

**HİBERNASYONDA “PELOPHYLAX CARALITANUS”
(AMPHIBIA: ANURA)’DA DNA HASARININ ARAŞTIRILMASI**

Selin GÜLEÇ

MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

TEZ NO: 2019-002

2019 - Afyonkarahisar

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİBERNASYONDA “PELOPHYLAX CARALITANUS”
(AMPHIBIA: ANURA)’DA DNA HASARININ
ARAŞTIRILMASI**

Selin GÜLEÇ

MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
tarafından 16.SAĞ.BİL.19 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2019-002
AFYONKARAHİSAR-2018

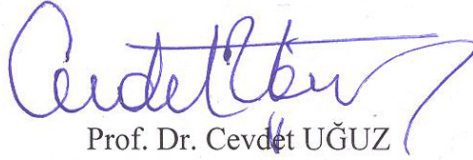
KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

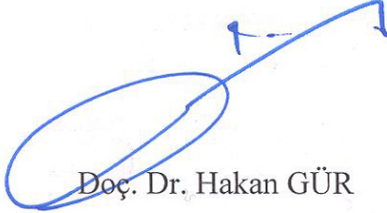
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14.01.2019



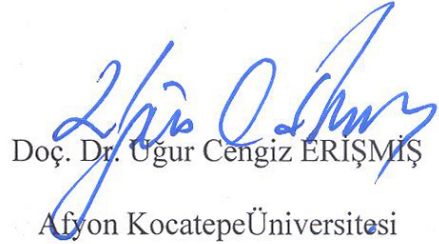
Prof. Dr. Cevdet UĞUZ

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Hakan GÜR

Ahi Evran Üniversitesi



Doç. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Selin GÜLEÇ'in "Hibernasyonda *Pelophylax caralitanus* (Amphibia: Anura)'da DNA Hasarının Araştırılması" başlıklı tezi / / 2019 günü saat’de Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zülfükar Kadir SARITAŞ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez konusunun belirlenmesinde, arazi çalışmalarında ve her daim destek ve yardımını hissettiğim yüksek lisans tez danışman hocam Doç.Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ'e teşekkür ederim. Yüksek lisans öğrenciliğim boyunca yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Cevdet UĞUZ, Doç. Dr. Metin ERDOĞAN, Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT, Doç. Dr. Sibel GÜR hocalarıma teşekkür ederim. Tüm tez çalışmam boyunca beni hiç yalnız bırakmayan sevgili Doç. Dr. Feyza ERDOĞMUŞ hocama teşekkürlerimi sunarım. Desteklerini ve yardımlarını benden sakınmayan Dr. Öğr. Üyesi Hakan TERZİ'ye, Arş. Grv. Fadimana KAYA'ya ve Öğr. Gör. Taner YOLDAŞ'a, Pınar YOLDAŞ'a çok teşekkür ederim. Arazi çalışmalarım ve tüm deney çalışmalarım benimle birlikte çalışan Veteriner Hekim Ahmet KARAMAN, Veteriner Hekim Tayfun DİKMEN ve Biyolog Hasan ŞAHİN'e çok teşekkür ederim.

Beni her konuda daima destekleyen, bugünlere gelmemi sağlayan ve zorlu koşullarda arkamda olduğunu bildiğim sevgili güzel ailem, canım annem Selda GÜLEÇ, canım babacığım İbrahim GÜLEÇ ve biricik kardeşim Cengiz GÜLEÇ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 16.SAĞ.BİL.19 proje numarası ile desteklenmiştir. Maddi desteklerinden dolayı Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL ve ONAY.....	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGE VE KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER.....	vii
ÇİZELGELER.....	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Mevsim Değişikliğine Uyum	1
1.2. Hibernasyon ve Evrimi.....	2
1.3. DNA Hasarı ve Comet Assay Tekniği	6
1.3.1. Comet Assay Tekniğinin Tarihi.....	8
1.3.2. Comet Hücre Sayımı ve Değerlendirilmesi	9
Şekil 1.2. Comet Assay ile elde edilen hücre çekirdeğinin görüntüsü.	10
1.3.3. Amfibilerde Comet Assay Deneyi.....	11
1.4. Hibernasyon Dönemine ve Aktif Döneme Ait Kan Parametreleri.....	13
1.5. <i>Pelophylax caralitanus</i> (Arıkan, 1988).....	16
2. MATERYAL ve METOT	21
2.1. Materyal.....	21
2.1.1 Arazi çalışması ve Örneklerin Toplanması.....	21
2.1.2 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	22
2.2 Metotlar	24
2.2.1. <i>Pelophylax caralitanus</i> 'un Hibernasyona Giriş, Hibernasyondan Çıkış Süresi ve Hibernasyon Sıcaklığının Belirlenmesi	24
2.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	25
2.2.2.1. Comet Analizi İçin Kullanılan Maddeler:.....	25
2.2.3. Comet Assay Yöntemi	25
2.2.3.1. Slaytların Hazırlanması.....	26
2.2.3.2. Lizis Tamponu	27
2.2.3.3 Elektroforez tamponu.....	27
2.2.3.4 Nötralizasyon	28
2.2.3.5 Boyama	28

2.2.4 Kan Parametrelerinin Ölçümü (Glukoz, Kolesterol, Üre, TAS, TOS).....	28
2.2.4.1 Glukoz Tayini.....	28
2.2.4.2 Kolesterol Tayini	29
2.2.4.3 Üre Tayini	30
2.2.4.4 Total Oksidan Seviyesi (TOS) Tayin ölçümü.....	31
2.2.4.5 Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Tayin ölçümü.....	32
2.2.5 İstatistik Analizleri.....	33
3. BULGULAR.....	35
3.1. Hibernasyona Giriş ve Çıkış Dönemi.....	35
3.2. Hibernasyona Öncesi ve Sonrası Ağırlık Değişimleri.....	37
3.3. Hibernasyona Giriş ve Sonrası Boy Uzunluğundaki Değişimler	37
3.4. Hibernasyonun DNA Hasarı Üzerine Etkisi.....	37
3.4.1. Hibernasyon, Aktif Dönem ve Pozitif Kontrol Gruplarında Comet Uzunluğu (CL).....	39
3.4.2. Hibernasyon, Aktif Dönem ve Pozitif Kontrol Gruplarında Kuyruk Uzunluğu.....	40
3.4.3. Hibernasyon, Aktif Dönem ve Pozitif Kontrol Gruplarında Kuyruk Uzunluğunda %DNA.....	42
3.4.4. Hibernasyon, Aktif Dönem ve Pozitif Kontrol Gruplarının Olive Moment Üzerine Etkisi	43
3.5. Hibernasyon ve Aktif Dönem Grubundaki Bireylerin Kan Parametreleri	44
3.5.1. Hibernasyon ve Aktif Dönem Grubundaki Bireylerin Glukoz Miktarı....	44
3.5.2. Hibernasyon ve Aktif Dönem Grubundaki Bireylerin Kolesterol Miktarı.	45
3.5.3. Hibernasyon ve Aktif Dönem Grubundaki Bireylerin Üre Miktarı.....	46
3.5.4. Hibernasyon ve Aktif Dönemde Total Antioksidan Seviyeleri	46
3.5.5. Hibernasyon ve Aktif Dönemde Total Oksidan Seviyeleri	46
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇ	55
ÖZET.....	58
SUMMARY	60
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	82

SİMGE VE KISALTMALAR

% : yüzde

♂-♀: dişi-erkek cinsiyet simgesi

cm : santimetre

dk: Dakika

mg/dl : miligram /desilitre

mg: miligram

mL: mililitre

mM : milimolar

mmol/l : milimol /litre

°C: Santigrat Derece

µg : mikrogram

µl: mikrolitre

µmol/l: mikromol / litre

mA: Miliamper

%DNA: % DNA miktarı

ATP : adenzin trifosfat

CL: Comet uzunluğu

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

H₂O₂ :hidrojen peroksit

IUCN : International Union for Conservation of Nature

KCl: Potasyom klorür

KH₂PO₄ : Dihidrojen potasyum fosfat

LMA: Düşük erime noktalı agar

Na₂HPO₄ x 7H₂O: Sodyum Monohidrojen Fosfat Heptahidrat

NaCl: sodyum klorür

NaOH: Sodyumhidroksit

NMA: Normal erime noktalı agar

NO : nitrik oksit

O₂ : oksijen

OH: hidroksil radikali

OM: Olive Tail Moment

ONOO: peroksinitrat

PBS: Phosphate Buffer Saline

rpm : Rotation per minute

SCGE: Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği

TAS: Total antioksidan durum

TL: Kuyruk Uzunluğu

TOS: Total oksidan durum

Tris-HCl : tris-hidroklorid

V: Volt

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Comet Assay hücrelerinin görsel değerlendirilmesi.....	10
Şekil 1.2. Comet Assay ile elde edilen hücre çekirdeğinin görüntüsü.....	10
Şekil 1.3. Endemik <i>P. caralitanus</i> 'un yayılım haritası (int. kay. 3).	18
Şekil 1.4. <i>Pelophylax caralitanus</i> 'un genel görünüşü	18
Şekil 2.1. <i>P. caralitanus</i> örneklerinin toplandığı arazi.	22
Şekil 2.2. Comet assay yöntemi aşamaları	26
Şekil 2.3. Comet Score IV program görüntüsü.....	34
Şekil 3.1. Hibernasyon döneminde <i>Pelophylax caralitanus</i> 'un dış görünüşü.(A-C) Vücudun katılaşması ve (D) gözlerde opaklaşma görüntüleri	35
Şekil 3.2. Hibernasyondan çıkan bireylerin zamana bağlı vücut sıcaklığı.	36
Şekil 3.3. Hibernasyon dönemindeki bireylerin Comet görüntüsü.....	38
Şekil 3.4. Aktif dönemindeki bireylerin Comet görüntüsü.....	38
Şekil 3.5. H ₂ O ₂ ile muamele edilmiş (pozitif kontrol) kan örneklerinin Comet görüntüsü.....	39
Şekil 3.6. Comet uzunluğu üzerine hibernasyon, aktif dönem ve pozitif kontrol uygulamalarının etkisi	40
Şekil 3.7. Kuyruk uzunluğu üzerine hibernasyon, aktif dönem ve pozitif kontrol uygulamalarının etkisi	41
Şekil 3.8. Kuyruk uzunluğunda %DNA üzerine hibernasyon, aktif dönem ve pozitif kontrol uygulamalarının etkisi	43
Şekil 3.9. Olive Moment değerleri üzerine hibernasyon, aktif dönem ve pozitif kontrol uygulamalarının etkisi	44

ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. <i>Pelophylax caralitanus</i> ’ un bilimsel sınıflandırılması.....	17
Çizelge 2.1. Örnek sayısı ve gölün biyotop özellikleri.....	21
Çizelge 2.2. Oda sıcaklığında Glukoz Tayin Kitin çalışma prosödürü.....	29
Çizelge 2.3. Oda sıcaklığında Kolestrol Tayin Kitin çalışma prosödürü	30
Çizelge 2.4. A1 Üre Tayin Kitinin Çalışma Prosödürü	31
Çizelge 2.5. A2 Üre Tayin Kitinin Çalışma Prosödürü 2	31
Çizelge 2.6. Total Oksidan Seviyesi (TOS) Tayin Kitin çalışma prosödürü.....	32
Çizelge 2.7. Total Antioksidan Tayin Kitinin Çalışma Prosödürü	33
Çizelge 3.1. Comet uzunluğunun hibernasyon,	39
Çizelge 3.2. Kuyruk uzunluğunun hibernasyon,.....	41
Çizelge 3.3. Kuyruk uzunluğunda %DNA hibernasyon,.....	42
Çizelge 3.4. Olive Moment’in hibernasyon,.....	43
Çizelge 3.5. Aktif ve hibernasyon dönemindeki bireylerin glukoz, kolesterol, üre, antioksidan ve oksidan değerleri	45

1. GİRİŞ

1.1. Mevsim Değişikliğine Uyum

Tüm canlı grupları her mevsim koşuluna uygun bir şekilde yaşamlarını sürdürebilme yeteneğine sahip olup, kendilerini olumsuz hava şartlarında koruyabilecekleri bir strateji geliştirmek zorunda kalırlar. Geliştirilen stratejik değişimler organizmanın davranış ve fizyolojilerinde bir takım değişimler meydana getirir ve evrimsel süreçte hayatta kalma şanslarını artırır. Ektotermik ve endotermik hayvanlarda bu değişimler, fizyolojik olabileceği gibi morfolojik olarak da kendilerini gösterebilirler. Bergmann kuralına göre (Bergmann, 1847); büyük ve geniş vücutlu memelilerin yüzey/hacim oranları küçük memelilere göre daha düşük olduğundan dolayı düşük sıcaklıklara daha rahat uyum sağlayabilirler (Ray, 1960; Ashton, 2002b; Belk ve Houston, 2002; Ashton ve Feldman, 2003; Gür, 2012). Aynı akraba grubundan olan memeli ve kuş türleri gibi sıcakkanlı hayvanların sıcak bölgelerde daha küçük, soğuk bölgelerde daha büyük vücutlu türleri yaşar. Küçük memeliler karşılaştıkları düşük sıcaklıkta ısı kaybını ürettikleri endojen ısı ile telafi edebilirler (Geiser, 2004; Atkinson, 1994, Atkinson ve Sibly, 1997; Sota ve ark., 2000; Blanckenhorn ve Hellriegel, 2002; Gür, 2010).

Ektotermik hayvanlarda çevresel ısı değişimlerine bağlı olarak farklı farklı fizyolojik, davranışsal ve morfolojik değişimler görülür. Ortam sıcaklığının çok fazla düşmesi veya yükselmesi durumunda ektotermik canlılar durgun bir hale bürünürlerken (inaktif dönem), sucul canlılar deri ve solungaç solunumu yaparak yaşamlarını çamurun altında geçirebilirler (int. kay. 1; Park, 1949; Lindsey, 1966; Masaki, 1967; Mousseau ve Roff, 1989; Blanckenhorn ve Fairbairn, 1995; Mousseau, 1997; Ashton, 2002b; Belk ve Houston, 2002).

1.2. Hibernasyon ve Evrimi

Mevsim sıcaklıklarının değişmesi, besin kıtlığının ortaya çıkması gibi sebepler ile canlılar yaşamlarını zora sokan koşullarda kendilerini korumak için metabolizmalarını en düşük seviyeye indirip, vücut yapılarını hissiz ve inaktif duruma getirirler. Bu bir uyku halidir (Geiser ve ark., 1995; 1998). Bu mevsimlik uyku hali yazın gerçekleştiğinde “estivasyon”; kışın gerçekleştiğinde ise “hibernasyon” olarak adlandırılır. Estivasyonu kuraklık ve yüksek sıcaklık tetiklerken, hibernasyonu düşük sıcaklık ve besin kıtlığı tetikler (Wade, 1930; Roots, 2006). Heterotermik endotermik zorlu yaşam şartlarında vücut sıcaklıklarını, fizyolojik işlevlerini ve metabolizma hızlarını kontrol edebilirler. Bu fonksiyonların kontrol edilme olayı torpor olarak adlandırılır (Barnes, 1989; Geiser ve Ruf, 1995). Torpor olayı her canlıda farklı gözlemlenebilir. Torporda çok fazla değişkenlik gösteren vücut sıcaklığı, 37 °C'nin birkaç derece altında, hatta 0 °C'in altında olabilir. Bu olay canlıların gösterdiği nişe ve türlere göre farklılık gösterir (Geiser ve ark., 2004; Gür ve ark., 2010). Su ve gıda eksikliği problemleri, mevsimsel soğukluk gibi çevresel sıkıntılardan kendini korumak için birçok canlı torporu kullanır. Bu süreç birkaç saat de sürebilir. Eğer torpor birkaç hafta devam ederse hibernasyon olarak isimlendirilir (Wang, 1978). Hibernasyon, Latince'deki “hibernatus” kelimesinden türemektedir ve Türkçe karşılığı “kışı geçirmek” anlamına gelmektedir (Roots, 2006). Hibernasyon olayı besin kıtlığına bağlı olarak hayvanlar üzerinde oluşabilecek olan strese karşı koyma davranışıdır (Nedergaard ve Cannon, 1990; int. kay.2).

Hibernasyon davranışı gösteren hayvanlar ekofizyolojik stratejileri gereği ürettikleri ve tükettikleri enerji arasında bir denge kurmak durumundadırlar (McNab, 2002; Gür ve ark., 2010; Gür ve ark., 2017). Hibernasyon fizyolojik olarak incelendiğinde, olumsuz çevre koşullarına karşı koyabilmek için metabolizma, dolaşım ve vücut ısısında azalmalar sonucu gelişen dönemsel bir uyku halidir (Yuan ve ark., 2007). Bazı hayvanlar toprak sıcaklığının düşmesiyle de birlikte metabolizma seviyelerini düşürerek torpor haline geçmek suretiyle hayatta

kalabilirler (Gür ve ark., 2014). Uzun süre kış uykusuna yatan memelilerde bu duruma bazı gen ifadelerindeki değişiklikler eşlik etmektedir. Örneğin hibernasyon sürecinde kardiyak fizyolojisi pirüvat dehidrogenaz kinaz izozimi 4 (PDK-4) 'ün ekspresyonu ile kontrol edilmektedir ve bu gen ifadesi hayvanların 6 aya kadar uykuda kalmalarına yardımcı olmaktadır. Memelilerde yaygın olan kardiyak fizyolojisinden sorumlu PDK-4 gen ifadesinin yaz aylarında daha düşük seviyede bulunurken kışın arttığı kanıtlanmıştır. Buna ek olarak, PRL-2 gen ekspresyonu hücre büyümesinden ve sinir hücrelerinin hibernasyon boyunca hücre siklusunun korunmasından görevli olduğu düşünülen bir gendir (Diamond ve ark. ,1994; Cates ve arkadaşları, 1996; Zeng ve arkadaşları, 1998; Geiser ve ark., 2002). Bu gen ifadesinin aktif dönem ve hibernasyon dönemi arasında farklılıklar gösterdiği görülmüştür (Yuhan ve ark., 2007). PRL-2 gen ekspresyonu hemoglobinde meydana gelen bir mutasyon hemoglobine daha fazla oksijenin bağlanmasına sebep olmuş ve oksijenin emiliminin artmasını sağladığı belirtilmiştir. Bu olay endoterm için oldukça büyük bir değişimdir (Kemp, 2005). Bu da gen ifadelerinin yanısıra zaman içerisinde bazı genlerde meydana gelen mutasyonların da hibernasyonun fizyolojisinde belirleyici etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu da hibernasyonun evrimsel süreç içerisinde de incelenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur.

Hibernasyonun fizyolojik bir olay olup kompleks bir doğa olgusu olduğu düşünülmektedir (Hudson, 1973; Harlow, 1997). Hibernasyonun tam olarak evrimsel kökeni bilinmemektedir (Geiser, 1998). Memelilerin devri olarak bilinen senozoyik dönemde, hibernasyon davranışının ilk kez ortaya çıktığı düşünülmüştür (Twente ve Twente, 1964). Hibernasyon olayının ortaya çıkış süreci incelendiğinde hibernasyonun kuşlar ve memelilerin ortak atasından itibaren var olduğu öngörülmektedir (Lyman ve ark.1982; Geiser ve Ruf, 1995; Geiser, 1998). Mrosovsky (1976) ve Bartholomew (1986), Hibernasyon olayının sıcakkanlı bir model organizmadan evrimleştiği düşünülmüştür (Hudson, 1973). Memeli ve kuşların ortak bir ataya bağlı olmasından dolayı, hibernasyonun bu iki sınıfın birbirinden ayrı evrimleşemeyeceğini savunmuşlardır(Geiser, 1998; Geiser ve ark., 2002).

Sadece palearktık bölgede yaşayan bireylere özgü bir davranış olduğu düşünülen hibernasyonun yakın zamanda araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda güney yarım kürede yaşayan bireylerde de torpor ile birlikte görülmeye başladığı görülmüştür (Geiser2010). Sistematik çalışmalarda özellikle de güney yarım kürede yaşayan memelilerde hibernasyondan sorumlu genler tanımlandıktan sonra proteomik ve genomik çalışmalar ile hibernasyona giren hayvanların plesiomorfik karakteri belirlenmelidir (Boyer ve Barnes1999). Bu, hibernasyonun evriminin açıklanması bakımından önemli bir adım olabileceği düşünülmektedir (Malan ve ark. 2014).

Dünya üzerindeki pek çok ekolojik yerleşim yerinde ektotermik omurgalılar başarılı bir şekilde yerleşmiştir. Bazı ektotermik omurgalılar yüksek enlemlere ve daima soğuk olan hava koşullarında maruz kalmaktadır. Mevsimsel geçişler kuzey enlemlerinde daha belirgindir (Blank ve Desjardins, 1986). Bu bölgelerde yaşayan omurgalılar kış mevsimi geldiğinde gıda yoksunluğu ve aşırı soğuma stresi ile karşılaşır. Bu hayvanların vücutları sıfırın altındaki sıcaklarda hayatta kalmak için vücut sıvılarını donduracak adaptasyonlar geliştirmişlerdir (Constanzo ve Lee, 2013). Soğukkanlı canlılarda vücut sıcaklığını kontrol eden mekanizmalar, memelilerin vücut sıcaklığının endotermik regülasyonuna eş değer kabul edilmektedir. Bu durumda soğukkanlı canlılarda görülen bu olay da hibernasyon olarak değerlendirilmelidir (Bicego-Nahas ve ark. 2001; Berner ve Puckett 2010; Hadamova ve Gvozdik, 2011).

