagülan glikoprotein (AFGP) şeklinde sınıflandırılmaktadır (Yıldırım, 2008). Amfibi genleri olan Fr10, Fr47 ve Li16'nın donmaya karşı toleransla ilişkili içerisinde olduğu bilinmektedir ve bu proteinler 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). 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; Yoldaş ve Erişmiş, 2021; Yoldaş ve Erişmiş, 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 bilgilerden yola çıkılarak *P. caralitanus* 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. caralitanus*' un 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.

2. LİTERATÜR ÇALIŞMALARI

2.1 Ekstrem Sıcaklıklarda Yaşam Sürdürme

Farklı stres 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. (HermesLima ve ZentenoSavín, 2002; Robert, 2003; Kontaş Aşkar vd., 2007; Storey ve Storey, 2011; HermesLima vd., 2015; Liu vd., 2018; Wu vd., 2018). 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).

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, denizde yaşayan (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 konsantrasyonu ile 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). Genel olarak, düşük sıcaklık yaralanmaları, metabolik regülasyonun, özellikle çok şiddetli veya uzun süreli olduğundageri dönüşü olmayan ve ölümcül metabolik dengesizliklere yol açan hücresel enerjinin bozulmasından kaynaklanır. Donmadan kaynaklanan yaralanmalar, buz kristallerinin fiziksel hasarını ve yapısal / metabol saf suyun buza dönüşmesini, donma konsantrasyonunun (yeniden muhafaza edilen sıvı bölmelerindeki konsantre çözeltilerin 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 çözeltilerin dakika kanallarında hapsolmuş 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).

2.1.1 Donma Durumundan 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 aşılایıcı 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).

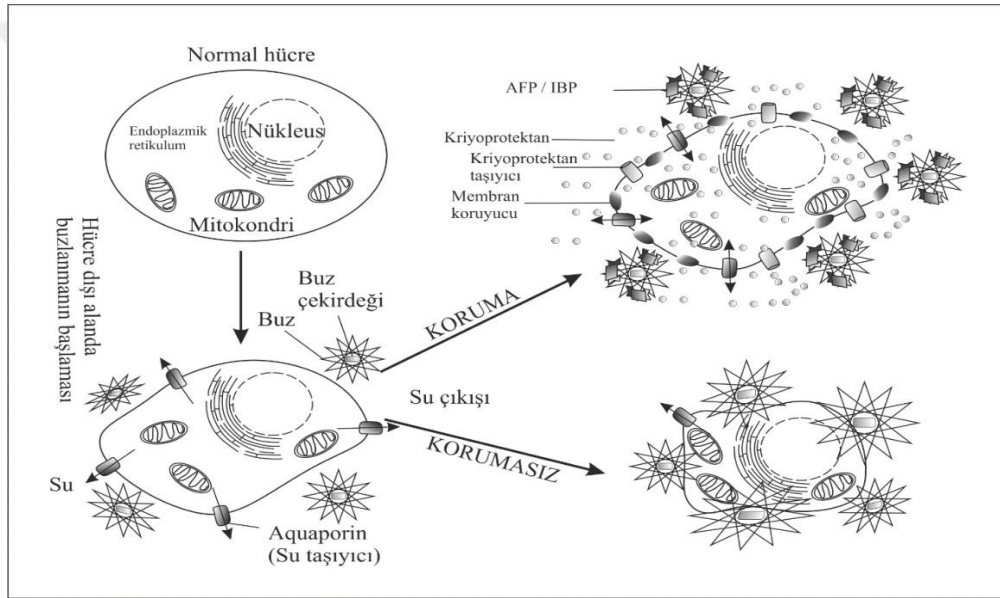
2.1.2 Donmayı Tolare Etme

Storey ve Storey (1988); Doğal iklim koşulları altında canlı hayvanlarda donma toleransı olgusu (Çizelge 2.1), 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 aşılایıcı dondurma meydana gelebilir. Bir kıs 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.

	Gelişmiş Donma Toleransı Olan Türler	Kısmi Donma Toleranslı Türler
Amfibiler	<i>Rana sylvatica</i> (Schmid, 1982) <i>Hyla versicolor</i> (Schmid, 1982) <i>Pseudacris crucifer</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)

Çizelge 2.1 Doğal iklim koşulları altında canlı hayvanlarda donma toleransı olgusu

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 2.2). 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).



Şekil 2.2: Soğuk stresinde korunan ve korunmayan hücreler (Gökmen, 2022).

2.2.2 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 molekül 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 kullanılabilceği öngörölse de omurgalıların bu adaptasyonu kullandığı bilinmemektedir (Costanzo ve Lee, 2013; Green, 2017). 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 %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).

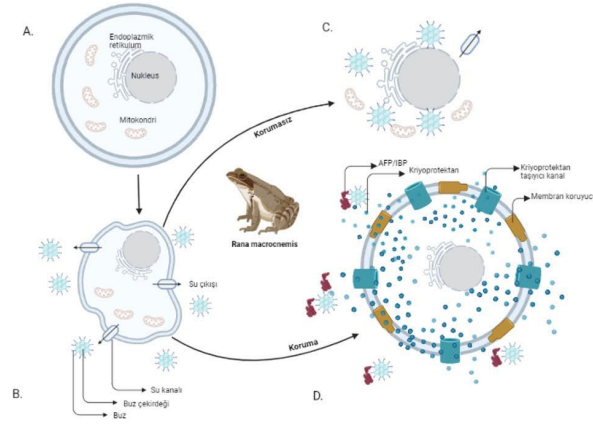
2.2.3 Anoksi Stresi

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 iletmez, bu da biyolojik iletişimin bozulmasına yol açar. (Storey vd., 1992; Rubinsky vd., 1994a; 1994b; 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 dona 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 (Joanisse ve Storey, 1996; Hermes-Lima ve Zenteno-Savín, 2002; Storey ve Storey, 2004; 2017).

Anoksik stres koşulları altında hücreler, asidoz oluşumunu kolay ve yalın hale getirerek, anoksik koşullara özgü gen / protein regülasyonunu aktive eder ve anaerobik adenozin 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 kullanılacakları glikojeni dönüştürerek sağlarlar. (Sullivan ve Storey, 2012; Storey ve Storey, 2017).

2.2.4 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 $\mu\text{mol/L}$) 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 2.3). Tatlı su kaplumbağalarında benzer bir mekanizma tanımlanmıştır. *Chrysemys clipart*, yeryüzündeki ilk kış boyunca kan şekerini 3 kat, gliserol miktarını 3 kat ve aminoasit seviyelerini 2,25 kat artırdı (Costanzo vd.,2000).



Şekil 2.3 *R. macronemis* 4 ile -2,5°C arasındaki donma ve çözünme döngüsünün şematik gösterimi (Yoldaş and Erişmiş 2021).

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 ubiquitin yolağında yer alan genlerin ekspresyonunun arttığı, hücre hasarından sorumlu genlerin ekspresyonunun azaldığı belirlendi (Amaral vd., 2020). 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 buldukları habitatta hayatta kalmaya devam edebilirler (Yoldaş, 2021; Gökmen, 2022).

2.3 Donma Toleransı Adaptasyonları

2.3.1 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). 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 hedeflerdir. 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).

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 sularda 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).

2.3.2 Hipometabolizma Durumunda Yer Alan Gen Düzenlemeleri

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 çözüldüğünde 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). Bununla birlikte, 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.

2.3.2.1 miRNA (Mikro RNA) Genlerinin Düzenlenmesi

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 kurbagalarının 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 oldukçauyumludur (Storey ve Storey, 2007).

2.3.2.2 Tersinir Protein Fosforilasyonu

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 hücreyel sinyalleme kademesinin açma/kapama aktivitesini kontrol eder. Donma toleransı ile ilgili olarak, çok sayıda tersinir fosforilasyon kontrolü örneği belgelenmiştir.

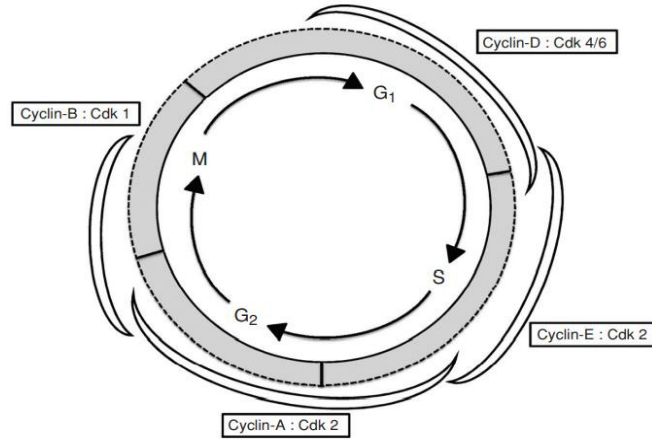
2.3.3 Hücre Siklusunun Kontrolü

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).

2.3.4 Hücre Sinyal İletiminin Düzenlenmesi

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). 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 kurbağalarda 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).



Şekil 2.4. 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 (Gökmen, 2022; Storey ve Storey, 2013).

2.3.5 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 bakırı 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).

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).

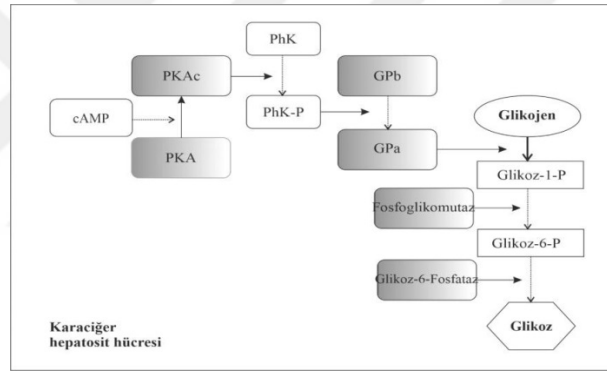
2.3.6 Kriyoprotektan Birikimi

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 dūřüren ve donma ve donma altındaki habitatlarda çeşitli organizmaların hayattakalmasını sağlayan antifriz proteinleri üretirler (DeVries, 1971; DeVries ve Wohlschlag, 1969). Antikoagulan proteinlerin, buz yüzeyini algılayan ve geri dönüşümsüz olarak bağlanan ve böylece daha fazla buz kristali büyümesini önleyen adsorpsiyon inhibisyonuyoluyla hareket ettiği düşünölmektedir (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 bileşikleri, hücre zarları (teraloz ve prolin gibi) ile etkileşime girer ve omurgasızlar tarafından yaygın olarak kullanılır. Bu bileşikler, donma kaynaklı hücre kütleli azalması sırasında zarın iki katmanlı yapısının stabilizasyonunu destekler. Dięer grup, düşük moleküler ağırlıklı kriyoprotektanları içerir. Bu moleküller ortamda yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunda, hücre içi su kaybını sınırlamak ve hücre kütleli en az korunmasını sağlamak için bir topoloji oluştururlar. Çoęu durumda, toplam vücut suyunun kütleli azaltılarak buza dönüştürölür ve kriyotolerant organizmalar, donma sırasında hücrelerinde yeterli kriyoprotektan biriktirir (Storey vd., 1992; 2021).

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).

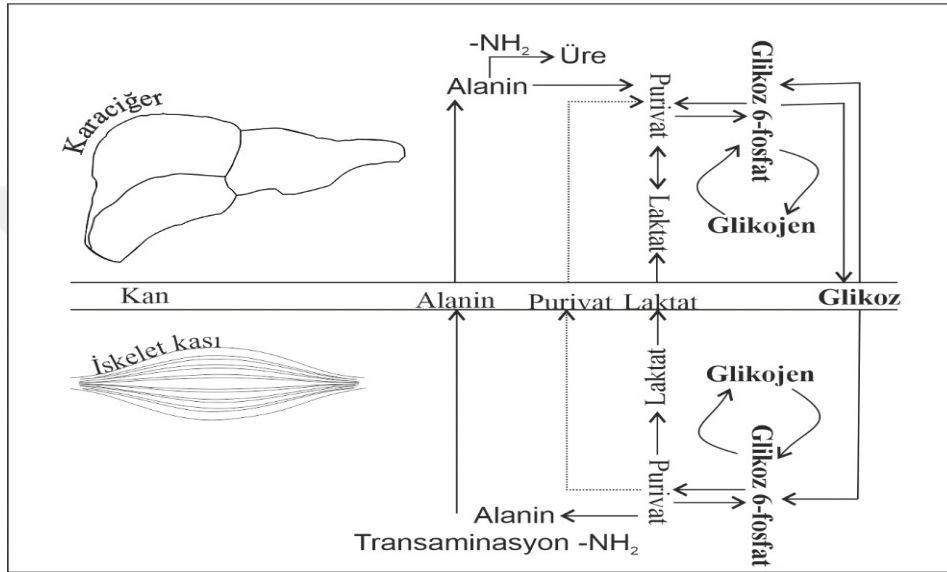
Donmuş kurbağalarda donma aşaması başladığında, hepatosit "beta adrenerjik" uyarımı ile büyük miktarlarda glikoliz sentezi başlatılır ve dondurmanın ilk birkaç dakikasında hızla protein kinaz A'yı (PKA) aktive eder. (Holden ve Storey, 1996; McNally, 2002; Rey vd., 2008, Roy ve Goswami, 2019; Zhang vd., 2020). Dört cAMP (siklik adenosin monofosfat) molekülünün PKA'nın iki düzenleyici alt birimine bağlanması, enzimi aktive ederek, aktif olmayan kuaterner holoenzimin iki katalitik alt birimini (PKAc) serbest bırakır (Taylor vd., 1990; Storey ve Storey, 2004; Dieni vd., 2012; Amaral, 2014; Mattice, 2018). PKA, glikojen fosforilaz kinazın (PhK) fosforilasyonu ve ardından glikojen fosforilazın (GP) fosforilasyonu ile aktive edilir. GP'nin fosforilasyonu, enzimin inaktif formu olan GPb'yi GPa yerine aktif forma çevirerek 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 2.7).



