

Cold Hardiness in Animals: The Cryobiology of Amphibians

Taner YOLDAŞ^{*1}, Uğur Cengiz ERİŞMİŞ²

¹Düzce University, Scientific and Technological Studies Application and Research Center, Düzce, TÜRKİYE

²Afyon Kocatepe University, Faculty of Sciences and Literatures, Molecular Biology and Genetics Department, Afyonkarahisar, TÜRKİYE

ORCID ID: Taner YOLDAŞ: <https://orcid.org/0000-0002-0209-312X>; Uğur Cengiz ERİŞMİŞ: <https://orcid.org/0000-0002-6958-2016>

Received: 16.09.2022

Accepted: 10.11.2022

Published online: 14.11.2022

Issue published: 31.12.2022

Abstract: Organisms adapt to abiotic environmental conditions in order to survive. Especially environmental temperature changes are effective on their feeding, reproduction, development, and morphology. Extreme temperature changes can be fatal, especially for ectothermic animals. Terrestrial ectotherms have developed some special behavioral, physiological, and biochemical strategies to survive in freezing temperatures in nature. Some species avoid freezing temperatures by migrating and hibernating under water or soil. Others have to spend the winter exposed to freezing conditions. In general, cold hardiness depends on freeze avoidance (supercooling) and freeze tolerance strategies. In the case of freeze avoidance, the liquid form of body fluids is preserved at temperatures below the freezing point, while the freezing of more than 50% of the total water in their bodies can be tolerated in animals using the freeze tolerance strategy. The freeze tolerance strategy, which has also been found in some amphibian and reptile groups from terrestrial hibernator animals, enables them to survive in freezing winter conditions. These special species are protected from the deadly effects of freezing by the cryoprotective mechanisms. These animals, whose vital activities are completely stopped during freezing, return to normal life in a short time after thawing. The research of this miraculous mechanism not only explains the complex adaptation of animals but also provides resources for tissue and cell cryopreservation technology. This review will contribute to those who want to do research on this subject, which has not yet been studied enough, by providing information on the freeze tolerance strategies of amphibians.

Keywords: Ectoterm hibernation, freeze tolerance, freeze avoidance, Cryoprotectants, antifreeze proteins, antioxidant defense.

Hayvanlarda Soğuğa Dayanıklılık: Çift Yaşarların Kriyobiolojisi

Öz: Organizmalar yaşamlarını devam ettirebilmek için abiyotik çevresel koşullara uyum sağlarlar. Özellikle ortam sıcaklığındaki değişimler; canlıların beslenme, üreme, gelişim ve morfolojileri üzerinde etkilidir. Sıra dışı sıcaklık değişimleri özellikle ektotermik hayvanlar için ölümcül olabilir. Karasal ektotermikler, doğada donma noktasının altındaki sıcaklıklarda hayatta kalabilmek için davranışsal, fizyolojik ve biyokimyasal bazı özel stratejiler geliştirmişlerdir. Bazı türler göç ederek su ya da toprak altında kış uykusuna yatmak suretiyle dondurucu sıcaklıklardan kaçınırlar. Bazıları ise donma koşullarına maruz kalarak kışı geçirmek zorundadırlar. Genel olarak dondurucu soğuğa dayanıklılık donmadan kaçınma (süper soğuma) ve donma toleransı stratejilerine bağlıdır. Donmadan kaçınma durumunda vücut sıvılarının donma noktasının altındaki sıcaklıklarda sıvı formu korunurken donma toleransı stratejisini kullanan canlılarda ise vücutlarındaki toplam suyun %50'sinden fazlasının donması tolere edilebilir. Karasal hibernatör hayvanlardan bazı amfibi ve sürüngen gruplarında da tespit edilen donma toleransı stratejisi onların dondurucu kış koşullarında hayatta kalmalarını sağlamaktadır. Bu özel türler kriyoprotektif mekanizmaları ile donmanın ölümcül etkilerinden korunurlar. Donma süresince yaşamsal faaliyetleri tamamen duran bu hayvanlar çözündükten sonra kısa bir süre içerisinde de normal yaşama dönerler. Bu mucizevi mekanizmanın araştırılması yalnızca hayvanların karmaşık adaptasyonunu açıklamakla kalmaz, aynı zamanda doku ve hücre kriyoprezervasyon teknolojisine de kaynak sağlar. Bu derleme amfibilerin donma toleransı stratejilerine dair bilgiler sunarak henüz yeterince çalışılmamış bu konuda araştırma yapmak isteyenlere katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Ektoterm kış uykusu, donma toleransı, donmadan kaçınma, Kriyoprotektanlar, antifriz proteinler, antioksidan savunma.

1. Giriş

Ilıman iklimde yaşayan canlılar için kış döneminin dondurucu soğuk koşulları hayati sorunlar teşkil etmektedir. Bu koşullarda, bazı endotermik hayvanlar yüksek metabolik hızları ve homeotermik yapılarının gereksinimi olan yiyeceği temin edemedikleri için ya göç ederek ya da metabolik hızlarının azaldığı kış uykusu (hibernasyon) gibi fizyolojik ve davranışsal adaptasyonlar ile hayatta kalabilirler (Geiser, 2004; Geiser, 2020). Dondurucu sıcaklıklar heterotermik yapıları nedeniyle ektotermik hayvanlar için daha tehlikelidir. Birçok soğukkanlı hayvan için göç davranışı enerji ve zaman maliyeti açısından mümkün olmayan bir seçenektir. Bu sebepten dolayı bu organizmalar uzun süreli kış

koşullarında kış uykusu, donmadan kaçınma (süper soğuma) ya da donma toleransı gibi adaptasyon mekanizmalarını kullanarak hayatta kalabilirler. Bu stratejilerin temel ortak noktaları ise metabolik hızın düşürülmesidir. Hipometabolizmada birçok ekofizyolojik ve biyokimyasal mekanizma canlıların donma koşullarında hayatta kalma başarısını artırır (Donoso et al., 2013; Ultsch, 2006).

Dondurucu soğuğa maruz kalan hayvanlar için temelde üç ana stres ortaya çıkar. Bunlar; hücre ve dokulardaki suyun donması ile oluşan fiziksel hasar, kan akışının durmasına bağlı olarak anoksi/iskemi oluşumu ve suyun hücreler arası boşluklara çıkışından kaynaklı fizyolojik dehidrasyon stresleridir. Donma toleranslı

*Corresponding author: taneryoldas@duzce.edu.tr

omurgalılar donma, anoksi ve dehidrasyon koşullarında glikoz, gliserol, üre gibi kriyoprotektan moleküller, bazı protein ve antioksidanlar sayesinde buz formunun kontrolü, anaerobik enerji optimizasyonu, yüksek asidozis ve anhidrobiyozis ile başa çıkmak gibi birçok metabolik süreci kontrol ederek doku ve hücrelerini korumayı başarırlar (Costanzo et al., 2013; Storey & Storey, 2017).

Donma koşullarına maruz kalmamak için böcekler çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Örneğin bal arıları termoregülasyon ile kovan sıcaklığını korumaya çalışırlar, çeşitli yusufçuk ve kelebek türleri kış dönemini donmayan sulara ya da toprak derinliklerinde larva olarak geçirirler, *Phylloscopus trochilus*, *Catharus ustulatus* ve *Danaus plexippus* gibi bazı böcek türleri de göç yolunu tercih edebilir (Duman & Newton, 2020; Merlin & Liedvogel, 2019; Storey & Storey, 2012). Donma koşullarına maruz kalmaktan kaçınmayan birçok böcek türü kriyoprotektan metabolitler (gliserol gibi) ve antifriz proteinler sayesinde vücut sıvılarının donma noktasını aşağıya çekebilirler ve donmadan kaçınma (süper soğuma) adı verilen bu adaptasyon mekanizması ile uzun süre hayatta kalabilirler (Storey & Storey, 2012).

Birçok su kurbağası (*Pelophylax ridibundus*, *Rana pipiens* ve *R. catesbeiana* gibi) ve tatlı su kaplumbağası (örneğin, *Trachemys scripta elegans*) gibi soğukkanlı omurgalılar kışı sulak alanların dip kısımlarında geçirirler (Storey & Storey, 2017; Wijenayake & Storey, 2016). Bu ortamlarda yüzey tamamen buz tutsa da dip bölge donma sıcaklıklarına ulaşmadığı için donmadan fiziksel olarak korunmuş olurlar (Storey et al., 2021; Tattersall & Ultsch, 2008). Karasal soğukkanlı bazı omurgalılar da korunaklı yuva yaparak ve yer altı sığınaklarına çekilerek donmadan korunabilirler. Bunların dışında vücut suyunun %65'ine kadar donmasını tolere edebilen türlerin kullandığı donma toleransı stratejisi de bir diğer ekofizyolojik adaptasyon mekanizmasıdır. Bu strateji gel git bölgelerindeki deniz yumuşakçaları, birçok böcek türü, karada kış uykusuna yatan bazı sürüngen ve amfibi türleri için özel bir adaptasyondur (Costanzo, 1995; Storey & Storey, 2017).

Soğukkanlı omurgalılardan birçok sürüngen türü kısa süreli donma periyodunda hayatta kalabilirken bazı kaplumbağa ve kertenkele türlerinin ise uzun süreli donma maruziyetine karşı tolerans gösterebildiği bilinmektedir (Costanzo et al., 2008; Ultsch, 2006). Kışı yüzeye yakın toprak ya da yaprak katmanları arasında geçiren bazı amfibiler donma koşulları ile başa çıkabilmek için donma toleransına sahiptirler. Örneğin, *Pseudacris crucifer* ve *Rana sylvatica* gibi bazı türler vücutlarındaki suyun %65'inin donmasını tolere edebilirler (McNally et al., 2003). Anadolu türleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda da endemik *Pelophylax caralitanus*, *Rana holtzi* ve *R. macrocnemis*'in de belirli düzeylerde donma toleransına sahip olduğu son dönemde ortaya çıkarılmıştır (Güleç, 2019; Yoldaş, 2021; Yoldaş & Erişmiş, 2021).

Bu derlemenin amacı, doğada dondurucu çevresel sıcaklıklara maruz kalan ve bu süreçte hayatta kalabilen hayvanlardan özellikle bazı amfibi türlerinin hayatta kalma stratejilerine dair mevcut çalışmaları bir araya getirmek ve Türkiye'de henüz çok az çalışılmış bu konuda daha kapsamlı çalışmalar tasarlanması için araştırmacılara rehberlik etmesidir.