Ektoterm omurgalılar donma adaptasyonunu destekleyen bazı mekanizmalar geliştirmiştir. Fakat bu özel mekanizmaların evrimleşme süreci hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Anurlar ve amfibiler soğuk koşullara güçlü klinal varyasyon gösterirler (Brattstrom, 1968; Snyder ve Weathers, 1975; Constanzo ve ark., 2013). Bazı amfibi türleri metabolik dengenin düzenlenmesi için soğuk ortamları tercih ederler (Wood 1991; Wood ve Malvin, 1991). Özellikle *bufo spp.* türleri toprağı kazarak nükleer pulmoner gaz değişimi için yüzeyde kalmak suretiyle kendilerini

koruma altına alırlar (Pinder, 1992). Sıcaklık değişimlerine maruz kalan *Bufo marinus* bireylerinde granüllü endoplazmik retikulum üzerinde bir takım değişiklikler ve CO₂ depolarında azalmalar gözlenmektedir (Kayser 1940; Stinner ve ark. 1994). PCO₂ hücre içinde önemli bir asit-baz düzenleyicidir. *Bufo marinus* ilk 36 saat içerisinde arteriyel kan gazı seviyesini (PCO₂) iki katına kadar çıkarttıktan sonra vücut sıcaklığı değişmeyerek sabit kalır. Daha sonrasında ise asidoz tablosu ve iyonik değişimler dengelenir. pH'ın normal değerlere dönmesiyle kan gazı (PCO₂) sabit kalır. Hibernasyon sürecinde hücre içi pH azalmaktadır. Hibernasyon sonrası uyanma esnasında solunum alma hızı artar ve CO₂ depoları hızla tükenir (Boutilier ve ark., 1979). Amfibilerde görülen normal kan gazı seviyesini korumak için solunum normal hızının üzerine çıkması, solunumsal asidoz gibi metabolik değişimler hibernasyona giren memeliler ile benzerlik göstermektedir (Glass ve ark. 1997). Sıcak ve ılıman bölgelerde orman tabanında minimum -5 ile -7 °C' de hibernasyona giren kurbağalara rastlanmaktadır (MacArthur ve Dandy, 1982; Schmid, 1982). Paleartik bölgelerde hava şartları daha ağırdır ve -1 ile -4 °C arasında değişen kar tabakası bulunan bu bölgelerde Avrupa karası kertenkelesi *Lacerta vivipara*'nın bulunduğu kaydedilmiştir (Grenot ve ark., 2000). Kuzey yarım kürenin en önemli türlerinden biri olan iç Alaska'ya özgü *Rana sylvatica* -16 °C'ye; hatta daha düşük bir derinliğe kadar donma toleransı göstermektedir (Storey, 1988). Ayrıca Asya Rusya'ya özgü iki semender (*Salamandrella keyserlingii* ve *S. schrenckii*) için -35 °C'ye karşı olağan üstü tolerans bildirilmiştir (Berman ve ark., 1984; Berman ve ark., 2010). Kuzey kutbunda bulunan kaplumbağa türlerinden *Chrysemys picta* -4 °C ile -15 °C derecede yüzey zeminin 5-10 cm altındaki yuvalarda donma toleransı ile hayatta kalabilir (Constanzo ve Lee, 2013). Benzer şekilde *Bufo spp.* gibi bazı kurbağa türleride soğuk stresinden korunmak için toprağı kazarlar (Pinder ve ark., 1992). Bazı türler ise bu durumun aksine yüzeyi kullanarak uzun periyotlu kış sürecine dayanabilirler (Schmid, 1982). Vücut sıvılarını ve dokularını donmaya karşı korumak için bazı stratejiler geliştirirler (Voituran ve ark., 2005). Su kurbağa türleri de çevresel strese karşı spesifik biyokimyasal ve fizyolojik stratejiler kullanarak metabolizma hızlarını ve oksijen tüketimini azaltıp akarsu, göl ve göletlerin anoksik çökeltilerine sığınır (Feidantsis ve ark., 2013).

1.3. DNA Hasarı ve Comet Assay Tekniği

Birçok kimyasal madde, fiziksel etmenler ve fizyolojik metabolik reaksiyonlar canlı hücrede moleküler değişikliklere neden olabilirler. X ışınları, ultraviyole, kimyasal ajanlar DNA'nın yapısı açısından yüksek oranda tehlike arz etmektedir. DNA hasarı, normal DNA metabolizması sırasında kendiliğinden veya çevresel faktörlerin etkisiyle oluşmaktadır. Normal DNA metabolizması sırasında oluşan DNA hasarının en önemli nedeni bazların kimyasal yapısında kendiliğinden meydana gelen değişimlerdir (Dinçer ve ark., 2010). Bu etkenler tek ve çift zincir kırılmalarına neden olur. Bu kırılmalar sonucu delesyonlar, insersiyonlar modifiye bazlarda DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağlanmasıyla DNA lezyonları oluşabilir. Oluşan hasar DNA tamir sistemleri tarafından onarılabilmele birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya tamir sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar hücre ölümüne ve mutasyona neden olabilir (Burçak ve Andican, 2004; Onur ve ark., 2009).

Hem karasal hem de sucul canlılar çevresel stresten olumsuz etkilenmektedir. Aşırı soğuk havalarda canlıları donmaya karşı koruyan kriyoprotektanlar vardır. Soğuk şokuna karşı kriyoprotektanların ve antioksidanların yetersiz kalması ile oksidatif stres oluşur. Stres ROS'ların artmasına sebep olur. (Williams ve Jeffrey, 2000; Cooke ve ark., 2003) DNA'nın kendini eşlemesi sırasında yan ürün olarak oluşan serbest radikallerdeki ajanlar DNA'da hasara sebep olmaktadır. (Burçak ve Andican, 2004; Onur ve ark., 2009).

Tüm canlılarda doğal dengenin bozulması ve kirletici miktarlardaki artış oksidan-antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulması yani oksidatif stres halinde, metabolizmada farklı bozuklukları ortaya çıkarır. Bu tarz zincir tepkimeleri oluşması protein, ROS'ların meydana gelmesi sonucunda, karbonhidrat, lipid ve DNA gibi biyomoleküller yapısal ve metabolik değişikliklere neden olur. DNA biyomolekülünde meydana gelen değişikler ya da DNA hasarları; endojen veya

ekzojen kaynaklı olup, bunlar mikro-biyozlem yöntemler ile belirlenirler. Mikro-biyo izlemede moleküler veya hücrel biyo göstergelerin kullanılması buna bağlı olarak özellikle populasyon, komünite ve ekosistem gibi biyolojik organizasyonun yüksek düzeylerinde meydana gelebilecek değişiklikler hakkında muhtemel tahminlerde katkı sağlamaktadır. Dolayısıyla bu tip biyogöstergelerde, uzun dönemde oluşacak biyolojik etkilerin kısa sürede gözlenen indikatörleri olarak düşünülebilir (Hellman ve ark., 1999, Erişmiş ve ark., 2012). Bu biyogöstergeler arasında DNA'yı etkileyerek genotoksik etki yaratan biyogöstergeler de bulunmaktadır (Migliore ve ark., 2006).

Karasal veya sucul ekosistemlerde kirlilik birikim etkilerinin belirlenmesi için model organizmalar kullanılmaktadır. Bu tarzda kirlilik birikim etkilerini izleyebilmek için makro ve mikro düzeyde çeşitli yöntemler kullanılır. Bu biyozlem yöntemleriyle makro düzeyde çeşitli çevresel kirleticilerin amfibi, balık gibi model organizmaların davranış, beslenme, üreme bozuklukları üzerine etkileri sebebiyle populasyon düzeylerindeki önemli azalmalar uzun vadeli çalışmalar ile belirlenebilir (Chapman, 2009; Erişmiş, 2011). Son yıllarda, genotoksisitenin belirlenmesinde DNA tek sarmal kırıklarının ölçümüne ilgi artmaktadır. Yapılan pek çok çalışmada, DNA tek sarmal kırıklarının miktarı, çeşitli çevresel kirleticilerin mutajenik ve karsinogenik özellikleri ile ilişkilendirilmektedir. DNA kırıklarını tayin etmeye dayalı bir yöntem olan tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis (SCGE)) veya Comet tekniği pek çok DNA hasarının ve onarımının tayininde, biyozleme çalışmalarında ve genetik toksikolojide yaygın kullanım alanı bulmuştur. Başta memeli hücrelerindeki DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan Comet tekniği günümüzde çeşitli canlıların hücreleri kullanılarak yapılabilmektedir (Singh ve ark., 1988; Tice ve ark., 2000; Reinecke ve Reinecke, 2004; Bonisoli-Alquati ve ark., 2010; Mosesso ve ark., 2013; Bolognesi, 2014; Fairbain ve ark., 1995).

1.3.1. Comet Assay Tekniğinin Tarihi

Comet tekniği biyolojik, kimyasal ve fiziksel nedenlerin oluşturduğu genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreler üzerinde göstermiş olduğu etkileri alkali ortamda DNA moleküllerinin elektriksel alanda göç etmeleri prensibine dayanır (Fairbain ve ark., 1995). Agaroz jel içine gömülen hücreler, yüksek tuz konsantrasyonu ve deterjanlar sayesinde lizise uğratılarak çekirdekte bulunan DNA'ları serbest ortama çıkartılır. Daha sonra DNA alkali bir ortamda elektroforetik yöntemler kullanılarak yürütülür. Farklı molekül ağırlığına sahip olan DNA molekülleri elektriksel ortamda yürütüldüğünde katottan anotta doğru farklı hızlarda göç ederler. Edityum bromür gibi boya ile boyanıp floresan mikroskopta incelendiğinde hasarlı DNA zincirleri kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur. Buradan yola çıkılarak bu tekniğe kuyruklu yıldız anlamına gelen "Comet Assay" ismi verilmiştir (Ostling ve Johanson 1984; Singh ve ark., 1988; Horoz ve ark., 2006; Lin ve ark., 2007; Dikilitaş ve ark., 2009; Gichner ve ark., 2009; Green, 1994; Collins, 2004).

İlk kez Rydenberg ve Johanson DNA'da tek zincir kırıklarını bu yöntemi kullanarak tespit etmiştir. Hücreleri lam üzerine gömülü olan agarozda düşük alkali ortamda lize ederek DNA'nın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Ardından nötralize ederek akrinin turuncusu ile DNA boyanıp kırmızının üzerine yeşil rengi ölçerek DNA'da meydana gelen hasarı görüntülemiştir. Fakat bu yöntem çok fazla kullanılamamıştır (Fairbain ve ark., 1995).

Ostling ve Johanson 1984'te bu tekniği geliştirerek "Microgel Electrophoretic Technique" adını verdikleri tek hücrenin DNA hasarını tespit eden bir model haline getirmiştir (Tice ve ark., 2000). Nötralizasyondan sonra hücreler akrinin turuncu ile boyanmış ve DNA hasarının derecesi bir fotometrenin kullanıldığı yeşil/kırmızı (çift sarmal DNA/tek sarmal DNA) oranının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Ostling ve Johanson (1984) geliştirdikleri bu yöntemle DNA'daki hasarları tek tek hücreler ile görüntülemiş ve bir prosödür yayınlamışlardır.

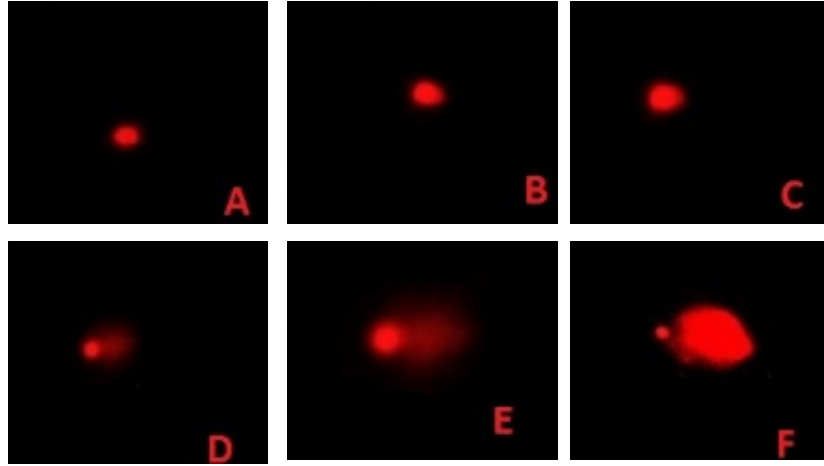
Mikroskop lamı üzerinde ince bir agaroz jelinde süspansiyon edilmiş memeli hücreleri, yüksek konsantrasyonlarda deterjanlar ve tuzlarla parçalanır, nötr koşullar altında elektroforezlenir ve bir floresan DNA bağlama boyası ile bu hücreler boyanır. Elektroforez sırasında kırık ve kopmuş DNA parçaları anot yönünde göç ederek çekirdekten uzaklaşmaya başlar. Kuyruklu yıldız benzer görüntüler elde ederek DNA'da oluşan hasarı belirleyen kullanışlı bir yöntem olmuştur. Singh ve arkadaşları (1988) bu prosedürü hem çift sarmal kırılmalarının tespit edilmesinde hem de tek sarmal kırılmalarına izin verebilecek alkali koşullar altında uyarlamışlardır. Son yıllarda Comet assay yöntemi avantajlı, hassas ve hızlı sonuç verdiği için tercih edilen bir teknik olmuştur (Tice ve ark., 1991).

Günümüzde densitometrik ve geometrik parametreleri ölçebilen görüntü analiz sistemleri bulunmaktadır. Henderson ve arkadaşları (1998) Comet testi, alkile edici ajanlar, interkalasyon ajanları ve oksidatif hasarın neden olduğu DNA hasarını tespit edebilmektedir. Singh ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilen metod ekotoksikolojide hayvan ve bitki hücreleri üzerine uygulanan Comet yöntemi olmuştur (McKelvey-Martin ve ark., 1993; Fairbairn ve ark., 1995; Tice, 1995; Anderson ve Plewa, 1998; Mitchelmore ve Chipman, 1998; Cotella ve Ferard, 1999).

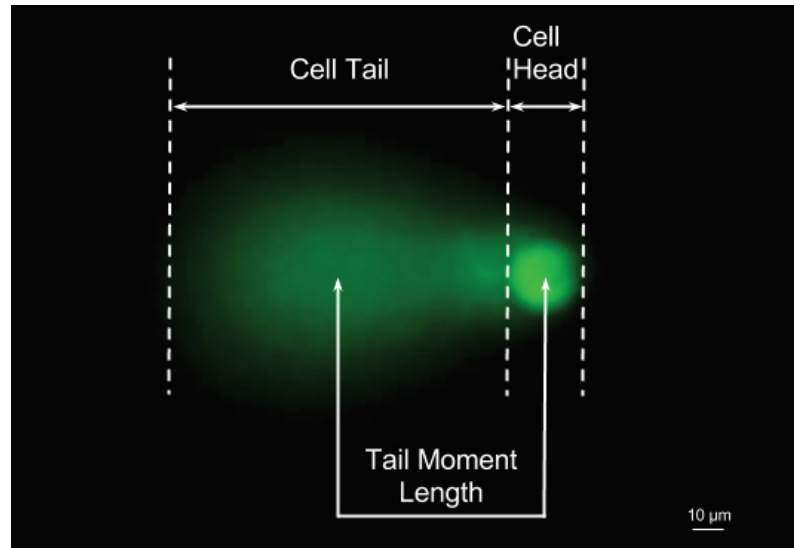
1.3.2. Comet Hücresi Sayımı ve Değerlendirilmesi

Comet assay yönteminde hasarın ne kadar fazla olduğu hücrelerin göç ettiklerinde oluşturdukları kuyruğun uzunluğuna göre belirlenir. Çekirdekten göç etmeyen baş ve hasarın büyüklüğüne göre çekirdek dışına göç eden kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Hasar derecesine göre 5 kategoride incelenmektedir (Şekil 1.1) (Hellman ve ark., 1995; Bowden ve ark., 2003). Hasarın doğruluğunu yazılım programları ile comet uzunluğu, comet yüksekliği, comet alanı, comet yoğunluğu, baş çapı, kafa alanı, kafa yoğunluğu, DNA başı, kuyruk uzunluğu, kuyruk alanı, kuyruk yoğunluğu, ortalama kuyruk yoğunluğu, % kuyrukta DNA kuyruk moment, olive

momenti gibi comet parametrelerinin ölçülmesi ile değerlendirilebilir (Şekil 2.2) (Anderson ve ark., 1996).



Şekil 1.1. Comet Assay hücrelerinin görsel değerlendirilmesi; A: “0” Hasarsız Grup; B: “I” Grup; C: “II” Grup; D: “III” Grup; E: “IV” Grup F: Apoptik Hücre



Şekil 1.2. Comet Assay ile elde edilen hücre çekirdeğinin görüntüsü.

1.3.3. Amfibilerde Comet Assay Deneyi

Amfibiler ile yapılan tüm çalışmalar *in vivo* olarak yürülmüştür. Ralph ve arkadaşları (1996) yapmış oldukları bir çalışmada, genotoksitesi fazla olduğu düşünülen farklı yerlerden hayvanlar toplamışlardır. *Bufo americanus* ve *Rana clamitans*'in iribaşları *in vivo* metil metansülfonat (MMS) konsantrasyonlarına maruz bırakılarak çekirdekli eritrositlerinde comet testi yapılmıştır (Ralph ve ark., 1996). Sonuç olarak, DNA'da kuyruk uzunluğunda ve çekirdeğin genişliği oranlarında doğrusal bir artış gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada ise Güney Ontario'da yaygın olarak kullanılan beş herbisit [AAtrex Nine-O (atrazine), Dual-960E (metalochlor), Roundup (glyphosate), Sencor-500F (metribuzin) ve Amsol (2,4- D amine)] genotoksitesi Kanada'da *Rana catesbeiana*'in iribaşlarının eritrositlerinde comet assay testi ile belirlenmiştir. Amsol haricindeki bütün herbisit uygulamalarında DNA hasarı tespit edilmiştir (Clements ve ark., 1997). Diğer bir çalışmada ise Erie Gölü'nün kuzey kıyısından yakalanan *Bufo americanus* ve *Rana clamitans* bulunduğu ortamdan su, tortu ve bitki örtüsünden alınarak buradaki kontaminantlara maruz bırakılmıştır (Ralph ve ark., 1996). *R. clamitans* 4 ay boyunca, *B. americanus*'da ise 6 hafta boyunca laboratuvar koşullarında muhafaza edilmiştir. Comet testinin sonuçlarına göre eritrositlerde genotoksik etkiler tespit edilmiştir (Ralph ve Petras, 1997). Yine başka bir çalışmada, 1993 ve 1995 yılları arasında Güney Ontario ve Kanada'da tarım alanından ve tarım dışı alandan 18 farklı yerden *R. clamitans* üzerinde çalışma yapılmıştır. Araştırmacılar, tarım alanı olan bölgeden yakalanan hayvanlar ile diğer alanlardan toplanan hayvanlar arasında comet testi uygulamaları sonuçlarında önemli bir farklılık gözlemlenmişlerdir. Fakat tarımsal uygulamaların etkisinin yıllar arasında varyansa göre daha az olduğu görülmüştür (Ralph ve Petras, 1997). 1994 yılında Windsor, Ontario'nun eteklerinde bulunan bir sanayi bölgesinden bulunduğu leopar kurbağa (*Rana pipiens*) iribaş üzerinde genotoksite çalışması yapmıştır. *R. pipiens* iribaşlarında DNA hasar seviyelerinde yıllık veya mevsime bağlı değişiklikler saptanmamıştır (Ralph ve Petras, 1997).

Araştırmacılar amfibilerin, su ve toprakta toksik atıkların değerlendirilmesinde yararlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Boone ve Bridgs, 2003). Amfibilerde deri solunumu da yaptığından dolayı habitatların çevresel kirlenmelerini kolayca emebilir ve yaşadıkları çevreye kısıtlamalar getirebilirler. Kuyruksuz kurbağalarda ağır metaller (Lefcort ve ark., 1998; Leontyeva ve ark., 1997), azotlu maddeler (Oldham ve ark., 1997), pestisitler (Schuyttema ve ark., 1993) ve yoğun tarım veya ağır endüstriyel faaliyet alanlarının etkilerini izlemek için comet assay yöntemi kullanılmıştır (Ralph ve ark., 1997). Özellikle, *Rana esculenta* kurbağa populasyonlarının eritrositlerinde DNA hasarının yüksek düzeylerde bulunması, atıkların atılmasında zararlı bileşiklerin varlığı ile açıklanabilen biyoindikatör olarak kullanılmıştır (Maselli ve ark., 2010). Yaşamlarını tarım alanlarında sürdüren amfibiler, olumsuz hava koşullarında özellikle yağmurlu günlerde liç ve drenaj aracılığı ile akarsular, nehirler ve göletler gibi sulak alanlar çok fazla miktarda kimyasal maddelere maruz kaldıkları bildirilmiştir. Soya fasülyesi tarlaları, mısır tarlaları ve tarım dışı alanlardan toplanan *Physalaemus cuvieri* amfibi türünde comet assay yöntemi ile yapılan incelemeler sonrasında DNA hasarı rapor edilmiştir. Soya fasülyesi alanından toplanan amfibi örneklerinde tarım dışı alanda toplanan örneklerle göre daha fazla hasar tespit edilmiş ve korelasyon testinde büyük bir anlamlılık olduğunu bildirmişlerdir. Rapora göre gölet alanları ne kadar küçükse daha fazla pestisite maruz kaldığını ve DNA hasarının o kadar fazla olduğunu bildirmişlerdir (Gonçalves ve ark., 2017). Wang ve arkadaşları (2009), *Rana nigromaculata* türünde erkek bireylerin testislerinde az seviyede bulunan kurşunun oksidatif hasarına ve DNA hasarı üzerinde çalışmıştır. Kurşun (Pb) ile uyarılan *R.nigromaculata* türünün oksidatif hasara bağlı olarak DNA hasarına uğradığına ve bu türde üreme toksisitesini tehlikeye atabileceğini bildirmiştir. Türkiye’de de Orta Anadolu’da bulunan Akdeğirmen dam gölü, Sinanpaşa göleti, Emre gölü ve Porsuk nehrinin kirliliğinin belirlenmesinde biyo belirteç olarak *Pelophylax ridibundus* türünün eritrositlerinden Comet assay yöntemi ile DNA hasarları ile belirlenmiştir (Erişmiş ve ark., 2013).

1.4. Hibernasyon Dönemine ve Aktif Döneme Ait Kan Parametreleri

Kara üzerinde kış uykusuna yatan omurgalılarda özellikle soğukkanlı omurgalılar için, kışın sıfırın altındaki sıcaklıklarda hayatta kalmaları ciddi bir problemdir (Storey, 1987). Amfibiler gibi ektotermik omurgalılar, doğal çevrelerinde çok çeşitli mevsimsel değişikliklerle karşı karşıya kalırlar (Hutchison ve Duprè, 1992; Hoffman ve Katz, 1997; Hermes-Lima ve Storey, 1998; Greenway ve Storey, 2000). Ayrıca yükselti ve coğrafi konumlar amfibilerde lökosit ve eritrositlerinde bozunmalar meydana getirdiği bildirilmiştir (Arıkan ve ark., 2010). Özellikle ılıman bölgelerde, düşük sıcaklıklar ve kışın yemek yetersizliği su kurbağalarının hayatta kalabilmek için kış uykusuna yatmasına neden olur. Bu hayvanlar ayrıca düşük sıcaklıklara çeşitli fizyolojik adaptasyonlar gösterirler (Duellman ve Trueb, 1994; Wells, 2007; Feidantsis ve ark., 2012).