Şekil 2.7 Glikojenoliz süreci (Yoldaş,2021; Gökmen,2022).

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). 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 2.8).



Şekil 2.8: Karaciğer, kas ve kan dokusunda glikoz döngüsü ve taşınma süreci. (Yoldaş, 2021, Gökmen, 2022)

2.3.6.2 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 hücrel hasar açısından glikoza göre daha uygun görünse de, gliserol üretimi daha fazla ATP tüketimi ve daha karmaşık yollar gerektirir (Storey ve Storey, 2017).

2.3.6.3 Üre

Antifiriz molekülü olarak önemli olan üre, pıhtılaşmayı önleyen ve hücre kütlelerini 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 yanıtıdır ve kurak ortamlarda veya aşırı tuzlu çevre koşullarında üre seviyesinin arttığı bilinmektedir (Hillman vd., 2008; Storey ve Storey, 2017). Kurbağalarda buldukları 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 chrysoceles*, 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).

2.3.7 Antifreeze Proteinleri

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 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).

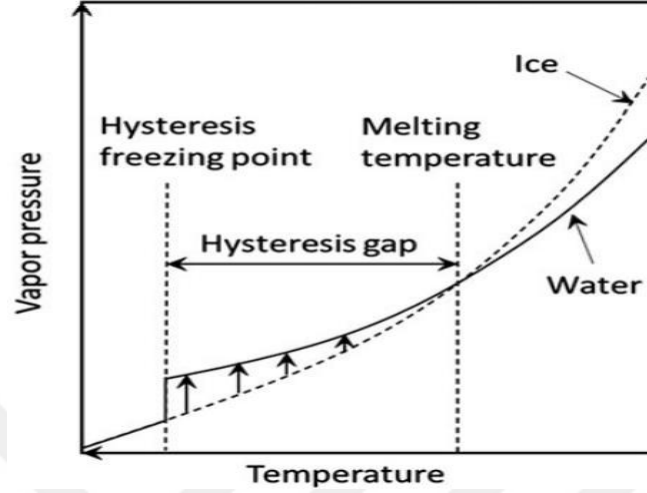
Kriyokoruyucu biyosenteze ek olarak, 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda donmaya toleranslı organizmaların hayatta kalması için başka bir strateji, buz oluşumunu kontrol etmek ve

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).

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 modülatörleri 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 2.9).

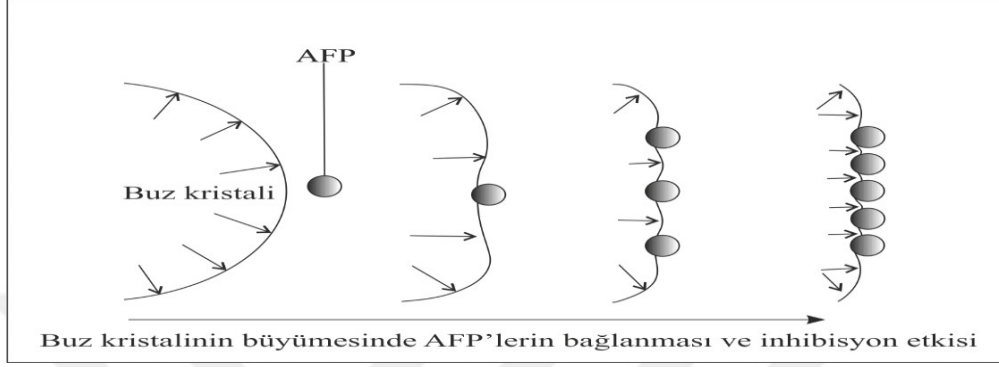


Şekil 2.9: Termal Histerizisde sıcaklık azaldıkça basınç artmalıdır (Ramløv ve Friis, 2020).

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 modülatörleri olarak kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır (Griffith ve Ewart, 1995).

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 2.10). Organizmalarda buzun yeniden kristalleşmesi, büyük buz kristalleri genişledikçe hücrelere ve dokulara zarar verebilir.



Şekil 2.10: AFP 'nin buz kristali yüzeyine bağlanması (Tejo vd., 2020; Yoldaş, 2021; Gökmen 2022)

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.

2.3.7.1 Antifreeze Proteinleri ve Biyoteknolojide Kullanımı

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 toksisiteleri yoktur, bu nedenle kriyojenik uygulamalar için çok daha uygundur. (Duman, 2015; Kim vd., 2017).

2.3.7.2 Li16

İlk olarak *R. sylvatica*'dan izole edilen ve donmuş koşullar altında kırılabilir 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).

2.3.7.3 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 veson 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).

2.3.7.4 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 kurbaçalarda 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 antikoruna 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).

2.4 *Pelophylax Caralitanus*

Türkiye'nin güneybatı Anadolu'daki göller bölgesinde yaşayan endemik bir kurbağa türü olan Anadolu kurbağası ya da Beyşehir kurbağası (*Pelophylax caralitanus*) Ranidae familyasının üyesidir. (Çizelge2.2).

Kingdom (Alem)	Animalia (Hayvanlar)
Phylum (Şube)	Chordata (Kordalılar)
Subphylum (Alt Şube)	Vertebrata (Omurgalılar)
Class (Sınıf)	Amphibia
Order (Takım)	Anura
Suborder (Alt takım)	Neobatrachia
Family (Aile)	Ranidae (Rafinesque 1814)
Genus (Cins)	<i>Pelophylax</i> (Fitzinger 1843)
Species (Tür)	<i>Pelophylax caralitanus</i> (Arıkan 1988)

Çizelge 2.2. *Pelophylax caralitanus*' un taksonomisi

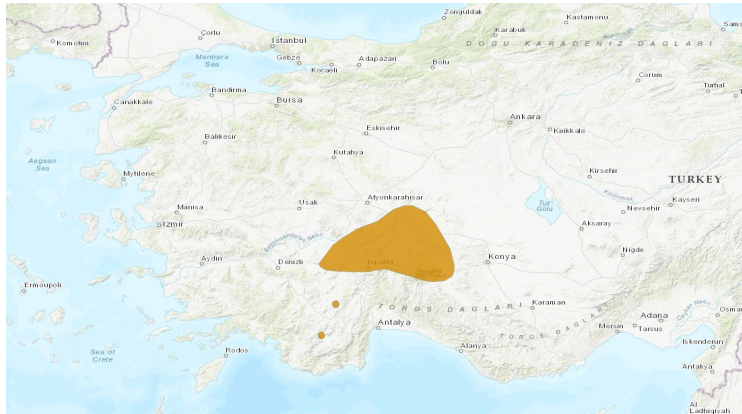
Beyşehir Kurbağasından (*P.caralitanus*) ilk kez 1944 yılında Bodenheimer tarafından *Rana ridibunda ridibunda* olarak bahsedilmiştir. Daha sonrasında ise Arıkan (1988), bireyin karnının rengi ve desenini dikkate alarak bu türü *Rana ridibunda caralitana* olarak farklı bit alt tür statüsünde tanımlamasını yapmıştır. Ancak Beerli ve ark. (1994) *R. r. caralita*'nın yeni bir alt tür olmadığını ve *R. r. caralitana* ile *Rana levantina* türlerinin *Rana (Pelophylax) bedriagae* türünün bir sinonimi olarak görülmesi gerektiğini iddia etmiştir. Daha sonrasında Beyşehir Gölündeki popülasyonda yapılan morfolojik, biyo-akustik ve bunun gibi çalışmalar sayesinde *R.r. caralitana*'nın hem *Pelophylax ridibundus*, hem de *Pelophylax bedriagae*'den farklı bir tür olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak *P.caralitanus* türü, yapılan taksonomik çalışmalarla birlikte yalnızca Konya Platosunda ve Anadolu Göller Bölgesi'nde yayılışı sınırlandırılmış bir endemik tür olarak sınıflandırılmıştır (Arıkan, 1988; Kıraç vd., 2022; Başkale vd., 2017; Başkale, 2012; Başkale vd., 2016; Erişmiş vd., 2019). *Pelophylax caralitanus* Türkiye'nin orta-güney kesiminde yer alan Türkiye Göller Bölgesi'nde yaşayan endemik bir türdür. Bu tür, IUCN Kırmızı Listesi'nde Tehdite Yakın (NT) olarak kategorize edilmiştir ve *P. caralitanus*'un şu anki popülasyon trendi , bu türün nesli tükenme

riskiyle karşı karşıya kalacak şekilde azalmaktadır (IUCN, 2022).

2.4.1 Beyşehir Kurbağasının Ülkemizdeki Yayılış Alanı

Tür ile yapılan çalışmalar sayesinde bu türün Beyşehir gölünün haricinde Eğirdir ve Suğla gölleri ile birlikte Çarşamba Suyu' nun akarsu kollarında yaşadığı tespit edilmiştir (Atatür ve diğ. 1989). Daha sonrasında Arıkan ve diğ. (1994)' nin yaptıkları çalışmaları sayesinde batı tarafında Gölcük (Isparta), doğu tarafında Hotamış Gölü, ve güney tarafında Toroslar'ın eteklerine kadar olan bölgede yaşadığı tespit edilmiştir. Daha sonraki yıllarda yapılmış olan araştırmalar neticesinde bu türün 15 farklı lokalitede daha yaşadığı bulunmuştur. (Ayaz ve diğ. 2006; Düşen ve diğ. 2004; Kaya ve diğ. 2002). Daha sonraki yıllarda yapılmış olan çalışmalarda ise bu türün Burdur, Antalya ve Denizli'de de yaşadığı fark edilmiştir. Türün güncel dağılış haritası Şekil 2.1'de verilmiştir. (ARISOY, 2017)

1.Bor-Niğde, 2.İvriz-Ereğli-Konya, 3.Yağmapınar-Karapınar-Konya, 4.Hotamış Gölü-Konya, 5.Tınaztepe-Seydişehir-Konya, 6.Suğla Gölü-Konya, 7.Derebucak-Konya, 8.Gencek Gölü-Derebucak-Konya, 9.Beyşehir Gölü-Konya (its terra typica), 10.Fele-Şarkıkarağaç-Isparta, 11.Eğirdir Gölü-Isparta, 12.Eber Gölü -Konya, 13.Gölcük Gölü-Isparta, 14.Işıklı Gölü-Denizli, 15.Acıgöl-Denizli, 16.Ağlasun-Burdur, 17.Yazıköy-BurdurGölü-Burdur, 18.Taşkesiği-Korkuteli-Antalya, 19.Girdev Platosu-Elmalı-Antalya, 20.Kırkgöz-Antalya.

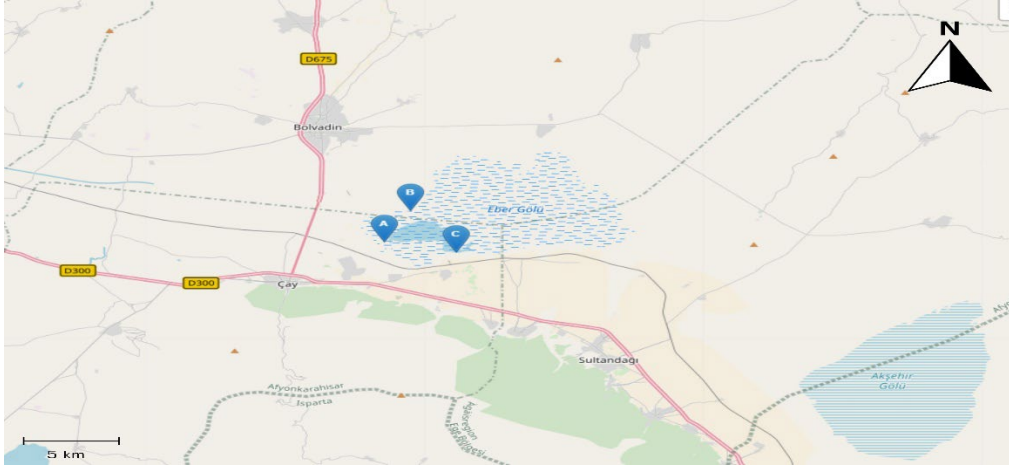


Resim 2.1 *P.caralitanus* yayılış alanı (IUCN 2022)

3. MATERYAL ve METOD

3.1 Saha Çalışmaları ve Deney Grupları

Çalışmada kullanılacak olan *P.caralitanus* türüne ait bireylerin aktif olduğu Temmuz, Ağustos ve Eylül aylarında, Göller bölgesinde yer alan Eber Gölünden örneklem yapılmıştır. Arazi çalışmalarında, bireylerden cinsiyeti göz ardı edilerek toplamda 28 adet yetişkin ve başkalaşım sürecini tamamlamış yavru hayvan yakalandı (Resim 3.1, Resim 3.2, Resim 3.3). Yetişkin bireyleri yakalamak için kepçeleme yöntemi kullanılırken, yavru bireyler ince su akarlarından el ile yakalandı. Yapılan saha çalışmaları boyunca arazinin ortalama sıcaklığı 29.6°C, bölgenin aylık sıcaklık standart sapması ise 3.42°C olarak belirlenmiştir. Sıcaklık verileri accuweather.com dan alınıp hesaplanmıştır. Sahadan toplanılan bireyler önceden etiketlenmiş steril plastik kutularda uygun sıcaklık, havalandırma ve nem koşullarında saklanarak laboratuvar ortamına getirildi. Laboratuvara getirilen bireyler deneysel çalışmalar yapılmadan önce hibernasyon evresine metabolizmalarını hazırlamak amacıyla en az 3 hafta boyunca beslenmeksizin tamamen karanlık +5 °C sıcaklıktaki ortamda saklandı. *P. caralitanus* türüne ait yetişkin bireylerin aynı ortamda bulunduğu, yine *P. caralitanus* türüne ait yavru bireyleri yediği gözlemlenmiştir. Bu sebep itibariyle türün yetişkin ve yavru bireyleri farklı saklama kaplarında muhafaza edilmiştir. Bu soğuk ortamda bekletme koşulu, hayvanların donma koşulları için metabolizmalarını hazırlanmalarını ve gerekli metabolik olayların tetiklenmesini sağlar. *P. caralitanus* türü için soğuk iklimde bekletilen hayvanlardan bir grup, kontrol grubu olarak seçildi ve kontrol grubu çalışmaları doğrudan bu soğuk ortamda bekletilen örneklerden alınarak yapıldı (Sullivan 2011, Sullivan ve Storey 2012, Sullivan vd. 2015a).