2. Dondurucu Soğukta Hayatta Kalma

Kış mevsiminin dondurucu koşulları ılıman iklimlerde yaşayan canlılar için ölümcül olabilir. Birçok küçük memeli ve *Phalaenoptilus nuttallii* gibi bazı kuş türleri de göç sürecindeki mesafeye bağlı enerji kullanımını açısından dezavantajlı oldukları için hibernasyon davranışı sergilerler (Geiser, 2020; Woods et al., 2019). Hibernatif memeliler torporda kısmi heterotermik özellik gösterirler, yani sabit vücut sıcaklığı korunamaz (Kart Gür et al., 2014).

Ektotermilerin hayvanların donma koşullarında hayatta kalabilmeleri metabolik hızın düşürülmesinin yanında ilave stratejileri de gerektirir. Termal açıdan korunaklı yuvaya sahip olmayan ve donma sıcaklığı altındaki koşullardan kaçınmayan türler donmanın sonuçlarından korunabilmek için donmadan kaçınma veya donma toleransı stratejilerini kullanmalıdır (Donoso et al., 2013). *Zootoca vivipara* (*Lacerta vivipara*) ve *Chrysemys picta* gibi bazı sürüngen türleri her iki stratejiyi de kullanabilmektedir. Bu durum, türlerin coğrafi olarak çok geniş alanlara uyum sağlayabilmelerini sağlamıştır (Costanzo & Lee, 2013). Her iki adaptasyonu da kullanabilen bazı böcek türleri ise kriyoprotektif dehidrasyon ve vitrifikasyon gibi ek stratejiler de kullanarak inanılmaz düşük sıcaklıklara dayanabilmektedirler. Örneğin *Cucujus clavipes puniceus* (Alaska kırmızı yassı odun böceği) larvalarının -100°C'ye maruz kaldıktan sonra hayatta kaldığı bilinmektedir (Sformo et al., 2010; Storey & Storey, 2012).

Donmadan kaçınma ve donma toleransı adaptasyonlarını kullanan canlılar hücresel dehidrasyon, enerji ihtiyacı, oksidatif hasar, iskemi, ozmo-iyonik dengesizlik, hücre hacminde azalma, yapısal hasar ve protein denatürasyonu gibi farklı birçok stresle başa çıkmak zorundadırlar (Costanzo & Lee, 2013). Donmadan kaçınan ve donma toleranslı canlılar mükemmel adaptasyon mekanizmaları ile kendilerini hem donma, anoksi ve dehidrasyonun getirdiği fiziksel hasarlarından korurlar hem de koşullar normalleştiğinde metabolizmalarının ve davranışlarının da hızlıca normale dönmesini sağlarlar.

2.1. Donmadan Kaçınma (Süper Soğuma)

Donmadan kaçınma ya da kurtulma olarak nitelendirilen bu adaptasyon davranışı, vücut sıvılarının donma noktasını çevresel sıcaklığın altına indirilmesi prensibine dayanır. Bu stratejiyi kullanan canlılar yüksek miktarda kriyoprotektan madde birikimi ve buz oluşumunu engelleyici proteinlerin yardımı ile 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda donmaktan kaçınabilirler. Birçok böcek ve eklembacaklılar yaygın olarak bu stratejiyi kullanır ve -40°C gibi sıra dışı soğuklarda bile donmadan kalabilirler (Costanzo & Lee, 2013; Duman & Newton, 2020).

Donmadan kaçınma adaptasyonunda sulu çözeltilerin kolligatif özelliği ve süper soğuma fenomeni sayesinde donma noktası aşağıya çekilir. Bu davranışı sergileyen canlılar birçok polihidrik alkol ve şekerleri antifriz madde olarak kullanırlar. Bu konuda en yaygın biriktirilen madde gliserol olarak tespit edilmiştir. Çok yüksek oranda kriyoprotektan birikimi ve dehidrasyon ile birlikte sulu vücut sıvıları süper soğuma fenomeni göstererek donma gerçekleşmeden 0°C'nin altındaki

sıcaklıklarda formunu koruyabilmektedir. Bu koşullarda vücuttaki suyun donmaya başladığı sıcaklık noktası süper soğuma noktası (SSN, SCP, "supercooling point") olarak adlandırılır (Kelleher et al., 1987; Storey & Storey, 2012).

Sıra dışı soğuk çevre koşullarına maruz bırakılan omurgalı ektoterm su kaplumbağalarından *Chrysemys picta* -20°C ve *Graptemys geographica* -14.8°C'ye kadar donmadan hayatta kalabilmektedirler (Baker et al., 2003; Costanzo et al., 2013). Asya ve Avrupa'da oldukça geniş bir alanda dağılışı gösteren *Z. vivipara* kertenkele türünün de glisemik indeksini dört kat arttırarak 3 hafta -3.5°C'de donmadan hayatta kalabildiği bildirilmiştir (Costanzo, Grenot, et al., 1995). Bunlara ek olarak *Podarcis sicula* ve *P. muralis* duvar kertenkeleleri, *Vipera berus* ve *Thamnophis sirtalis* gibi yılan türlerinin de donmadan kaçınma stratejisini kullandığı rapor edilmiştir (Voituron et al., 2003). Böceklerde ise bu stratejinin kullanımı omurgalılara göre çok daha yaygındır. Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera ve Coleoptera grubuna ait birçok böcek türü genellikle gliserol ve sorbitolü kriyoprotektan olarak kullanarak kolaylıkla -10 ile -30°C civarında SSN'ye sahip olabilir. Arktik bölge böceklerinden *Pytho deplanatus*'un donma noktası -55°C olarak kaydedilmiştir (Duman, 2001).

2.2. Donma Toleransı

Donma noktasının altındaki sıcaklıklara maruz kalan birçok canlı vücut sıvılarının donmasını engellemeye çalışırken bazı türler vücutlarındaki suyun %65'ine kadarının buza dönüşmesini tolere edebilirler. Donma toleranslı türler olarak adlandırılan bu canlılarda aylarca sürebilen uzun kış dönemine bağlı vücut suyunun %50 sinden fazlası buz formuna dönüşür; solunum, dolaşım ve sinirsel iletim gibi tüm hayati fonksiyonlar durur. Ancak, donma toleranslı türler geliştirdikleri özel adaptasyon stratejisi sayesinde çevresel koşulların normale dönmesi ile birlikte tüm bu hayati fonksiyonların tekrar geri kazanımı ile normalleşebilirler. Bu özel canlılar donma ve çözünme evrelerinde ölümcül olabilecek birçok fiziksel ve biyokimyasal stresle başa çıkabilirler (Biggar et al., 2013; Layne & Lee, 1987).

Donma toleransı adaptasyon mekanizması temelde iç organların ve hücrelerin dehidrasyonu, anoksi ile mücadele, ölümcül hücre içi buzlanmayı engellemek için yoğun miktarda metabolit biriktirilmesi, vücuttaki buzlanmanın yeri ve şekillendirilmesinin kontrolü, hipometabolizma ve antioksidan savunma gibi birçok stratejiyi barındırır (Costanzo et al., 2013; Storey & Storey, 2017). Bu adaptasyon mekanizmasının bugüne kadar hayvanlar âleminde eklembacaklılar, karından bacaklılar ve böcekler gibi omurgasızların yanında amfibiler ve sürüngenler gibi omurgalılarda da kullanıldığı belirlenmiştir (Costanzo & Lee, 2013).

Donma toleransı kendi içerisinde üç temel strese karşı dayanıklılığı gerektirir. Bu dayanıklılıklar anoksi toleransı, dehidrasyon toleransı ve soğuk (buzlanma derecesindeki) toleransı olarak bilinirler ve mekanizmaları enerjinin minimum kullanımına karşılık maksimum yaşam süresi elde etmeyi destekleyen metabolizmanın baskılanması (hipometabolizma) temeline dayanır (Storey & Storey, 2017). Donma esnasında oluşan buz kristallerinin hücre ve dokulara fiziki hasarı, hücre içi buzlanmayı önlemek için hücredeki suyun hücreler arası boşluklara itilmesinden kaynaklı hücresel dehidrasyon,

akciğer, kalp ve kan akışının durması sonucu besin ve oksijenin taşınmaması sonucu anoksi ve iskemi oluşumu, sinirsel iletimin durmasından kaynaklı tüm hayati süreçlerin durması gibi baskılar birçok canlı için geri dönülmez ölümcül sonuçlar doğururken, donma toleranslı hayvanların doğal başa çıkabildikleri koşullardır. Donma toleransı adaptasyonu bunlara ek olarak çözünme sürecinde buzun erimesi sonucu ortaya çıkan suyun hücrelere girme çabasının getirdiği ozmotik basınç ve oksijen içeren kanın ani reperfüzyonu ile birlikte reaktif oksijen türleri (ROS) ile de mücadeleyi gerektirir (McNally et al., 2003; Storey et al., 2021). Tüm bu streslere karşı başarılı adaptasyon sağlanabilmesi canlıların ekosistemdeki yaşam döngüsü, beslenme ve üreme davranışlarındaki başarısına da katkı sağlamaktadır.

Poikiloterm omurgalılardan *Terrapene ornata*, *T. carolina*, *C. picta* ve *Z. vivipara* bilinen güçlü donma toleransına sahip sürüngen türleridir (Storey & Storey, 2017; Voituron et al., 2004). Karasal hibernatör olan anur türlerinden ise *R. sylvatica*, *P. triseriata*, *P. crucifer*, *Dryophytes chrysoscelis* ve *D. versicolor* (*Hyla versicolor*) yüksek donma toleransına sahiptirler (Costanzo et al., 2013; Storey & Storey, 2004). Bunların yanında hibernasyon evresini toprağın ya da suyun derin ve donmayan bölgelerinde geçiren sucul kurbağaların daha ziyat donma toleransı gösterdiği laboratuvar ortamı testlerinde tespit edilmiştir (Costanzo et al., 1993). Semenderlerdeki donma toleransının yaygın olmadığı düşünülse de yeterli araştırmalar yapılmamıştır. Bu kapsamda en bilinen örnekler Sibiryaya ve Schrenck semenderleri (*Salamandrella keyserlingii*, *Salamandrella schrenckii*)'dir. Bu iki türün de -30°C ye kadar sıra dışı dondurucu koşullarda hayatta kalabildikleri bilinmektedir (Berman & Meshcheryakova, 2012; Niu et al., 2018). Günümüzde giderek artan çalışmalar neticesinde donma toleranslı amfibi sayısı giderek artmaktadır. Literatürde donma toleransı açısından değerlendirilen bazı amfibi türleri Tablo 1'de örneklendirilmiştir.