Geliştirdikleri stratejiler ile biyokimyasal ve fizyolojik olayların getirdiği olumsuz durumlarda (hücre ölümü, makromoleküllere hasar verme, metabolik bozulma ve oksidatif stres) oluşabilecek hasarları en aza indirmeye çalışmaktadır. (Constanzo ve Lee, 2013). Schmid (1982) kara kurbağalarının kış uykusu sırasında donma konusunda doğal bir dayanma toleransı olduğunu bildirmiştir. Çeşitli omurgasızlar, özellikle karasal böcekler, kışın hayatta kalmak için hücre dışı ortamlarını dondurmak için tolerans gösterirler. Donma toleransı yeteneğine sahip tek omurgalı hayvanların kurbağalardır. Kurbağaların donma toleransına olan adaptasyona tepkilerini ölçmek için birçok çalışma yapılmıştır. (Pinder ve ark., 1992; Lutz ve Nilsson, 1997; Storey, 1999; Jackson, 2000; Hochachka ve Lutz, 2001; Storey ve Storey, 2001;).

Bazı kurbağalar vücutlarının % 65'ine kadar donma toleransı gösterirler (Schmid, 1982; Costanzo ve Lee, 2013; Storey ve Storey, 2017). Donma toleransı, kurbağaların vücutlarının ekstrasellüler boşluklarında buz birikiminin yol açtığı kan akışının durması ve hücrelerin dehidrasyona uğramasıyla anoksi ve iskeminin

gerçekleştiği stres göstergesidir. Bu strese katlanmak için hücrelerde ATP üretiminin gerçekleştiği fonksiyonları baskı altına alınır. Hücrelerin sağ kalmak için bu strese hücre büyümesi, çoğalması ve hücre döngüsünün durdurulması ile karşı koydukları düşünülmektedir (Zhang ve Storey, 2012). İskemi, organlara oksijenlenmiş kanın reperfüzyonu sonucu oluşan ROS'ların (çoğunlukla reperfüzyonun erken safhasında mitokondriyal solunum tarafından ve daha sonraki evrelerde aktif fagositler tarafından oluşturulur) neden olduğu lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı ile paralel olarak gerçekleşir (Lipton, 1999; Lefter ve Grander, 2000; White ve ark., 2000). Donma ve çözülmenin yarattığı stres, metabolik ve homeostatik bozulmalara, hipoksik ve oksidatif hasarlara yol açmaktadır ve hücre zarları ve organeller gibi hassas yapılara karşı ozmotik/mekanik zarar vermektedir (Storey ve Storey, 1988). Farklı amfibi türlerinde çözülme sonrası türler arasında eritrosit boyutlarında farklılık olduğu ve kan hücrelerinde bozunmaların meydana geldiği bildirilmiştir (Arıkan ve çiçek 2014). Amfibiler doğal donma toleransına karşı oluşabilecek hasarları en aza indirmek için koruyucu mekanizmalar geliştirmiştir. Özellikle farklı amfibi türlerinde üreme döneminde kırmızı kan hücreleri ve hematokrit değerleri artmaktadır (Dönmez ve ark., 2009). Donmanın başlangıç aşamasında, karaciğer glikojeninden glukozun mobilize edilmesini tetiklediği ve glukozun vücuda dağıldığı tespit edilmiştir. Bu korelasyona dayanarak, glukozun hayvanı donmadan koruduğu ileri sürülmüştür (Costanzo ve Lee, 1991; Costanzo ve ark., 1993). Amfibiler üreyi ozmotik stres esnasında biriktirirler (Griffith, 1991; Katz, 1992; Shpun ve ark., 1992 Costanzo and Lee, 2008;). Üre birikimi ılıman hibernatörlerde sık görülür. Bu durum toprak neminin sonbaharda en düşük oranda olması ve toprak donmasından dolayı toprağın su potansiyelindeki düşme nedeniyle gerçekleşir (Spaans ve Baker, 1996). Bu nedenlerle oluşan ozmatik stresle başa çıkmak için hayvanlar üre biriktirirler (Schiller, 2008; Rosendale, 2012). Ayrıca amfibilerin soğuğa maruz kaldıkları durumlarda ürenin retensiyonu artmaktadır (Hong, 1957; Miller ve ark., 1968; Nielsen and Jorgensen, 1990).

Hücre zarı, değişen mevsimsel değişimler ve çevresel koşullarına göre akışkanlığını koruması gerekmektedir. Hücre zarındaki lipid molekülleri değişim göstererek mevsimsel geçişlere uyum sağlarlar (Reynolds ve ark., 2014). İyon kanallarını ve sinyal moleküllerini kapsayan sinaptik bölgelerdeki lipidlerin artışına kolesterolün oldukça büyük etkisi vardır (Jia ve ark., 2006; Petrov ve ark., 2011a). Kolesterolün azalmasıyla sinaptik bölgelerde oluşan lipidlerin peroksidasyonuna sebep olan ROS'ların arttığını bildirmişlerdir (Petrov ve ark., 2014). Lipid metabolizması, membranogenezis ve gametogenez ile ilgili olduğundan kurbağanın yıllık kolesterol metabolizması ve cinsiyete bağlı kolesterol metabolizması, mevsimsel davranışı ve cinsiyete bağlı fizyolojik aktivitelerinin karaciğerdeki lipid içeriğini ve üretimini etkileyip etkilemediğini çalışmışlardır. Yaz aylarında kolesteril ester olarak depolanan kolesterol sentezinin arttığına işaret ederken, kış aylarında kolesterol seviyesinin düştüğü belirtmişlerdir (Bruscalupi ve ark., 1989).

Oksijen pek çok yaşam formu için önemli bir gazdır ancak reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu çok fazla canlı için olumsuzluk yaratır (Beckman ve Ames, 1998; Halliwell ve Gutteridge, 1999). ROS'lar süper oksit radikali, peroksinitrat (ONOO), hidroksil radikali (OH), lipid peroksitler, nitrik oksit (NO) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) olarak sınıflandırılır (Hermes-Lima ve Tani 2002).

Soğuk iklimlerde hibernasyona giren sürüngen ve amfibiler dokularının dondurulmasına izin vererek hayatta kalmayı başarabiliyorlar. Dondurma sırasında buz hücre dışı boşluklara yayılmaya başlar ve organlarda kan dolaşımı yavaş yavaş azalır. Eğer donma olayı hücre içine yayılmaya başlar ise o zaman hayvanlar için ölüm kaçınılmaz bir hal alır (Storey ve ark., 1996). Donma olayı boyunca dokular omurgalıların O_2 sınırlamasına, adenilatların tükenmesine ve glikolitik nihai ürünlerin laktat ve alanin birikimine neden olmaya başlar. Donma sırasında metabolik hız (anaerobik yollara geçiş) da baskı altındadır. Dahası, donmanın sonuçları, kuruma etkisine benzer birçok özellik taşır. Çünkü her iki stres de hücre sıvısını etkin bir şekilde giderir, ozmolarite ve sitoplazmanın iyonik kuvvetini artırır

ve hücre hacmini azaltır (Storey ve Storey, 1999; Storey ve ark., 1996; Storey ve Storey, 2001).

Amfibiler; memeliler, kuşlar ve sürüngenlerin aksine su geçirgen bir dış dolguya sahiptir ve günde vücut ağırlığının % 6-9'unu kaybedebilir (Hillman, 1980). Birkaç yarı suda yaşayan tür, toplam vücut suyunun % 25-40'ını kaybederek rehidrasyon sonrası yaralanma göstermez. Yer altına yuva yapan çöl kurbağaların, hücreleri, 50 saatlik suyun transferi sonucunda aşırı dehidrasyona uğramış olan serbest çözücü olmayan kurbağa türleri gibi, % 50 - 60 gibi daha yüksek vücut su kayıpları ile karşılaşır (Pinder ve ark., 1992). Toplam vücut suyunun %65'i ekstrasellüler buza dönüşür (Churchill ve Storey, 1993). Şiddetli dehidrasyon sırasında kan viskozitesinde bir artış ve hacimde bir düşüş meydana gelir. Bu, kardiyovasküler sistemin işlevini bozarak nabız oranında bir düşüşe ve organlara O₂ veriminde azalmaya yol açar. Böylece iç organlar hipoksik hale gelir ve anaerobik metabolizma ürünleri oluşur (Hillman, 1987; Churchill ve Storey, 1995). Rehidrasyon sırasında cildin üzerinde hızlı bir su alımı kan hacmi ve kardiyovasküler fonksiyonu iyileştirir ve oksijenlenmiş kanla doku perfüzyonuna devam etmesini sağlar. Bu nedenle şiddetli dehidrasyon ve ardından rehidrasyon, iskemi-reperfüzyon stresine güçlü benzerlikler taşımaktadır ve antioksidan savunmaların dehidrasyondan kurtarılması sırasında oksidatif stresin önlenmesinde rol oynayabileceği görülmüş ve antioksidan seviyeleri artmaya başlamıştır (Hermes-Lima ve Storey, 2001).

1.5. *Pelophylax caralitanus* (Arıkan, 1988)

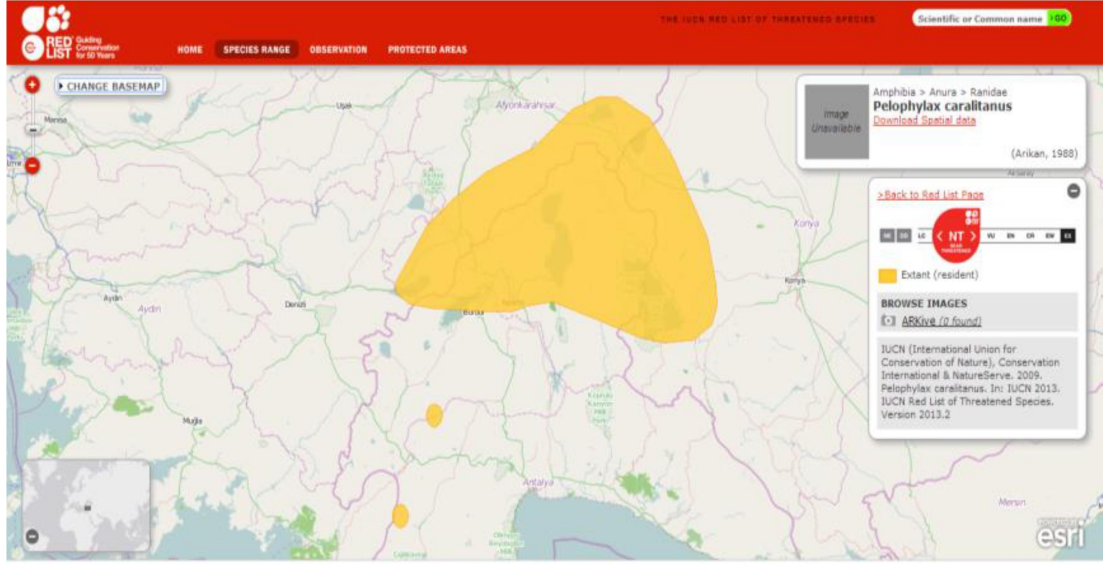
Ranidae (gerçek su kurbağaları) familyası yaşamını suya bağımlı olarak yaşar. Dünya genelinde yaygın bir kozmopolit dağılışa sahip olup en fazla Afrika ve Asya'da yayılmış göstermişlerdir. Ranidae familyasında bacaklar oldukça uzun olup,

dilleri ağız tabanının ön yerinden bağlı, arka ucu serbest ve çatallıdır. Diş yapısına bakıldığında dişler üst çenelerinde (Maksilla – Premaksilla) mevcuttur.

Ülkemizde ise *Pelophylax ridibunda* ve *Pelophylax caralitanus* türleri bulunmaktadır (Budak ve Göçmen, 2008; Arıkan1988; 1989; Erişmiş, 2017). *P.caralitanus* ülkemizde endemik olan tür olup, Göller bölgesi ve iç anadolunun batısına kadar yayılış dağılımı gösterir (Şekil 1.3). Sulak alanlardan ayrılmazlar ve genellikle su kanallarında, bol sazlıklı alanlarda yaşarlar. Böceklerle beslenme sağlarlar. Vücut yapıları iridir. Kulak zarı belirgindir. Pürtüklü ve yumuşak bir deri yapısına sahiptir. Sırt kısmı rengi koyu yeşilden açık kahverengiye doğru değişiklik gösterir. Başın yan tarafında koyu renkli şerit görülmez. Karın kısmında kirli beyaz zemin üzerinde turuncu, ara sıra sarı görünebilen lekeler bulunur. Ayrıca ventral kısımda siyah benekler bulunabilir. Böylece diğer türlerden kolaylıkla ayırt edilebilir (Şekil 1.4). Bu tür ülkemizde yenilebilir kurbağa türü olup diğer ülkelere ihraç edilir. Bu türlerin popülasyon sayılarının büyük ölçüde azalmasının sebepleri arasında ova kurbağası türlerinin üreme zamanı toplanmasıdır. (Türkiye Amfibi ve Sürüngenleri, 3. Baskı) sulak habitat alanlarının kurumaya başlaması, canlıların barınma alanının daraltıp, besin kıtlığı ve çevresel stres türün azalış sebepleri arasındadır (Erişmiş, 2014). Türün bilimsel sınıflandırılması Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. *Pelophylax caralitanus* ' un bilimsel sınıflandırılması

Bilimsel Sınıflandırma		
Kingdom (Alem)	Animalia	Hayvanlar
Phylum	Chordata	Vertebrallılar
Class (Sınıf)	Amphibia	Amfibiler
Order (Takım)	Anura	Kuyuksuz
Family (Aile)	Ranidae	Kurbağalar
Genus (Cins)	Pelophylax	Su Kurbağaları
Species (Tür)	<i>Pelophylax caralitanus</i> (Arıkan, 1988)	Beyşehir Kurbağası



Şekil 1.3. Endemik *P. caralitanus*'un yayılım haritası (int. kay. 3).



Şekil 1.4. *Pelophylax caralitanus*'un genel görünüşü (Fotoğraf: Doç. Dr. Uğur Cengiz Erişmiş)

Türkiye bulunduğu coğrafi konum ile üç kıta arasında köprü vazifesi gördüğünden dolayı subtropikal bir iklim yapısına sahiptir. 3 değişik bitki coğrafi bölgesine sahip olmasından dolayı tüm mevsimler yaşanır. Jeolojik, topoğrafik, jeomorfolojik çeşitlilik, akarsu, göl ve deniz gibi sulak alanlar bakımından oldukça zengindir(DPT ve BM, 2010). Ülkemiz bu özelliğinden dolayı çok fazla canlı türü için yaşam alanı oluşturur. Çok zengin bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Avrupa kıtasından daha fazla tür çeşitliliği bulunmasından dolayı genetik çeşitlilik bakımından önemlidir Ülkemiz biyoçeşitliliğin yanısıra endemizm bakımından da çok zengindir (Guner et al., 2000, Ozturk, 2002). Ekolojik ve ekonomik bakımdan değerli olan Beyşehir su kurbağası *Pelophylax caralitanus*' da endemik türlerimiz arasındadır.

Ülkemizin bazı bölgelerinde sonbahar ve kış mevsimlerinde sıcaklıklar donma noktasının altına kadar düşebilmekte ve bu durum canlıların hayatlarına devam edebilmeleri açısından büyük önem taşımaktadır. Bazı canlılar hayatlarına devam edebilmek için hibernasyon gibi bazı adaptasyonlar geliştirmişlerdir (Arıkan ve Çiçek,2014; Gür ve ark, 2010). Kış aylarını hayatta kalabilmek için su altında, bataklık içinde, toprak altında ya da toprak üzerinde geçirmektedirler (Storey, 1987). Sert kış koşullarına rağmen hayatta kalmayı başarabilen canlılar arasında amfibiler de bulunmaktadır (Storey, 2004). Amfibilerde aktif, prehibernasyon ve hibernasyon dönemlerinde biyokimyasal ve fizyolojik değişimlerin yanı sıra davranış modelleri çalışılmıştır (Costanzo ve Lee, 2013; Layne 1999). Fakat DNA hasarını gösteren çalışmalar az sayıda bulunmaktadır.

Bununla birlikte ülkemizde endemik bir tür olan *Pelophylax caralitanus*'un eritrosit boyutları farklı amfibi türleri ile karşılaştırılmış olmasına karşın bu türde fizyolojik ve biyokimyasal değişimler ile DNA hasarı üzerine hibernasyon döneminin etkileri araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır (Arıkan ve Çiçek, 2014). Bu nedenle, bu araştırmada Göller bölgesinde yayılış gösteren ve ülkemiz için ekolojik öneme sahip olan endemik Beyşehir su kurbağası *Pelophylax caralitanus*'da, mevsimsel değişikliklere bağlı olarak hibernasyon ve aktif dönemde bazı fizyolojik

ve biyokimyasal parametrelerin (kan glukoz, kolestrol, üre, toplam antioksidan ve toplam oksidan seviyeleri) yanı sıra DNA hasarının comet testi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1 Arazi çalışması ve Örneklerin Toplanması

Eber Gölü'nde 19 – 25 Nisan 2017 tarihleri arasında toplam 30 *Pelophylax caralitanus* örneği derinliğin 1 m'den az olan yerlerden kepçe yardımı ve elle toplandı (Şekil 2.1). Gölün biyotop özellikleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir. Toplanan örnekler ayrı ayrı steril ve tek kullanımlık kaplara bırakıldı. Doğal ortamını bozmamak amacı ile her bir kaba göl suyu eklenerek laboratuvar ortamına getirildi.

Çizelge 2.1. Örnek sayısı ve gölün biyotop özellikleri

Göl Adı	Örnek sayısı ♂♂+♀♀	Toplama Tarihi	Hava (°C)	Su (°C)	Nem (%)	pH
Eber Gölü	30	19.04.2017 25.04.2017	12	10.5	55	8.3



Şekil 2.1. *P. caralitanus* örneklerinin toplandığı arazi.

2.1.2 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Veteriner Fakültesi Viroloji laboratuvarında bulunan laboratuvar malzemeleri ve cihazlar bu tez çalışmasında sırasında kullanılmıştır.

Elisa cihazı – (Rayto)

Elektroforez düzeneği

Floresan mikroskop – (nikon eclipse e100)
20x20 yatay elektroforez tankı – (Thermo Scientific-EC 300 XL)
Lamel (24 x 60 mm, 24 x 50 mm) – (iso lab)
Hassas terazi – (Ohaus-Pioneer)
Dijital pH metre – (hanna instruments)
Eppendorf tüpü –
+4 °C Buz Dolabı – (BEKO)
-3 °C Derin Dondurucu – (BEKO)
Vorteks– (Jeio tech)
Soğutmalı santrifüj– (Kubato)
Su banyosu–(Lab Companion)
Isıtıcı tabla– (Mtops)
Hemogram tüp (K3 EDTA LI tüp)
Holder (kan alma tüpü tutucusuna iğnesi vida)
Değişik hacimlerde otomatik pipet– (Genuine Axygen Quality)
Farklı boyutlarda deney tüpü, balon joje ve beher glass– (İso Lab)
Lam / lamel pensi–(İso Lab)
Cerrahi makas, pens, eldiven–(İso Lab)
İnsulin enjektörü
Hematokrik tüp -(VITREX)
Kumpas
Dijital termometre–(RoHS)
Taşıma kapları

2.2 Metotlar

2.2.1. *Pelophylax caralitanus*'un Hibernasyona Giriş, Hibernasyondan Çıkış Süresi ve Hibernasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Laboratuvara getirilen *Pelophylax caralitanus*'ların 10 tanesi hibernasyon için sıcaklığın belirlenmesinde kullanılmıştır. Yapılan ön denemelerde, *Pelophylax caralitanus* türüne ait 2 birey, hibernasyona hazırlık evresi olarak +4 °C'de 15 gün boyunca bekletildikten sonra -20 °C'ye alındı 60 dk içinde vücut sıcaklığı termometre ile -6 °C olarak ölçülmüştür. Bireyler tekrar oda sıcaklığına alındığında hepsinin öldüğü tespit edilmiştir. Bir sonraki denemede ise 4 birey hazırlık evresinden sonra -4 °C'ye maruz bırakılmıştır. İlk 5 saat içerisinde hareketlerde durağanlaşma başlamıştır. 5-10. saatler arası gözler kapakları kapanmış ve içe doğru bükülme pozisyonuna girerek küremsi bir morfolojik şekil almıştır. 10- 24 saatleri arasında derinin üst tabakasında buzullanmalar görülmüştür. Bireyler oda sıcaklığında çözülmeye bırakılmıştır. Ancak bireyler canlı olmadığı görülmüştür. Son olarak yukarıda belirtilen hibernasyona hazırlık evresini takiben bu türe ait 4 birey -3 °C'de 24 saat bekletilmiştir. Bu bireylerde ise vücut sıcaklıkları termometre ile $-2 \pm -2,5$ °C olarak ölçülmüştür. Tekrar oda sıcaklığına alınan bireylerin yaşam döngülerine devam ettiği belirlenmiştir. Bu bağlamda, *Pelophylax caralitanus* 'un yaşamını devam ettirebildiği en düşük sıcaklık -3 °C olduğu belirlenmiştir.

Geriye kalan 20 adet *Pelophylax caralitanus* 'dan her birey için hassas teraziyle ağırlık ve hassas kumpas ile boy (Baş + Gövde) ölçümleri yapıldı. Total boy aralığı $83,02 \pm 57,32$ mm' aralığında, ortalaması $68,76 \pm 6,8$ mm olan *Pelophylax caralitanus* türüne ait 10 birey hibernasyon grubu, 10 bireyde oda sıcaklığında tutularak (aktif grup) 2 gruba ayrılmıştır. Aktif grupta bulunan bireylerden hidrojen peroksit (H₂O₂) yöntemi uygulanarak pozitif kontrol olarak

belirlenmiştir. Hibernasyona giren 10 bireyin ortalama boy uzunluğu $71,13 \pm 4,6$ mm, aktif grupta ise $66,40 \pm 7,0$ mm'dir. Her iki grup total boy uzunluğu bakımından student's test ile karşılaştırıldığında fark olmadığı tespit edilmiştir. (Student's test = 1,598 p= 0,12 > 0,05).

Hibernasyon grubu olarak belirlenen 10 birey kapların altına nemli havlu yerleştirilmiştir. 2 hafta boyunca $+4$ °C 'de prehibernasyon döneminde tutulmuştur. Örnekler 2 hafta sonunda hibernasyona girmesi için -3 °C dolapta 24 saat bekletildi. 24 saat içinde tamamen hibernasyona giren örneklerden enjeksiyon ve Hematokrik tüp yardımı ile kan örnekleri alınarak deney başlatılmıştır.