Şekil 3.1 Beyşehir kurbağasının toplama bölgesinin harita görüntüsü



Resim 3.1 Metamorfozunu tamamlamış yavru bireylerin toplama alanları





Resim 3.2 Yetişkin bireylerin toplama alanları



Resim 3.3 Saha çalışmalarında toplanan *P. caralitanus* türüne ait bireyler

Doğal ortamdaki habitatlarında kış mevsimi periyodu boyunca bireylerin maruz kaldıkları anoksi, dehidrasyon ve donma stres koşulları, laboratuvar ortamında yapay olarak oluşturuldu. Bu çalışma kapsamına araziden toplanan bireyler 3 ana stres, 3 normalleşme ve 1 kontrol grubu olmak üzere toplamda 7 gruba ayrıldı. Her bir grupta 4 (n=4) hayvan yer aldı. Bu stres, yeniden normale dönme ve kontrol gruplarında bulunan bireylerden maruziyet periyotlarından sonra fiziksel, biyokimyasal ve moleküler testlerin yapılması için örnekler alınmıştır.

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

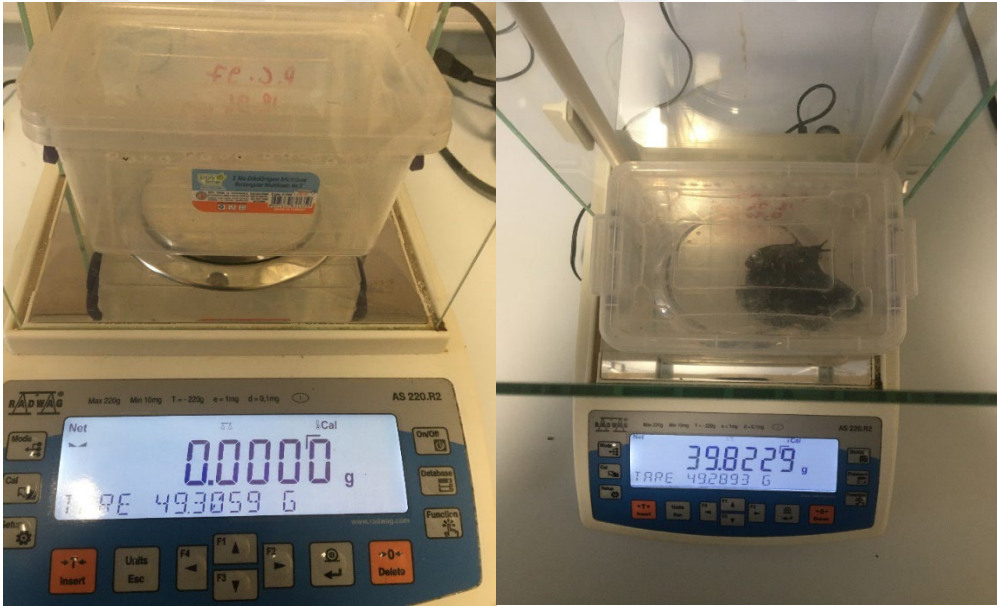
Çizelge 3.1 *P. caralitanus* türü için kullanılan maruziyet grupları çizelgesi.

3.2. Deney Koşulları

Bu çalışmada üç ana stres grubu (donma, dehidrasyon ve anoksi), bu stres koşulları uygulandıktan sonra normalizasyon grubu (çözünme, rehidrasyon ve reoksi) ve kontrol grupları oluşturuldu. Her bir grup için cinsiyet ayrımı yapmaksızın yetişkin ve yavru bireylerden oluşan rastgele en az 4 hayvan seçildi. Deneyde kullanılan tüm bireylerin, deney koşulları öncesi SVL ve ağırlık ölçümleri yapıldı (Resim 3.4, Resim 3.5). Kontrol grupları “3.1 Saha Çalışmaları ve Deney Grupları” bölümünde bahsedildiği gibi +5 °C ortamda, yetişkin ve yavru bireylerin birbirinde farklı ortamlarda tutulduğu laboratuvar koşullarında sağlanan uygun nem ve hava koşullarında bekletilen hayvanlardan oluşmaktadır.



Resim 3.4 Tüm bireylerin deney koşullarına maruz bırakılmadan önce SVL ölçümlerinin yapılması.



Resim 3.5 Tüm bireylerin deney koşullarına maruz bırakılmadan önce boş kutuların tara ağırlığı alınarak net ağırlık ölçümünün yapılması.

3.2.1 Donma Stresi ve Çözünme Grubu

Donma stresine maruz kalması için her bir gruptan yetişkin ve yavru bireylerden rastgele şekilde 4'er, toplamda iki stresi grubu için 8 adet birey seçildi ve tabanında nemli kağıt havlular bulunan ve hava delikleri olan kapalı, steril plastik kutulara aktarıldı. Sonrasında ise $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış bir dolap içerisine aktarıldı (Resim 3.6).

Laboratuvar ortamında oluşturulan bu $-2,5$ °C donma sıcaklığı daha öncesinde Güleç S. (2019)' nin yaptığı çalışma sayesinde tespit edilmiştir. Güleç S. (2019)'da laboratuvara getirdiği *Pelophylax caralitanus* türüne ait 2 bireyi ilk olarak -20 °C'de 60 dakika bekletip vücut sıcaklığını ölçtüğünde bireylerin vücut sıcaklıklarını -6 °C olarak tespit etmiştir. Bu bireyleri tekrardan çözünme koşullarına aldığıında ise hepsinin öldüğünü gözlemlemiştir. Bir sonraki denemesinde ise 4 adet bireyi -4 °C' ye koyup gözlemlerini sürdürmüştür. İlk 5 saatin sonunda bireyler hareketsizleşmeye başlamış, 5 ve 10. saatlerin arasında ise göz kapakları kapanmış ve bireyler içe doğru bükülerek küre şeklinde yakın bir morfolojik pozisyon kazanmıştır. 10 ve 24. saatler arasında ise deride buzlanmanın olduğunu tespit etmiştir. 24 saatin sonunda bu bireyleri yeniden çözünme koşullarına aldığıında hepsini öldüğünü gözlemlemiştir. Son olarak ise yine *Pelophylax caralitanus* türüne ait 4 bireyi -3 °C'de 24 saat bekletmiştir. Bu süre boyunca canlıların vücut sıcaklıklarını ölçtüğünde ile $-2 \pm -2,5$ °C arasında değiştiğini tespit etmiştir. Bu bireyleri ise tekrar oda sıcaklığına aldığıında hepsinin yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirdiğini tespit etmiştir. Dolayısıyla *Pelophylax caralitanus* 'un yaşayabileceği minimum sıcaklığı -3 °C olarak belirlemiştir (Güleç 2019). Bir saatlik soğuma sürecinden ve ekzoterm (dış kristalleşme,kurbağa derisinde küçük bir buzlanma görülmesi) bölgesinin oluşmasını gözledikten sonra 24 saat süren donma stresi süresi başlatıldı. Kurbağaların vücut sıcaklığı, sıcaklık ölçen bir veri kaydedici cihaza (datalogger) hayvanların abdomen kısmına sabitlenen termokupl vasıtası ile kaydedildi (Cai ve Storey 1997, Voituron vd. 2003, Sullivan ve Storey 2012). Donma stresi sonrası çözünme grubu oluşturmak için donma stresi grubuyla birlikte koyulan ve 24 saat sonunda dolaptan alınan grubun tekrar yaşamsal faaliyetlerini yerine getirip getiremediği kayıt altına alındı. Hayatta kalan bireyler $+5$ °C kontrol ortamı sıcaklığına bırakılarak 24 saat daha beklendikten sonra örneklendi (Costanzo vd. 1993a, Cai ve Storey 1997, Sullivan ve Storey 2012).





Resim 3.6 Donma stresi için hazırlık ve devamında donma stresinin başlatılması

3.2.2 Dehidrasyon Stresi ve Rehidratasyon Grubu

Kontrol sıcaklığında bulunan ortamdaki alınan bir grup hayvan dehidrasyon stresinin uygulanması için, içerisinde silika jel bulunan desikatörlere koyuldu ve +5 °C'de 40 saat inkübe edildi (Resim 3.7). Her saat ortalama %1 vücut suyu kaybedileceği hesaplanarak %40 dehidre hayvanlar örnekledi. 40 saat %40 dehidrasyon stresi uygulanmış bir diğer grup ise, dehidrasyon stresi uygulandıktan sonra içerisinde 1 cm yüksekliğinde dH₂O bulunan yeni kavanoza alındı ve rehidratasyon için +5 °C'de 24 saat bekletildikten sonra örnekleme yapıldı (McNally 2002, McNally vd. 2003, Sullivan ve Storey 2012, Sullivan vd. 2015b) .



Resim 3.7 Dehidrasyon stresi için hazırlık ve devamında dehidrasyon stresinin başlatılması.

3.2.2 Anoksi Stresi ve Reaksi Grubu

Anoksi stresinin uygulanması için kontrol ortamı sıcaklığında bulunan hayvanlardan bir grup alınarak, içerisinde azotla doyurulmuş 50 ml dH₂O bulunan plastik kutulara koyuldu. İlk olarak 30 dakika N₂ (Azot) gazı verildi. Daha sonra buza batırılmış olan kaba 15 dakika daha gaz verildi ve kabın ağzı ve etrafı hava almaması için önce parafilm sonrasında ise streç film ile sıkıca sarıldı. Anoksi işlemi uygulanan hayvanlar +5 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra hayvanlardan örnekleme işlemi yapıldı. Daha sonra bir grup daha anoksi stresine maruz bırakıldı ve 24 saat inkübasyon sonucu içerisinde 1 cm yüksekliğinde dH₂O bulunan yeni bir kaba alındı ve normal hava alması sağlanarak +5 °C'de 24 saat yenide inkübe edildi. Sonrasında ise reaksi grubunun refleksleri kontrol edilerek örnekleme işlemi gerçekleştirildi (McNally 2002, McNally vd. 2003, Sullivan vd. 2015b).



Resim 3.8 Anoksi stresinin uygulanması

3.3 Kurbağalardan Doku Örneklerinin Alınması

Stres koşulları uygulanmış tüm hayvanların stres deneyleri sonunda buldukları kavanoz ve kaplara MS 222 (1-2 g/L; pH 7.0) eklenmesi ile hayvanların anestezisi gerçekleştirildi. Anestezi işlemi uygulanmış hayvanların vücut boşluklarından heparinli

kapiller tüp vasıtasıyla kan alındı. Alınmış olan kan örnekleri, ependorf tüplere aktarıldı ve +5 °C’de 10,000 rpm de 5 dk. santrifüj edildi. Elde edilen kan serumları, daha sonra biyokimyasal parametrelerin belirlenmesinde kullanılmak için -80 °C’de saklandı (Costanzo ve Lee Jr. 1993, Voituron vd. 2002a). Kan alma işleminden sonra stres koşullarına maruz kalan hayvanlara double-pithing yöntemiyle ötenazi uygulandı ve hızlıca buz üzerinde diseksiyonu yapıldı. Diseksiyonu yapılan hayvanlardan kas, beyin ve karaciğer dokularından örnekler dikkatlice kesilerek çıkartıldıktan sonra sıvı azot yardımıyla donduruldu ve -80 °C’ye yerleştirildi (Cai ve Storey 1997, McNally vd. 2002). Alınan bu örnekler gen ekspresyon seviyelerinin tayininde kullanılacak olması sebebiyle, dokularda bulunan RNA’ların nükleazlar gibi inhibitörlerden etkilenmemesi için hızlıca dondurulması gerekmektedir. Aynı zamanda dokulardaki glikoz miktarının ve su miktarının tayini için diseksiyonu yapılmış örneklerden ikişer parça daha kas, beyin ve karaciğer dokularından örnekler alındı (Resim 3.9).



Resim 3.9 Stres koşullarına maruz kalmış hayvanlardan kan ve doku örneklerinin alınması.

3.4 Vücut Ağırlıklarının ve Dokulardaki Su Miktarlarının Ölçümü

Deney öncesi ve sonrası bireylerin vücut ağırlıklarındaki değişimi incelemek için, stres koşullarına maruz bırakılan her bir birey, farklı renklerdeki elastik bantlarla işaretlendi ve not edildi. Deney başlamadan hemen önce ve deney sonrasında bireylerin vücut ağırlıklarındaki değişimler kayıt altına alındı. (Costanzo vd. 1993a, Voituron vd. 2005).