3. Donma Süreci

Bilindiği üzere sıcaklık 0°C ve altına düştüğünde su buza dönüşür. Soğukkanlı hayvanların da bu donma sıcaklıklarına maruz kalmaları esnasında oluşabilecek patofizyolojik sorunlardan biri de hücre içindeki suyun kristalleşmesidir. Hücre içi buzlanmanın gerçekleşmesi hemen hemen tüm canlılar için (bazı nematod türleri hücre içi buzlanmayı tolere edebilir) tamir edilemez ölümcül hasarlara sebep olur. Bu sebeple donma toleransında yalnızca hücre dışı ve vasküler boşluklardaki buz oluşumu ve bunun oluşturacağı mekanik hasara dayanılmasından söz edilebilir (Roy & Goswami, 2019; Storey & Storey, 2017).

Güçlü donma toleransına sahip *R. sylvatica* ile yapılan çalışmalarda, donmanın nefes alma, kalp atışı, kan dolaşımı, uzuv hareketleri ve refleksler gibi normal fizyolojik ve fiziksel faaliyetleri kesintiye uğrattığı tespit edilmiştir (Costanzo & Lee, 2013). Yoldaş (2021) çalışmasında elde edilen *Rana macrocnemis*'e ait donma ve çözünme süreçleri boyunca gerçekleşen fiziksel gözlemler, sıcaklık kayıt verileri ve fizyolojik değişimler Şekil 1'de gösterilmiştir. Kan akışının durması iskemi ve anoksiyi; hücre dışı boşluklarda, deri altı ve karın boşluğundaki buzlanma da hücresel dehidrasyonu meydana getirir

(Sullivan et al., 2015).

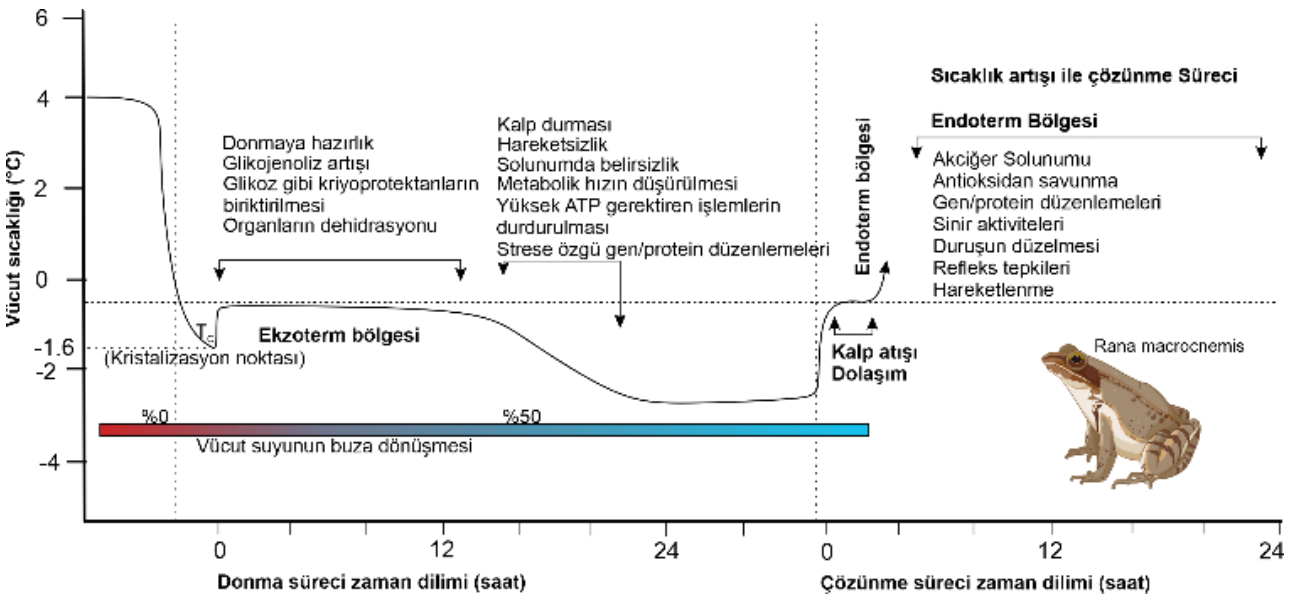
Donma toleranslı hayvanlarda buz oluşumu genellikle vücut sıvılarının donma noktasının 2-3°C daha altında başlar. Donmanın başladığı bu sıcaklığa "süper soğuma noktası, SSN" adı verilir (Berman et al., 2020). Buzlanmanın bu şekilde başlatılması hayvanlara hem hayatta kalmaları için gerekli düzenlemeleri yapmaları için zaman kazandırır hem de ani buzlanma dalgasının

önüne geçilmesini sağlar. Buz çekirdeklenmesi yani suyun buz kristali olarak sıvı fazdan katı faza dönüşmesi için gerekli ilk adım; vücut sıvılarının cilt yüzeyi gibi bir epitel tabakadan çevresel buza teması, spesifik olmayan buz kaynaklarının (deri ya da bağırsak bakterileri gibi) epitel dokuya teması ya da özel "buz çekirdekleyici proteinler" (BÇP, en: INP, *ice nucleating protein*) vasıtası ile başlatılır (Duman, 2015; Storey & Storey, 2017).

Tablo 1. Güçlü ve zayıf donma toleransına sahip bazı amfibiler.

Table 1. Some amphibians with low & well-developed freeze tolerance.

Tür Adı	Test Edilen Koşulları/Hayatta Kalma Durumu	Referanslar
<i>Donma Toleranslı Olduğu Belirlenmiş Semenderler</i>		
<i>Salamandrella keyserlingi</i>	-10°C ile +5°C arası döngüde 130 gün	(Berman & Meshcheryakova, 2012)
<i>Salamandrella schrenckii</i>	-20°C'de 40 günden fazla	(Berman et al., 2010)
<i>Güçlü Donma Toleranslı Kurbağalar</i>		
<i>Rana sylvatica</i>	-2.5 ile -4°C'de 2 aya kadar, -16°C'de de 14 güne kadar	(Costanzo et al., 2013)
<i>Rana arvalis</i>	-2.5°C'de 2 gün %100, -3.5°C'de 3 günde %50 yaşam	(Voituron et al., 2009)
<i>Pseudacris crucifer</i>	-6.0°C'de 5 güne kadar hayatta kalma	(Storey & Storey, 1986)
<i>Pseudacris triseriata</i>	-3.0°C'de 3 gün, -2.5°C'de 4 günden fazla hayatta kalma	(Storey & Storey, 1987)
<i>Dryophytes versicolor</i>	-6.0°C'de 6 gün, -2.5°C'de 14 güne kadar hayatta kalma	(Layne & Lee, 1989)
<i>Dryophytes chrysoscelis</i>	-2.5 ile -2.9°C arasında 20-42 sa. sürelerde hayatta kalma	(Irwin & Lee, 2003)
<i>Zayıf (Donma koşullarına kısa süreli dayanabilen) Donma Toleranslı Kurbağalar</i>		
<i>Hyla regilla</i> ve <i>H. japonica</i>	-6.0°C'de 6 sa. / -4.0°C'de 6 sa. %80 hayatta kalma	(Croes & Thomas, 2000; Hirota et al., 2015)
<i>Rana ridibunda</i>	-2.0 ile -3.0°C'de 8-36 sa. dayanabilme	(Voituron et al., 2003)
<i>Rana lessonae</i> ve <i>Rana esculenta</i>	-2.5°C'de 9-13 sa. donmaya dayanabilme	(Voituron et al., 2005)
<i>Rana dalmatina</i> ve <i>Rana temporaria</i>	-2.0°C'de 8 sa. donma sonunda %50 hayatta kalma	(Voituron, 2009)
<i>Rana amurensis</i>	-2.5°C'de 3 gün ve -1.5°C'de 10 gün hayatta kalma.	(Berman et al., 2017)
<i>Pelophylax caralitanus</i>	-4 ve -20°C'de %0, -3°C'de 24 sa. %100 hayatta kalma	(Güleç, 2019)
<i>Rana macrocnemis</i>	Dağistan (~1100-1800m) hayvanlar -1°C'de 5 günde %5; Türkiye (>2000m) hayvanları -2.5°C 24 sa. %100 yaşam	(Bulakhova et al., 2020) (Yoldaş & Erişmiş, 2021)



Şekil 1. *Rana macrocnemis*'in donma ve çözünme döngüsünün şematik gösterimi.

Figure 1. Illustration of the freezing and thawing cycle of *Rana macrocnemis*.

Suyun hücre dışı buza dönüşmesi sırasında içerisinde çözünen maddeler matrisden uzaklaştırılır ve saf su olarak kristalleşir. Böylece donmadan kalan hücre

dışı sıvının ozmolalitesi daha fazla yükselir. Buradaki yüksek ozmoz hücre içi suyun dışarı çekilmesinde de etkilidir. Hücre içinde kalan az miktarda sıvının donma

noktası vücut sıcaklığına eşitlenene kadar ozmolalite yükselir. Böylece hücre sel sıvı daha fazla soğutulamayacağından hücre içi buzlanma riski de en aza indirgenmiş olur. Vücuttaki buz ve su dengesi çevresel sıcaklıktan etkilense de donma süreci boyunca devam eder (Storey & Storey, 2013). Suyun hücre dışına çıkmasıyla oluşan dehidrasyon hücre hacmini azaltır, doku da küçülür. Bu hacimsel azalışlar kritik seviyenin altına indiğinde aşırı sıkışma ile plazma membranının çift katmanlı yapısının hasar görmesine, bu da çözünme esnasında işlevsiz bir hücre iskeleti olmasına yol açar (Storey, 2017).

Dehidrasyonun yanında donma sürecinin bir diğer ana sonucu da anoksidir (Storey & Storey, 2013). Gelişmiş anoksi toleransına sahip karasal hibernatör canlılar (kara kaplumbağaları, bazı kurbağalar ve kertenkeleler gibi) donduklarında tüm dolaşımını durmasına rağmen oluşan iskemik/anoksik koşullarda hayatta kalabilirler. Anoksik koşullarla başa çıkabilmek için asidozun azaltılması, anaerobik ATP kullanımı optimizasyonu ve ilgili gen/protein düzenlemelerinin yapılması gerekmektedir (Storey & Storey, 2017; Sullivan & Storey, 2012).