2.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

2.2.2.1. Comet Analizi İçin Kullanılan Maddeler:

NaCl

KCl

KH_2PO_4

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Tris-HCl

EDTA

Trisma base

Triton X100

DMSO

NaOH

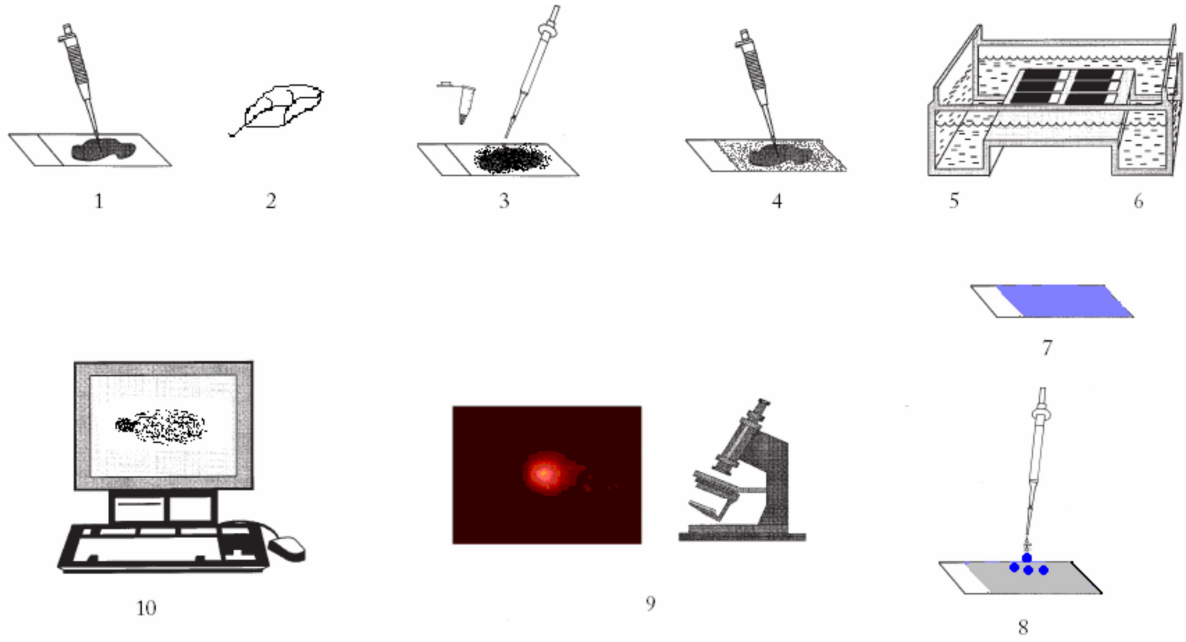
Ethidium bromide

Düşük kaynama dereceli agaroz (LMA-37 °C)

Normal kaynama dereceli agaroz (NMA-65 °C)

2.2.3. Comet Assay Yöntemi

Comet yöntemi Şekil 2.2.'deki basamaklara göre uygulanmıştır.



Şekil 2.2. Comet assay yöntemi aşamaları (Dikilitaş ve ark. , 2010)

2.2.3.1. Slaytların Hazırlanması

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂ PO₄, 2,9g Na₂ HPO₄ 7 H₂ O, 3,2g Trizma HCl (C₄ H₁₁ NO₃, FW:157,6) 100 ml. dH₂O ile çözdürüldü. Analizden 10 kat sulandırılarak 1X yapıldı ve pH 7,5 'e ayarlandı. Hazırlanan PBS çözeltisi içerisinde % 1'lik NMA agaroz kaynayana kadar mikrodalga fırında çözdürüldü. Homojen bir çözelti halinde olan agaroz jel ile belirli bir miktarda ısıtıcı tabla üzerinde ısıtılan lamlar kaplanarak soğumaya bırakılmıştır.

Her bireyden 10 µl total kan alındı. protein ve serum agarozun düşmemesi için 90 µl PBS ile yıkandı. %0,5 300 µl LMA (37 °C) eklenerek NMA kaplı olan lamellere hücrelerin yapışmasını sağlayacak homojen karışım elde edildi. Her

örnekten 100 µl alınarak NMA ile kaplanarak soğutulmuş olan lamlara damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatılarak 10 dk +4 °C 'de bekletildi. Daha sonra lameller dikkatlice çıkarılıp en az 30 dk bekleme alındı.

H₂O₂ Çözeltisi Pozitif Kontrol Hazırlanması

% 35'lik H₂O₂ çözeltisinden 50mM çözelti hazırlandı. 10 µl total kan alınarak 90 µl PBS yıkamı 20 µl 50mM H₂O₂ eklendi. 5 dk buz kaseti üzerinde bekletildi ve +4 °C 'de 5 dk 2500 rpm 'de santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek 500 µl PBS pelete eklendi. Tekrar +4 °C 'de 5 dk 2500 rpm 'de santrifüj edildi. Peletten 25 µl alınarak 75 µl LMA eklenip agoroz kaplı lamlara yayıldı.

2.2.3.2. Lizis Tamponu

73g NaCl, 18,6 g EDTA, 0,6 g Trizma base 500 mL dH₂O ile stok çözelti hazırlandı. % 1 oranında triton X-100 ve % 10 DMSO eklenerek pH 10'a ayarlandı ve buzdolabında soğutuldu. Hazırlanan lamaların üzerinde yapışmış olan hücreler +4 °C yaklaşık 2,5 saat lize edildi.

2.2.3.3 Elektroforez tamponu

1 mM EDTA, 300 mM NaOH, 1000 mL dH₂O ile çözdürülerek alkali elektroforez çözeltisi hazırlandı (pH>13). Buz soğukluğundaki elektroforez tamponu tankın içine döküldü ve DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması için 30 dk inkübasyona bırakıldı. Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu

tampon çözelti içerisinde 300 mA, 20 volt'luk elektriksel alanda 30 dk yürütüldü (Ostling ve Johanson, 1984; Singh ve ark. ,1988; Horoz ve ark., 2006; Erismiş ve ark., 2012).

2.2.3.4 Nötralizasyon

Elektroforezde yürütme işlemi sonunda alkali tampon çözeltisini slaytlardan uzaklaştırmak için 0,4 M Tris HCl 100 mL dH₂O ile nötralizasyon tamponu hazırlandı (pH: 7,5). Her bir slaytlar 5 mL Tampon çözelti ile yıkandı (Ostling ve Johanson, 1984; Singh ve ark., 1988; Horoz ve ark., 2006).

2.2.3.5 Boyama

Slaytlar 5µg/mL edityum boya ile boyandı ve floresan mikroskopta değerlendirmeye alındı.

2.2.4 Kan Parametrelerinin Ölçümü (Glukoz, Klosterol, Üre, TAS, TOS)

2.2.4.1 Glukoz Tayini

Glukoz seviyelerini ölçüm için hazır kit kullanılmıştır.

Kit içerisinde bulunanlar

- R1 1 x 500 mL R2 1 x 7.5 mL R3 1 x 5 mL
- R1 6 x 250 mL R2 6 x 3,75 mL R3 1 x 5 mL
- R1 6 x 1000 mL R2 6 x 15 mL R3 2 x 5 mL

Trinder yöntemi glukoz, GOD tarafından glukonik asit ve hidrojen peroksit ile oksitlenir; bu da, POD ile birlikte, kırmızı bir kinonimini elde etmek için kolo-4 fenol ve PAP ile reaksiyona girer. Kan örneklerimiz glukoz konsantrasyonu ile orantılı olarak renkli kompleksin absorbanı 500 nm'de ölçülür (Farrance ,1987; Trinder, 1996). Glukoz Tayin Kitin çalışma prosödürü Çizelge 2.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Oda sıcaklığında Glukoz Tayin Kitin çalışma prosödürü

Tüplere pipet ile eklenmesi	Kör	standart	Örnek
Reagent (R1+R2)	1mL	1mL	1mL
Distile su	10 µl		
Standart (R3)		10 µl	
Örnek			10 µl

Sonuçların hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Glukoz} = \text{Abs}(\text{örnek}) / \text{Abs}(\text{standart}) \times \text{standart konsantrasyonu}$$

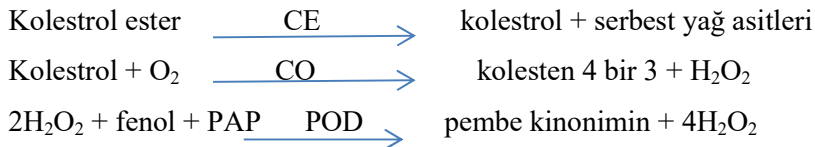
2.2.4.2 Kolesterol Tayini

Kolesterol seviyelerini ölçüm için hazır kit kullanılmıştır.

Kit içerisinde bulunanlar

R1 2 x 100 mL	R2 2 x 100 mL	R3 1 x 5 mL
R1 10 x 100 mL	R2 10 x 100 mL	R3 1 x 5 mL
R1 6 x 500 mL	R2 6 x 500 mL	R3 2 x 5 mL

500 nm 'de ölçülen Allain ve arkadaşları tarafından uyarlanan enzimatik yöntem ve reaksiyon şekli aşağıda verilmektedir. (Allain ve ark., 1974). Kitin Çalışma Prosödürü Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.



Çizelge 2.3. Oda sıcaklığında Kolestrol Tayin Kitin çalışma prosödürü

Tüplere pipet ile eklenmesi	Kör	standart	örnek
Reağent (R1+R2)	1mL	1mL	1mL
Distile su	10 µl		
Standart (R3)		10 µl	
Örnek			10 µl

Sonuçların hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

Sonuç= Abs(örnek) / Abs(standart) x standart konsatrasyonu

2.2.4.3 Üre Tayini

Üre seviyelerini ölçüm için hazır kit kullanılmıştır.

Kit içerisinde bulunanlar:

R1 7 x 30 mL R2 7 x 30 mL R3 1 x 10 mL

R1 10 x 100 mL R2 10 x 100 mL R3 1 x 10 mL

Talke ve Schubert reaksiyonuna dayanan enzimatik yöntem, Tiffany ve diğerleri tarafından basitleştirilmiştir. Reaksiyon aşağıdaki gibidir:



340 nm' de sabit bir zaman aralığında ölçülen, NADH' nin NAD' ye dönüştürülmesinden dolayı emilimdeki azalma, numunedeki üre miktarı ile orantılıdır (Talke ve Schubert, 1965; Tiffany ve ark., 1972). Üre Kitin çalışma prosödürü Çizelge 2.4 ve 2.5' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. A1 Üre Tayin Kitinin Çalışma Prosödürü

Termostat Küvette Pipetleme (30 - 37 ° C)	Standart	Örnek
Reagent (R1+R2)	1mL	1mL
Standart(R3)	5 µl	
Örnek		5 µl

Çizelge 2.5. A2 Üre Tayin Kitinin Çalışma Prosödürü 2

Termostat Küvette Pipetleme (30 - 37 ° C)	Standart	Örnek
Reagent (R1+R2)	1mL	1mL
Standart(R3)	10 µl	
örnek		10 µl

Sonuçların hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Sonuç} = \text{Abs}(A1-A2) \text{ örnek} / \text{Abs}(A1-A2) \text{ standart} \times \text{standart Konsantrasyonu}$$

2.2.4.4 Total Oksidan Seviyesi (TOS) Tayin ölçümü

Total oksidan seviyelerinin ölçülmesi için hazır kit kullanılmıştır .

Kitin içinde bulunanlar:

Reagent 1 : 1 x50 mL

Reagent 2 : 1 x10 mL

Standart 1

Standart 2

Örneklerde bulunan oksidanlar ferro iyon-o-dianisidini ferrik iyon oksitler. Gliserol bu reaksiyonu yükseltir. Asidik ortamda ferrif iyonlar kromojen ile birlikte renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan renk ile oksidanların miktarı ölçülmektedir.

Standart olarak H₂O₂ kullanılır. 530 nm de 37 °Cde okuma yapılır (Erel, 2005). Total Oksidan Seviyesi (TOS) Tayin Kitin çalışma prosödürü Çizelge 2.6' da gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. Total Oksidan Seviyesi (TOS) Tayin Kitin çalışma prosödürü

Pipetleme	Örnek	Standart
Standart		75 µl
Örnek	75 µl	
Reagent1	500 µl	500 µl
Karışım	30 saniye içinde A1 ölçümü yapılır	
Reagent 2	25 µl	25 µl
Karışım	5 dk içinde A2 ölçümü yapılır	

Sonuçların hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır

$$\Delta: \Delta\text{Abs.2} - \Delta\text{Abs.1}$$

($\Delta\text{Abs.örnek} / \Delta\text{Abs.standart2}$) x konsatrasyon şeklinde hesaplanır.

2.2.4.5 Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Tayin ölçümü

Total antioksidan seviyelerinin ölçülmesi için hazır kit kullanılmıştır.

Kitin içinde bulunanlar:

- Reagent 1 : 1 x 50 mL
- Reagent 2 (ABTS solüsyonu): 1 x 10mL
- Standart 1
- Standart 2: 1 x1 mL

Oksidasyon reaksiyonuna ABTS (R2) eklenerek yeşil-mavi renk oluşturulur. Antioksidanlar örnekteki oksidani bastırmak için renk karışımını durdurur. 660nm de ölçüm yapılarak sonuca ulaşılır (Erel, 2004). Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Tayin Kitin çalışma prosödürü Çizelge 2.7' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.7. Total Antioksidan Tayin Kitinin Çalışma Prosödürü

Pipetleme	Örnek	Standart (CAL,H ₂ O)
Standart		30 µl
Örnek	30 µl	
Reagent1	500 µl	500 µl
Karışım	30 saniye içinde A1 ölçümü yapılır	
Reagent 2	75 µl	75 µl
Karışım	5 dk içinde A2 ölçümü yapılır	

Sonuçların hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

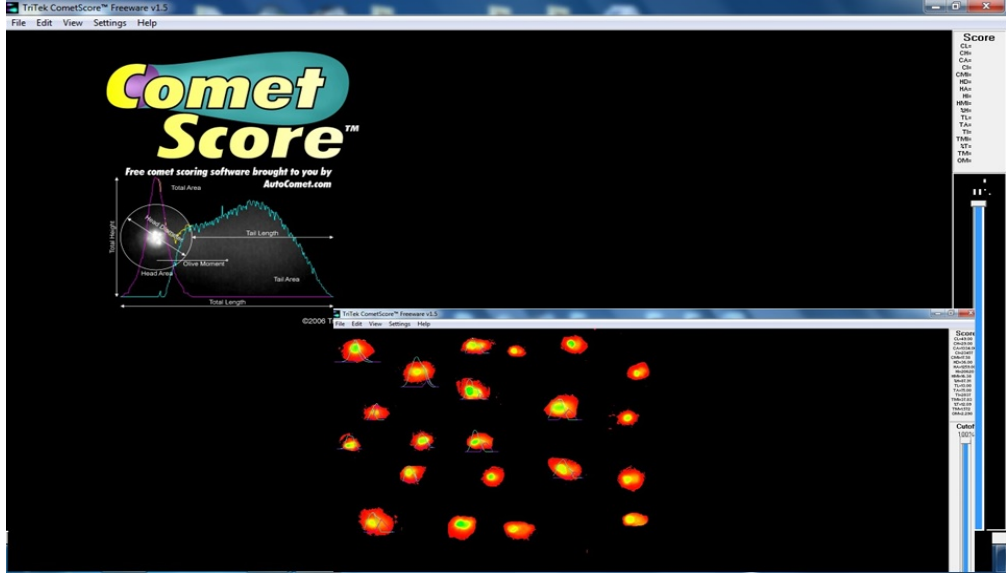
Hesaplanması : Δ : Abs.2-Abs.1

Sonuç= $[(\Delta\text{AbsH}_2\text{O})-(\Delta\text{Abs örnek})] / [(\Delta\text{AbsH}_2\text{O})-(\Delta\text{Abs standart})]$

2.2.5 İstatistik Analizleri

Hibernasyon ve aktif dönem grupları için Kan parametreleri olarak belirlenen Glikoz, Kolesterol, Üre, TAS ve TOS testleri XLSTAT ile ikili karşılaştırmada kullanılan student's T testi ile istatistiksel değerlendirilme yapıldı. Hibernasyon grubunda bulunan bireylerin hibernasyon öncesi ve sonrasında vücut ısısı ile zaman arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon analizi XLSTAT programı kullanılarak belirlendi (Şekil 3.2.).

Comet Assay IV, programı (Şekil 2.3) ile Comet hücresi için baş kısım ile kuyruğun sonunu ifade eden comet uzunluğu (CL), kuyruk uzunluğu (TL), kuyrukta bulunan % DNA miktarı (%DNA) ve baş ile kuyruk arasındaki uzaklığın farkının %DNA ile çarpımının 100'e bölünmesi ile hesaplanan Olive Moment (OM) parametreleri değerlendirilmiştir. XLSTAT excel programı ile ANOVA testi ile tek yönlü varyans analizi ile istatistiksel analizler yapıldı.

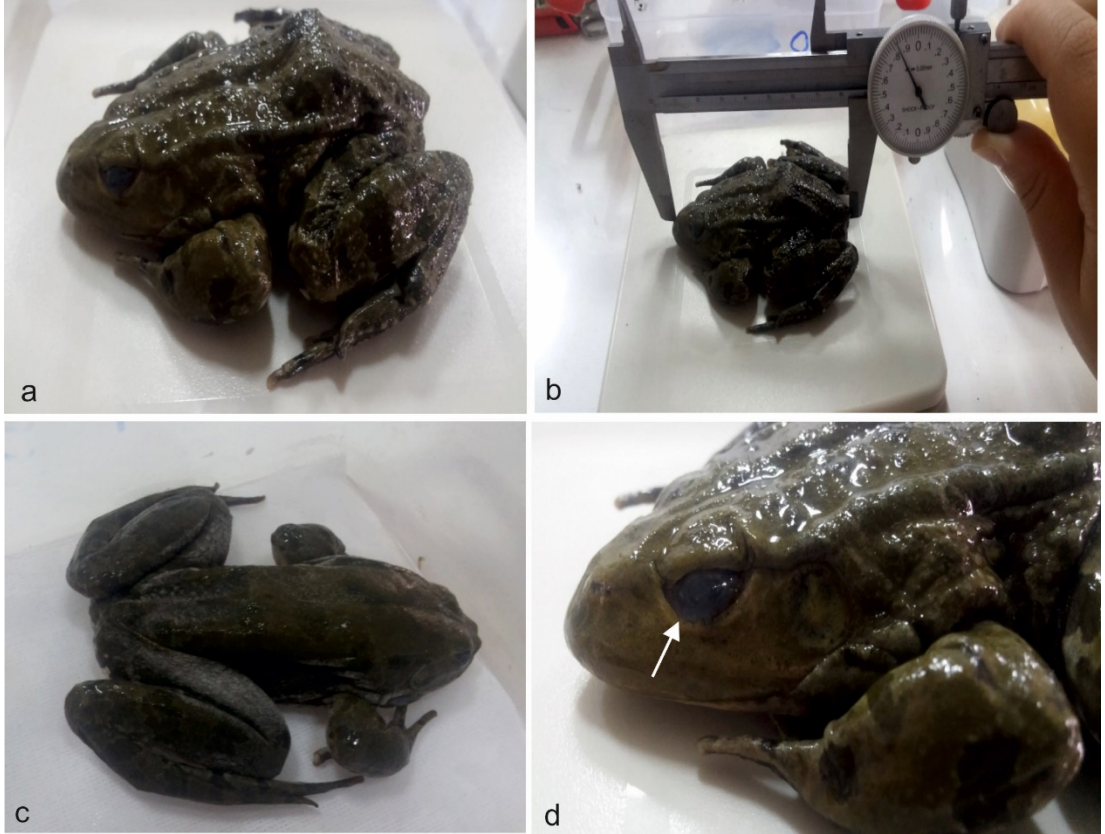


Şekil 2.3. Comet Score IV program görüntüsü.

3. BULGULAR

3.1. Hibernasyona Giriş ve Çıkış Dönemi

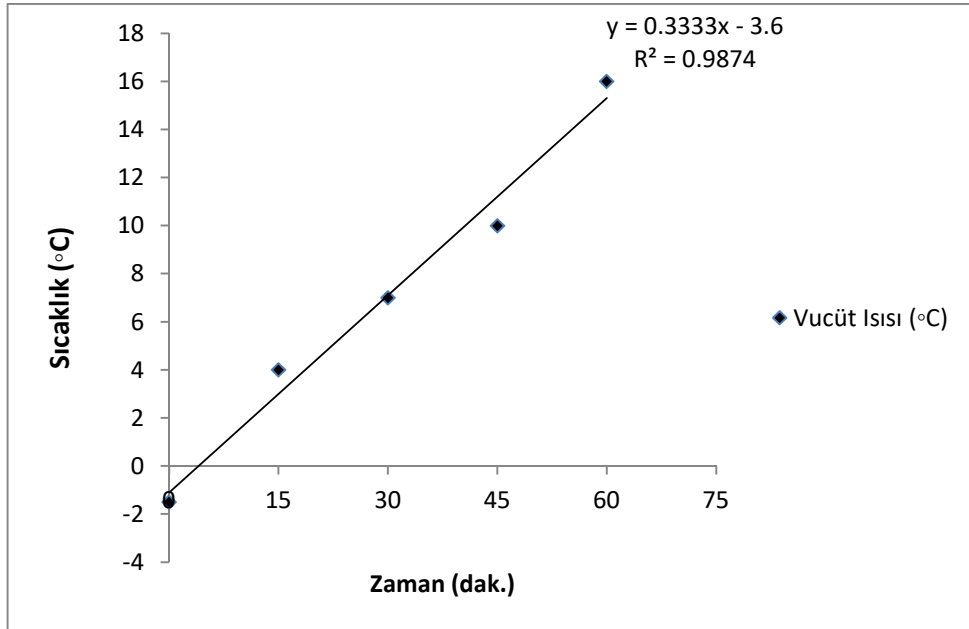
Pelophylax caralitanus türüne ait 10 birey, iklim kabininde 4 °C’de 15 gün boyunca hibernasyona hazırlık evresinde bekletildikten sonra -3°C’ye alınmıştır. Hibernasyonun ilk 4 - 5 saatlik sürecinde bireylerin hareketlerinde yavaşlama, ön ve ayak extremitelerinin gövdeye doğru içe çektiği (vücuda yakınlaştırma davranışı), göz kapaklarının kapanması ve vücut morfolojisinin küresemi bir hal aldığı gözlemlendi. Hibernasyonun 12. saatinde deride buz kristalleri gözlenmiş olup, kalan 7 saatlik süreçte tamamen hibernasyona girmiştir (Şekil 3.1a).