Uygulanan çeşitli stres koşullarında karaciğer ve kas dokularındaki su kaybı miktarını tespit etmek için, nihai vücut ağırlığı ölçüldükten sonra bireylerden kan ve doku örnekleme için yapılması esnasında birer parça karaciğer ve arka bacak bölgesinden kas dokusu kesilerek tartıldı. Alınan bu dokular 105 °C'de iki gün boyunca inkübe edildi. Daha sonra ise yeniden tartıldı ve taze doku ile kuru doku arasındaki net ağırlık farkı hesaplanarak, dokulardaki su miktarının değişimi hesaplandı (Voituron vd. 2003, Costanzo 2005).

3.5 Dokulardan Glikoz Seviyesinin Belirlenmesi

Deney koşullarına maruz kalan bireylerin dokularındaki glikoz seviyelerinin tayini için doku ve kan örnekleri kullanıldı. Bu örneklerin alınması “3.3 Kurbağalardan Doku Örneklerinin Alınması” bölümünde belirtildiği üzere literatüre uygun olarak yapıldı. Elde edilen kan örneklerini santrifüjledikten sonra süpernatant kısım olan plazmalar, glikoz tayininde kullanılması için dikkatlice önceden etiketlenmiş yeni ve steril tüplere aktarıldı. Glikoz tayininde kullanılmak üzere dokulardan 80-100 mg parça kesilerek ve yüzey kısmında bulunan nem kurutma kağıdı vasıtasıyla uzaklaştırıldı. Alınan doku örnekleri hassas terazi (0,0001 g hassasiyetle ölçüm yapabilen, Ohaus PA224C) vasıtasıyla tartılarak, dokuların ağırlıkları not edildi. Dokular, 10 hacim buz soğukluğunda perklorik asit (%7 w/v) içinde homojenizatör vasıtasıyla (Heidolph Silentcrusher M) hemen homojenize edildi. Daha sonra dokularda bulunan proteinleri çöktürmek için 2.000 x g'de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüjleme sonucunda tüpte oluşan süpernatant kısım alındı ve KOH tamponu ile nötralize edildi. Nötralize olmuş doku özütleri ve plazma örneklerinde glikoz oksidaz metodu ile çalışan ölçüm kiti (Biolabo, # 87109) kullanılarak spektrofotometrik şekilde glikoz seviyesinin belirlenmesi sağlandı (Resim 3.10) (Storey ve Storey 1984, Cai ve Storey 1997, Voituron vd. 2002a, 2003, Amaral vd. 2018).



Resim 3.10 Stres koşullarına maruz kalmış hayvanlardan alınan kan, karaciğer ve kas dokularından yapılan glikoz tayini.

3.6 Antifriz Proteinlerinin Gen İfadeleri

Genetik analizler vasıtasıyla daha önce literatürde tespit edilmiş olan antifriz proteinlerinin (FR47, FR10 ve Lİ16) kontrol koşulları altında var olup olmadıkları, yapılacak olan gen ekspresyon çalışmaları ile belirlenen bu proteinlerin hangi seviyede ifade edildikleri mRNA tabanlı olarak belirlendi. *P. caralitanus* türüne ait bireylerde farklı stres koşulları altında hangi antifriz proteinine ait genlerinin ekspresyon seviyesindeki değişiklikler tespit edildi. Bu kapsamda, yapılacak olan çalışma sıra ilk olarak total RNA izolasyonu ile başlamakta olup, daha sonra ters transkriptaz yöntemi ile cDNA eldesi, sonrasında RT-qPCR çalışması ve son olarak elde edilen verilerin değerlendirilmesi şeklinde gerçekleştirildi (Yoldaş, 2021).

3.6.1 Dokulardan Total RNA İzolasyonu ve Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Moleküler çalışmaların yapılmış olduğu odanın, çalışmalar yapılmadan en az 24 saat önce UV ışık kaynağı ile önce sterilizasyonu gerçekleştirildi. Çalışmalarda kullanılmış olan tüm plastik kaplar ve, ependorf tüpler, mikropipet uçları ve solüsyonlar %0,1 (v/v) diethylpyrocarbonate (DEPC) ile yıkanıp, etanol içerikli solüsyonlar haricinde diğer solüsyonlar ve çalışma esnasında kullanılmış olan cam ve diğer malzemeler uygun sıcaklık ve basınçla otoklavlanarak steril edildi. -80 °C'de dondurulmuş olarak saklanan dokular yeniden sıvı azot uygulanması ile havanda dövülerek toz haline

getirildi. 50 mg karaciğer dokusu ve 100 mg kas dokusu tartılarak öncede etiketlenmiş yeni steril tüplere alındı. Bu örneklere, her bir örnek için 1 ml PureZOL™ (Biorad, ABD, Kat. No: 732-6890) solüsyonu eklendi. Daha sonra 200 µl kloroform eklendikten sonra homojenizatöre yerleştirildi ve homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Homojenize edilen örnekler daha sonra 10,000 g de 15 dk, 4 °C’de santrifüjlendi. Santrifüleme sonrası tüplerdeki RNA içeren akuatik (üst) faz, 1.5 ml hacmindeki yeni ve önceden etiketlenmiş steril tüplere transfer edildi. Daha sonra bu tüpler 500 µl izopropil alkol eklendi ve oda sıcaklığında 20 dk inkübasyon sağlandı. İnkübasyon sonucunda tüpler, 12,000 g de 15 dk 4 °C’de tekrar santrifüj edildi. Tüpte oluşan pellet, 1 ml %70 etanol (DEPC ddH₂O ile hazırlanmış) ile yeniden yıkandı ve tekrar 7,500 g de 5 dk 4 °C’de santrifüjlendikten sonra sıvı faz dikkatlice uzaklaştırıldı. Tüpte kalan pellet kısım 10 dk havalandırılıp kurutulduktan sonra 25 µl DEPC ddH₂O ile resüspanse edilip total RNA izolasyonu tamamlandı. RNA kalitesi, nanodrop kullanılarak 260/280 nm de absorbans ölçüm değerlerinin oranına göre karar verildi ve sonrasında 260 nm absorbans ölçümüyle de miktar tayini yapıldı (Sullivan vd. 2015b). Yapılan kloroform ile total RNA izolasyonu protokülünün yanında RT-qPCR çalışmalarında herhangi bir olası sorunla karşılaşmamak için spin-kolon tekniği ile çalışan ticari total RNA izolasyon kiti (Norgen #37500) ile de kit protokolüne uygun olarak yeni bir total RNA izolasyon çalışması gerçekleştirildi.



Resim 3.11 Total RNA izolasyonu basamağına ait görüntüler

Total RNA içerisinde bulunan mRNA’lar ı uzun süre stabil olarak saklayabilmek ve onlar ile PCR çalışmalarını gerçekleştirebilmek için mRNA’ları, cDNA’ya dönüştürmek gerekmektedir (Gökmen, 2022). Bu sebeple total RNA’ dan cDNA dönüşümü için, ekstrakte edilen total RNA’lar yaklaşık olarak 1 µg olaca şekilde DEPC distile su

vasıtasıyla seyreltildi, bu sayede cDNA dönüşümü sonrası her tüpte neredeyse eşit miktar cDNA elde etmiş olundu. Ticari olarak elde edilen cDNA sentez kiti içerisinde bulunan malzeme ve kimyasallar kullanılarak, kit protokolüne uygun şekilde reaksiyon karışımı yeni bir tüp içerisine hazırlandı (A.B.T.TM cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity)). Ters Transkriptaz Reaksiyonu için: ortalama 2 µl 10X reaksiyon tamponu, ortalama 1 µl dNTP karışımı, ortalama 2 µl heksamer, ortalama 1 µl ters transkriptaz, ortalama 0.5 µl RNaz inhibitörü, ortalama 3.5 µl RNaz free water ve 10 µl RNA (OligodT 5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' içeren) hacimleri ayarlanarak son hacim 20 µl' ye tamamlandı. PCR çalışmasından önce strip tüplere spin-vorteks uygulaması yapıldı. Öncesinde UV ışık ile sterilize edilmiş odada konvensiyonel PCR cihazına (Prime Thermal Cycler) örnekler yerleştirilerek 10 dk 25 °C, 120 dk 37 °C, 5 dk 85 °C'de protokol girişi yapıldı. Ardından inkübasyon sağlandı ve cDNA eldesi işleminin son basamağı olan 1 dakika buz üzerinde soğutma işlemi gerçekleştirilerek cDNA sentez işlemi gerçekleştirildi. (Resim 3.11).



Resim 3.12 Ters transkriptaz ve cDNA sentezine ait görüntüler

3.6.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları

Ters transkriptaz PCR (reverse transcriptase PCR, RT-qPCR) çalışmaları laboratuvarımızdaki Bioneer Exicycler 96 real-time (eş zamanlı) PCR cihazıyla gerçekleştirildi. Öncesinde yapılan çalışmalarla elde edilen cDNA' lara, ekspresyon seviyesini ölçmeyi hedeflediğimiz genlerin primerleri ile birlikte PCR işlemi uygulandı. Ticari olarak alınan SYBR green floresans boya içerikli reaksiyon tamponu (BioRad

SsoAdvanced Universal Inhibitor-Tolerant SYBR Green Supermix #1725016 ve Roche LightCycler® 480 SYBR Green I Master #04896866001) ile birlikte protokole uygun olarak hazırlanan reaksiyon, real time PCR cihazı ile aşağıda verilen protokole göre çalışıldı. Bu kapsamda çoğalma, yani amplifikasyon gerçekleştiğinde, eğer hedef genler dokularda mevcut ve amplifikasyona olmuş ise, cihaz tarafından, yapılan ışığa tespit edilerek, Ct (cycle treshold) / Cq (quantification cycle) değerlerinin elde edilmesi hedeflendi. Hedeflediğimiz genler olan *fr47*, *fr10*, *li16* ve housekeeping (normalizasyon-endojen kontrol geni) geni olan *α-tubulin* geninin ekspresyon yani ifade seviyelerini belirlemek üzere her bir numuneye, ayrı ayrı Polimeraz Zincir Reaksiyonu çalışması yapıldı (Resim 3.12).



Resim 3.13 RT-qPCR çalışmasına ait görüntüler

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

RT-qPCR Reaksiyon karışımı		RT-qPCR Koşulları	
2x SYBR mix	10 µl	1. Aktivasyon	95 °C'de 5-6 dk.
Revers primer*	0,4 µl	2. Denatüreasyon	95 °C'de 10 sn.
Forward primer*	0,4 µl	3. Bağlanma-Uzama	60 °C'de 10-15sn
cDNA**	2 µl	Okuma	
Su***	x µl	4. 2 ve 3. Basamaklarda	35- 40 döngü
Son hacim	20 µl	5. Melting Curve	60°C- 95°C****

*: Stok konsantrasyonu 250-500 nM, **: kullanılan cDNA miktarı 100 ng/μl, ***: Nükleaz içermeyen PCR grade” su ****: Her bir saniyede 1 °C artacak şekilde.

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

Çizelge 3.3 *α-tubulin*, *fr47*, *li 16* ve *fr10* gen bölgelerine ait primerler.

3.6.3 Değerlendirme

Gen ifadesi çalışmalarının sonuçlarının değerlendirilmesi için rölatif kantitasyon yöntemi kullanıldı (Gökmen, 2022). Hedeflediğimiz genler olan *fr47*, *fr10* ve *li16* genlerinin ekspresyon seviyeleri, amplifiye olması sebebiyle ışığa yapan örneklerden hesaplanan Ct/Cq değerleri vasıtasıyla kontrol grubundaki örneklerin ve stres uygulanmış deney gruplarında bulunan örnekler arasında *α-tubulin* geni normalizasyon işlemi yapılarak değerlendirildi (Yoldaş, 2021). Bu değerlendirme yapılırken Delta-Delta Ct Metodu (Yaklaşım metodu, $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) kullanıldı (Livak ve Schmittgen 2001). Elde edilen veriler REST yazılımının kullanılmasıyla değerlendirildi. (Relative Expression Software Tool – Multiple Condition solver REST-MCS ©- version 2).