Hücre dışı buzlanmada vasküler genişleme ve damarların lümeninde buzlanma görülmektedir. Vasküler genişleme kontrol edilemediğinde damarların yapısal bütünlüğü bozulur ve çözünme sonrası kanın damar dışına çıkarak iç kanama ve ölüme yol açabilir (Storey & Storey, 2001). Donma koşullarının uzun süre var olması durumunda buz bağlayıcı proteinler (BBP, IBP, *ice binding protein*) ya da antifriz proteinler (AFP, *antifreeze protein*) adı verilen proteinler küçük buz kristallerine bağlanarak onların büyümesini ve rekristalizasyonu engellerler. Böylelikle buz kristallerinin doku ve hücrelere zarar vermesinin önüne geçilir (Storey & Storey, 2017).

3.1. Donma Sürecinin Kontrolü - Hipometabolizma

Metabolizmanın baskılanması durumu (hipometabolizma) birçok organizma tarafından çeşitli çevresel streslere karşı kullanılan bir yanıt mekanizmasıdır. Metabolik hızın %30 altına indirilmesi torpor, hibernasyon, estivasyon, diyapoz, anhidrobiyoz, anaerobiyoz ve donma toleransı gibi birçok koşulda hayat kurtarıcıdır (Kart Gür & Gür, 2017; Storey & Storey, 2011). Örneğin *C. picta* su sıcaklığının 10°C olduğu koşullarda metabolik hızını %10'a düşürerek su altında 3-4 ay boyunca hayatta kalabilir (Jackson, 2002). Kurbağalardan *R. sylvatica*'nın da metabolik hızı ve biyolojik süreçlerin sıcaklığa duyarlılık ölçüsü olan Q_{10} değerinin sıcaklığın düşmesi ile doğru orantılı olarak azaldığı bildirilmiştir (Sinclair et al., 2013).

Hayatta kalmak için kritik öneme sahip hipometabolizmanın kontrolünde ise epigenetik faktörler ve transkripsiyonel kontrol, hücre sinyal düzenlenmesi ve enerji kullanımı yüksek metabolik olayların baskılanması, hücre döngüsü yavaşlatılması ve anti apoptoz mekanizmaları rol oynar (Al-attar et al., 2020; Storey & Storey, 2007). Hipometabolik evreye geçişte hücre döngüsü, moleküler adaptasyonlar, enzim aktiviteleri, protein ve RNA sentezi, iyon kanallarında taşıma işlemleri gibi süreçlerin baskılanması büyük oranda ATP kullanımını azaltarak yeni bir homeostaz oluşumunu sağlar. Örneğin, kış uykusundaki yer sincabı (*Spermophilus lateralis*)'nın birçok dokusunda ATPaz aktivitesinin %40'a

kadar düştüğü belirlenmiştir (MacDonald & Storey, 1999).

Hipometabolizmayı etkileyen mekanizmalardan epigenetik faktörler de donma toleransında nesiller boyu aktarılabilecek özelliklerin oluşmasını sağlayabilir. Epigenetik varyasyonlar, çevresel strese adaptasyonda DNA dizilerindeki varyasyonlardan daha yüksek bir oranda oluşabilir. Örneğin Storey & Storey (2017)'de son buzullaşmanın ardından kuzeye doğru genişleyen *R. sylvatica* popülasyonlarında hayatta kalma limitlerinin gelişmesindeki kilit unsurun epigenetik kalıtım olabileceğini belirtmiştir. Bu türün hayatta kalma limitleri Ontario bölgesi hayvanlarında -5°C, Alaska hayvanlarında ise -16°C olarak kaydedilmiştir (Costanzo et al., 2013). Çevresel streslere karşı hipometabolizmayı düzenleyici yanıtlardan bir diğeri de miRNA'lardır. *R. sylvatica* ve *D. chrysoscelis* ile yapılan çalışmalar donmaya yanıt olarak karaciğer ve kas dokularında hücre döngüsünün yavaşlatılmasında ve apoptozisin engellenmesinde rol alan miR16, miR2 ve miR30'un ekspresyonlarında artış olduğunu göstermiştir (Amaral et al., 2020; Biggar et al., 2009). Bunların dışındaki birçok miRNA'nın ekspresyonun enerji yönetimi ve nöroprotektif etki amaçlı olarak azaldığı düşünülmektedir. Hücre döngüsü kontrolünde aktif rol oynayan bazı siklin bağlı kinazların (Cdk) *R. sylvatica*'da donma, anoksi ve dehidrasyon koşullarında %50-60 oranında azalarak, Cdk inhibe eden proteinlerin fosforilasyonunun arttığı tespit edilmiştir (Storey & Storey, 2017; Tan et al., 2013).

Solunum, dolaşım, sinyal iletimi ve kas hareketleri gibi yaşamsal faaliyetlerin durduğu donma sırasında hayatta kalabilmek için ihtiyaç duyulan enerji eldesi anaerobik enerji üretim yöntemi ile sağlanır. Yeterli glikan depolama ve gelişmiş glikolitik kapasite vasıtasıyla uzun süre ATP sentezi sağlanabilir. Glikoz, gliserol ve ürenin donma toleranslı amfibilerde enerji üretiminde ve kriyoprotektan olarak sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir (Yoldaş & Erişmiş, 2021).

4. Kriyoprotektanlar

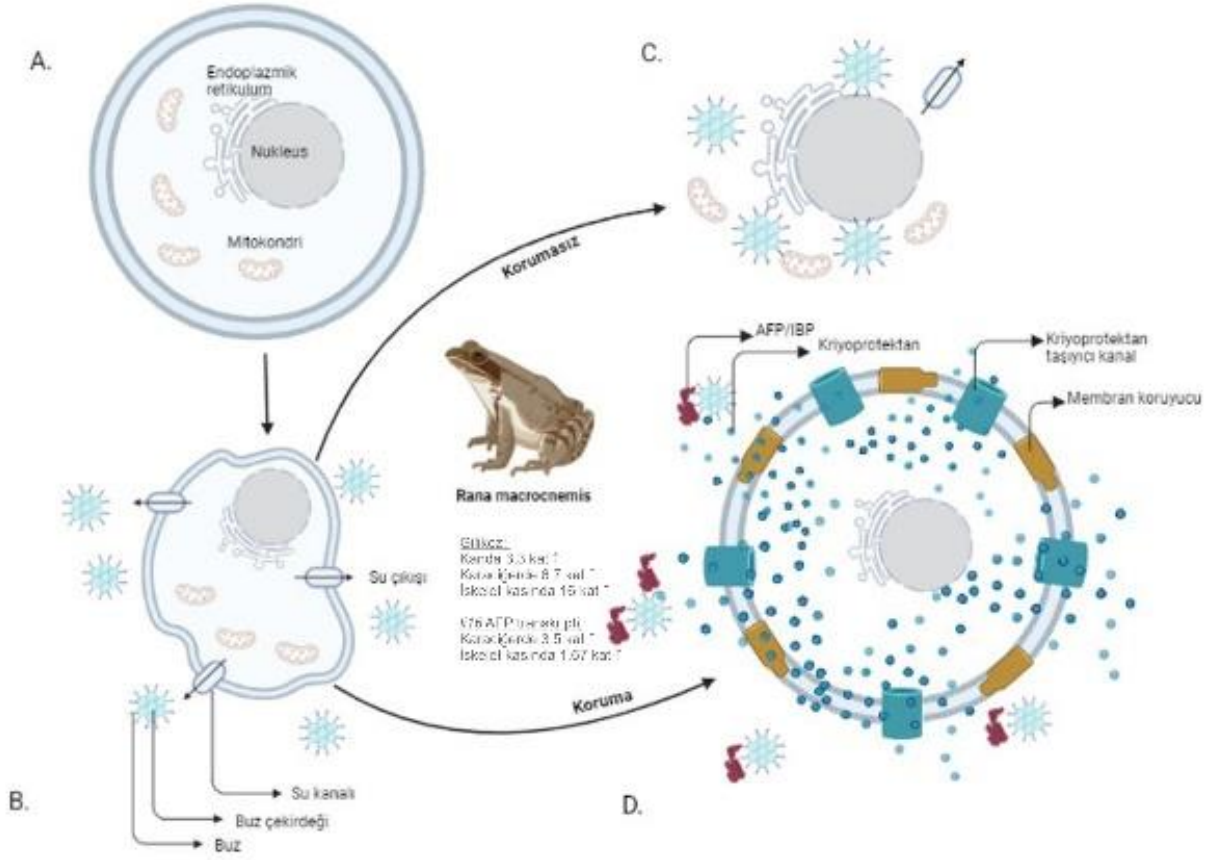
Donma ve donmaya bağlı streslere maruz kalan ektotermik canlıların kullandığı en önemli strateji yüksek miktarlarda metabolit biriktirmektir. Kriyoprotektan olarak adlandırılan bu metabolitler, hücre iç ve dış bölümlerinde yer alarak ozmolalitenin yükselmesine dolayısı ile de donma noktasının düşmesine sebep olurlar ve böylece hücreyi buzlanmanın etkilerinden korurlar (Şekil 2). Kriyoprotektan madde olarak karbonhidratlar, proteinler (IBP, BÇP, AFP'ler gibi) üre ve antioksidan maddeler kullanılabilir.

Glikoz, gliserol ve üre en yaygın kullanılan kriyoprotektanlar olarak tespit edilmiştir. Kurbağalarda da oldukça yaygın olan bu kriyoprotektanlardan gliserol ve üre *D. versicolor* ve *D. chrysoscelis*'de, glikoz da *R. sylvatica*, *Pseudacris triseriata*, *P. maculata* ve *P. crucifer* gibi birçok türde baskın kriyoprotektan metabolit olarak rol aldığı tespit edilmiştir (Amaral et al., 2018; Costanzo et al., 2015).