Şekil 3.1. Hibernasyon döneminde *Pelophylax caralitanus*'un dış görünüşü.(A-C) Vücudun katılaşması ve (D) gözlerde opaklaşma görüntüleri

Hibernasyona giren bireyler oda sıcaklığına alındığında bireylerin ekstrasellüler sıvının donmasına bağlı olarak ekstremiteleri sertleşmiş ve abdomenleri katılaşmış yapılar, göz kapaklarında opaklaşma görülmüştür. (Şekil 3.1d). Özellikleri 24 saatlik sürecin sonuna kadar devam etmiş olup solunum ve kalp atışı deri üzerinde belirginliğini yitirmiştir.

Bireylerin oda sıcaklığında, 15 dakikalık periyotlarda vücut ısıları ölçülmüştür. İlk 15 dk'lık periyotta vücut sıcaklığı yaklaşık 0 – 4 °C olarak belirlenmiş, İkinci periyotta (30. dk) vücut sıcaklığı 0 – 7 °C'ye yükselmiş olup her iki periyotta da bireylerde bir hareketlilik gözlenmemiştir. Üçüncü periyot (45. Dak.) vücut sıcaklığı 10 °C olarak belirlenmiş ve bu sıcaklıkta bireylerin göz kapaklarında hareketlilik ve kalp atışları gözlemlenmiştir. Dördüncü periyotta (60. dk) solunum hızı artmış, vücut sıcaklığı 16 °C'ye yükselmiş ve ekstremitelerde hareketlilik artmıştır (Şekil 3.2). Bireylerin vücut ısı ile zaman arasındaki ilişkiyi gösteren denklem $y = 0.3333x - 3.6$ olarak belirlenmiştir (Şekil 3.2). Zaman ve vücut sıcaklığı arasında pozitif bir ilişkinin olduğu saptanmıştır ($r=0.98$; $p<0.001$).



Şekil 3.2. Hibernasyondan çıkan bireylerin zamana bağlı vücut sıcaklığı.

3.2. Hibernasyona Öncesi ve Sonrası Ağırlık Değişimleri

Hibernasyon dönemine girmeden önce ve hibernasyondan çıkışta, bireylerin vücut ağırlıkları ölçülmüştür. Bireylerin hibernasyon öncesi ağırlıkları 73,9 - 35,2 g arasında değişirken, hibernasyon sonrasında bu değerler 71,6 - 34,8 g aralığında belirlenmiştir. Hibernasyona öncesi ve sonrası bireylerdeki ağırlık kaybı % 2,7 olarak saptanmıştır. Ancak hibernasyon öncesi ve sonrasında bireylerin ağırlıklarında bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir (Student t-testi = 0,195, $P_{0,05} < 0,847$).

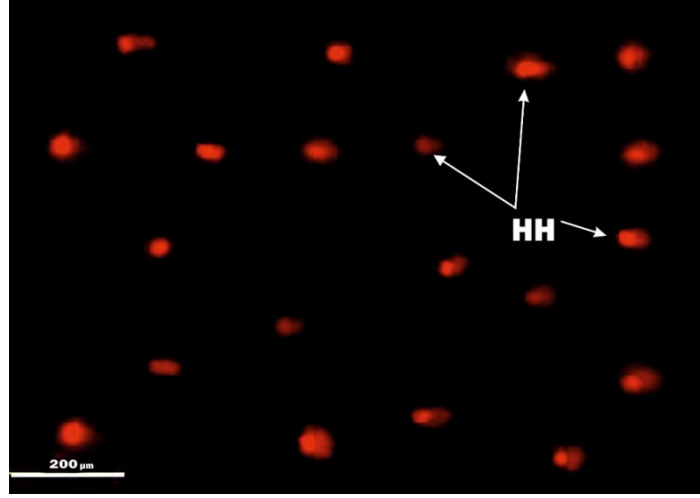
3.3. Hibernasyona Giriş ve Sonrası Boy Uzunluğundaki Değişimler

Hibernasyon dönemine girmeden önce ve hibernasyondan çıkışta bireylerin toplam boy uzunluğu ölçülmüştür. Bireylerin hibernasyon öncesi toplam boy uzunlukları 63,16 - 83,2 mm arasında değişirken, hibernasyon sonrasında 82,16 - 62,44 mm olarak belirlenmiştir. Hibernasyon öncesi ve sonrası bireylerdeki toplam boy uzunluğunda % 1,7 azaldığı tespit edilmiştir. Ancak hibernasyon öncesi ve sonrasında bireylerin toplam boy uzunluklarında bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir (Student t-testi = 0,204, $P_{0,05} < 0,840$).

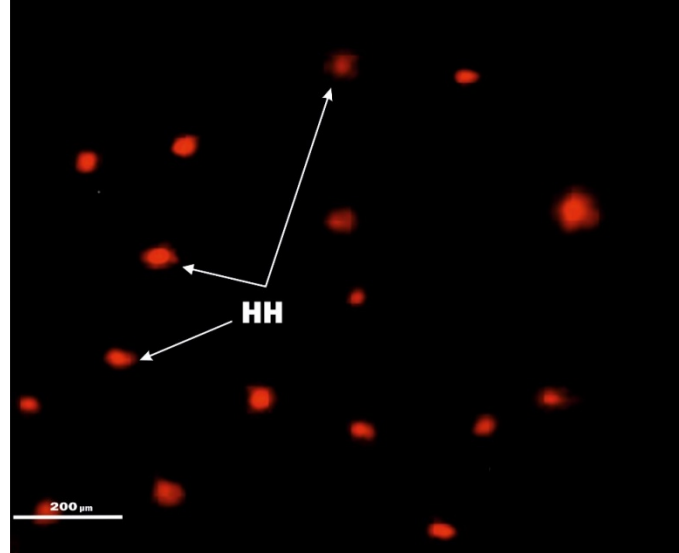
3.4. Hibernasyonun DNA Hasarı Üzerine Etkisi

Aktif ve hibernasyon dönemlerindeki bireylerin DNA üzerindeki hasarı belirlenmek için total 10 µl kan almış olup pozitif kontrol için ise aktif dönemdeki bireylerin total kanlarına 20 µl 50 mM'lık H₂O₂ uygulaması yapılmıştır.

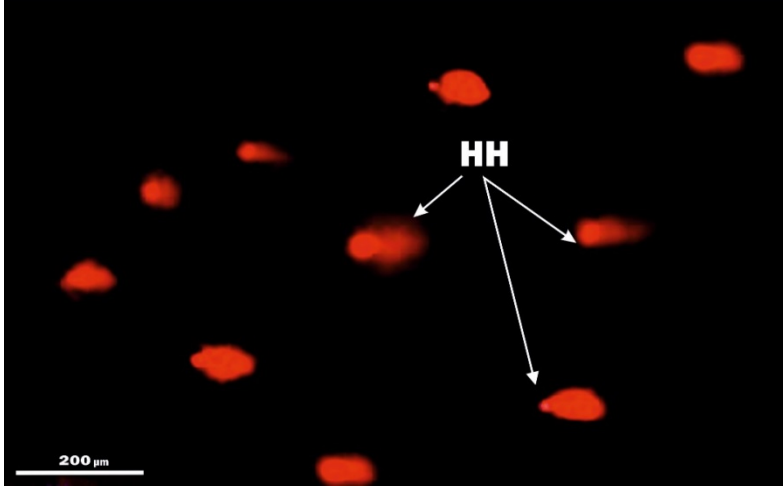
Comet assay yöntemi ile, ve grubu için 3 tekrarlı slayt hazırlanmış ve her birey için 200 comet hücresi sayılmıştır. 200 comet hücrelerinin CL, TL, %DNA ve OM parametrelerine göre gruptaki DNA hasarlar durumları tespit edilmiştir. Hibernasyon sonrasında, aktif dönem ve pozitif kontrol gruplarına ait floresan mikroskop ile çekilmiş Comet görüntüleri Şekil 3.3, 3.4 ve 3.5’de gösterilmiştir. Hibernasyon dönemindeki ve kontrol grubu incelendiğinde, DNA hasarını gösteren hasarlı hücrelerin (HH), kuyruk oluşumu açıkça gözlenmiştir.



Şekil 3.3. Hibernasyon dönemindeki bireylerin Comet görüntüsü.



Şekil 3.4. Aktif dönemindeki bireylerin Comet görüntüsü



Şekil 3.5. H₂O₂ ile muamele edilmiş (pozitif kontrol) kan örneklerinin Comet görüntüsü.

3.4.1. Hibernasyon, Aktif Dönem ve Pozitif Kontrol Gruplarında Comet Uzunluğu (CL)

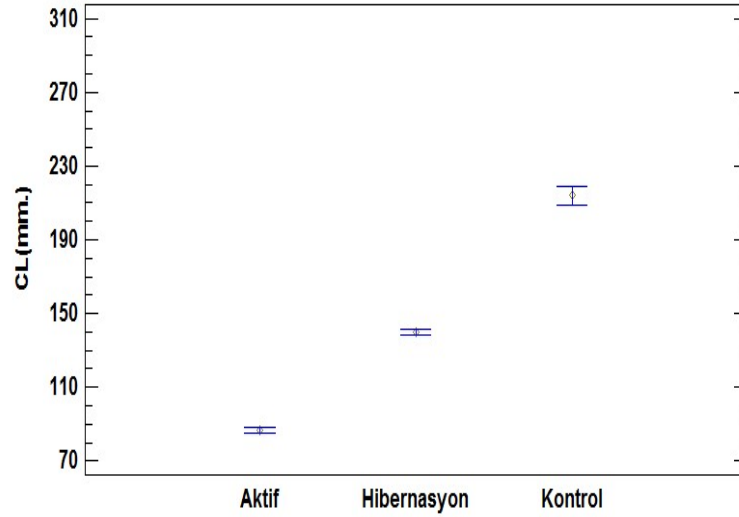
Hibernasyon grubunda CL değeri 43 – 337,0 μm, aktif grupta 3 – 701,0 μm pozitif kontrol grubunda ise 80 – 343,0 μm arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Comet uzunluğunun hibernasyon, aktif dönem ve pozitif kontrol arasındaki varyans analizi (N: Hücre Sayısı, ORT: ortalama, SH: Standart Hata , LSD < 0.001)

Grup	N	ORT.	SH.	Minimum	Maximum
Aktif	2000	86,69	1,34	3,0	701,0
Hibernasyon	2000	140,01	0,87	43,0	337,0
Pozitif kontrol	200	213,94	2,92	80,0	343,0
Total	4200	118,14	0,93	3,0	701,0

Ortalama comet uzunluğu değerleri, hibernasyon sürecindeki grupta $140,01 \pm 0,87$ μm, aktif grupta $86,6 \pm 1,34$ μm ve kontrol grubunda ise $213,9 \pm 2,92$ μm olarak bulunmuştur. gruplar arasındaki farklılıkların varyans analiz yapmış, her üç

grubunda birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir ($F_{2,4199} = 935$, $LSD P_{0,000} < 0,001$; Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Comet uzunluğu üzerine hibernasyon, aktif dönem ve pozitif kontrol uygulamalarının etkisi ($p < 0,001$)

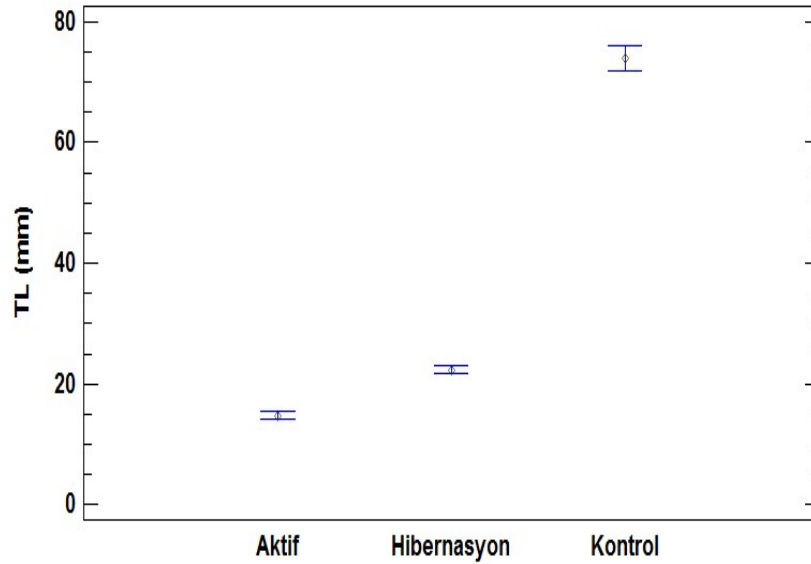
3.4.2. Hibernasyon, Aktif Dönem ve Pozitif Kontrol Gruplarında Kuyruk Uzunluğu

Hibernasyon grubunda TL değeri 0 – 140,0 μm arasında, aktif grubunda 0 – 107,0 μm ve pozitif kontrol grubunda ise 3 – 210,0 μm arasında belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Kuyruk uzunluğunun hibernasyon, aktif dönem ve pozitif kontrol arasındaki varyans analizi (N: Hücre Sayısı, ORT: Ortalama SS: Standart Hata, LSD < 0.001)

<i>Grup</i>	<i>N</i>	<i>ORT.</i>	<i>SH.</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
Aktif	2000	14,7035	0,38986	0	107,0
Hibernasyon	2000	22,3315	0,49579	0	140,0
Pozitif kontrol	200	73,955	2,65139	3,0	210,0
Total	4200	21,1574	0,377542	0	210,0

Ortalama kuyruk uzunluğu değerleri, hibernasyon sürecindeki grupta $22,3 \pm 0,49 \mu\text{m}$, aktif grupta $14,7 \pm 0,38 \mu\text{m}$ ve pozitif kontrol grubunda ise $73,9 \pm 2,65 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur. Kuyruk uzunluğunun, gruplar arasındaki farklılıkların varyans analizi yapmış, her üç grubunda birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir ($F_{2,4199} = 722,15$, $LSD < 0.001$; Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Kuyruk uzunluğu üzerine hibernasyon, aktif dönem ve pozitif kontrol uygulamalarının etkisi ($P < 0,001$)

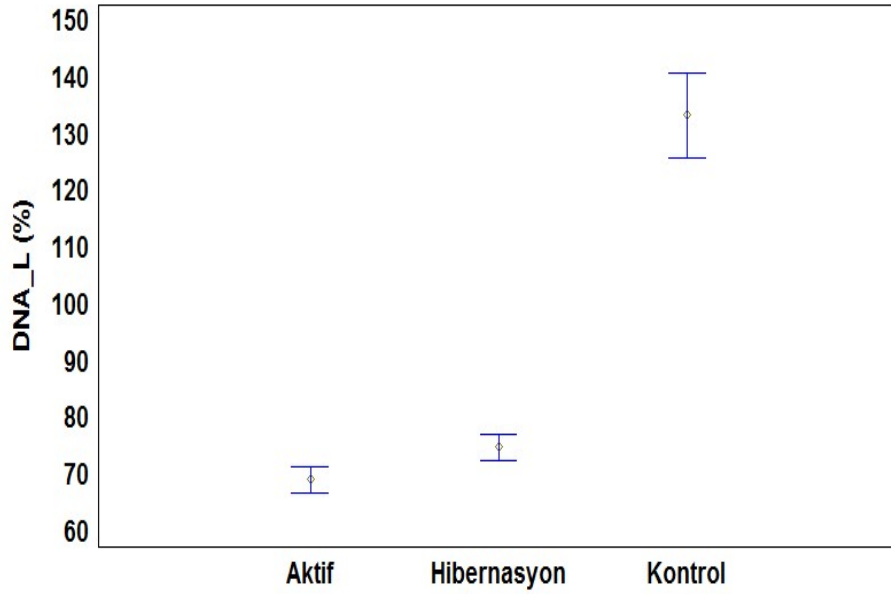
3.4.3. Hibernasyon, Aktif Dönem ve Pozitif Kontrol Gruplarında Kuyruk Uzunluğunda %DNA

Hibernasyon grubunda %DNA değeri 0 – 333,0 µm, aktif grupta 0 – 332,0 µm ve hidrojen peroksit uygulanan kontrol grubunda ise 0 – 313,0 µm arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Kuyruk uzunluğunda %DNA hibernasyon, aktif dönem ve pozitif kontrol arasındaki varyans analizi (N: Hücre Sayısı, ORT: Ortalama SH: Standart Hata, LSD < 0.001)

<i>Grup</i>	<i>N</i>	<i>ORT.</i>	<i>SH</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Col_1</i>
Aktif	2000	69,0905	1,83808	0	332,0	332,0
Hibernasyon	2000	74,836	1,56309	0	333,0	333,0
Pozitif kontrol	200	133,38	5,33404	0	313,0	313,0
Total	4200	74,8879	1,19441	0	333,0	333,0

Ortalama kuyruk uzunluğu %DNA değerleri, hibernasyon sürecindeki grupta $74,8 \pm 1,56$ µm, aktif grupta $69,09 \pm 1,83$ µm ve kontrol grubunda ise $133,4 \pm 5,33$ µm olarak saptanmıştır. Kuyruk uzunluğu %DNA, gruplar arasındaki farklılıkların varyans analizi yapılmış, her üç grubunda birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir ($F_{2,4199} = 64,61$, LSD < 0,001; Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Kuyruk uzunluğunda %DNA üzerine hibernasyon, aktif dönem ve pozitif kontrol uygulamalarının etkisi ($P < 0,001$)

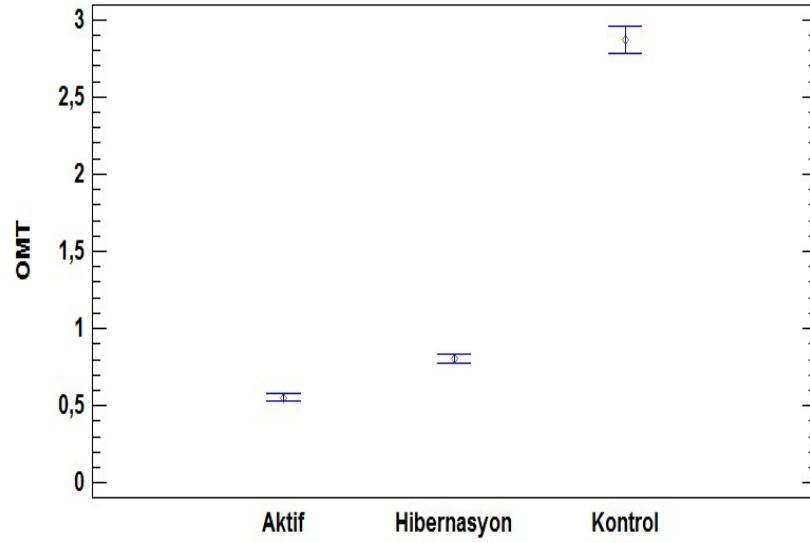
3.4.4. Hibernasyon, Aktif Dönem ve Pozitif Kontrol Gruplarının Olive Moment Üzerine Etkisi

Hibernasyon grubunda OM değeri 0 – 7,304 μm arasında, aktif grupta 0 – 5,144 μm arasında, pozitif kontrol grubunda ise 0 – 9,136 μm arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Olive Moment'in hibernasyon, aktif dönem ve pozitif kontrol arasındaki varyans analizi (N: Hücre Sayısı, ORT: Ortalama SH: Standart Sapma, LSD < 0.001)

Grup	N	ORT.	SH.	Minimum	Maximum
Aktif	2000	0,55	5,144	0	5144,0
Hibernasyon	2000	0,805	7,304	0	7304,0
Pozitif kontrol	200	2,870	9,136	0	9136,0
Total	4200	0,784	9,136	0	9136,0

Ortalama kuyruk uzunluğu OM değerleri, hibernasyon sürecindeki grupta $0,805 \pm 7,3 \mu\text{m}$, aktif grupta $0,55 \pm 5,14 \mu\text{m}$ ve kontrol grubunda ise $2,870 \pm 9,13 \mu\text{m}$ olarak saptanmıştır. OM, gruplar arasındaki farklılıkların varyans analizi yapılmış, her üç grupta birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir ($F_{2,4199} = 624,58$, $\text{LSD} < 0,001$; Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Olive Moment değerleri üzerine hibernasyon, aktif dönem ve pozitif kontrol uygulamalarının etkisi ($P < 0,001$)

3.5. Hibernasyon ve Aktif Dönem Grubundaki Bireylerin Kan Parametreleri

3.5.1. Hibernasyon ve Aktif Dönem Grubundaki Bireylerin Glukoz Miktarı

Hibernasyon sonrasındaki 10 bireyin glukoz miktarı $281,24 \pm 151,2 \text{ mg/dL}$ olarak belirlenirken, aktif dönemdeki 10 bireyin glukoz miktarı $124,86 \pm 36,6 \text{ mg/dL}$ olarak tespit edilmiştir. Hibernasyon sonrasındaki bireylerin aktif dönemdeki bireylere göre glukoz miktarı oranında 2,25 kat artışı tespit edilmiştir (Çizelge 3.5). Student's t testi

analizlerine göre iki grup arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($P_{0,008} < 0,05$).

Çizelge 3.5. Aktif ve hibernasyon dönemindeki bireylerin glukoz, kolesterol, üre, antioksidan ve oksidan değerleri

Parametre	Aktif dönem	Hibernasyon	Değişim oranı
Glukoz	124,86±36,6 mg/dL	281,24±151,2 mg/dl	2,25 kat
Kolesterol	2,06±0,70 mmol/L	3,80±0,72 mmol/L	%45,7
Üre	1,025 ±1,11mg/dL	2,85±0,75 mg/dL	2,78 kat
Antioksidan	1,61±0,41 mmol/L	2,62±0,96 mmol/L	%62,7
Oksidan	4,70 ±1,23 µmol/L	7,91±0,83 µmol/L	%68,2

3.5.2. Hibernasyon ve Aktif Dönem Grubundaki Bireylerin Kolestrol Miktarı

Hibernasyon sonrasındaki 10 bireyin kolestrol miktarının ortalaması $2,06 \pm 0,70$ mmol/L, aktif dönemdeki 10 bireyin kolestrol miktarının ortalaması ise $3,80 \pm 0,72$ mmol/L. olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.12). Aktif döneme göre hibernasyon sonrasında kolesterol miktarı % 45,7 oranında azalmıştır (Çizelge 3.5). Üç grup arasında Student's t testi sonucuna göre hibernasyon dönemindeki bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p: 0,001 > 0,05$).

3.5.3. Hibernasyon ve Aktif Dönem Grubundaki Bireylerin Üre Miktarı

Hibernasyon sonrasındaki 10 bireyin üre miktarının ortalaması $2,85 \pm 0,75$ mg/dL, aktif dönemdeki 10 bireyin üre miktarının ortalaması ise $1,025 \pm 1,11$ mg/dL olarak belirlenmiştir. Aktif döneme göre hibernasyon sonrasında üre miktarı 2,78 kat artmıştır (Çizelge 3.5). Karşılaştırmalı Student's t testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p: 0,009 < 0,05$).