3.6.3.1 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ Metodu ile Hesaplama

$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ Metodu, kolay uygulanabilirliği sebebiyle rölatif gen ekspresyon çalışmalarında sıklıkla kullanılan metottur. Bu yöntem sayesinde hem hedeflenen genlerin, hem de referans yani housekeeping genlerin, %100’e yakın bir verimlilikle amplifiye olduğunu varsayar. Bu yöntemi kullanmadan önce, hedeflenen genlerin ve referans alınan genlerin amplifikasyon-çoğalma verimliliklerini belirlemek gereklidir. Bu sayede yapılan varsayımların doğru olup olmadığı kontrol edilir. (Livak ve Schmittgen 2001). Hedeflenen genlerin ve referans genlerin birbirlerine benzer ve neredeyse % 100 amplifikasyon verimliliğine sahip olduğu teyit edilmesinden sonra, aşağı yazılı olan

basamaklar izlenerek farklı örneklerdeki hedeflenen genin ekspresyon seviyesindeki fark ölçülebilir:

Öncelikle hem stres koşulları uygulanmış test örneğinin hem de kontrol örneğinin için hedeflenen geninin C_t değeri, referans alınan gene göre normalleştirilir. Sonrasında ise, test örneğinin ΔC_t değeri, kontrol örneğinin ΔC_t değerine göre normalizasyon işlemi gerçekleştirilir. Son olarak ise ekspresyon oranı hesaplanır. (Yoldaş, 2021)

$$1a. \Delta C_t (\text{test grubu}) = C_t (\text{hedef gen}) - C_t (\text{referans gen})$$

$$1b. \Delta C_t (\text{kontrol-grubu}) = C_t (\text{hedef gen}) - C_t (\text{referans gen})$$

$$2. \Delta \Delta C_t = \Delta C_t (\text{test grubu}) - \Delta C_t (\text{kontrol grubu})$$

$$3. 2^{-\Delta \Delta C_t} = \text{Normalizasyonu sağlanmış ekspresyon oranı}$$

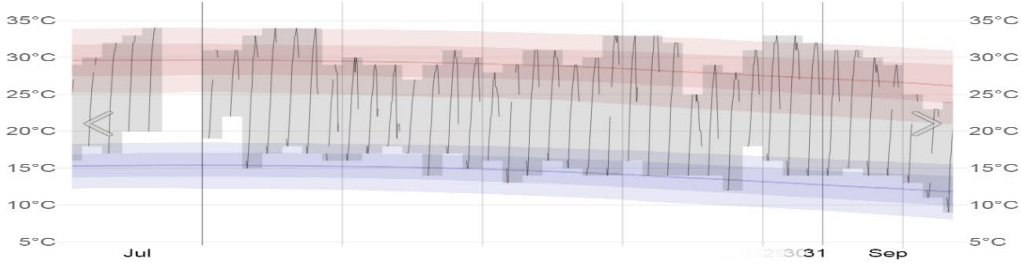
3.7 İstatistiksel olarak hesaplama

Çalışma sonucunda elde edilen veriler, ortalama \pm standart hata şeklinde değerlendirildi (Gökmen, 2022). Çalışmada kullanılan hayvanların stres koşulları uygulanmadan önceki ve stres koşulları uygulandıktan sonraki ağırlıkları Wilcoxon Signed-Ranks Test kullanılarak hesaplandı. Stres ve yeniden normale dönme sürecinin, beyin, kan, kas ve karaciğerdeki glikoz seviyelerindeki etkileri, varyans analizi (ANOVA) ile hesaplandı ve stres koşulları uygulanan gruplar arasındaki farklar Tukey-HSD-post-hoc karşılaştırma testi ile hesaplandı. Dokulardaki bulunan su oranları sonuçlar kısmında yüzdelik olarak açıklandı, fakat yüzdelik verilerin arcsine / square-root dönüşümünün yapılmasının devamında istatistiksel açıdan analizi (ANOVA Tukey-HSD) metodu ile yapıldı. Rölatif (göreceli) gen ifadesi analizleri için normalizasyonu sağlanmış ekspresyon oranı ($2^{-\Delta \Delta C_t}$) verilerinin 2 tabanındaki logaritmik değeri alındı ve istenilen veriler elde edildi ve istatistik analiz için kullanıldı. Kontrol grubundaki bireylerin ve stres koşulları uygulanmış deney grupları aralarında bulunan farkın anlamlı olup olmadığı Student's *t-test* analizi ile belirlendi (Yoldaş, 2021).

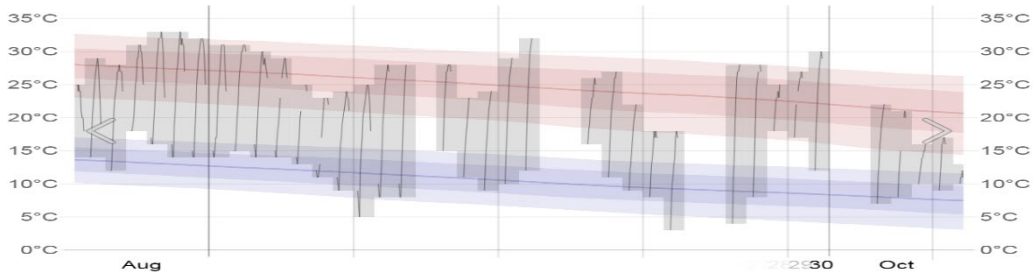
4. BULGULAR

4.1 Sahadan Örnek Toplama Çalışması

P.caralitanus türü için yapılan arazi çalışmaları, Afyonkarahisar İlindeki sıcaklık ve hayvanların aktif olduğu dönemlere dikkat edilerek Ağustos ve Eylül ayı süresince gerçekleştirilmiştir. Saha çalışmalarının yapıldığı habitatlardaki hava ve su ortamlarının fiziksel verileri weatherspark sitesinde mevcut olan verilerle sayesinde belirlendi. Anadolu Kurbağası olarak bilinen *P.caralitanus*' un ergin bireyleri saha çalışmaları esnasında genellikle gölet kenarında, yavru bireyler ise küçük akarsuların kenar kısımlarında ve akarsuların iç kısmında yakalandı. Türün seçtiği bu habitat sayesinde hem sudan uzak kalmayıp nemli ortamlarda bulunmuş, hem de sucul ve karasal kaynaklı besinlere kolaylıkla erişim sağlamış olduğu belirtilebilir. Aynı zamanda yaşadığı habitatın renklerine uyumlu vücut deseni ile bulunduğu ortamda kolayca gizlenebilir ve kendisini avlayan predatör türlere karşı kamufle olabilmektedir.



Şekil 4.1: Gri çubuklar Ağustos ayı için kaydedilmiş olan sıcaklıkların günlük verilerini göstermektedir. 25 ila 75 ve 10 ila 90. yüzdelik bantlarla günlük olarak ortalama şekilde yüksek ve düşük (kırmızı çizgi- mavi çizgi) sıcaklık verileri. İnce noktalı çizgiler karşılık gelen ortalama algılanan sıcaklıklardır (2.İnt. Kyn.).



Şekil 4.2: Gri çubuklar Eylül ayı için kaydedilmiş olan sıcaklıkların günlük verilerini göstermektedir. 25 ila 75 ve 10 ila 90. yüzdelik bantlarla günlük olarak ortalama şekilde yüksek ve düşük (kırmızı çizgi- mavi çizgi) sıcaklık verileri. İnce noktalı çizgiler karşılık gelen ortalama algılanan sıcaklıklardır (2.İnt. Kyn.).

4.2 Soğuk Stresi ve Bireyleri Hayatta Kalma Stratejisi

Anadolu Kurbağası' nın (*P.caralitanus*) donma stresi altında hayatta kalma becerisi laboratuvar ortamındaki yapılan deneyler vasıtasıyla araştırıldı. Bunun için *P.caralitanus* türünün toplamda (N = 28) 7 stres koşuluna (n=4) maruziyeti sağlandı. Stres koşulları uygulanmış tüm bireylerin stres koşulları sonrasında hayatta kaldıkları gözlemlendi kaldı. Özellikle ergin bireylerin yavru bireylere nazaran daha fazla yaşam mücadelesi vermesi, bu tür için, yavru bireylerin donma stresine daha hassas, yetişkin bireylerin ise daha dirençli olduğunu göstermiştir.

Donma stresine maruz kalan bireyler 24 saat süresince $-2,5^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi. Donma stresi sürecinde ve stres koşullarının sonrasında bireyler deri renginin koyulaşması, uzuvların sertleşmesi, hareketsizlik durumu ve gözlerin opaklaşması gibi donma belirtileri gösterdi (Resim 4.1). Donma stresinin devamında oluşturulan çözünme grubundaki bireylerde, ilk defa kalp atışlarının gözükmesi yaklaşık olarak 25 dk sonra gerçekleşti. Bireyin ilk kas refleksi ise yaklaşık olarak 1. saatin sonunda gözlemlendi. Çözünme koşullarında hayvanda ilk kalp atışının gözükmesinden sonra zaman geçtikçe gözlerde bulunan opaklık yavaş yavaş kaybolmakta, kas refleksi olarak önce parmaklarda titreme şeklinde refleksler gözükmekte, son olarak ise vücut uzuvlarının hareketi gözlenmiştir (Resim 4.2). Çözünme sürecindeki hayvanın stres koşulları uygulanmadan önceki haline dönmesi ve uzuvlarını rahat olarak hareket ettirebilmesi için gereken sürenin yaklaşık olarak 2.5 saat olduğu belirlendi.

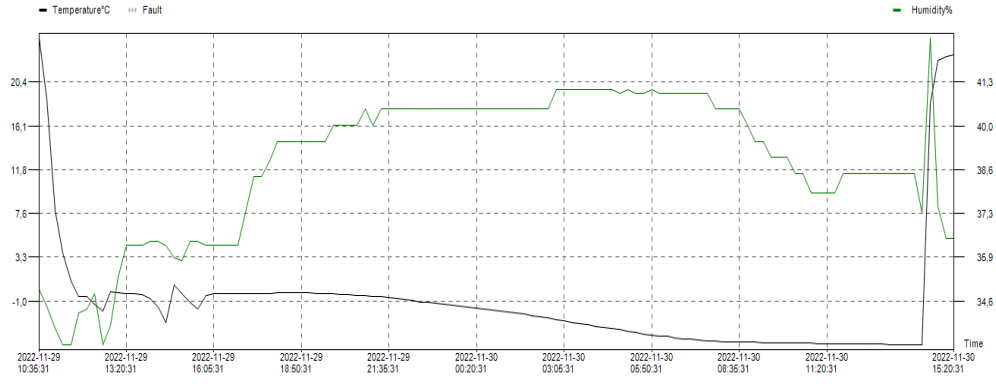


Resim 4.1 Donma stresi sonrası gözlerin opaklaşması ve çözülme durumu



Resim 4.2 Donma stresi sonrası bireylerde strese bağlı değişikliklerin görüntüleri

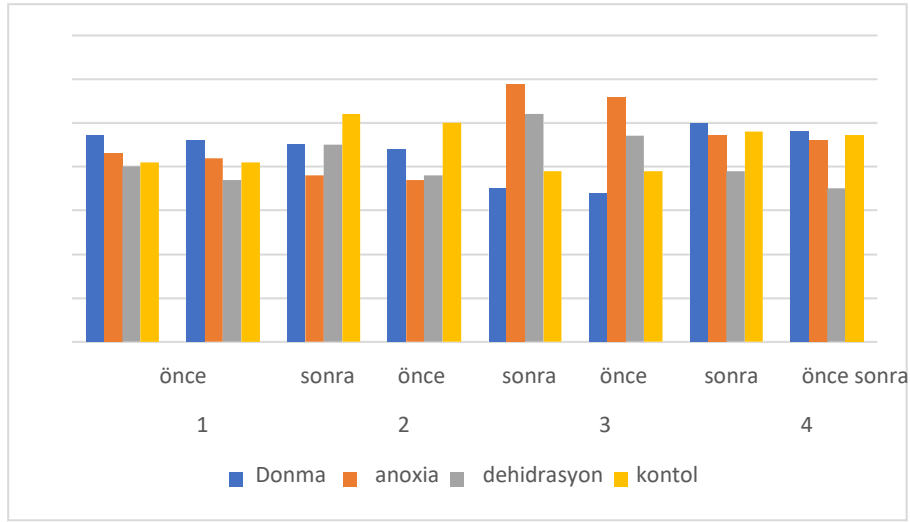
Donma stresi esnasında bireylerin abdomen kısmına sabitlenmiş olan datalogger verilerine bakıldığında, hayvanlarda ekzoterm yani dış kristallenmenin oluşmasından yaklaşık 90 dakika sonra ani şekilde tetiklenmiş olan bir metabolik hızlanma olduğu ve hayvanda kriyoprotektanların üretiminin maksimuma çıktığı kaydedilmiştir. Stresin uygulanmaya başlandığı ilk andan itibaren bireyin vücut sıcaklığının ani şekilde yaklaşık olarak 0,5°C lere düştüğü fakat bu noktadan sonra bireyin ortam sıcaklığına karşı metabolik olarak bir direnç gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Yaklaşık olarak bir saat süren soğuk stresi durumu öncesi süreçte, donma durumu esnasında bireyin hayatta kalmasında önemli görevleri olan kriyoprotektanlar, hayvan tarafından sentezlenmektedir. Belirli bir sıcaklık noktasından sonra, bireyin vücut sıcaklığı stres koşullarında uygulanmış olan dış ortamın sıcaklığına inmiş ve bu sıcaklık noktasından sonra birey tamamen donmuş ve o halde kalmıştır. Bu noktadan sonra deney süresi boyunca bireyin vücut sıcaklığı, stres koşullarındaki ortam sıcaklığına paralel olarak seyretmiştir. Donma stresi sonrasında, örnekleme yapılan bireyleri mesanesinde, karın boşluğunda ve iç organlarında buzlanma oluşunu gözlemlendi. Bu, donma süreci esnasında dokularda bulunan suyun hücre membranından geçerek ayrıldığını ve hücre içerisinin donmasını önlemek amacıyla hücreler arası boşluğa transfer olduğunu gösterir.