Donma sürecinde rol aldığı tespit edilerek buz çekirdekleyici (BÇP), buz şekillendirici (BŞP, en: ISP, *ice structuring protein*) ve antifriz proteinler (AFP) olarak isimlendirilen özel protein grupları buzlanmanın tetiklenmesi, baskılanması ya da şekillendirilmesini

sağlayarak donma sürecinin kontrolünü sağlarlar. BÇP'ler özellikle böcekler tarafından kullanılan, hemolenf sıvısının ozmolalitesinin artırılarak hücrelerin dehidrasyonunu sağlayan, AFP'ler ise çoğunlukla donma

toleranslı türlerde buz kristallerinin büyümesini engellemede etkin proteinlerdir (Duman, 2001; Olijve et al., 2016; Storey & Storey, 2017).



Şekil 2. Donma koşullarında korunan ve korunmayan hücrelerin durumu.

Figure 2. Illustration of cryoprotected and unprotected cells under freezing conditions.

Canlılarda kriyobiyojik çalışmalar devam ettikçe donma ve çözünme süreçlerinde rol alan yeni moleküller ve bu moleküllerin detaylı işlevleri ortaya konmaya devam edecektir. Dondurucu kış dönemlerinde kullanılan tüm bu stratejiler ile ektotermik hayvanlar hücre içi buz oluşumunu engeller, anoksi ve dehidrasyon ile başa çıkabilir ve çözünme sürecindeki oksidatif stresleri bertaraf ederek zorlu koşullarda habitatlarında var olmaya devam edebilirler.

4.1. Glikoz, Gliserol ve Üre

Hücrelerde kriyoprotektanların biriktirilmesi donmaya dayanıklılıkta en önemli faktörlerden biridir. Sıklıkla omurgasız hayvanlar tarafından kullanılan teraloz ve prolin gibi hücre membranı ile etkileşimde olanlar donma sürecinde hacmi azalan hücrenin membranındaki çift katlı yapının stabil kalmasına destek olurlar. Daha düşük molekül ağırlıklı glikanlardan oluşan glikoz, gliserol, laktat gibi moleküllerin yüksek konsantrasyonlarda biriktirilmesi hücredeki su kaybını sınırlayarak kolligatif bir yapı ile minimum hücre hacminin korunmasını sağlar (Storey et al., 2021; Storey et al., 1997). Karasal omurgasızlar donmadan kaçınma ve donma toleransında kriyoprotektan olarak fazla miktarda gliserol ve/veya sorbitol, ribitol, ve etilen glikol gibi diğer polihidrik alkollerini biriktirirler (Duman et al., 1991). Omurgalılardan donma toleranslı kurbağaların kullandığı en yaygın

kriyoprotektanların ise glikoz, gliserol ve üre olduğu belirlenmiştir (Amaral et al., 2020; Costanzo, 2005; Niu et al., 2018).

Çoğu organizma temel enerji eldesini glikolizis ile sağlar ve kullanabileceğinden fazla glikoz ve diğer glikanları da glikojenez ile glikojene dönüştürerek depolar. Omurgalı hayvanlarda karbonhidratların depolanma formu olan glikojen, önemli bir enerji deposu olmasının yanı sıra donmadan korunmada da önemli bir kaynak rolündedir. Glikojen kurbağalarda aktif dönemde enerji kaynağı olmanın yanında pasif dönemde de bazal metabolizmayı destekleyici unsurdur. Kış döneminde donma toleranslı kurbağalar için çok önemli bir kriyoprotektan kaynağıdır (Dieni et al., 2012; Sinclair et al., 2013). Kurbağalardaki glikojen rezervleri üreme dönemi ile en alt seviyeye ve kış öncesi dönemde de en üst seviyeye ulaşır. Kış dönemi öncesi *R. sylvatica* karaciğer ağırlığının %18'i kadar yüksek seviyelerde glikojen depoladığı kaydedilmiştir (Storey et al., 1997). Bunun dışında çevresel şartların glikojen rezervlerini etkilediği bilinmektedir. Örneğin Alaska bölgesindeki *R. sylvatica* bireylerinde Ohio'dakilere göre daha yüksek glikojen sentaz aktivitesi tespit edilmiştir (Costanzo et al., 2013).

R. sylvatica ile yapılan çalışmalarda donma başladığında en fazla tepki veren kriyoprotektanın glikoz

olduğu, 5 mM'den 250 mM (Alaska bölgesi hayvanlarında 800 mM'a kadar) seviyelerine yükseldiği belirtilmiştir (Costanzo et al., 2013; Costanzo, 2019; Hawkins et al., 2019). Glikoz donmanın yanı sıra anoksi ve dehidrasyon koşullarında da artmaktadır. Örneğin dehidrasyon koşullarında donma toleransı bulunmayan *R. pipiens*'in karaciğer dokusundaki glikoz seviyesi kontrole göre 24 kat artış göstermiştir. Bu oran aynı koşullara maruz bırakılan donma toleranslı türlerin (*R. sylvatica* ve *P. crucifer*) tepkisinden bile fazla olarak kaydedilmiştir (Churchill & Storey, 1994, 1995). Donma toleranslı kurbağalardaki başarı donma ile tetiklenen glisemik cevaba bağlıdır. Glikojenoliz ile karaciğerde sentezlenen glikoz, dolaşım durmadan önce diğer dokulara hızlıca taşınır (Hawkins et al., 2019; Storey & Storey, 2004). Bu süreçte plazma membranlarındaki glikoz taşıyıcıların da sayısı artarak organlardaki glikoz birikimi de hızlandırılır (Roy & Goswami, 2019).

Soğuğa karşı cevap stratejilerinde çoğunlukla omurgasızların kullandığı kriyoprotektan metabolit ise gliseroldür (Duman & Newton, 2020; Storey & Storey, 2012). Amfibilerden *Salamandrella keyserlingii* ve *Hylid* türü kurbağaların da gliserolü donma toleransında donmadan koruyucu molekül olarak kullandığı kaydedilmiştir. *Dryophytes chrysoseleis* ve *D. versicolor* (*Hyla versicolor*) türlerinde donma maruziyeti sonrası gliserol seviyesinin 300 - 425 mM seviyelerine yükseldiği bildirilmiştir (Layne & Lee, 1989; Stogsdill et al., 2017).

Hücre hasarı açısından gliserolün sentezi ve kullanımı glikoza göre daha avantajlı olsa da gliserolün üretimi enerji maliyeti açısından ve daha kompleks yollar gerektirmesi yönüyle dezavantajlıdır. Amfibilerde kriyoprotektan olarak kullanılacak karbonhidratın seçimi evrimsel bir sıçrama olabileceği gibi semenderlerin gliserolü kullanması maruz kalınan aşırı soğuk çevre koşullarına da bağlı olabilir (Layne & Stapleton, 2009; Storey & Storey, 2017).

Kriyoprotektan olarak kullanılan bir diğer önemli molekülün üre olduğu bilinmektedir. Üre, özellikle hücre hacmindeki aşırı azalmayı engellemek için kolligatif direnç sağlayan ve ozmolalitenin artışına büyük katkı sağlayan bir metabolittir (Costanzo et al., 2013; Costanzo & Lee, 2008). Hayvanlarda yıl boyunca vücuttaki hidrasyona bağlı değişikliklere ve kış uykusu döneminde çevrenin kuraklaşmasına yanıt olarak etki gösteren üre, nadiren de olsa donma toleranslı kurbağalar tarafından donmaya yanıt olarak da kullanılmaktadır (Costanzo, 2005; Hawkins et al., 2019). Alaska bölgesindeki *R. sylvatica*'da soğuğa tepki olarak plazma üre seviyesi 8.6 kat artmıştır. Aynı türün dehidrasyona maruziyetinde ise bu artış 18.7 kata kadar çıkmıştır (Costanzo et al., 2013). *D. chrysoseleis* gliserolün yanında üreyi de kriyoprotektan olarak kullanmaktadır. Bunların dışında Tibet platosunda yayılış gösteren *Nanorana pleskei* ve *N. parkeri*'nin de donma maruziyetlerinde üre, maltotrioz ve melezitoz moleküllerinin kriyoprotektan olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir (Niu et al., 2018, 2021). Karasal kurbağalarda ortamdaki suyun azalmasına bağlı olarak biriken üre yüksek ozmolalite ile vücuttan su kaybını geciktirir ve su alımını teşvik eder. Neredeyse tüm kurbağalarda dehidrasyon, estivasyon sürecindeki kuraklık ya da aşırı tuzlu şartlara karşı bir savunma aracı olarak kullanılmaktadır (Hillman et al., 2008; Storey & Storey,

2017).

4.2. Antifriz Proteinler

Buzlanmanın kontrol edilmesinde buz çekirdekleyici, buz bağlayıcı ya da antifriz proteinler olarak adlandırılan protein grupları tespit edilmiştir (Duman, 2015; Duman & Newton, 2020).

Donmanın başlaması buzlanma yapılanmasını kontrol eden proteinler (BÇP, buz çekirdekleyici protein ve BŞP, buz şekillendirici protein) tarafından da gerçekleştirilebilir. BÇP'ler hücre dışında kristallenmeyi artırarak buzun ulaşmadığı hücrelerin çevresindeki ozmolalitenin artmasını sağlar. Böylelikle bu bölgelerdeki hücrelerin buzlanması ya da aşırı soğuması engellenir (Duman & Newton, 2020; Bektaş & Altıntaş, 2007; Storey et al., 2021). Antifriz proteinler (AFP) buz kristallerinin büyümesini kontrol ederek buzun rekristalizasyonunu yani daha tehlikeli boyutlara ulaşmasını engellerler (Storey & Storey, 2017).

Buzlanmanın artmasını ve rekristalizasyonunu önleyen AFP'ler Antartik teleost balıklarında (Notothenioidei) keşfedilmiştir (Devries, 1971). Normal koşullardaki teleost balıklarda kan dokusunun donma noktası -0.5°C iken, Antartik ve subantartik bölgelerde yaşayan Notothenioidei alttakımına ait balıklarda -1.9°C'ye kadar düştüğü kaydedilmiştir (Costanzo et al., 1995). Sonraki çalışmalarda AFP'lerin soğuk su balıklarında ve donmadan kaçınma stratejisi ile kış atlatan böceklerde de bulunarak AFP 1-4 ve antifriz glikoprotein (AFGP) olarak sınıflandırılmıştır (Eskandari et al., 2020).