3.5.4. Hibernasyon ve Aktif Dönemde Total Antioksidan Seviyeleri

Hibernasyon sonrasındaki 10 bireyin antioksidan miktarının ortalaması $2,62 \pm 0,96$ mmol/L olarak belirlenirken, aktif dönemdeki 10 bireyin antioksidan miktarının ortalaması $1,61 \pm 0,41$ mmol/L olarak tespit edilmiştir. Hibernasyon sonrasında bulunan bireylerin aktif dönemdeki bireylere göre antioksidan miktarı ortalama % 62,7 oranında arttığı saptanmıştır (Çizelge 3.5). Karşılaştırmalı student's t testi uygulandığında ise bireylerin hibernasyon ve aktif dönemleri arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p: 0,0069 < 0,05$).

3.5.5. Hibernasyon ve Aktif Dönemde Total Oksidan Seviyeleri

Hibernasyon sonrasındaki 10 bireyin oksidan miktarının ortalaması $7,91 \pm 0,83$ μ mol/L olarak belirlenirken, aktif dönemdeki 10 bireyin oksidan miktarının ortalaması $4,70 \pm 1,23$ μ mol/L olarak tespit edilmiştir. Hibernasyon döneminin sonrasında bulunan bireylerin aktif dönemdeki bireylere göre oksidan miktarı ortalama % 68,2 oranında arttığı saptanmıştır (Çizelge 3.5). Karşılaştırmalı student's t testi uygulandığında ise bireylerin hibernasyon ve aktif dönemleri arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p: 0,001 < 0,05$).

4. TARTIŞMA

Hibernasyon, hayvanların hayatta kalmak için stresli koşullarda kullandıkları, kendilerini korumak için geliştirdikleri stratejik davranıştır. Kış uykusuna yatan hayvanların birçoğu bu esnada yaşamsal faaliyetlerini minimum düzeyde tutar. Çeşitli araştırmalarda, donma toleransı gösteren canlıların hayatta kalabilmeleri için stratejik değişkenler gösterdiği, donma esnasında vücut sıcaklığı minimum dereceye düşse de cins ve türler arasında önemli farklılıklar belirlenmiştir (Storey 2004; Voituron ve ark., 2005; Constanzo ve Lee, 2013; Xiao ve ark., 2016).

Bu hayvanlar arasında en fazla çalışılan grup kurbağalardır. Karasal kurbağalar donmaya daha fazla toleranslıdır. Buna karşın, sucul hibernatörlerin donmaya karşı daha az toleranslı olduğu belirtilmiş olup bu türlerle ilgili az sayıda çalışma yapılmıştır. (Voituron ve ark., 2005).

Coğrafik konum ve mevsimsel değişimlerin kurbağa türlerinde kriyoprotektan üretiminde farklılıklara neden olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca kuzey bölgelerde yaşayan türlerin güney bölgelerindeki türlere göre nispeten kış uykusu için daha fazla hazırlık rezervi ürettiği belirtilmiştir (Costanzo ve ark., 1993). Storey ve Storey (1988), *Hyla crucifer* ve *Rana sylvatica* türlerinin hibernasyon sırasında vücutlarının % 65'ini buza dönüştürdüğünü ve bu türlerin 15 güne kadar hayatta kalabildiklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, *Rana pipiens* türünün -2 °C'de 8 saate kadar glukoz depolayabildiği ve bu sayede hayatta kalabildiği gösterilmiştir. Diğer taraftan, -6 °C'de tutulan *Rana septentrionalis* ve *Rana pipiens* türlerinin 5. günün sonunda öldüğü rapor edilmiştir (Storey ve Storey, 1988). Voitoren (2009) *Rana sylvatica*, *Hyla versicolor*, *H. crucifer* ve *Pseudacris triseriata* türlerinin çok soğuk hava şartlarında biriktirdikleri kriyoprotektantlar ile hayatta kalabildiklerini göstermişlerdir. *Rana arvalis* türünün -3 °C'de 72 saat yaşayabildiğini belirtmiştir. Voitoren ve ark. (2005), kışı su altında geçiren *Rana ridibunda* türünün su altındaki

oksijeni kullanarak 8-36 saat içerisinde vücudunun % 55'ini buz haline çevirdiğini saptamışlardır. Bununla birlikte, buzlanmanın % 60 ve üzerine çıktığı durumda hayvanların yaşamlarını yitirdiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar bu sucul hibernatörü “*kısmi donma toleranslı*” bir tür sınıflandırmışlardır (Voitoren ve ark. ,2005). *P. caralitanus* türünün, -4 °C ve daha düşük sıcaklıklarda vücut sıcaklığı -6°C ölçülmüş olup oda sıcaklığına alınan bireylerin hepsinin öldüğü tespit edilmiştir. Ancak -3°C’de 24 saat hayatta kalabildiği tespit edilmiştir. Böylece sıcaklıktaki düşüşün ve süredeki uzamanın bu türde ölüme neden olduğu belirlenmiştir.

Omurgasız canlılarda doğal donma toleransı görülürken, kış uykusuna yatan memelilerde ve ektotermik omurgalılarda bu durum farklıdır (Block, 1991; . Voituron ve ark, 2005). Memeliler kış uykusu halinde vücut sıcaklığı minimum hale getirip kanın pıhtılaşmasını baskılamak için antifriz proteinlerini miktarını, glukoz seviyesini ve antioksidan enzimlerini artırır (Storey, 1996; Cai ve Storey, 1997; Hutchison ve Star Hazard, 1984; Stolyar ve ark. ,2008) .

Cai ve Storey (1997), donma sıcaklıklarına maruz bırakılan kurbaçalarda ilk olarak dehidrasyona neden olan iyon kuvvetinin ve sitoplazma osmolalitesinin arttığını saptamışlardır. Bu olayı takiben strese neden olan iskemi durumu belirlenmiştir. Daha sonraki evrelerde kan akışının yavaşladığı ve dolaşımın durduğu belirtilmiştir. Son olarak, buz oluşumundan dolayı kapillerde mekanik hasarın olduğu ve organların zarar gördüğünü belirtilmiştir. Bununla birlikte, bu belirtilen stres faktörlerine karşı düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektantların yüksek konsantrasyonlarda biriktiği bildirilmiştir. Hibernasyona girme sırasında glikojen fosforilaz aktivasyonunun arttığı ve karaciğerin glukozu bütün organlara taşıyarak periferel bölgelerde glukoz seviyesinin yaklaşık 5 mM’dan 200-300 mM’a çıktığı belirtilmiştir. Costanzo ve ark. (1993), *R. sylvatica* türünde eritrosit hücrelerinin donma ve çözünmesinin stres koşullarına dayanaklılığını üzerine glukoz seviyesinin etkisini değerlendirmişlerdir. Donma sıcaklıklarında hücrelerde artan glukoz

seviyesinin, oluşabilecek hasarları azaltabildiği buna karşın donma sırasında hemolizin yaşanabildiği ve hücrelerde hasar meydana geldiği belirtilmiştir. Çözülmüş kurbağaların biraz anemik olduğu buna karşın bu durumun oksijen verme sistemini etkilemediği bildirilmiştir. Bu durumda homeostazın yeniden düzenlenmesinin ve oluşan hasarların iyileştirilmesinin zamanla gerçekleştiği belirtilmiştir (Costanzo ve ark., 1993). Dondurma sağ kalımının ardından yapılan *in vivo* deneylerde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (Costanzo ve ark., 1993; 2004). Elde edilen verilerde *P. caralitanus*'un glukoz miktarının oda sıcaklığında bulunan aktif dönemdeki bireylere göre -3 °C'de 24 saat içerisinde hibernasyon dönemine girmiş bireylerde 2,25 kat artmıştır. Bu sonuçlar hibernasyon sırasında artan glukozun *P. caralitanus* türünde bir kriyoprotektan olarak fonksiyon gördüğü ileri sürülebilir.

Rana esculenta türünün karaciğer örneklerinde lipit ve kolesterol miktarının soğuk hibernasyon döneminde (Kasım ayı) düştüğü bildirilmiştir. Bununla birlikte, serbest kolesterol tüm yıl boyunca sabit kaldığı rapor edilmiştir (Bruscalupi ve ark., 1989). Balıklar, amfibiler ve sürüngenler arasında düşük sıcaklıklara uyumun genellikle membranların kolesterol içeriğindeki azalma ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Cuculescu ve ark., 1995; Hazel 1988; Sorensen 1993). Reynolds ve ark. (2014), güney bölgelere göre kuzey bölgelerde yayılış gösteren *Rana sylvatica* türlerinde kolesterol içeriğinin daha düşük olduğunu ve bu durumun soğuk koşullarda membran fonksiyonunu korumak için bir adaptasyon mekanizması olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, kolesterol kullanımının, NADPH oksidaz aktivasyonu yoluyla hücre içi ve dışı boşlukta reaktif oksijen türlerinin seviyelerinde artışa yol açabileceği bildirilmiştir (Petrov ve ark., 2014). Kolesterolün tükenmesiyle birlikte reaktif oksijen türlerinin seviyelerinin arttığı, NADPH oksidazın hücre dışına H₂O₂ saldırdığı ve hücre zarından geçerek sitoplazmaya kadar ulaştığı rapor edilmiştir (Jin ve ark. 2011).

Alaskada yaşayan *Rana sylvatica* 'nın yıl boyunca, kolesterol degerleri ölçülmüş, mevsimsel kolesterol değişimlerinin ortalaması $13,4 \pm 0,8$ olarak belirlenirken, Ohio'da yayılış gösteren *Rana sylvatica* türünde mevsimsel kolesterol değişiminin ortalaması $16,0 \pm 0,6$ olarak ölçülmüştür (Reynolds ve ark., 2014). Kolesterol içeriğinin, daha soğuk ortamlara adaptasyon için bu kurbağa türüne yardımcı olabileceği bildirilmiştir. Ohio'ya göre Alaska'da yayılış gösteren *Rana sylvatica* türünde nispeten daha düşük kolesterol içeriğinin, daha soğuk ortamlara adaptasyon için bu kurbağa türüne yardımcı olabileceği bildirilmiştir (Hassett ve Crockett, 2009; Reynolds ve ark., 2014). Ülkemizde Ohio ile aynı enlemde bulunduğundan dolayı kolesterol miktarı düşük seviyede ölçülmüştür. Aktif dönemdeki bireylere göre hibernasyon döneminde bulunan bireylerde $45,7$ oranında azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuç, düşük kolesterol içeriğinin soğuk ortamlara adaptasyon için *P. caralitanus* türüne yardımcı olabileceğini göstermiştir.

Kurbağalar dehidrasyona dirençli omurgalı canlılardır. Ozmotik strese cevap olarak kurbağalar vücut sıvısının ozmalaritesini yükseltmeye başladığı ve hipeüremi biriktirdiği bildirilmiştir (Griffith, 1991; Katz, 1992; Scheer ve Markel, 1962; Shpun ve ark., 1992). Ilıman bölgelerde sonbahar aylarında toprağın donmasıyla birlikte su potansiyelinin düştüğü ve nemin en aza indirildiği belirtilmiştir. Bu bölgelerde kış uykusuna yatan canlıların ozmotik stres ile başa çıkmak için üre biriktirdiği bildirilmiştir. Ürenin vücut sıvılarının donma noktasını azalttığı (Clausen ve Costanzo, 1990), metabolizmayı baskıladığı (Muir ve ark., 2008) ve su kullanma potansiyelinin azaldığı durumlarda membran akışkanlığını koruduğu (Nowacka ve ark., 2012) bildirilmiştir. *Rana sylvatica* türünde ürenin, kışa hazırlık periyodunda biriken başlıca kriyoprotektan olduğu ve protein katabolizmasının bir sonucu olarak biriktiği bildirilmiştir (Costanzo and Lee, 2005; Costanzo ve ark., 2015). Bununla birlikte, ürenin soğuğa maruz kalan kurbağalarda böbrek fonksiyonlarındaki bir azalmaya bağlı olarak daha fazla arttığı belirtilmiştir. Soğuğa maruz bırakılan *R. sylvatica* türünde plazma üre seviyesinin yaz aylarına göre 25 kat fazla olduğunu bildirmişlerdir (Zimmerman ve ark., 2007; Costanzo ve ark., 2005).

Bununla birlikte, bir ağaç kurbağası türü olan *Dryophytes chrysoscelis*'de iki hafta süreyle 5 °C'lik uyumlama sıcaklığının üre konsantrasyonunu 2 kat arttırdığı buna karşın donma sıcaklığının (-2,5 °C, 24 saat) üre seviyesinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir (Amaral ve ark., 2018). Costanzo ve ark. (2015), üre birikiminin en fazla karaciğerde olduğunu ve çözünme esnasında meydana gelen yaralanmalarını önlediğini bildirmişlerdir.

Benzer olarak araştırmamızda üre miktarı hibernasyondaki (-3 °C, 24 saat) bireylerde 2,78 kat artış göstermiştir. Bu sonuçlar, donma sıcaklığına maruz bırakılan *P. caralitanus* türünde vücut sıvısının donma noktasını düşürerek su kullanma potansiyelinin azaltıp hücre zar akışkanlığını korumaktadır. Miktarı artan ürenin protein katabolizmasının sonucunda bir kriyoprotektan olarak fonksiyon görebileceği ileri sürebilir.

Oksijenli solunum yapan tüm canlılar hücrenel bileşenlere zarar veren oksidatif stresin etkilerini azaltmak için bir antioksidan savunma sistemine sahiptir ancak antioksidan sistemler oldukça karmaşıktır ve bileşenleri farklılık gösterir. Kış uykusuna yatan su kurbağalarının dokularında görülen iskemi ve reperfüzyon sırasında oluşan ROS'ların oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir. ROS'lar makromolekülleri oksitleyerek hücre zarında hasar oluşturan lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır (Hermes-Lima ve Storey, 1996, 1998; 2002; Bagnyukova ve ark., 2003, Lukic ve ark., 2017). Birçok omurgalı ve amfibi türünde, hibernasyon döneminde meydana gelen oksidatif stres sonucu oluşabilecek hasarı en aza indirmek için katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi önemli antioksidan enzim sistemleri gelişmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Hermes-Lima ve ark., 2002). Bu nedenle antioksidan ve oksidan ilişkisini inceleyen çalışmalarda genellikle SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitesindeki değişimler araştırılmıştır (Prokić ve ark., 2017; Voituron ve ark., 2006; Hermes-Lima ve ark., 2002:).

Oksijensiz ortama ve donma stresine toleranslı olan *Lacerta vivipara* türünde antioksidan enzimlerin aktivitesinde artış olduğu, *Chrysemys picta* türünün ise önce -6 °C' de ardından -2.5 °C'de 48 saat boyunca kış uykusuna yatırılıp donma toleransının oksidatif hasarı en aza indiren antioksidan savunma sisteminin geliştiği, çevresel strese bağlı olarak kırmızı yanaklı su kaplumbağasında (*Trachemys scripta elegans*) anoksiya sırasında beyin ve karaciğerde SOD aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (Willmore ve Storey, 1997). Yer sincabı (*Spermophilus citellus*) kış uykusuna hazırlık evresinde beyaz adipoz dokuda CuZnSOD ekspresyonunda azalma görüldüğü saptanmıştır (Vucetic ve ark., 2013),

Amerika kıtasında dağılım gösteren Anur türü *Rana pipiens*' in sıcaklığı bağlı olarak dehidrasyon çalışmalarında kas dokusundaki SOD aktivitesinde bir azalma gösterdiği belirtilmiştir (Hermes-Lima ve Storey, 1998). *R. sylvatica*'nın hücrelerinde donma toleransı sırasında iskemik stres uygulanmış, iskemi sırasında oksidatif stresten dolayı ROS'ların artmaya başladığı reperfüzyon ile tekrar oksijenizasyon oluşmaya başladığında ROS'ların tekrar ayırt edilmeye başlandığı ve stres sırasında SOD miktarının arttığı bildirilmiştir (Ferrari ve ark., 1991; Storey ve Storey, 1986). Simpson. ve Lucchesi, 1987; Zweier ve Talukder, 2006).

SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimler, total antioksidan ve oksidan ilişkisinin aktivitesini belirler. Ancak amfibi türlerinde total antioksidanların ve total oksidanların seviyesinin üzerine donma sıcaklıklarının etkisinin araştırıldığı çalışmalara literatürde rastlanılmamıştır.

Yaptığımız çalışmada ise *P.caralitanus* 'tan alınan kan ile total antioksidan ve total oksidan miktarları açısından hibernasyon dönemindeki bireylerin aktif dönemdeki bireylere göre antioksidan miktarlarında % 62,7 oranında, oksidan miktarlarında da % 68,2 oranında bir artış tespit edilmiştir. Oksidan miktarının

artmasıyla birlikte antioksidan miktarı da neredeyse aynı oranda bir artış göstermiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, sistemdeki antioksidan seviyesindeki aktivasyonlar canlının hayatta kalma stratejisini önemli bir etken olarak geliştirdiği anlaşılmaktadır (Hermes-Lima and Storey 1993, 1996; Joannis and Storey 1996a, b; Voituron et al. 2006).

Kurbağaların yaşamsal döngüsünde hibernasyon öncesi ve sonrası stress, oksidatif hasara ve hipoksik koşullara, homeostatik ve metabolik bozulmalarla, organeller ve hücre zarı gibi çabuk etkilenen yapılarda mekanik ve ozmotik zarara neden olduğu bildirilmiştir (Storey and Storey, 1988).

Comet testi günümüzde genotoksisite, mutajenite, UV ve iyonize radyasyonun DNA'da neden olduğu hasarların belirlenmesinin yanında strese bağlı oksidatif hasarların belirlenmesinde de kullanılan bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Achary ve ark. 2008; Dikilitas ve ark., 2009). Araştırmamızda, düşük sıcaklık uygulaması ile hibernasyona sokulmuş *Pelophlyax caralitanus* türünde DNA hasarı comet testi ile belirlenmiştir.

DNA hasarı (tek iplik kırılmaları, çift iplik kırılmaları ve çapraz DNA bağlanmaları) potansiyel olarak mutajenik düzensizliklerini ifade etmekte olup; sucül ve karasal ekosistemlerin biyo izlemi için önerilmiştir (Mitchelmore ve Chipman 1998; Svendsen ve ark., 2004). Şimdiye kadar yapılan literatür araştırmalarımızda, omurgasız ve omurgalı hayvanlar üzerine pestisit, herbisit, fungusit gibi çeşitli kirleticiler neden olduğu DNA hasarı hakkında çalışmalar bulunmaktadır (Rosenstein ve Chao 1985; Lowcock ve ark., 1997; Erismis ve ark., 2012; Yang ve ark., 2006; Yin ve ark., 2008; Wang ve Jia, 2009; Arcaute ve ark., 2014; Pérez-Iglesias ve ark., 2015; Gonçalves ve ark., 2017.) Ancak hibernasyona giriş ve çıkış dönemine ait DNA zararları ilgili çalışmalara rastlanılmamış, Anadolu Beyşehir Su kurbağası *P. caralitanus* türünde hibernasyon döneminde mevcut türün DNA hasarı ile ilgili

belirlenen parametrelerde Comet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruktaki %DNA ve Olive moment artış belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu bulgular hibernasyona giren DNA hasarını ortaya koyan ilk çalışmadır.

5. SONUÇ

Ektotermik omurgalılar sucul ve karasal ekosistemlerde dağılış gösterirler. Bazı ektotermik omurgalılar mevsimsel geçişlerin farklı olduğu yüksek enlemlerde ve her dem soğuk bölgelerde hem iklimsel hem de antropojenik faktörlere bağlı olarak aşırı streese maruz kalırlar, yaşamlarını devam ettirebilmeleri için ekofizyolojik özelliklerini dengede tutarlar. Ekofizyolojik davranışlar organizmalarda farklıdır.

Göller bölgesinde yaşayan Beyşehir su kurbağası (*Pelophylax caralitanus*) endemik türlerimizdendir. Bu çalışmada, hibernasyona girecek bireyler 15 gün 4 °C'de prehibernasyon ile hazırlık evresinde tutuldu. Daha sonra bireyler farklı düşük sıcaklıklara maruz bırakıldı -4 °C ve daha düşük sıcaklarda bireyler yaşamlarını devam ettirememiştir. Ancak -3 °C'de de hayatta kalabildikleri gözlemlendi. Böylece -3 °C'de hibernasyona giren *P. caralitanus*'un hibernasyon dönemindeki kan dokusunda glukoz, kolesterol, üre, total oksidan ve total antioksidan değişimler ve comet assay yöntemi ile DNA hasarı araştırılmıştır.

Bu bağlamda, hibernasyon öncesi ve sonrası bireylerin, 15 gün boyunca 4 °C'de, ardından 24 saat -3 °C'de tutulup hibernasyona girmeleri sağlanmıştır. Hibernasyon dönemi, aktif dönem ve hidrojen peroksit ile hazırlanan pozitif kontrol grubu olmak üzere üç gruba ayrıldı. Her bireyde 200 comet hücresi sayıldı ve belirlenen comet parametreleri ölçüldü.

Comet uzunluklarının (CL) ortalaması hibernasyon döneminde $140,01 \pm 0,87$ μm , aktif dönemde $86,6 \pm 1,34$ μm ve pozitif kontrol grubunda ise $213,9 \pm 2,92$ μm olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, en fazla comet uzunluğu pozitif kontrol grubunda belirlenirken, en az comet uzunluğu aktif dönem grubunda tespit edilmiştir.

Hibernasyon dönemindeki grup ise comet uzunluğu bakımından aktif döneme nispeten daha fazla bulunmuştur.

Kuyruk uzunluklarının (TL) ortalaması hibernasyon sürecindeki grupta $22,3 \pm 0,49 \mu\text{m}$, aktif grupta $14,7 \pm 0,38 \mu\text{m}$ ve kontrol grubunda ise $73,9 \pm 2,65 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, en fazla kuyruk uzunluğu pozitif kontrol grubunda belirlenirken, en az kuyruk uzunluğu aktif dönem grubunda tespit edilmiştir. Hibernasyon sonrasındaki grup ise kuyruk uzunluğu bakımından aktif döneme nispeten daha fazla bulunmuştur.

Kuyruk uzunluğunda %DNA 'da hibernasyon sürecindeki grupta $74,8 \pm 1,56 \mu\text{m}$, aktif grupta $69,09 \pm 1,83 \mu\text{m}$ ve kontrol grubunda ise $133,4 \pm 5,33 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, DNA hasarının kuyruk uzunluğundaki %DNA miktarı en fazla pozitif kontrol grubunda, hibernasyon sonrasındaki ve en az aktif grupta olduğu belirlenmiştir.