Şekil 4.3 Donma stresi altındaki bireyin datalogger verileri

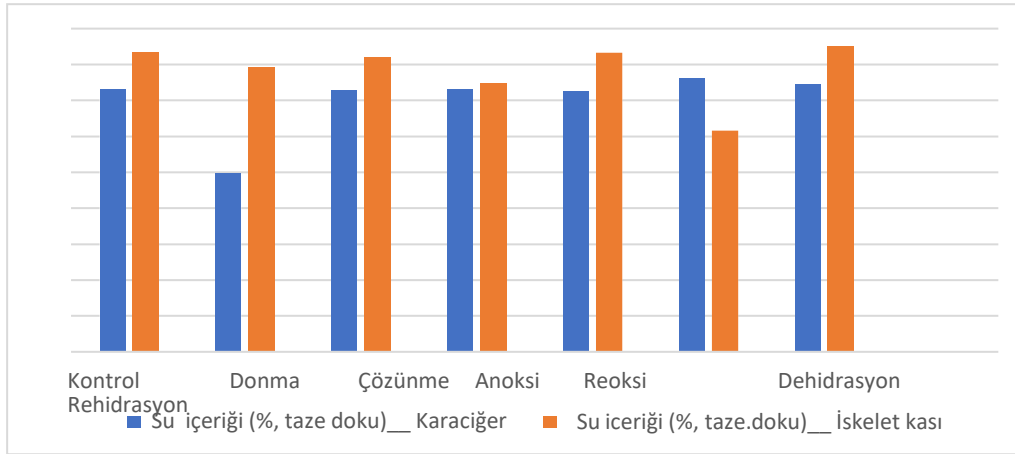
4.3 Bireylerdeki Ağırlık Değişimleri ve Dokularındaki Nem Miktarı

Oluşturulan tüm stres grupları ve kontrol grubunun stres koşulları uygulanmasından önceki ve stres koşullarının uygulanmasından sonraki ağırlıkları ölçüldü ve elde edilen veriler kıyaslandı. (Şekil 4.2). Donma stresi grubunda bulunan hayvanların stres koşulları öncesindeki ortalama ağırlıkları 25,32 gramdan 24,72 grama düşmekle birlikte yüzdesel olarak %2,15 oranında azalmıştır, Oksijensizlik stresi grubuna ait bireylerin stres koşulları öncesi ortalama ağırlıkları 33,48 gramdan 32,75 grama düşmekle birlikte yüzdesel olarak %2,8 oranında azalmıştır, dehidrasyonstresi grubuna ait bireylerin stres koşulları öncesi ortalama ağırlıkları 28,65 gramdan 25,34 grama düşmekle birlikte yüzdesel olarak %12,38 azalmıştır. Vücut ağırlığında yüzdesel olarak en fazla düşüş dehidrasyon stresi maruz kalan bireylerde görülmüştür. Saha çalışmalarıyla birlikte getirilen kurbağalar aynı gün içerisinde tartılmıştır. Aynı bireyler deneyden hemen önce de tartıldığında ortalama olarak 1 gram kilo kaybı yaşamıştır. Dolayısıyla hayvanların 3 haftalık metabolizma hazırlama sürecindeki kilo kaybı yaklaşık olarak 1 gramdır.



Şekil 4.4: *P. caralitanus*' un stres koşulları uygulanmadan önceki ve stres koşulları uygulandıktan sonraki vücut ağırlığındaki değişim

Donma stresine maruz kalan bireylerdeki dehidrasyon olayının nasıl şekilde gerçekleştiğini incelemek amacıyla stres koşullarına maruz kalan hayvanların dokularında bulunan su miktarları incelenmiştir. Deney gruplarındaki bireylerden elde edilen sonuçlar ile kontrol grubundaki hayvanlardan elde edilen sonuçları karşılaştırdığımızda, farklı dokularda bulunan su miktarları, farklı stres koşulları içerisinde önemli farklılık göstermiştir. Ayrıca stres altında kalmış ve yine normal koşullara döndürülmüş bireylerin sonuçları da kontrol grubunda bulunan bireylerin sonuçlarından önemli derecede fark göstermemesi, bireylerde bulunan dokuların normalizasyon sonrası eski hallerine yeniden döndüğü düşünülmektedir. Stres koşulları altındaki bireylerin karaciğer dokularında bulunan su miktarı, kontrol grubunda bulunan bireylerle kıyaslandığında, donma stresinde %3,42 azaldı, anaoksi stresinde %1,08 azaldı, dehidrasyon stresinde ise %22,73 azalma göstermiştir. Dehidrasyon stresi haricinde diğer gruplarda bulunan bireylerin organlarındaki yüzde su miktarlarının kontrol grubundaki bireylerin ölçülen seviyelerine yakın seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir. Stres koşulları uygulanmış bireylerin iskelet kasında bulunan su miktarları, kontrol grubundaki bireylerle kıyaslandığında, donma stresi koşullarında %2,17 azaldığı, anoksi stresinde %7,13 azaldı, dehidrasyon stresinde ise % 19,17 azalmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.5: *P. caralitanus*' un stres koşulları uygulanmadan önceki ve stres koşulları uygulandıktan sonraki dokulardaki su miktarlarındaki değişim

Gruplar	Vücut ağırlıklarının (g) grup ortalaması		Su miktarı (% olarak taze doku)		
	Öncesi	Sonrası	P değeri	Kara-ciğer	Kas
Kontrol	43,12	42,87	0,068	72,38	78,83
Donma	25,32	24,72	0,068	71,88	78,12
Çözünme	36,63	36,44	0,068	73,67	82,16
Anoksi	33,48	32,75	0,064	71,11	76,44
Reoksi	29,87	29,75	0,068	72,27	79,38
Dehidrasyon	28,65	25,34	0,430	51,13	63,95
Rehidrasyon	42,29	41,98	0,068	74,45	83,64

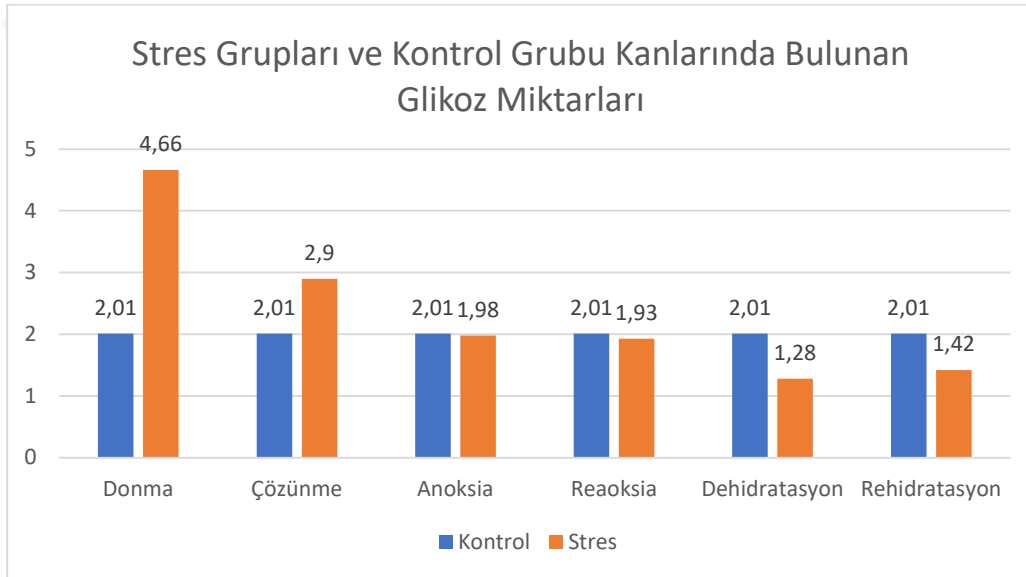
Çizelge 4.1 Vücut ağırlıkları ve taze dokudaki su miktarları

4.4 Glikoz Ölçümleri

Anadolu kurbağasında donma stresi, oksijensizlik stresi ve dehidratasyon streslerinin devamındaki normal duruma dönme sürecinin kandaki glikoz düzeyi, aynı zamanda karaciğer ve kas üzerinde olan etkilerini incelemek için bir takım ölçüm çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Glikoz düzeyleri taze olan dokular üzerinde incelendi ve hesaplama esnasında kuru kütle düzeltmeleri yapılmamıştır

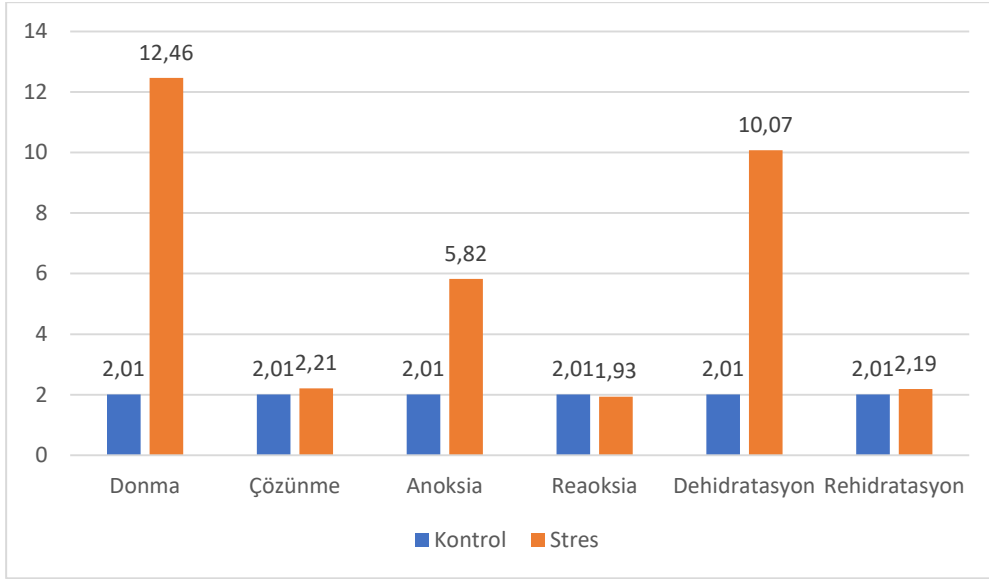
Soğuk stresi esnasında *P. caralitanus*'un kanında bulunan glikoz seviyesi 2,32 kat ($2,01 \text{ mL}^{-1}$ 'den $4,66 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1}$ 'ye) artış göstermiştir. Kanda bulunan glikoz düzeyi, oksijensizlik stresi altında ($1,98 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1}$) ve dehidratasyon stresi altında ise ($1,28$

$\mu\text{mol mL}^{-1}$) artış göstererek stres koşullarına karşı cevap vermiş oldu, ancak kanda bulunan glikoz düzeyindeki bu yükselişler istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde değildi. ($P < 0,05$). Soğuk stresi, oksijensizlik stresi ve dehidratasyon streslerine maruz kalan bireylerin yükselen glikoz seviyelerinin, normalizasyonu sağlanmış bireylerle kıyaslanması yapıp yeniden kontrol grubunda bulunan bireylerin glikoz seviyelerine yaklaşmış olduğu ifade edildi. Soğuk stresi altındaki bireylerin yeniden normal hale getirildiği çözünme grubundaki bireylerde $2,09 \mu\text{mol mL}^{-1}$, oksijensizlik grubunu normal hale getirdiği reaksi grubunda $1,93 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ve dehidrate olmuş bireylerin yeniden normal hale getirildiği rehidratasyon durumunda ise $1,42 \mu\text{mol mL}^{-1}$ glikoz konsantrasyonu tespit edildi (Şekil 4.4). ($P > 0,005$)



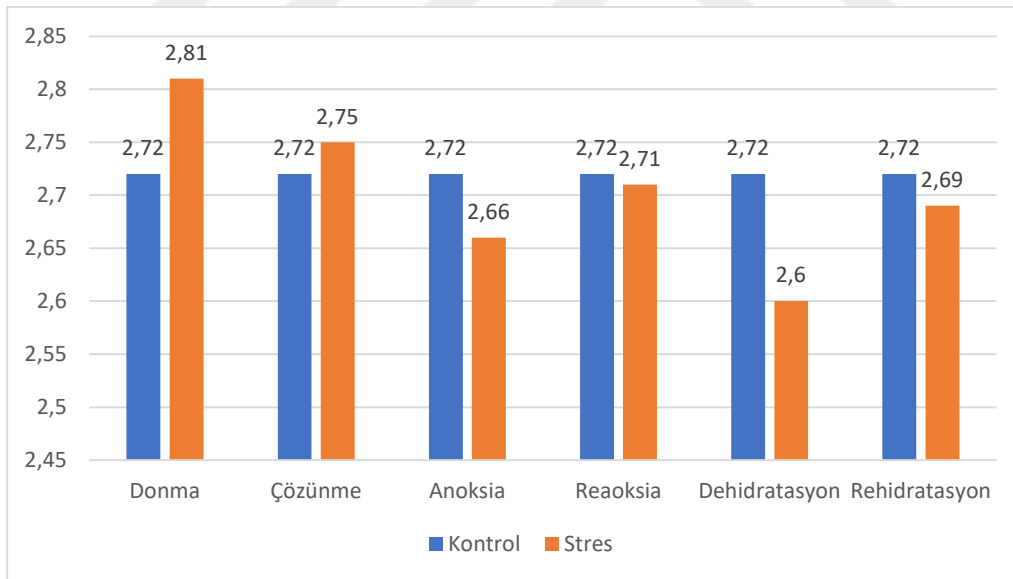
Şekil 4.6 Stres grupları ve kontrol grubu kanlarında bulunan glikoz miktarları

Donma stresi sonrası karaciğer dokusundaki glikoz seviyesi 6,2 kat, dehidrasyon stresi sonrası 5,01 kat ve anoksia stresi sonrası ise 2,9 kat artış göstermiştir. Stres sonrası yeniden normale dönen grupların karaciğerlerindeki glikoz seviyeleri ise kontrol grubundan önemli düzeyde farklılık göstermemiştir. (Şekil 4.5)



Şekil 4.7 Stres grupları ve kontrol grubu karaciğerlerinde bulunan glikoz miktarları

Stres ve normalleşme gruplarının kas dokularında yapılan glikoz ölçümlerinin kontrol grubundaki bireyleri glikoz seviyeleri ile kıyaslandığında değerler birbirlerine çok yakın ve istatistiksel olarak bir anlam ifade etmemiştir. (Şekil 4.6) ($P>0,05$)