Günümüzdeki çalışmalar tıp, veteriner ve gıda endüstrisi alanlarındaki araştırmalarda yaygın araştırma ve kullanım alanına sahip olan AFP'lerin psikrofil mikroorganizmalar, bitkiler, nematotlar, böcekler ve ektoterm omurgalılar gibi birçok canlı grubunda var olduğunu göstermiştir (Naing & Kim, 2019). Adsorbsiyon-inhibisyon mekanizmasına sahip olan AFP'ler buz yüzeyine adsorbe olurlar ve termal histerezis etkileri ile rekristalizasyonu ve buzlanmanın artmasını kısıtlarlar. Bu özellikler AFP'lerin donmuş gıda endüstrisinde gıdalarda raf ömrünün uzatılmasında, tıp alanında da organ nakli, trombositlerin korunması ve habis tümörlerin yok edilmesi gibi alanlarda kullanım avantajı bulmasını sağlamaktadır (Storey & Storey, 2017; Tejo et al., 2020). Bunların dışında AFP'lerin sert kış koşullarına sahip bölgelerdeki ekinlerin korunması, sıcak su balıklarının daha soğuk ortamlarda yetiştirilmesi, transplant ve transfüzyon dokularının daha iyi ve uzun süre saklanması, kriyocerrahinin geliştirilmesi ve hipotermi tedavisi gibi farklı alanlarda da kullanılabilmesi belirtilmiştir (Bektaş & Altıntaş, 2007).

Omurgalılardaki donma toleransı çalışmalarındaki model organizma statüsünde olan *R. sylvatica* karaciğer cDNA kütüphanesi ile gerçekleştirilen geçmiş dönem çalışmalarda donma ile ilişkili olarak bazı genlere odaklanılmıştır. Bunlardan bazıları daha önceden tanımlanmış fibrinojen alt üniteleri, ADP/ATP translokaz ve mitokondri fosfat taşıyıcılardan sorumlu genler iken üç adet yeni protein ve sorumlu genleri tanımlanmıştır. Amfibilere özgü FR10, FR47 ve Li16 olarak adlandırılan bu proteinlerin membranlarla ilişkili hidrofobik bölgelerinin bulunduğu, farklı sinyal yolları ile donma, anoksi ve

dehidrasyon streslerinde görev alabildikleri ve farklı dokularda farklı ekspresyon seviyesi gösterebildikleri bildirilmiştir (Cai & Storey, 1997; McNally et al., 2002, 2003; Storey, 2004). Bu proteinlerle ilişkili olan genler (*fr10*, *fr47* ve *li16*) de farklı dokularda farklı seviyelerde ifade olmakla birlikte her üçünün de donmadan sorumlu olduğu gösterilmiştir (Storey, 2004; McNally et al., 2003).

İlk olarak *R. sylvatica* cDNA kütüphanesinden ortaya konulan *fr10* geni protein kodlayan bölgesinin mRNA dizisinin 550 bp olduğu, dizinin 90 amino asitlik (aa) ve 10 kDa büyüklüğünde FR10 proteininin kodlandığı bir açık okuma bölgesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Cai & Storey, 1997). Donma toleransında rol alan, 2002 yılında tanımlanan yeni bir protein olan Li16 (115 aa)'nın sentezinden sorumlu olan *li16* geni transkripti 446 bp uzunluğa sahip olup, Li16 proteininin hesaplanan kütlesi 12.8 kDa iken western blot çalışmaları proteinin 15 kDa civarında olduğunu göstermiştir (McNally et al., 2002). Yine *R. sylvatica* çalışmalarında tespit edilen ve en büyük AFP'lerden biri olma özelliğine sahip FR47 proteinine ait *fr47* geni 3678 bp uzunluğundadır (McNally et al., 2003). Yapılan teorik hesaplamalar ve western blot analizleri proteinin yaklaşık 47 kDa ağırlığa sahip olduğunu göstermiştir. Protein yapısındaki belirli bölgelerin güçlü hidrofobik yapıda olması proteine muhtemelen transmembran özellik kazandırdığı bildirilmiştir (Storey & Storey, 2004; Sullivan et al., 2015).

R. sylvatica'nın donmaya (24 saat -2.5°C) maruz bırakılması sonrası *fr10* mRNA seviyesinin karaciğer ve bağırsaklarda artış gösterdiği; kalp, akciğer, mesane ve beyin dokularında orta seviyede yükseldiği ve böbrek dokusunda ise azalış gösterdiği tespit edilmiştir. İskelet kasında ise gen ekspresyon seviyesi stabil kalmıştır (Cai & Storey, 1997; Storey & Storey, 2001). Yine *R. sylvatica*'nın 24 saat donma maruziyeti sonrası *li16* transkript seviyesinin karaciğerde 3.7 kat arttığı kaydedilmiştir. Li16 protein seviyesinin de transkript seviyesine paralel olarak 2.4 kat arttığı tespit edilmiştir. Karaciğer dokusundaki gen ve protein ekspresyon seviyelerinin anoksi maruziyetinde de artış yönünde tetiklenirken dehidrasyon stresine tepkisi çok fazla olmamıştır. Ekspresyon seviyeleri anoksi sonrası normalleşme sürecinde ise hızla azalış göstermiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda Li16 proteininin donma esnasındaki iskemi durumuna direnç göstermede rol oynayabileceği belirtilmiştir (McNally et al., 2002; Sullivan & Storey, 2012). Donma toleransından sorumlu genler üzerine yapılan araştırmalarda *fr47* geni mRNA'sının donma toleranslı *R. sylvatica*, *H. versicolor* ve *P. crucifer* türlerinde ifade edilirken *R. pipiens* ve *Scaphiopus couchii* gibi donma toleranslı olmayan türlerde olmadığı tespit edilmiştir. *R. sylvatica* karaciğer dokusunda *fr47* ekspresyon seviyesi 24 saat donma sonrası 5.1 kat, 24 saat anoksi sonrası 6.4 kat ve dehidrasyon sonrası 2.7 kat arttığı tespit edilmiştir. Yapılan immunoblotlama çalışmaları da donma ve çözünme sürecinde protein seviyesinin arttığını, anoksi ve dehidrasyon süreçlerinde de bir miktar azalış olduğunu göstermiştir (McNally et al., 2003; Sullivan et al., 2015).

Anadolu dağ kurbağalarından *Rana macrocnemis* ve endemik *R. holtzi* ile yapılan bir çalışmada donma, anoksi, dehidrasyon stresleri ve stres sonrası normalleşme süreçlerindeki *fr10*, *fr47* ve *li16* gen ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Doğu Anadolu bölgesinden 2000 m ve üzeri

rakımdan toplanan *R. macrocnemis* karaciğer dokusunda donma maruziyeti (24 saat -2.5°C) *li16* transkript seviyesini yaklaşık 3.5 kat, anoksi stresi ise *fr47* mRNA ekspresyonunu 2.7 kat arttırmıştır. Bolkar dağlarında endemik olarak kabul edilen ve 2500 m rakımdan toplanan *R. holtzi* karaciğer dokusunda donma, anoksi ve dehidrasyon koşullarının hepsi *fr10* gen ekspresyon seviyesinin artış göstermesine sebep olmuştur (Yoldaş, 2021).

4.3. Antioksidanlar

Organizmalar birçok strese karşı antioksidan savunma sistemi ile cevap oluştururlar (Kültz, 2005). Donma toleranslı hayvanlarda oksijen seviyesine bağlı oluşan hipoksi ya da anoksi streslerine tepki olarak antioksidan savunma sistemi rol oynar (Lima & Savin, 2002; Storey & Storey, 2017). Metabolik hızın düşük olduğu kış döneminde maruz kalınan donma, ultraviyole radyasyon ve oksijene erişememe gibi abiyotik faktörler ile donma ve çözünme döngüsündeki oksijen seviyesi ROS oluşumunu artırır. Bu ROS seviyesine bağlı olarak iskemi - reperfüzyonu hasarlarının felç ve kalp krizi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Storey et al., 2021; Storey & Storey, 2013, 2017).

Donmuş bir hayvan donma, anoksi ve dehidrasyon koşulları ortadan kalktığında başlayan normalleşme sırasında sisteme oksijenin hızlı girmesi sonucu oluşan reaktif oksijen türleri (ROS)'nin saldırısına uğrar. ROS'lar hücreler düzeyde protein, lipid ve hatta DNA yapılarında hasara sebep olabilirler (Storey & Storey, 2012). Donma toleranslı kurbağalardan *R. sylvatica*'nın normalleşme sürecinde antioksidan rolü olan glutatyon peroksidaz enziminin böbrek, kalp ve iskelet kasında neredeyse iki katına çıktığı bildirilmiştir (Joanisse & Storey, 1996). Benzer çalışmalarda antioksidan savunmada temel olarak süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, ve glutatyon S-transferaz enzimlerinin rol aldığı belirlenmiştir (Lima & Savin, 2002; Storey & Storey, 2017).

Anoksi toleranslı kaplumbağalar ve kış uykusundaki memeliler gibi hareket kapasitesi ve oksijene erişimi daha fazla olan hayvanların yapısal antioksidan savunmalarının ve mevsimsel değişken antioksidan kapasitelerinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Lima & Savin, 2002; Storey & Storey, 2017). Gelgit bölgelerindeki yumuşakçalar ve böcekler de dahil birçok donma toleranslı türün incelenmesi sonucu antioksidan savunmanın başarılı bir donma toleransında önemli faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir (Storey & Storey, 2017; Tang et al., 2021).

5. Tartışma ve Sonuç

Donma toleranslı türler; doğal ortamlarında haftalarca boyunca hareketsiz, bir buz parçası formunda hayatta kalabilirler ve tekrar normale dönebilirler. Anadolu dağ kurbağalarından *R. macrocnemis* de laboratuvar koşullarında donduktan sonra tekrar hayatta kalabilen türler arasına girmiştir (Şekil 3). Bunu sağlayan hayvanların sahip oldukları biyokimyasal ve ekofizyolojik adaptasyonlardır. Genel olarak organlardaki dehidrasyon, hücre içi buzlanmayı önlemek için metabolit biriktirilmesi, anaerobik enerji üretimi, buzlanmanın kontrol edilmesi ve oksidatif streslerin bertarafı gibi stratejilerin sistematik olarak kullanılması donma sürecinde hayatta kalmayı

sağlamaktadır. Böylece bu ektotermik özel türler zorlu iklimsel koşullara rağmen habitatlarında varlıklarını

devam ettirebilirler.



Şekil 3. Donma sonrası *Rana macrocnemis*'e ait genel görünüş (Yoldaş, 2021).