Olive moment (OM) parametresinde ortalama hibernasyon sürecindeki grupta $0,805 \pm 7,3 \mu\text{m}$, aktif grupta $0,55 \pm 5,14 \mu\text{m}$ ve kontrol grubunda ise $2,870 \pm 9,13 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, en fazla olive moment değeri pozitif kontrol grubunda belirlenirken, en az olive moment değeri aktif dönem grubunda tespit edilmiştir. Hibernasyon sonrasındaki grup ise olive moment değeri bakımından aktif döneme nispeten daha fazla bulunmuştur.

Hibernasyon öncesi ve sonrası dönemlerde *P.caralitanus* örneklerinde kan parametrelerinin sonuçlarına bakıldığında; hibernasyon döneminde bulunan bireylerde aktif dönem bireyelerine göre glukoz miktarının 2,25 kat arttığı belirlenmiştir. Kolesterol miktarı hibernasyon döneminde bulunan bireyelerde aktif dönem bireyelerine göre % 45,7 azaldığı saptanmıştır. Hibernasyon dönemindeki

bireylerde üre miktarı ise aktif dönemkilere göre 2,78 kat artmıştır. Total antioksidan miktarında hibernasyonda bulunan bireylerde %62,7 artış ve total oksidan miktarında ise % 68,2 oranında artış olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak *P.caralitanus* hibernasyona girdiğinde çevresel ve bazı kan parametrelerindeki fizyolojik değişimlerden dolayı DNA hasarına uğradığı belirlenmiştir. Bununla birlikte kış uykusundan çıkıp aktif dönemine girdiğinde hasara uğrayan DNA'ların çoğunluğunun tamir edildiği gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada *P.caralitanus'un* hibernasyon öncesi ve hibernasyon sonrası ekofizyolojik değişimleri incelenmiştir. Ülkemizde bulunan diğer türler için model bir çalışma olmuştur.

ÖZET

Bu çalışmada, ülkemizin göller bölgesi için endemik bir tür olan Anadolu Beyşehir Su Kurbağası (*Pelophylax caralitanus*)'nda bazı fizyolojik değişimler ve DNA hasarı üzerine hibernasyon döneminin etkileri araştırılmıştır. Hibernasyonun fizyolojik bir davranış olduğu bildirilmiştir. Besin kıtlığında ve mevsimsel sıcaklıkların düşmesi ile gerçekleşir. Canlılar hayatlarını sürdürebilmek için metabolizmalarını minimum seviyeye indirirerek uyku haline geçerler. Jel elektroforez yöntemi olarak bilinen comet assay, DNA hasarını belirlemede kullanılan bir yöntemdir. Kolay, hızlı ve hassas bir yöntem olması sayesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Literatürde amfibiler üzerinde yapılan comet assay deneyleri genellikle biyoizlem çalışmaları olarak yapılmıştır. Hibernasyona giren amfibiler üzerinde DNA hasarını comet assay yöntemi ile belirleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Hibernasyon dönemine giren amfibilerde oluşan DNA hasarının ve fizyolojik değişikliklerin aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Stresli koşullar altında amfibilerde meydana gelebilecek olumsuz etmenleri en aza indirmede yardımcı olabilir. Eber Gölü'nden toplanan 30 bireyden 20 tanesi çalışmamız için belirlenmiş olup boy uzunlukları ölçülmüş ve ölçülen değerler arasında istatistiksel bir anlam olmadığı saptanmıştır ($p=0,12>0,05$). Bu bireylerden 10 tanesi aktif dönemde bırakılıp kalanları ise -3°C 'da hibernasyon dönemine girmeleri için belirlenmiştir. Aktif dönemde bırakılan bireylerin kanından H_2O_2 kullanılarak pozitif kontrol grubu oluşturulmuştur. Her bireyden alınan kan ile *P. caralitanus*'un hibernasyon döneminde comet assay yöntemi ile DNA hasarının belirlenmesinin yanı sıra glukoz, kolesterol, üre, total antioksidan ve total oksidan miktarlarındaki değişimler de araştırılmıştır. Hibernasyon dönemi, aktif dönem ve pozitif kontrol gruplarında comet uzunluğu (CL), kuyruk uzunluğu (TL), kuyrukta bulunan % DNA miktarı (% DNA) ve olive moment (OM) parametreleri değerlendirilerek her birey için 200 comet hücresi sayılmıştır. Bu parametrelerden alınan sonuçlara göre, hibernasyon döneminde bulunan bireylerde aktif dönemdeki bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış DNA hasarı bulunmuştur ($p<0,001$).

Bu çalışmada DNA hasarının yanı sıra belirlenen kan parametrelerindeki değişimler de gözlemlenmiştir. Hibernasyon döneminde, aktif dönemdeki bireylere göre glukoz miktarı 2,25 kat, üre miktarı 2,78 kat artış gösterirken, total antioksidan miktarında % 65,7 ve total oksidan miktarında % 68,2 artış olduğu saptanmıştır. Kolesterol miktarında ise %45,7 oranında bir azalma gözlenmiştir. Anadolu Beyşehir Su kurbağası olan *P.caralitanus*'un düşük sıcaklıklara maruz kaldığında bile hayatta kalmayı başardığı görülmüştür. Hibernasyona bırakılan bireylerin en fazla -3 °C'a kadar kısmi donma toleransı gösterebildikleri gözlenmiştir. Bu bireylerde donma ve çözülme sırasında glukoz ve üre seviyelerinin artması ile de oluşan stresin olumsuz etkilerinin hafifletildiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Amfibi, Comet assay, DNA hasarı, Hibernasyon, *Pelophylax caralitanus*

SUMMARY

In this study, some physiological changes in the Anatolian Beysehir Water Frog (*Pelophylax caralitanus*), which is an endemic species for the lakes region of our country, and the effects of the period of hybridization on DNA damage were investigated. It has been reported that hibernation is a physiological behavior. It occurs in food shortages and in seasonal temperatures. Living things go into sleep by minimizing their metabolism in order to sustain their lives. The comet assay, known as the gel electrophoresis method, is a method used to determine DNA damage. It is an easy, fast and sensitive method and is a frequently used method. In the literature, the comet assay experiments on amphibians were generally carried out as biomass studies. No study has been found to determine DNA damage on the amphibians entering the hybridization by the comet assay method. It is of great importance to clarify the DNA damage and physiological changes that occur in the amphibians entering the hibernation period. Under stressful conditions, it can help to minimize the negative factors that may occur in amphibians. The length of the 20 ones determined for study from the 30 individuals collected from Eber Lake was measured *in vitro* and it was found that there was no statistical significance between the measured values ($p=0.12>0,05$). Ten of these individuals were determined to be left in the active period and the rest were allowed to enter the hibernation period at -3°C . Positive control group was formed by using H_2O_2 from the blood of the individuals left in the active period. In addition to determination of DNA damage by the comet assay method, changes in glucose, cholesterol, urea, total antioxidant and total oxidant levels were investigated in the hybridization period of *P. caralitanus* with blood from each individual. Comet length (CL), tail length (TL), % DNA amount (% DNA) and olive moment (OM) parameters in queue were counted and 200 comet cells were counted for each individual. According to the results of these parameters, statistically significant increase in DNA damage was found in the individuals who were in the hibernation period compared to the individuals in the active period ($p < 0,001$).

In this study, changes in blood parameters were observed as well as DNA damage. While the amount of glucose in the active period was 2,25 times and the amount of urea increased 2,78 times compared to the individuals in the active period, the total antioxidant amount increased by % 65,7 and the total oxidant amount increased by % 68,2 . The amount of cholesterol decreased by % 45,7. It was seen that *P. caralitanus*, a water frog, managed to survive even when exposed to low temperatures. It was observed that individuals left to hibernation could exhibit partial freezing tolerance up to -3 °C. It has been observed that the negative effects of stress caused by the increase of glucose and urea levels during freezing and thawing of these individuals have been alleviated.

Key words: Amphibian, Comet assay, DNA damage, Hibernation, *Pelophylax caralitanus*

KAYNAKLAR

- ACHARY, V. M., JENA, S., PANDA, K. K. VE PANDA, B. B. (2008). Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70: 300–310.
- ALLAIN C. C., Poon L. S. Chan G.S. C., Richmond W. Fu C.P. (1974). Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol, *The American Association of Clinical Chemists, Inc.* 20/4 , p.470-475.
- AMARAL M. CLARA F., FRISBIE JAMES · GOLDSTEIN L. DAVID · KRANE M. CARISSA. (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.
- ANDERSON D, PLEWA MJ. (1998). The International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 13:67-73.
- ANDERSON, D., DHAWAN, A., WEI, T. AND PLEWA, M.J. (1996). An investigation of bone marrow and testicular cells invivo using the comet assay. *Mutat. Res.* , 370, 159-174.
- ARCAUTE DE R.C. , PÉREZ-IGLESIASA J.M. , NIKOLOFF N. , NATALE G.S. , SOLONESKI S. , LARRAMENDY M.L. (2014). Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays *Ecological Indicators* 45 632–639.
- ARIKAN, H. (1988). On a new form *Rana ridibunda* (Anura: Ranidae) from Turkey. *Istanbul Universitesi Fen Fakültesi Mec.*, **53**: 81-87.
- ARIKAN, H. (1989): *Rana ridibunda* (Anura, Ranidae) populasyonlarının kan hücrelerinin sayısı bakımından incelenmesi. *Turkish Journal of Zoology* 13(2): 54-59.
- ARIKAN, H., KESKİN, N.A., ÇEVİK, İ.E., ERİŞMİŞ, U.C. (2010): A Study on the Blood Cells of Anatolian and Thracian populations of the Fire-Bellied Toad, *Bombina bombina* L. (Anura: Bombinatoridae). *Animal Biology* 60: 61-68.
- ASHTON, K.G. 2002a. Patterns of within-species body size variation of birds: strong evidence for Bergmann's rule. *Glob. Ecol. Biogeogr.*, **11**: 505–523.
- ASHTON, K.G. 2002b. Do amphibians follow Bergmann's rule? *Can. J. Zool.*, **80**: 708–716.
- ASHTON, K.G. AND FELDMAN, C.R. 2003. Bergmann's rule in nonavian reptiles: turtles follow it, lizards and snakes reverse it. *Evolution*, **57**: 1151–1163.

- ATKINSON, D. 1994. Temperature and organism size – a biological law for ectotherms? *Adv. Ecol. Res.*, **25**: 1–58.
- ATKINSON, D. AND SIBLY, R.M. 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends Ecol. Evol.*, **12**: 235–239.
- BAGNYUKOVA, T.V., STOREY, K.B., LUSCHAK, V.I. (2003). Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. *Jurnal of Thermal Biology*, **28**: 21- 28.
- BAKER J.P. , COSTANZO P.J. , JR LEE E.R. (2007). Oxidative stress and antioxidant capacity of a terrestrially hibernating hatchling turtle, *J Comp Physiol B* ; **177**:875–883 DOI 10.1007/s00360-007-0185-0.
- BARNES, B. M., (1989). Freeze avoidance in a mammal body temperatures below 0°C in an Arctic hibernator. *Science*, **244**, 1593-1595.
- BARTHOLOMEW, G. A. (1986). The diversity of temporal heterothermy, in *Living in The Cold*. Ed: H. C. Heller, X. J. Musacchia, L.C.H. Wang , Proceedings of the Seventh International Symposium on Natural Mammalian Hibernation, *Elsevier Science Publishing Co.*, New York, 1-9.
- BECKMAN, K.B., AMES, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**, 547–581.
- BELK, M.C. AND HOUSTON, D.D. 2002. Bergmann's rule in ectotherms: a test using freshwater fishes. *Am. Nat.*, **160**: 803–808.
- BERGMANN, C. 1847. Über die Verhältnisse der Wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Größe. *Göttinger Studien*, **3**: 595.
- BERMAN, D. I., LEIRIKH, A. N. AND MESHCHERYAKOVA, E. N. (2010). The Schrenck newt (*Salamandrella schrenckii*, Amphibia, Caudata, Hynobiidae) is the second amphibian that withstands extremely low temperatures. *Dokl. Biol. Sci.* **431**, 131-134.
- BERMAN, D. I., LEIRIKH, A. N. AND MIKHAILOVA, E. I. (1984). Winter hibernation of the Siberian salamander *Hynobius keyserlingi*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* **20**, 323-327.
- BERNER NJ, PUCKETT RE. 2010. Phenotypic flexibility and thermoregulatory behavior in the eastern red-spotted newt (*Notophthalmus viridescens viridescens*). *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* **313**:231–9.
- BÍCEGO-NAHAS KC, GARGAGLIONI LH, BRANCO LG. 2001. Seasonal changes in the preferred body temperature, cardiovascular and respiratory responses to hypoxia in the toad, *Bufo paracnemis*. *J Exp Zool* **289**:359–65.

- BLANCKENHORN, W.U. AND FAÏRBAÏRN, D.J. 1995. Life history adaptation along a latitudinal cline in the water strider *Aquarius remigis* (Heteroptera: Gerridae). *J. Evol. Biol.*, **8**: 21–41.
- BLANCKENHORN, W.U. AND HELLRÏEGEL, B. 2002. Against Bergmann's rule: fly sperm size increases with temperature. *Ecol. Lett.*, **5**: 7–10.
- BLANK, J. L., DESJARDÏNS, C., (1986). Metabolic and reproductive strategies in the cold, in *Living in The Cold*, H. C. Heller, X. J. Musacchia, L. C. H. Wang (eds.), Proceedings of the Seventh International Symposium on Natural Mammalian Hibernation, *Elsevier Science Publishing Co.*, New York, 373-381.
- BLOCK, W. (1991). To freeze or not to freeze? Invertebrate survival of sub-zero temperatures. *Funct. Ecol.* **5**, 284-290.
- BOLOGNESI, C. , CIRILLO, S. (2014). Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Curr. Zool.* **60** (2). : 273–284.
- BONISOLI-ALQUATI, A., VORIS, A., MOUSSEAU, T.A., MÏLLER, A.P., SAINO, N. (2010). DNA damage in barn swallows *Hirundo rustica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part C 151 271–277.
- BOONE MD, BRIDGES CM. (2003). Effects of pesticides on amphibian populations. In: Semlitsch RD ed. *Amphibian Conservation*. Washington: Smithsonian Institution, 152–167.
- BOWDEN,R.D., BUCKWALTER, M.R., MCBRIDE, J.F., JOHNSON, D.A., MURRAY, B.K. AND O'NEÏLL, K.L.(2003). Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the comet assay. *Mutat. Res.* , 537, 1-9.
- BOYER, B. B., BARNES, B. M., (1999). Molecular and Metabolic Aspects of Mammalian Hibernation Expression of the hibernation phenotype results from the coordinated regulation of multiple physiological and molecular events during preparation for and entry into torpor. *BioScience*, Volume 49, Issue 9, 1, Pages 713–724.
- BRATTSTROM, B. H. (1968). Thermal acclimation in anuran amphibians as a function of latitude and altitude. *Comp. Biochem. Physiol.* **24**, 93-111.
- BRUSCALUPI G. , CASTELLANO F. , SCAPLN S. , TRENTALANCE A. , (1989). Cholesterol Metabolism in Frog (*Rana esculenta*) Liver: Seasonal and Sex-related Variations. *Lipids* **24**, 105-108.
- BUDAK, A ., GÏÇMEN, B. (2008). Herpetoloji ders kitabı Ege üniversitesi yayınları-fen fakültesi yayın no:194 Isbn 975-483-658-2.
- BURCAK G. ,ANDICAN,G. (2004). Oksidatif dna hasari ve yaşlanma.*Cerrahpaşa tıp.derg.***35**:4.

- CAI,Q.& STOREY, K.B. (1997). Upregulation of a novel gene by freezing exposure in the freeze-tolerant wood (*rana sylvatica*). *Gene* 198, 305-312.
- CATES, C.A., MICHAEL, R.L., STAYROOK, K.R., HARVEY, K.A., BURKE, Y.D., RANDALL, S.K., CROWELL, P.L., CROWELL, D.N. (1996). Prenylation of oncogenic human PTP(CAAX) protein tyrosine phosphatases. *Cancer Lett.* 110, 49–55.
- CHAPMAN, A.S. (2009). Integrated Modelling of the river-sediment-soil-groundwater system; advanced tools for the management of catchment areas and river basins in the context of global change EC FP6 Project no. 505428 (GOCE).
- CHURCHILL TA, STOREY KB. (1993). Dehydration tolerance in wood frogs: a new perspective on development of amphibian freeze tolerance. *Am J Physiol* 265:R1324–R1332.
- CHURCHILL, T.A. , STOREY, K.B. (1995). Metabolic effects of dehydration on an aquatic frog, *Rana pipiens*. *J. Exp. Biol.* 198, 147–154.
- CLAUSEN DL, COSTANZO JP. (1990). A simple model for estimating the ice content of freezing ectotherms. *J Therm Biol* 15:223–231.
- CLEMENTS C, RALPH S, PETRAS M. (1997). Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environ.Mol.Mutagen.* 29:277-288.
- COLLINS AR (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 26: 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>.
- COOKE MS, EVANS MD, DİZDAROĞLU M, LUNEC J. (2003). Oxidative DNA damage: Mechanism, mutation and disease. *FASEB J*, 17(10): 1195- 214.
- COSTANZO JP, LEE RE (1993). Cryoprotectant production capacity of the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *Can J Zool* 71:71–75.
- COSTANZO JP, LEE RE (2013) Avoidance and tolerance of freezing in ectothermic vertebrates. *J Exp Biol* 216:1961–1967.
- COSTANZO JP, LEE RE, WRIGHT MF. (1991). Effect of cooling rate on the survival of frozen wood frogs, *Rana sylvatica*. *J Comp Physiol B* 161: 225–229.
- COSTANZO JP, LEE RE. (2005). Cryoprotection by urea in a terrestrially hibernating frog. *J Exp Biol* 208:4079–4089.
- COSTANZO JP, REYNOLDS AM, DO AMARAL MCF, ROSENDALE AJ, LEE RE .(2015). Cryoprotectants and extreme freeze tolerance in a subarctic

population of the wood frog. *access scientific journal published by the Public Library of Science* 10:e0117234.

- COSTANZO P. J. AND LEE E. R., JR. (2013). COMMENTARY Avoidance and tolerance of freezing in ectothermic vertebrates., *The Journal of Experimental Biology* 216, 1961-1967 .
- COSTANZO, J. P. AND LEE, R. E., JR. (2008). Urea loading enhances freezing survival and postfreeze recovery in a terrestrially hibernating frog. *J. Exp. Biol.* 211, 2969- 2975.
- COSTANZO, J. P. AND LEE, R. E., JR. (2005). Cryoprotection by urea in a terrestrially hibernating frog. *J. Exp. Biol.* 208, 4079-4089.
- COSTANZO, J. P., DINKELACKER, S. A., IVERSON, J. B. AND LEE, R. E., JR (2004). Physiological ecology of overwintering in the hatchling painted turtle: multiple-scale variation in response to environmental stress. *Physiol. Biochem. Zool.* 77, 74-99.
- COSTANZO, J. P., LEE, R. E., JR AND LORTZ, P. H. (1993). Glucose concentration regulates freeze tolerance in the wood frog *Rana sylvatica*. *J. Exp. Biol.* 181, 245-255.
- COTELLA, S. AND FÉRARD, J.F. (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34, 246-255.
- CUCULESCU M, HYDE D, BOWLER K (1995). Temperature acclimation of marine crabs: changes in plasma membrane fluidity and lipid composition. *J Therm Biol* 20:207–222.
- D.R. JOANISSE, K.B. STOREY. (1996). Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog, *American Journal of Physiology*. 271 R545–R553.
- D.R. JOANISSE, K.B. STOREY. (1996) . Oxidative stress and antioxidants in overwintering larvae of cold-hardy goldenrod gall insects, *J. Exp. Biol.* 199 1483–1491.
- DHAWAN, A., BAJPAYEE, M. VE PARMAR, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology Toxicology*, 25:5–32.
- DIKILITAS, M., KOCYIGIT, A. VE YIGIT, F. (2009). A molecular-based fast method to determine the extent of DNA damages in higher plants and fungi. *African Journal of Biotechnology*, 8 (14): 3118-3127.
- DINCER, Y. ,KANKAYA, S.(2010). DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay.*Türkiye Klinikleri.* 30: 1365-73.

- DİAMOND, R.H., CRESSMAN, D.E., LAZ, T.M., ABRAMS, C.S., TAUB, R., (1994). PRL- 1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3752–3762.
- DÖNMEZ, F., TOSUNOĞLU, M., GÜL, Ç. (2009): Hematological values in hermaphrodite, *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758). *North-Western Journal of Zoology* 5(1): 97-103.
- DUELLMAN, W., TRUEB, L. (1994). *Biology of Amphibians*, pp. 1–670. Pages: i-xxi. Egan, S.E., Weinberg, R.A., 1993. *The pathway to signal achievement. Nature* 365 (6449), 781–783.
- EREL O. (2005) . A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38:1103–1111.
- EREL O. A.(2004). novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation *Clinical Biochemistry* Pages 277-285.
- ERİSMİS UC (2017). Age, Size, and Growth of the Turkish Endemic Frog *Pelophylax caralitanus* (Anura: Ranidae) *The Anatomical Record*<https://doi.org/10.1002/ar.23758>
- ERİSMİS UC, CİĞERCİ İH, 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 *Bull Environ Contam Toxicol.* 90:660–665
- ERİSMİS U. C. (2011) .Abundance, demography and population structure of *Pelophylax ridibundus* (Anura:Ranidae) in 26-August National Park (Turkey). *North–West J Zool* 1:5–16.
- ERİSMİS U.C. , KONUK M. , YOLDAS T., AGYAR P. , YUMUK D. , KORCAN E .(2014). Survey of Turkey’s endemic amphibians for chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* . *Dis Aquat Org* 111:153-157.
- ERİSMİS, U, CİGERCI İ.H, KONUK M. (2012). Comet Assay in Amphibian Biomonitoring 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03–07 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye.
- FAIRBAIRN DW, OLIVE PL, O'NEIL KL.(1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Res* 339:37-59.
- FARRANCE I. (1987). Plasma Glucose Methods, A Review. *Clinical Biochemist Reviews.*, 8: 55-68.
- FEIDANTISIS K. ,ANESTIS A. ,VASARA E., SKLAVOUNOU .,MICHAELIDIS B. (2012) . Seasonal variations of cellular stress response in the heart and gastrocnemius muscle of the water frog (*Pelophylax ridibundus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 162 , 331–339.