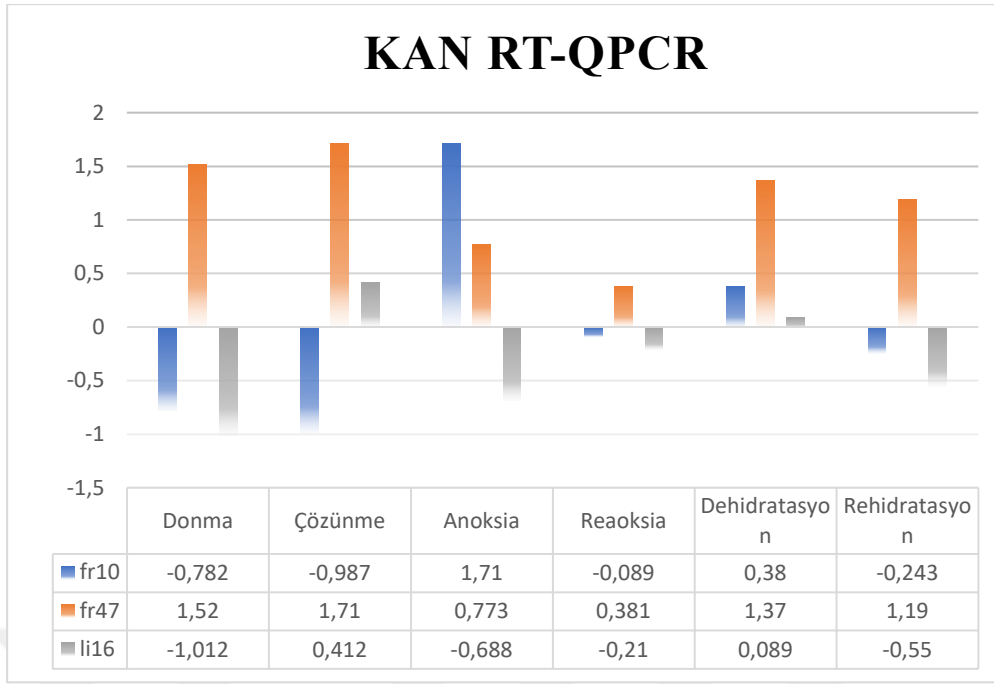
Şekil 4.8 Stres grupları ve kontrol grubu kas dokusunda bulunan glikoz miktarları

4.5 Gen İfadesi Sonuçları

Amfibilerin soğuk stresine karşı sentezlediği özgül antifreeze proteinleri olan fr10, fr47 ve li16 proteinlerinin genleri *P.caralitanus* türünün kas, karaciğer, ve kas dokularında ifade düzeyleri Real-Time qPCR metodu ile belirlenmiştir. Bunu için dokulardan total RNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen RNA' lardan devamında cDNA dönüşümü sağlanmıştır. Sonrasında ise Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemiyle sonuçlara ulaşılmıştır.

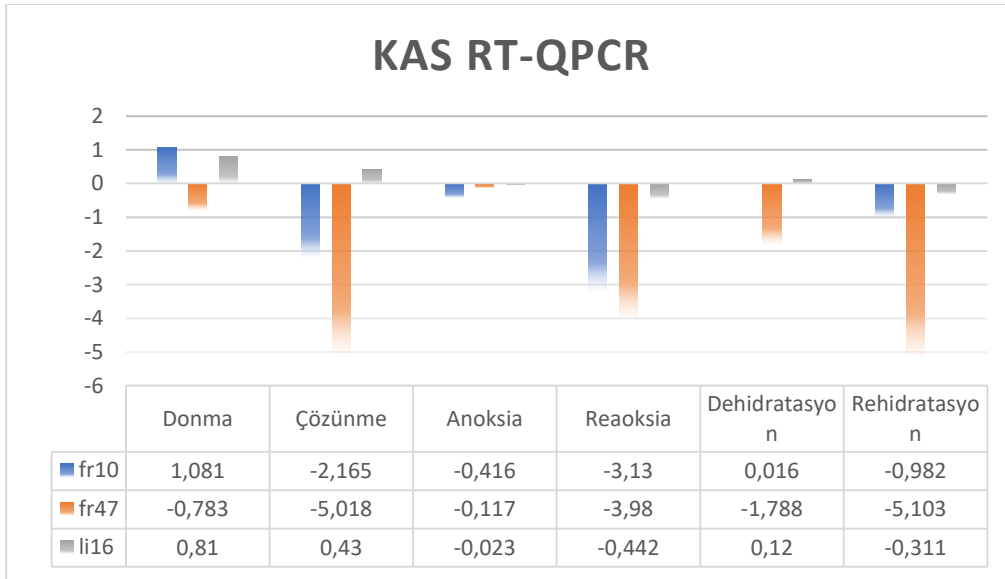
4.5.1 Antifreeze Proteinlerini İfade Eden Genlerin Düzenlenmesi

Bireylerin stres maruziyeti sonrası ve yeniden normalleşme süreci sonrası gen ifadesi düzeylerine bakıldığında donma stresi, dehidrasyon stresi, anoksia stresi ve bu streslerin yeniden normale döndürme gruplarındaki bireylerde genel olarak aşağı yönlü bir azalma olduğu görülmüştür. Fakat bazı durumlarda bireylerin maruz kaldıkları bu streslerden korunmak amacıyla gen ifadelerini yukarı yönde düzenlediği görülmüştür. Tüm stres ve yeniden normale gruplarındaki bireylerden alınan kan örneklerinde fr47 genin ifadesi yukarı yönde düzenlendiği tespit edildi. Donma grubunda bulunan bireylerde fr47 geninin ifadesi 1,52 kat, çözünme grubunda bulunan bireylerde 1,71 kat, dehidrasyon grubundaki bireylerde 1,37 kat, rehidrasyon grubundaki bireylerde 1,19 kat, anoksia grubundaki bireylerde 0,773 kat, reoksia grubundaki bireylerde ise fr47 geninin ifadesi 0,381 kat yukarı yönde artış göstermiştir. li16 geninin ifadesi ise yalnızca donma stresi sonrası yeniden normalleşme grubu olan çözünme grubundaki bireylerde 0,412 kat ve dehidrasyon stresine maruz kalan bireylerde 0,089 kat artış göstermiştir. Diğer tüm stres grupları ve normalleşme gruplarında ise li16 geninin ifadesi aşağı yönde düzenlenmiştir. fr10 geni ise yalnızca anoksia stresi uygulanmış bireylerde 1,71 kat ve dehidrasyon stresi altındaki bireylerde 0,38 kat artış göstermiştir. Diğer tüm stres grupları ve normalleşme gruplarında ise fr10 geninin ifadesi aşağı yönde düzenlenmiştir (Şekil 4.7).



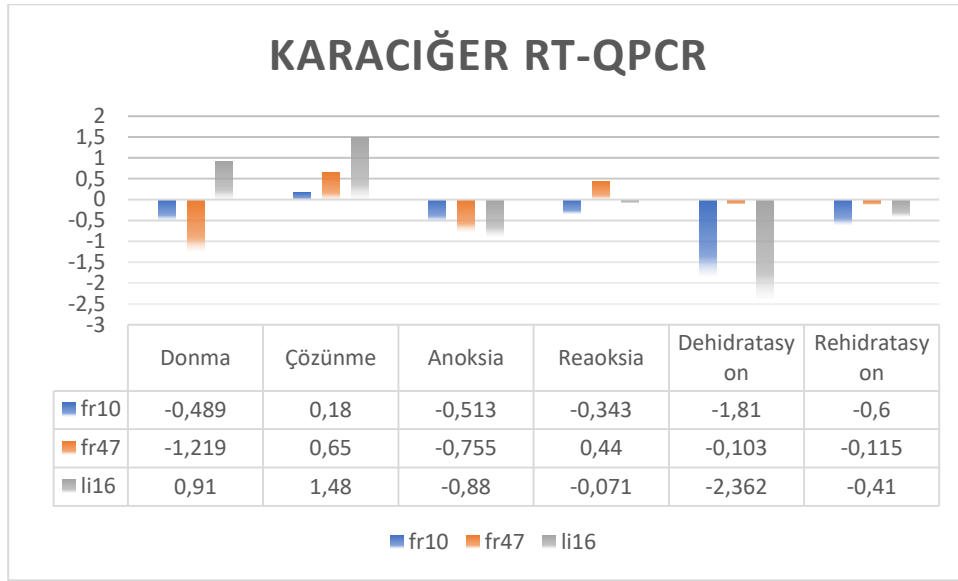
Şekil 4.9 Kandan ölçülen antifreeze genlerinin ifade seviyelerindeki değişim

Tüm stres ve yeniden normale döndürülmüş gruplarda bulunan bireylerden alınan iskelet kası doku örneklerinde fr47 genin ifadesi aşağı yönde düzenlendiği tespit edildi. fr10 geninin ifade düzeyi incelendiğinde, yalnızca donma stresi uygulanmış bireylerde 1,081 kat ve dehidrasyon stresi uygulanmış bireylerde 0,016 kat yukarı yönde düzenlenme tespit edilmiştir. Diğer tüm stres grupları ve normalleşme gruplarında ise fr10 geninin ifadesi aşağı yönde düzenlenmiştir. li16 proteinini ifade eden genlerin düzenlenmesi incelendiğinde ise donma stresi uygulanmış bireylerde 0,81 kat, donma stresi sonrası yeniden normale dönme grubu olan çözünme grubunda bulunan bireylerde 0,43 kat ve dehidrasyon stresi uygulanmış bireylerde 0,12 kat yukarı yönde gen ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Diğer tüm stres grupları ve normalleşme gruplarında ise li16 geninin ifadesi aşağı yönde düzenlenmiştir (Şekil 4.8)



Şekil 4.10 Kas dokusundan ölçülen antifreeze genlerinin ifade seviyelerindeki değişim

Tüm stres ve yeniden normale döndürülmüş gruplarda bulunan bireylerden alınan karaciğer dokularındaki örneklerde fr47 genin ifadesi, donma stresinin yeniden normale döndürülmesi grubu olan çözülme grubunda 0,65 kat, anoksia stresinin yeniden normale döndürülmesi grubu olan reoksia grubunda ise 0,44 kat yukarı yönde artış olarak düzenlenmiştir. Diğer tüm stres grupları ve normalleşme gruplarında ise fr47 geninin ifadesi aşağı yönde düzenlenmiştir. fr10 geninin ifade düzeyi incelendiğinde yalnızca donma stresinin yeniden normale döndürülmesi grubu olan çözülme grubunda 0,18 kat yukarı yönde düzenlenmiştir. Diğer tüm stres grupları ve normalleşme gruplarında ise fr10 geninin ifadesi aşağı yönde düzenlenmiştir. li16 geninin ifade düzeyi incelendiğinde ise donma stresi uygulanmış bireylerde 0,91 kat, donma stresinin yeniden normale döndürülmesi grubu olan çözülme grubunda ise 1,48 kat yukarı yönde düzenlenmiştir. Diğer tüm stres grupları ve normalleşme gruplarında ise li16 geninin ifadesi aşağı yönde düzenlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.11 Karaciğer dokusundan ölçülen antifreeze genlerinin ifade seviyelerindeki değişim

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan bu çalışmayla birlikte dünya genelinde çok çalışılmış fakat ülkemizde ilk defa 2021 yılında çalışmaları başlanmış olan antifreeze proteinlerini ifade gen bölgelerinin, Türkiye endemik *P.caralitanus* türünde varlığının saptanması hedeflenmiştir. *P.caralitanus* türünde yaptığımız çalışmalar sonucunda bireylerin kanlarında bulunan glikoz düzeyi yalnızca donma stresi altında, karaciğerlerinde bulunan glikoz düzeyi ise tüm stres koşulları uygulanmış bireylerde artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Uygulanan stres koşulları ile birlikte bu streslere maruz kalmış bireylerin tamamında vücut ağırlıklarında düşüş meydana geldi. Bunun yanı sıra tüm bireylerin metabolik olarak hazırlanması için 3 hafta bekletilen sürede, tüm bireyler yaklaşık olarak birer gram düşüş kaydedilmiştir. Stres koşulları uygulanmış bireylerde, donma stresi uygulanmış bireylerin karaciğerlerindeki su miktarının azaldığı, diğer stres koşullarında ise göz ardı edilebilecek seviyelerde arttığı tespit edilmiştir. Bireylerin iskelet kaslarında bulunan su miktarları ise stres uygulanmış tüm gruplarda azalmış, fakat dehidrasyon stresi uygulanmış bireylerdeki bu azalışın miktarı göz ardı edilebilir olarak düşünülebilir. Amfibilerin donma şartlarına karşı direnç kazandıran *fr10*, *fr47* ve *li16* proteinlerini ifade eden genlerin ise Türkiye’de sınırlı bir bölgede yayılış gösteren *P.caralitanus* türünde var oldukları sonucuna ulaşılmıştır. Tüm stres koşullarına maruz kalmış bireylerin kanlarında *fr47* geninin yukarı yönde düzenlendiği, özellikle donma stresi uygulanmış bireylerde ise karaciğer, kas ve kan dokularında *li16* genin ifadesinin yukarı yönde düzenlendiği tespit edilmiştir. Laboratuvarda uygulanan tüm stres maruziyetlerinin devamında hayatta kalmayı başarabilen tüm *P.caralitanus* bireylerinin stres maruziyeti sonrası daha hareketli ve aktif olduğu saptanmıştır. Bunun sonucu olarak *P.caralitanus* türünde yapılan kriyobiyoloji çalışmalarında, bireylerin vücutlarında bulunan glikozun, uygulanan bu stres koşullarıyla mücadelesi esnasında kayda değer bir metabolik ürün olduğu sonucuna varılmıştır. Stres sonrası yeniden normale dönen bireylerde ölçülen glikoz düzeylerinin kontrol grubunda bulunan bireylerdeki glikoz düzeyleri ile kıyaslandığında ise, stres koşulları sürecinde artan glikoz düzeylerinin, kontrol grubunda bulunan bireylerin glikoz düzeylerine yakın düzeylere indiği görülmüştür. Kurbağalarda tespit edilen *fr10*, *fr47* ve *li16* proteinlerini ifade eden genlerin ifade düzeyleri, uygulanan farklı stres durumlarında farklı şekilde ifade edilmiştir. Donma stresine maruz kalan bireylerdeki *li16* genini ekspresyon düzeyinin artışı, bu genin iki yaşamlılarda soğuk stresine karşı bir cevap olarak

düzenlendiğini kanıtlar niteliktedir. Aynı zamanda fr47 proteinini ifade eden genin stres koşulları uygulanmış tüm bireylerin karaciğer dokularındaki artışı, bu genin iki yaşamlılarda varlığını ve stres koşulları altında düzenlediğini göstermektedir.