Figure 3. General view of *Rana macrocnemis* after freezing (Yoldaş, 2021).

AFP'lerin tıp, gıda ve tarım endüstrilerinin yanında birçok farklı alanlarda kullanım avantajı sağlayabileceği öngörülmektedir. Son yıllarda en çok ilgi çeken konulardan birisi de insanların dondurulmasıdır. Uluslararası bazı araştırma enstitüleri ve özel şirketler hastaların klinik ölümünden sonra kriyoprotektanlar kullanılarak dondurulması konusunu araştırmaktadır. Fakat teoride vitrifikasyonun sinir hücreleri ve beyin dokusuna çok fazla hasar vereceğinden dolayı tekrar hayata dönmenin mümkün olmayacağı düşünülmektedir. Bunun dışında yasal sorunlar ve etik açıdan uygun görülmemesi sebebi ile insanlar üzerinde kriyoteknoloji uygulamalar büyük oranda sektöre uymamaktadır.

Zorlu çevre koşullarında poikiloterm canlıların hayatta kalma stratejilerinin aydınlatılması biyoçeşitliliğin korunmasına da katkı sağlayabilir. Türlerin çevreye bağlı hayatta kalma sınırlarının belirlenmesi koruma planlarının yapılmasında, bölgedeki tür çeşitliliğinin artırılmasında, üreme verimliliği çalışmalarında ve istilacı türler ya da patojen organizmalar ile mücadele gibi konularda doğru stratejilerin belirlenmesini sağlayabilir.

Sonuç olarak AFP'lerin ve kriyoprotektif maddelerin birçok alanda kullanıma potansiyeli; hayatı kolaylaştırma, gıda problemleri, tedavi ve sıra dışı koşullarda hayatta kalma gibi konularda insanlığa avantajlar sağlayacaktır. Bu kapsamda ilerleyebilmek için

kriyobiyojik çalışmalara daha fazla önem verilmesi, hangi türlerde hangi kriyoprotektanların kullanıldığı ve kullanım stratejilerinin ne olduğunun daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

Etik kurul onayı: Bu çalışma için etik kurul onayı alınmasına gerek yoktur.

Çıkar çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

Yazar katkısı: Fikir/Kavram - T.Y., U.C.E.; Tasarım - T.Y.; Denetleme/Danışmanlık - T.Y.; Kaynaklar/Fon Sağlama - U.C.E.; Materyaller - T.Y., U.C.E.; Veri Toplama veya İşleme - T.Y.; Analiz Yorumlama - U.C.E.; Kaynak Taraması - T.Y.; Makalenin Yazımı - T.Y.; Eleştirel İnceleme - T.Y., U.C.E.

Kaynaklar

- Al-attar, R., Wu, C.-W., Biggar, K. K., & Storey, K. B. (2020). Carb-Loading: Freeze-Induced Activation of the Glucose-Responsive ChREBP Transcriptional Network in Wood Frogs. *Physiological and Biochemical Zoology*, 93(1), 49-61. <https://doi.org/10.1086/706463>
- 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 chrysolcelis*: Responses to Cold Acclimation and Freezing. *BMC Genomics*, 21(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6602-4>
- Amaral, M. C. F. do, Frisbie, J., Goldstein, D. L., & Krane, C. M. (2018). The Cryoprotectant System of Cope's Gray Treefrog, *Dryophytes chrysolcelis*: Responses to Cold Acclimation, Freezing, And Thawing. *Journal of*

- Comparative Physiology B*, 188(4), 611-621. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1153-6>
- Baker, P. J., Costanzo, J. P., Iverson, J. B., & Lee, R. E. (2003). Adaptations to terrestrial overwintering of hatchling northern map turtles, *Graptemys geographica*. *Journal of Comparative Physiology B*, 173(8), 643-651. <https://doi.org/10.1007/s00360-003-0373-5>
- Bektaş, G. I., & Altuntaş, A. (2007). Antifriz Proteinler. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 18, 27-32.
- Berman, D. I., Bulakhova, N. A., & Meshcheryakova, E. N. (2017). Adaptive strategies of brown frogs (amphibia, anura, Rana) in relation to winter temperatures in the northern Palaearctic. *Zoologicheskii Zhurnal*, 96(11), 1392-1403. <https://doi.org/10.7868/S0044513417110034>
- Berman, D. I., Bulakhova, N. A., Meshcheryakova, E. N., & Shekhovtsov, S. V. (2020). Overwintering and cold tolerance in the Moor Frog (*Rana arvalis*) across its range. *Canadian Journal of Zoology*, 98(11), 705-714. <https://doi.org/10.1139/cjz-2019-0179>
- 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(1), 131-134. <https://doi.org/10.1134/S0012496610020171>
- 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(1), 97-100. <https://doi.org/10.1134/S0012496612020068>
- Biggar, K. K., Dubuc, A., & Storey, K. (2009). MicroRNA Regulation Below Zero: Differential Expression of miRNA-21 and miRNA-16 During Freezing in Wood Frogs. *Cryobiology*, 59(3), 317-321. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.08.009>
- Biggar, K. K., Kotani, E., Furusawa, T., & Storey, K. B. (2013). Expression of freeze-responsive proteins, Fr10 and Li16, from freeze-tolerant frogs enhances freezing survival of BmN insect cells. *FASEB Journal*, 27(8), 3376-3383. <https://doi.org/10.1096/fj.13-230573>
- Bulakhova, N. A., Mazanaeva, L. F., Meshcheryakova, E. N., & Berman, D. I. (2020). Resistance of the Iranian long-legged wood frog (*Rana macrocnemis* Boulenger, 1885) (Amphibia, Anura) to negative temperatures on land and to hypoxia in water during overwintering. *Herpetology Notes*, 13(December), 1079-1086.
- Cai, Q., & Storey, K. B. (1997). Upregulation of a Novel Gene by Freezing Exposure in The Freeze-Tolerant Wood Frog (*Rana sylvatica*). *Gene*, 198(1-2), 305-312. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00332-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00332-6)
- 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(6), 492-498. <https://doi.org/10.1007/BF00714587>
- Churchill, T. A., & Storey, K. B. (1995). Metabolic Effects of Dehydration on An Aquatic Frog, *Rana pipiens*. *The Journal of Experimental Biology*, 198(Pt 1), 147-154. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7891032>
- Costanzo, J. P. (2005). Cryoprotection By Urea In A Terrestrially Hibernating Frog. *Journal of Experimental Biology*, 208(21), 4079-4089. <https://doi.org/10.1242/jeb.01859>
- 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), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1189-7>
- Costanzo, J. P., Amaral, M. C. F. do, 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(18), 3461-3473. <https://doi.org/10.1242/jeb.089342>
- Costanzo, J. P., Grenot, C., & Lee, R. E. (1995). Supercooling, ice inoculation and freeze tolerance in the European common lizard, *Lacerta vivipara*. *Journal of Comparative Physiology B*, 165(3), 238-244. <https://doi.org/10.1007/BF00260815>
- 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(18), 2969-2975. <https://doi.org/10.1242/jeb.019695>
- Costanzo, J. P., & Lee, R. E. (2013). Avoidance and Tolerance of Freezing In Ectothermic Vertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 216(11), 1961-1967. <https://doi.org/10.1242/jeb.070268>
- Costanzo, J. P., Lee, R. E., DeVries, A. L., Wang, T., & Layne, J. R. (1995). Survival mechanisms of vertebrate ectotherms at subfreezing temperatures: applications in cryomedicine. *The FASEB Journal*, 9(5), 351-352. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.5.7896003>
- Costanzo, J. P., Lee, R. E., & Lortz, P. H. (1993). 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(4), R721-R725. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.265.4.R721>
- 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(6), 297-379. <https://doi.org/10.1002/jez.460>
- Costanzo, J. P., Reynolds, A. M., Amaral, M. C. F. do, Rosendale, A. J., & Lee, R. E. (2015). Cryoprotectants and Extreme Freeze Tolerance In A Subarctic Population of The Wood Frog. *PLOS ONE*, 10(2), e0117234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117234>
- Croes, S. A., & Thomas, R. E. (2000). Freeze tolerance and cryoprotectant synthesis of the Pacific Tree Frog *Hyla regilla*. *Copeia*, 3, 863-868. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2000\)000\[0863:FTACSO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2000)000[0863:FTACSO]2.0.CO;2)
- Devries, A. L. (1971). Glycoproteins As Biological Antifreeze Agents In Antarctic Fishes. *Science*, 172(3988), 1152-1155. <https://doi.org/10.1126/science.172.3988.1152>
- 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. <https://doi.org/10.1242/jeb.065961>
- Donoso, D. P., Bauer, A. M., Meiri, S., & Uetz, P. (2013). Global Taxonomic Diversity of Living Reptiles. *PLoS ONE*, 8(3), e59741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059741>
- Duman, J. G. (2001). Antifreeze and Ice Nucleator Proteins in Terrestrial Arthropods. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 327-357. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.327>
- Duman, J. G. (2015). Animal Ice-Binding (Antifreeze) Proteins And Glycolipids: An Overview With Emphasis on Physiological Function. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1846-1855. <https://doi.org/10.1242/jeb.116905>
- Duman, J. G., & Newton, S. S. (2020). Insect Antifreeze Proteins. In H. Ramlov & D. S. Friis (Eds.), *Antifreeze Proteins Volume 1* (Vol. 1, pp. 131-187). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41929-5_6
- Duman, J. G., Wu D. W., Xu L., Tursman D., Olsen T. M. (1991). Adaptations of Insects to Subzero Temperatures, *The Quarterly Review of Biology*, 66(4), 387-410. <https://doi.org/10.1086/417337>
- Eskandari, A., Leow, T. C., Rahman, M. B. A., & Oslan, S. N. (2020). Antifreeze Proteins and Their Practical Utilization in Industry, Medicine, and Agriculture. *Biomolecules*, 10(12), 1649. <https://doi.org/10.3390/biom10121649>
- Geiser, F. (2004). Metabolic Rate and Body Temperature Reduction During Hibernation and Daily Torpor. *Annual Review of Physiology*, 66(1), 239-274. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.115105>
- Geiser, F. (2020). Seasonal Expression of Avian and Mammalian Daily Torpor and Hibernation: Not a Simple Summer-Winter Affair. *Frontiers in Physiology*, 11(May), 1-19. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00436>
- Güleç, S. (2019). Hibernasyonda 'Pelophylax caralitanus' (Amphibia: Anura)'da DNA Hasarının Araştırılması (536228). Retrieved from <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/giris.jsp>.
- 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(December 2018), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2019.01.009>
- Hillman, S. S., Withers, P. C., Drewes, R. C., & Hillyard, S. D. (2008). Ecological and Environmental Physiology of Amphibians. In *Ecological and Environmental Physiology of Amphibians*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198570325.001.0001>
- Hirota, A., Takiya, Y., Sakamoto, J., Shiojiri, N., Suzuki, M., Tanaka, S., & Okada, R. (2015). Molecular Cloning of cDNA Encoding an Aquaglyceroporin, AQP-h9, in the Japanese Tree Frog, *Hyla japonica*: Possible Roles of AQP-h9 in Freeze Tolerance. *Zoological Science*, 32(3), 296-306. <https://doi.org/10.2108/zs140246>
- 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. <https://doi.org/10.1242/jeb.005500>
- Jackson, D. C. (2002). Hibernating without Oxygen: Physiological Adaptations of the Painted Turtle. *The Journal of Physiology*, 543(3), 731-737. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.024729>