5.1 Donma Stresi Durumu ve Yeniden Normal Hale Gelinmede Bireylerin Fizyolojik Tepkileri

Antifriz proteinleri (AFP'ler), organizmaların donma ve alt donma ortamlarında hayatta kalmasını sağlayan benzersiz bir protein sınıfıdır (Chen, Wu, Cai, & Wang, 2020). AFP'ler, güçlü buz yeniden kristalleşme engelleme (IRI) aktivitesine sahiptir, çünkü AFP'ler buz yüzeyinde absorbe edilebilir ve buz kristalleri arasındaki su akışını engeller. Bu nedenle buzun büyümesini sınırlandırır (Davies, 2019). IRI aktivitesi, organizmaların ölümcül 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, ve diğerleri, 2021). Laboratuvar koşullarımızda donma stresinin uygulandığı esnada Güleç (2019) in de gözlemediği gibi $-2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ortam sıcaklığında canlıların vücut sıcaklıklarını ölçtüğümüzde, bireylerin vücut sıcaklıklarının $-2 \pm -2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasında değiştiği gözlemlendi. Donma stresine maruz kalan bireyler yeniden çözünme için oda sıcaklığına alındığında bireylerin hücre dışı sıvısının donmasına bağlı olarak vücut uyuşmaları sertleşmiş ve abdomenleri katılaşmıştır. Bununla birlikte göz kapaklarında opaklaşma görülmüştür. 24 saat donma stresi uygulanan bireylerde solunum ve deri üzerinde kalp atışı belirgenliğini kaybetmiştir. Bu bireyleri ise tekrar oda sıcaklığına aldığı anda hepsinin yaşamsal fonksiyonlarını devam ettiği tesit edilmiştir. Donma maruziyeti sonrasında ilk 20 dakikada çözünmeye başlayan canlılar, 90 dakika sonrasında normal nörodavranışlar sergilemişlerdir. Bu sonuçlar ise Güleç (2019)'in çalışmasıyla örtüşmekte ve çalışma sonuçlarını destekler niteliktedir (Güleç, 2019). Donma koşulları için metabolizma hazırlık evresinde yarı uyku durumunda olan hayvanlar donma çözünme stresi sonrasında normalleşme sürecinde metabolik hazırlık dönemine ve hatta normal süreç davranışlarına göre daha hareketliydi. Tüm bu durumlar göz önüne alındığında Anadolu'da bulunan *P. caralitanus* türünün donma stresine karşı yüksek bir adaptasyon gösterdiği bulunmuştur.

5.2 Bireylerin Vücut Ağırlıkları ve Dokularında Bulunan Su Miktarları

Antifriz glikoproteinlerin buz yüzeylerine bağlandığı ve büyümeyi engellediği gösterilmiştir (Brown, Yeh, Burcham, & 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, Urbańczyk, Góra, Latajka, & Sewald, 1989). Yaptığımız laboratuvar çalışmalarında *P. caralitanus* 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. Elde edilen sonuçlar, *R. macrocnemis* ve *R. holtzi* türlerinin soğuğa maruziyet, anoksi ve dehidrasyon streslerinde vücut ağırlıklarının azalması sonuçlarını da desteklemektedir. Costanzo (2015), *R. slvatica* ile yaptığı çalışmalarda benzer sonuçlara ulaşmıştır. Amaral (2018), ise *D. chrysozelis* 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.

5.3 Kriyoprotektan Olarak Görev Alan Glikoz Seviyesi

Laboratuvarımızda yaptığımız çalışmalarda *P. caralitanus* türü kanında tüm stres gruplarında glikoz seviyesi artmış olup, genel artış soğuğa maruziyet grubunda (2,32 kat) görülmüş, fakat istatistiksel olarak anlamsızdır. Karaciğer dokusunda tüm stres gruplarında anlamlı bir artış (soğuğa maruziyet: 6,2 kat, anoksia: 2,9 kat ve dehidrasyon: 5,01 kat) görülmüştür. Kas dokusunda ise tüm stres gruplarında glikoz seviyeleri kontrol gruplarıyla eşdeğere yakın olup anlamsızdı. 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.

5.4 Amfibilerde Bulunan Antifreeze Proteinleri ve Gen Ekspresyon Seviyeleri

Çalışmamızda amfibiye özgü gen bölgesi olan li16 gen bölgesi karaciğerde, soğuğa maruziyet sonrası çözünmede 1,48 kat ve donma 0,091 kat grubunda yukarı yönlü regülasyon göstermiştir. Kanda, soğuğa maruziyet sonrası çözünmede 0,412 kat, dehidrasyon grubunda ise 0,089 kat yukarı yönlü regülasyon göstermiştir. Kasta, soğuğa maruziyet 0,081 kat ve soğuğa maruziyet sonrası çözünmede 0,43 kat ve dehidrasyon grubunda 0,12 kat yukarı yönlü regülasyon göstermiştir. 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 LiI6 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 hemfikirdi.

Çalışmamızda amfibiye özgü gen bölgesi olan Fr10 gen bölgesi kan, anoksia (1,71 kat)

ve dehidrasyon (0,38 kat) maruziyetlerinde artmış, kasta, soğuğa maruziyette(1,081 kat) ve dehidrasyon grubunda (0,016 kat) artmış, karaciğerde, soğuğa maruziyet sonrası çözünme grubunda (0,18 kat) artmıştır. 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 24saatlik dondurmada 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 seviyede idi. Dehidrasyona yanıt 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.

Çalışmamızda, kas dokusu örnekleriyle yapılan çalışmada gen regülasyonları incelendiğinde Fr 47 geni, tüm maruziyet ve normalleşme gruplarında aşağı regüle olmuştur. Kandan alınan örneklerde tüm stres ve normalleşme gruplarında fr47 geni artmıştır. Fr47 geni karaciğer doku örneklerinde soğuğa maruziyet normalleşmesi çözünme grubunda (0,65 kat) anoksi normalleşmesi reoksia grubunda (0,44 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). 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.

5.5 Sonuç

Kriyoprezervasyon, hücreleri, dokuları, ve organları aşırı düşük sıcaklıklarda koruma yöntemini ifade eder. Modern biyoloji, tıp, fizyoloji ve benzerleri kriyoprezervasyondan ayıramaz (. 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 sıgır 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 germplazmını korumanın güvenli ve etkili bir yöntemidir (Liu vd., 2007). Tüm bunların sonucunda hızlı yayılış gösteren *P.caralitanus* kurbağa türünde 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. 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 sağ kalım mekanizmaları *P.caralitanus* türü için çok rahat geçmiş hatta normalleşme döngülerinde oldukça hareketli olmaları bu türün önemini vurgulamaktadır. Kriyolojik çalışmaları çok yönlü hem genetik hem de biyoteknolojik çalışmalarına katkı sağlamasının yanı sıra , uzay çalışmalarında önemli konular arasında kalma niteliğini devam ettirecektir.

6. KAYNAKLAR

- Ağyar, P. 2014, Real-Time Pcr Kullanılarak Beyşehir Gölü Ve Çevresinde İki Amfibi Patojeninin (Batrachochytrium Dendrobatidis Ve Ranavirüs) Yaygınlığının İlk Kez Saptanması. *Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 34s. , Afyonkarahisar
- 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., Rezwani, 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., Urbańczyk, M., Góra, J., Latajka, R., & Sewald, N. 1989. Antifreeze glycopeptides: from structure and activity studies to current approaches in chemical synthesis. *Life Chem. Rep.*, 1-32.

- 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 I 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, I. 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., Çevik, 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.
- 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.
- 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.

- Baçoğlu, M., Özeti, N., & Yılmaz, I. 1973. Amphibians of Turkey. *Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi, İzmir, 50*, 1-155.
- Ben, R. N. 2001. Antifreeze glycoproteins—preventing the growth of ice. *ChemBioChem*, 2(3),161-166.
- 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.
- 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,
- 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*, 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.
- Chen, X., Wu, J., Cai, X., & Wang, S. 2020. Production, structure–function relationships, mechanisms, and applications of antifreeze peptides. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*.
- 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,

- 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, *Ranapipiens.*, *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),
- 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. Supercooling, ice inoculation and freeze tolerance in the European common lizard, *Lacerta vivipara*, *Journal of Comparative Physiology B*, 165, 238–244.
- Costanzo J P, Lee R E. 1993. Cryoprotectant Production Capacity of The Freeze-Tolerant WoodFrog , *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,
- 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.

- 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. 2019. Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. *Trends Biochem Science*, 548-555.
- Davies, P. L. 2022. Reflections on antifreeze proteins and their evolution. *Biochemistry and CellBiology*.
- 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.
- Degree T, Mutyam V. 2013. Aquaglyceroporin Expression and Regulation in Erythrocytes From Freeze Tolerant Cope ' S Gray Treefrog *Hyla Chrysoscelis*.
- 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 MolecularBiology*, 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.
- 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.
- ERİSMİS, 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).
- Erismis, U. C., Ciğerci, 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.
- Erismis, 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.
- 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.
- Eto, T. K., & Rubinsky, B. 1993. Antifreeze glycoproteins increase solution viscosity. *Biochemical and biophysical research communications*, 197(2), 927-931.
- 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.
- 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
- 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* 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.
- 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 twoactivities. *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 FreezingConditions, *Journal of Biosciences*, 39, 931–944.
- Güleç, S. 2019. Hibernasyonda “*Pelophylax caralitanus*”. *Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 24s, Afyonkarahisar
- Gökmen, A. 2022. *Ova Kurbağası (Pelophylax ridibunda) ’nın Kriyobiyolojisi Üzerine Araştırmalar*. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar.
- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- Holmstrup M, Zachariassen K E. 1996. Physiology of cold hardiness in earthworms, *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology*, 115, 91–101.
- 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.
- 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 *SolidState 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 cellbiology*, 8(6), 586-593.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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.

- 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.
- 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
- Liu, X., Pan, Y., Liu, F., He, Y., Zhu, Q., Liu, Z., & Zhan, X. 2021. A Review of the Material Characteristics, Antifreeze Mechanisms, and Applications of Cryoprotectants (CPAs). *Journal of Nanomaterials*.
- Martino M N, Zaritzky N E. 1989. Ice Recrystallization In A Model System and In Frozen Muscle Tissue, *Cryobiology*, 26, 138–148.
- 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
- 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.
- 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
- 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.
- Pincheira-Donoso D, Bauer A M, Meiri S, Uetz P. 2013. Global Taxonomic Diversity of Living Reptiles, *PLoS ONE*, 8, e59741,

- 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.
- Robert J. 2003. Evolution of heat shock protein and immunity, *Developmental & Comparative Immunology*, 27, 449–464.
- 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.
- Ring R A. 1981. The physiology and biochemistry of cold tolerance in arctic insects, *Journal of Thermal Biology*, 6, 219–229.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- Sullivan K J. 2011. Expression Pattern of The Novel Freeze-Responsive Genes *li16*, *fr10* and *fr47* In The Wood Frog, *Rana sylvatica*, Carleton University, Ph.D. Thesis, 143p, Ottawa.
- Sullivan K J, Storey K B. 2012. Environmental Stress Responsive Expression of The Gene *li16* In *Rana sylvatica*, The Freeze Tolerant Wood Frog, *Cryobiology*, 64, 192–200.
- 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 invertebrate 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 frozenfrog. *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.
- 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*.

- Thomas Alerstam, A. H. 2003. Long-distance migration: evolution and determinants. *OIKOS*, 103(2), 247-260.
- 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 *Panagrolaimusdavidi*, *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 quinquemaculata*, *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.
- 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
- Valbona A. 2013. Physiological Response to Freezing In Pool Frog *Pelophylax lessonae*
- 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.
- 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.
- 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.
- 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*, Caleton University, 147,
- Zachariassen K E, Kristiansen E. 2000. Ice Nucleation and Antinucleation in Nature, *Cryobiology*, 41, 257–279.

Yoldaş, T. 2021. *Anadolu Dağ Kurbağalarının Kriyobiolojisi Üzerine Araştırmalar*. Afyonkarahisar: Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Yoldaş, T., & Erişmiş, 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., & Erişmiş, U. C. 2022. Cold Hardiness İn Animals: The Cryobiology Of Amphibians. *Commagene Journal Of Biology* 6(2), 242-253.

İnternet Kaynakları

1- IUCN. 2022. *IUCN*. IUCN Red List: <https://www.iucn.org/> (17.11.2022)

2-<https://weatherspark.com/h/m/148636/2022/9/Historical-Weather-in-September-2022-at-Afyon-Airport-Turkey#Figures-Temperature> (28.09.2022)