- Joanisse, D. R., & Storey, K. B. (1996). Oxidative Damage And Antioxidants In *Rana sylvatica*, The Freeze-Tolerant Wood Frog. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 271(3), R545-R553. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.271.3.r545>
- 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(2), 299-309. <https://doi.org/10.1007/s13364-013-0154-9>
- 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.
- 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(8), 581-586. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(87\)90073-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90073-4)
- Kültz, D. (2005). Molecular and Evolutionary Basis of the Cellular Stress Response. *Annual Review of Physiology*, 67(1), 225-257. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635>
- Layne, J. R., & Lee, R. E. (1987). Freeze tolerance and the dynamics of ice formation in wood frogs (*Rana sylvatica*) from southern Ohio. *Canadian Journal of Zoology*, 65(8), 2062-2065. <https://doi.org/10.1139/z87-315>
- 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(2), 133-137. <https://doi.org/10.1002/jez.1402490203>
- 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(2), 215. <https://doi.org/10.1007/s00360-008-0304-6>
- Lima, M. H., & Savin, T. Z. (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. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00080-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00080-7)
- MacDonald, J. A., & Storey, K. B. (1999). Regulation of Ground Squirrel Na⁺K⁺-ATPase Activity by Reversible Phosphorylation During Hibernation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254(2), 424-429. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9960>
- Merlin, C., & Liedvogel, M. (2019). The Genetics and Epigenetics of Animal Migration and Orientation: Birds, Butterflies and Beyond. *Journal of Experimental Biology*, 222(Pt Suppl 1), jeb191890. <https://doi.org/10.1242/jeb.191890>
- McNally, J. D., Sturgeon, C. M., & Storey, K. B. (2003). Freeze-Induced Expression of a Novel Gene, *fr47*, In The Liver of The Freeze-Tolerant Wood Frog, *Rana sylvatica*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1625(2), 183-191. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(02\)00603-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(02)00603-6)
- McNally, J. D., Wu, S.-B., Sturgeon, C. M. C. M., & Storey, K. B. (2002). Identification and Characterization of a Novel Freezing Inducible Gene, *li16*, In The Wood Frog *Rana sylvatica*. *The FASEB Journal*, 16(8), 902-904. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0017je>
- Naing, A. H., & Kim, C. K. (2019). A brief review of applications of antifreeze proteins in cryopreservation and metabolic genetic engineering. *3 Biotech*, 9(9), 329. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1861-y>
- Niu, Y., Cao, W., Wang, J., He, J., Storey, K. B., Ding, L., Tang, X., & Chen, Q. (2021). Freeze tolerance and the underlying metabolite responses in the Xizang plateau frog, *Nanorana parkeri*. *Journal of Comparative Physiology B*, 191(1), 173-184. <https://doi.org/10.1007/s00360-020-01314-0>
- Niu, Y., Wang, J., Men, S., Zhao, Y., Lu, S., Tang, X., & Chen, Q. (2018). Urea and Plasma Ice-Nucleating Pproteins Ppromoted The Modest Freeze Tolerance In Pleske's High Altitude Frog *Nanorana pleskei*. *Journal of Comparative Physiology B*, 188(4), 599-610. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1159-0>
- Olijve, L. L. C., Meister, K., DeVries, A. L., Duman, J. G., Guo, S., Bakker, H. J., Voetsa, I. K., & Voets, I. K. (2016). Blocking Rapid Ice Crystal Growth Through Nonbasal Plane Adsorption of Antifreeze Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(14), 3740-3745. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524109113>
- Roy, P., & Goswami, P. (2019). Freeze tolerance in wood frogs. *Journal of Investigative Genomics*, 6(1), 1-4. <https://doi.org/10.15406/jig.2019.06.00078>
- Sformo, T., Walters, K., Jeannet, K., Wowk, B., Fahy, G. M., Barnes, B. M., & Duman, J. G. (2010). Deep supercooling, vitrification and limited survival to -100°C in the Alaskan beetle *Cucujus clavipes puniceus* (Coleoptera: Cucujidae) larvae. *Journal of Experimental Biology*, 213(3), 502-509. <https://doi.org/10.1242/jeb.035758>
- 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. <https://doi.org/10.1242/jeb.076331>
- Stogsdill, B., Frisbie, J., Krane, C. M., & Goldstein, D. L. (2017). Expression of the aquaglyceroporin HC-9 in a freeze-tolerant amphibian that accumulates glycerol seasonally. *Physiological Reports*, 5(15). <https://doi.org/10.14814/phy2.13331>
- Storey, J. M., Wu, S., & Storey, K. B. (2021). Mitochondria and the Frozen Frog. *Antioxidants*, 10(4), 543. <https://doi.org/10.3390/antiox10040543>
- Storey, K. B. (2004). Strategies for exploration of freeze responsive gene expression: advances in vertebrate freeze tolerance. *Cryobiology*, 48(2), 134-145. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.10.008>
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (1986). Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially-hibernating amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 83(4), 613-617. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90699-7](https://doi.org/10.1016/0300-9629(86)90699-7)
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (1987). Persistence of Freeze Tolerance in Terrestrially Hibernating Frogs after Spring Emergence. *Copeia*, 1987(3), 720. <https://doi.org/10.2307/1445665>
- 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(613), 1-19. [https://doi.org/10.1016/S1568-1254\(01\)80003-6](https://doi.org/10.1016/S1568-1254(01)80003-6)
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (2004). Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Vertebrate Freeze Tolerance: The Wood Frog. In E. Benson, B. Fuller, & N. Lane (Eds.), *Life in the Frozen State* (Vol. 274, pp. 243-274). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203647073.ch7>
- 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(10), 1700-1714. <https://doi.org/10.1242/jeb.02716>
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (2012). Insect cold hardiness: metabolic, gene, and protein adaptation. *Canadian Journal of Zoology*, 90(4), 456-475. <https://doi.org/10.1139/z2012-011>
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (2013). Molecular Biology of Freezing Tolerance. *Comprehensive Physiology*, 3(3), 1283-1308. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130007>
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (2017). Molecular Physiology of Freeze Tolerance In Vertebrates. *Physiological Reviews*, 97(2), 623-665. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2016>
- 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(3), 200-213. <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2001>
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (2011). Heat shock proteins and hypometabolism: adaptive strategy for proteome preservation. *Research and Reports in Biology*, 57. <https://doi.org/10.2147/RRB.S13351>
- Sullivan, K. J., Biggar, K. K., & Storey, K. B. (2015). Expression and Characterization of the Novel Gene *fr47* During Freezing In The Wood Frog, *Rana sylvatica*. *Biochemistry Research International*, 2015, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/363912>
- 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(3), 192-200. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.01.008>
- Tan, Y. J., Xiong, Y., Ding, G. L., Zhang, D., Meng, Y., Huang, H. F., & Sheng, J. Z. (2013). Cryoprotectants up-regulate expression of mouse oocyte AQP7, which facilitates water diffusion during cryopreservation. *Fertility and Sterility*, 99(5), 1428-1435. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.049>
- Tang, Z., Chen, B., & Niu, C. (2021). Antioxidant defense response during hibernation and arousal in Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* juveniles. *Cryobiology*, 99(January), 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.01.015>
- Tattersall, G. J., & Ultsch, G. R. (2008). Biological Ecology of Aquatic Overwintering in Ranid Frogs. *Biological Reviews*, 83(2), 119-140. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00035.x>
- Tejo, B. A., Asmawi, A. A., & Rahman, M. B. A. (2020). Antifreeze Proteins: Characteristics and Potential Applications Bimo. *Makara Journal of Science*, 24(1), 58-64. <https://doi.org/10.7454/mss.v24i1.11728>
- Ultsch, G. R. (2006). The Ecology of Overwintering Among Turtles: Where Turtles Overwinter and Its Consequences. *Biological Reviews*, 81(03), 339. <https://doi.org/10.1017/S1464793106007032>

- Voituron, Y., Barré, H., Ramløv, H., & Douady, C. J. (2009). Freeze Tolerance Evolution Among Anurans: Frequency and Timing of Appearance. *Cryobiology*, 58(3), 241-247. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.01.001>
- 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(2), 118-126. <https://doi.org/10.1002/jez.a.10285>
- 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(4), 367-373. <https://doi.org/10.1002/jez.a.20042>
- 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(6), R1563-R1570. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00711.2004>
- Voituron, Y., Paaschburg, L., Holmstrup, M., Barré, H., & Ramløv, H. (2009). Survival and Metabolism of *Rana arvalis* During Freezing. *Journal of Comparative Physiology B*, 179(2), 223-230. <https://doi.org/10.1007/s00360-008-0307-3>
- Wijeneyaka, S., Storey, K. (2016) The Role of DNA Methylation During Anoxia Tolerance in a Freshwater Turtle (*Trachemys scripta elegans*). *Journal of Comparative Physiology B*, 186(3), 333-342. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-0960-x>
- Woods, C. P., Czenze, Z. J., & Brigham, R. M. (2019). The avian “hibernation” enigma: thermoregulatory patterns and roost choice of the common poorwill. *Oecologia*, 189(1), 47-53. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4306-0>
- Yoldaş, T. (2021). Anadolu Dağ Kurbağalarının Kriyobiyoloji Üzerine Araştırmalar (689754). Retrieved from <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/giris.jsp>.
- 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(November 2020), 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.019>
-