- FEIDANTISIS, K., ANESTIS, A., MICHAELIDIS, B. (2013). Seasonal variations of anti-/apoptotic and antioxidant proteins in the heart and gastrocnemius muscle of the water frog *Pelophylax ridibundus*. *Cryobiology*, 67: 175–183.
- FERRARÌ, R., CECONI, C., CURELLO, S., CARGNONI, A., PASINI, E. AND SIOLI, O. (1991). The occurrence of oxidative stress during reperfusion in experimental animals and men. *Cardiovasc Drugs Ther.* 5:277-87.
- FRENCH, A. R. (1988). The patterns of mammalian hibernation, *American Scientist*, 76, 569-575.
- GEISER, F. (1998). Evolution of daily torpor and hibernation in birds and mammals: importance of body size. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 25, 736-740.
- GEISER, F. (2004). Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. First published 2003. *Annu. Rev. Physiol*, 66, 239–74.
- GEISER, F. (1998). Evolution of daily torpor and hibernation in birds and mammals: importance of body size. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 25:736-740.
- GEISER, F., HIEBERT, S., KENAGY, G. J. (1989). Torpor Bout Duration during the Hibernation Season of Two Sciurid Rodents: Interrelations with Temperature and Metabolism. *Department of Zoology, University of Washington*, pp. 489-503.
- GEISER, F., N. GOODSHIP, C. PAVEY. (2002). Was basking important in the evolution of mammalian endothermy. *Physiological Zoology* 89:412-414.
- GEISER F AND RUF T. (1995). Hibernation versus daily torpor in mammals and birds: Physiological variables and classification of torpor patterns. *Physiological Zoology* 68: 935–966.
- GEISER F, RUF T (1995) Invited perspectives in physiological zoology hibernation versus daily torpor in mammals and birds: Physiological variables and classification of torpor patterns. *Physiol Zool* 68:935-966.
- GEISER F. (2010) Hibernation, Daily Torpor and Estivation in Mammals and Birds: Behavioral Aspects. In: Breed M.D. and Moore J., (eds.) *Encyclopedia of Animal Behavior*, volume 2, pp. 77-83 Oxford: Academic Press.
- GEISER F. (2004). Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol* 66:239–74.
- GICHNER, T., ZNIDAR, I., WAGNER, E.D. VE PLEWA, M.J. (2009). The use of higher plants in the comet assay. In: *The Comet Assay in Toxicology* Edited by Alok Dhawan and Diana Anderson. *Royal Society of Chemistry*, p: 98- 119.

- GLASS ML, FERNANDES MS, SONCINI R, GLASS H, WASSER JS. (1997). Effects of dry season dormancy on oxygen uptake, heart rate, and blood pressures in the toad, *Bufo paracnemis*. *J Exp Zool* 279:330–6.
- GONCALVES W. M. , GAMBALÉ G. P. , GODOY R. F., ALVES A. A., REZENDE A. DE H. P. , CRUZ DA D. A. , MACIEL M. N. , NOMURA F.B. P. R. , MARCO-JR2 DE P., DANIELA M. DE S. (2017). The agricultural impact of pesticides on *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Amphibia: Anura) ascertained by comet assay , *Zoologia* 34: e19865.
- GREEN, M. H. L., WAUGH, A. P. W., LOWE, J. E., HARCOURT, S. A., COLE, J., AND ARLETT, C. F. (1994). Effect of deoxyribonucleosides on the hypersensitivity of human peripheral blood lymphocytes to UV-B and UV-C irradiation. *Mutat. Res.* **315**, 25–32.
- GREENWAY, S.C., STOREY, K.B. (2000). Activation of mitogen-activated protein kinases during natural freezing and thawing in the wood frog. *Mol. Cell. Biochem.* 209, 29–37.
- GRENOT, C.J. ,GARCIN L. ,DAO J. ,HÉROLD J. ,FAHYS B. AND TSÉRÉ-PAGÈS H. (2000). How does the European common lizard, *Lacerta vivipara*, survive the cold of winter? *Comp. Biochem. Physiol.* 127A, 71-80.
- GRIFFITH, R. W. (1991). Guppies, toadfish, lungfish, coelacanths and frogs: a for the evolution of urea retention in fishes. *Environ. Biol. Fishes* 32, 199-218.
- GRIGG, G. C., BEARD, L. A., AUGEE, M. L. (1991). Echidnas in the high country. *Australian Natural History*, 23(7), 528-537.
- GÜR, H., KART GÜR M. (2010). Anatolian ground squirrels (*Spermophilus xanthoprimum*): hibernation and geographic variation of body size in a species of old world ground squirrels. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry* 38: 247–253.
- GÜR, H, KART GÜR M. (2012). Is spatial variation in food availability an explanation for a Bergmannian size pattern in a North American hibernating, burrowing mammal? An information-theoretic approach. *Journal Zoology* 287: 104– 114.
- GÜR, H. (2010). Why do Anatolian ground squirrels exhibit a Bergmannian size pattern? A phylogenetic comparative analysis of geographic variation in body size. *Biological Journal of the Linnean Society* 100: 695-710.
- H ARIKAN, K ÇİÇEK (2014). Morphology of peripheral blood cells from various species of Turkish Herpetofauna *Acta Herpetologica* 5(2): 179-198.
- HADAMOVA M, GVOZDIK L. (2011). Seasonal acclimation of preferred body temperatures improves the opportunity for thermoregulation in newts. *Physiol Biochem Zool* 84:166–74.

- HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Eds., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, 1-25.
- HARLOW, H., (1997). Winter body fat, food consumption and nonshivering thermogenesis of representative spontaneous and facultative hibernators: the white-tailed prairie dog and black-tailed prairie dog. *J. Therm. Biol.*, 22, 21-30.
- HASSETT RP, CROCKETT EL (2009) Habitat temperature is an important determinant of cholesterol contents in copepods. *J Exp Biol.* 212:71-77.
- HAZEL JR. (1988). Homeoviscous adaptation in animal cell membranes. In: Aloia RC, Curtin CC, Gordon LM (eds) *Advances in membrane fluidity—physiological regulation of membrane fluidity*. Liss, New York, pp 149-188.
- HELLMAN, B., VAGHEF, H. AND BOSTROM, B., (1995). The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.*, 336, 123-13.
- HELLMAN, L. FRIIS, H. VAGHEF, C. EDLING. (1999). Alkaline single cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a study on subjects with residential exposure to radon, *Mutat. Res.* 442) 121-132.
- HENDERSON L, WOLFREYS A, FEDYK J, BOURNER G, WINDEBANK S. (1998). The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* 13:89-94.
- HERMES-LIMA, M., STOREY, K. B. (1996). Relationship between anoxia exposure and antioxidant status in the frog *Rana pipiens*. *Am. J. Physiol.*, 271: R918-R925.
- HERMES-LIMA, M., STOREY, K.B. (1998). Role of antioxidant defences in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of the leopard frog *Rana pipiens* *Mol. Cell. Biochem.* 189, 79-89.
- HERMES-LIMA, M., ZENTENO-SAVIN, T. (2002) . Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol.* Pages 537-556.
- HERMES-LIMA, M., STOREY, J.M. AND STOREY, K.B. (1998). Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp Biochem Physiol B.* 120:437-448.
- HILLMAN, S. (1987). Dehydrational effects on cardiovascular and metabolic capacity in two amphibians. *Physiol. Zool.* 60, 608-613.
- HILLMAN, S.(1980). Physiological correlates of differential dehydration tolerance in anuran amphibians. *Copeia* 1980, pp: 125-129.

- HOCHACHKA, P. W. AND SOMERO, G. N. (2002). Biochemical Adaptation: Mechanism and Process 623 in in Physiological Evolution. Oxford: Oxford University Press. *Pharmacol.* 133, 537–556.
- HOCHACHKA, P.W., LUTZ, P.L. (2001). Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 130, 435–459.
- HOFFMAN, J., KATZ, U. (1997). Salt and water balance in the toad *Bufo viridis* during recovery from two different osmotically stressful conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* A117, 147–154.
- HONG, S. K. (1957). Effects of pituitrin and cold on water exchanges of frogs. *Am. J. Physiol.* 188, 439-442.
- HOROZ M., BOLUKBAS, C., BOLUKBAS, F., KOCYIGIT, A., ASLAN M., KOYLU A.O., GUMUS M., CELIK H., KOKSAL M. (2006). “Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection *Mutation*” *Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Volume 596, Issues 1-2, Pages 137-142.
- HUDSON, J. W. (1973). Torpidity in mammals, in Comparative Physiology of Thermoregulation. G. C. Whittow (edt.), Vol 3, *Academic Press, London*, 97-165.
- HUTCHISON, V.H., DUPRÈ, R.K. (1992). Thermoregulation. In: Feder, M.E., Burggren, W.W.(Eds.), *Environmental Physiology of the Amphibians*. pp. 206–249.
- HUTCHISON, V.H., STAR HAZARD III, E., (1984). Erythrocytic organic phosphates: diet and seasonal cycles in the frog, *Rana berlandieri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 79, 533– 538.
- JACKSON, D.C.(2000). Living without oxygen: lessons from the freshwater turtle. *Comp. Biochem. Physiol.* 125, 299–315.
- JIA JY, LAMER S, SCHUMANN M, SCHMIDT MR, KRAUSE E & HAUCKE V. (2006). Quantitative proteomics analysis of detergent-resistant membranes from chemical synapses: evidence for cholesterol as spatial organizer of synaptic vesicle cycling. *Mol Cell Proteomics* 5, 2060–2071.
- JIN S, ZHOU F, KATIRAI F & LI PL .(2011). Lipid raft redox signaling: molecular mechanisms in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 15, 1043–1083.
- K.B. STOREY, J.M. STOREY. (1996). Natural freezing survival in animals, *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 27., 365–386.

- K.B. STOREY, J.M. STOREY. (1999). Gene expression and cold hardiness in animals, in: R. Margesin, F. Schinner (Eds.), *Cold-adapted Organisms—Ecology, Physiology, Enzymology, and Molecular Biology*, Springer, Heidelberg, pp. 385–407.
- K.B. STOREY, J.M. STOREY. (2001). Signal Transduction and Gene Expression in the Regulation of Natural Freezing Survival . *Cell and Molecular Response to Stress*. Volume 2, Pages 1-19.
- K.B. STOREY. (1999) . Living in the cold: freeze-induced generesponses in freeze-tolerant vertebrates, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26 57–63.
- KART GÜR ,M., BULUT Ş., GÜR H. & REFİNETTİ, R. (2014). Body temperature patterns and use of torporin an alpine glirid species, woolly dormouse. *Act Theriol.(warz)*. 59,299-309.
- KART GÜR, M. & GÜR ,H.(2017).Küçük Bir Memeli Türünün Ekofizyolojisi ve Evrimsel Coğraf-yası: Anadolu Yer Sincabı :*Kebikec. Insa.Bilim.İcin Kaynak Araştırmali Derg.*70-74 .
- KATZ, U. (1992). Environmental challenge and the role of urea in amphibian osmoregulation. *Dtsch. Zool. Ges.* 85, 247-257.
- KAYSER C. 1940. Le quotient respiratoire chez quelques espe`ces poi`kilothermes. *Ann Physiol Physicochim Biol* 16:1–68.
- LAYNE JR. (1999). Freeze tolerance and cryoprotectant mobilization in the gray treefrog (*Hyla versicolor*). *J Exp Zool* 283: 221–225.
- LEFCORT H, MEGUIRE RA, WILSON LH, ETTINGER WF. (1998). Heavy metals alter the survival, growth methamorphosis and antipredatory behaviour of Columbia spotted frog *Rana luteiventris* tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 447–456.
- LEFER, D.J., GRANDER, N. (2000). Oxidative stress and cardiac disease. *Am. J. Med.* 109, 315–323.
- LEONTYEVA OA, SEMENOV DV, ESENIN AV. , (1997). Brown frogs as bioindicator of heavy metal contamination: preliminary results on the common frog *Rana temporaria* in Moscow Province. In: Pensoft Publishers ed. *Advance in Amphibian Research in the Former Soviet Union. Sofia* 2: 125–131.
- LIN, A., ZHANG , X., CHEN, M. AND CAO, Q. (2007). Oxidative stres and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Science*, 19: 596- 602.
- LIPTON, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79, 1431–1568.

- LINDSEY, C.C. 1966. Body sizes of poikilotherm vertebrates at different latitudes. *Evolution*, **20**: 456–465.
- LOWCOCK LA, SHARBEL TF, BONIN J, QUELLET M, RODRIGUE J, DESGRANGES JL (1997) Flow cytometric assay for in vivo genotoxic effects of pesticides in Green frogs (*Rana clamitans*). *Aquatic Toxicology* 38: 241–255. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00846-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00846-6).
- LUKIC NATASA , KOJIC DANIJELA , SUKALO GORAN , KUKAVICA BILJANA, . (2017). Seasonal Changes In Isoenzyme Pattern And The Activities Of Superoxide Dismutase And Catalase In The Liver Of Green Frogs *Pelophylax Esculenta* Complex As Part Of Tolerance To Freezing And Thawing., *Fresenius Environmental Bulletin*, , pages 1548-1553.
- LUTZ, P.L., NILSSON, G.E. (1997). Contrasting strategies for anoxic brain survival. Glycolysis up or down. *J. Exp. Biol.* 200, 411–419.
- LYMAN CP, WILLIS JS, MALAN A, AND WANG LCH. (1982). Hibernation and Torpor in Mammals and Birds. New York, NY: Academic Press.
- M. HERMES-LIMA, J.M. STOREY, K.B. STOREY.(2001). Chapter 20 Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. *Cell and Molecular Responses to Stress* Volume 2, Pages 263-287.
- M. HERMES-LIMA, K.B. STOREY. (1993) . Antioxidant defenses in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes, *American Journal of Physiology* 265 R646 R652.
- M. HERMES-LIMA, K.B. STOREY . (1993) . Antioxidant defenses in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes , *Am. J. Physiol.* 265 R646–R652.
- MACARTHUR, D. L. AND DANDY, J. W. T. (1982). Physiological aspects of overwintering in the boreal chorus frog (*Pseudacris triseriata maculata*). *Comp. Biochem. Physiol.* 72A, 137-141.
- MALAN A.(2014). The Evolution of Mammalian Hibernation: Lessons from Comparative Acid-Base Physiology. *Integrative and Comparative Biology*. volume 54, number 3, pp. 484–496.
- MASAKI, S. 1967. Geographic variation and climatic adaptation in a field cricket. *Evolution*, **21**: 725–741.
- MASELLI V, POLESE G, RIPPA D, LIGRONE R, RASTOGI RK ET AL. , (2010). Frogs, sentinels of DNA damage include by pollution in Naples and the neighbouring Provinces. *Ecotox. Environ. Saf.* 73:1525–1529.
- MCKELVEY-MARTIN VJ, GREEN MHL, SCHMEZER P, POOL-ZOBEL BL, DE MÉO M, COLLINS A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): *A European review. Mutation Research* 288:47-63.

- MCNAB BK. (2002). *The physiological ecology of vertebrates: a view from energetics*. Cornell, NY: Cornell University Press. Pages 774–775.
- MIGLIORE, RL. COLOGNATO, A. NACCARATI, E. BERGAMASCHI. (2006) . Relationship between genotoxicity in somatic and germ cells: findings from a biomonitoring study, *Mutagenesis* 21 149–152.
- MILLER, D. A., STANDISH, M. L. AND THURMAN, A. E. (1968). Effects of temperature on water and electrolyte balance in the frog. *Physiol. Zool.* 41, 500-506.
- MITCHELMORE CL, CHIPMAN JK. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat.Res.-Fundam.Mol.Mech.Mut.* 399:135-147.
- MOSESSO P, ANGELETTI D, PEPE G, PRETTI C, NASCETTI G ET AL.(2012). The use of cyprinodont fish, *Aphanius fasciatus*, as a sentinel organism to detect complex genotoxic mixtures in the coastal lagoon ecosystem. *Mutat. Res-Gen. Tox. Env.* 742: 31–36.
- MOUSSEAU, T.A. 1997. Ectotherms follow the converse to Bergmann's rule. *Evolution*, **51**: 630–632.
- MOUSSEAU, T.A. AND ROFF, D.A. (1989). Adaptation to seasonality in a cricket – patterns of phenotypic and genotypic variation in body size and diapause expression along a cline in season length. *Evolution*, **43**: 1483–1496.
- MROSOVSKY, N. (1976). Lipid programmes and life strategies in hibernators. *Amer. Zool.* , 16, 685-697.
- MUIR TJ, COSTANZO JP, LEE RE. (2008). Metabolic depression induced by urea in organs of the wood frog, *Rana sylvatica*: effects of season and temperature. *J Exp Zool* 309A:111–116.
- NEDERGAARD, J., CANNON, B. (1990). Mammalian hibernation, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B 326, 669-686.
- NIELSEN, K. H. AND JØRGENSEN, C. B. (1990). Salt and water balance during hibernation in anurans. In *Biology and Physiology of Amphibians* (ed. W. Hanke), pp. 333-349.
- NOWACKA A, DOUEZAN S, WADSO L, SPARR E. (2012). Small polar molecules like glycerol and urea can preserve the fluidity of lipid bilayers under dry conditions. *Soft Matter* 8:1482–1491.
- OLDHAM RS, LATHAM DM, HILTON-BROWN D, TOWNS M., COOKE AS et al. (1997). The effect of ammonium nitrate fertiliser on frog *Rana temporaria* survival. *Agr. Ecosyst. Environ.* 61: 69–74.

- ONUR, E., TUGRUL, B., BOZYIĞIT, F. (2009). DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Derg.* **7**: 61-70.
- OSTLING O., JOHANSON K.J. (1984). "Microelectrophoretic Study Of Radiation-Induced DNA Damage In Individual Mammalian Cells" *Biochemical And Biophysical Research Communications* , 123, 291–298.
- PARK, O. 1949. Application of the converse Bergmann principle to the carabid beetle, *Dicaeleus purpuratus*. *Physiol. Zool.*, **22**: 359–372.
- PÉREZ-IGLESIAS J.M. , SOLONESKİ S. , NİKOLOFF N. , NATALE G.S. , LARRAMENDY M.L.(2015). Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation PivotHs on montevideotreefrog *Hypsiboas pulchellus* tad-poles (Anura, Hylidae) *Ecotoxicology and Environmental Safety* 11 . 15–24.
- PETROV AM, KUDRYASHOVA KE, ODNOSHIVKINA YG & ZEFIROV AL . (2011). Cholesterol and lipid rats in the membrane of nerve terminal and membrane of synaptic vesicle. *Neurochem J* **5**, 13–19.
- PETROV M.A. , YAKOVLEVA A. A. AND ZEFIROV L. A.(2014). Role of membrane cholesterol in spontaneous exocytosis at frog neuromuscular synapses: reactive oxygen species–calcium interplay. , *The Journal of Physiology* , pp 4995–5009.
- PİNDER, A. W., STOREY, K. B. AND ULTSCH, G. R. , (1992). Estivation and hibernation. *In Environmental Physiology of the Amphibians* (ed. M. E. Feder and W. W. Burggren), pp. 250-274.
- PROKIĆA M. D. , BORKOVIĆ-MITIĆA S. S. KRİZMANIĆB I. I. , MUTIĆC J. J., GAVRIĆA J. P. , DESPOTOVIĆA S. G., GAVRILOVIĆA B. R., RADOVANOVIĆA T. B., PAVLOVIĆA S. Z., SAIĆIĆA Z. S. (2017). Oxidative stress parameters in two Pelophylax esculentus complex frogs during pre- and post-hibernation: Arousal vs heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 202 -19–25.
- RALPH S, PETRAS M, PANDRANGI P, VRZOC M. (1996). Alkaline single-cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environ.Mol.Mutagen.* 28:112-120.
- RALPH S, PETRAS M. (1997). Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (comet) assay. *Environ.Mol.Mutagen.* 29:418-430.
- RAY, C. (1960). The application of Begmann's rule and Allen's rule to the poikilotherms. *J. Morphol.*, **106**: 85–109.
- REINECKE SA, REINECKE AJ. (2004). The comet assay as a biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Arch. Environ.Contam. Toxicol.* 46: 208–215.

- REYNOLDS M. ALICE , JR. LEE E. RICHARD COSTANZO P JON. (2014) . Membrane adaptation in phospholipids and cholesterol in the widely distributed, freeze - tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. , *The Journal of Comparative Physiology* DOI 10.1007/s00360-014-0805-4.
- ROOTS, C. (2006). Hibernation, Greenwood Press, London, 219 p.
- ROSENDALE, A. J., COSTANZO, J. P. AND LEE, R. E., JR.. (2012). Seasonal variation and response to osmotic challenge in urea transporter expression in the dehydration and freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *J. Exp. Zool. A* 317, 401-409.
- ROSENSTEIN BS, CHAO CKC .(1985). Characterization of DNA repair in a mutant cell line derived from ICR 2A frog cells that are hypersensitive to non-dimer DNA damage induced by solar ultraviolet radiation. *Mutat Res* 146:191–196.
- SCHEER, B. T. AND MARKEL, R. P. (1962). The effect of osmotic stress and hypophysectomy on blood and urine urea levels in frogs. *Comp. Biochem. Physiol.* 7, 289-297.
- SCHILLER, T. M., COSTANZO, J. P. AND LEE, R. E. (2008). Urea production capacity in the wood frog (*Rana sylvatica*) varies with season and experimentally induced hyperuremia. *J. Exp. Zool. A* 309, 484-493
- SCHMID, W. D. (1982). Survival of frogs in low temperature. *Science* 215, 697-698.
- SCHMIDT-NIELSEN, B. AND FORSTER, R. P. (1954). The effect of dehydration and low temperature on renal function in the frog. *J. Cell Comp. Physiol.* 44, 233-246.
- SCHUYTEMA GS, NEBEKER AV, GRIFFIS WL, WILSON KL. (1991). Teratogenesis, toxicity, and bioconcentration in frogs exposed to dieldrin. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 332–350.
- SCHUYTEMA GS, NEBEKER AV, PETERSON JA, GRIFFIS WL. (1993). Effects of pentachlorophenol - contaminated food organisms on toxicity and bioaccumulation in the frog *Xenopus laevis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24: 359–364.
- SHPUN, S. , HOFFMAN, J. AND KATZ, U. (1992). Anuran Amphibia which are not acclimable to high salt, tolerate high plasma urea. *Comp. Biochem. Physiol. A* 103, 473-477.
- SINGH N.P., MCCOY M.T., TICE R.R., SCHNEIDER E.L. (1988). “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells” *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- SIMPSON, P.J. AND LUCCHESI, B.R. (1987). Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Lab Clin Med.* 110(1):13-30.

- SNYDER, G. K. AND WEATHERS, W. W. (1975). Temperature adaptations in amphibians. *Am. Nat.* 109, 93-101.
- SORENSEN PG. (1993). Changes of the composition of phospholipids, fatty acids and cholesterol from the erythrocyte plasma membrane from flounders (*Platichthys flesus* L.) which were acclimated to high and low temperatures in aquaria. *Comp Biochem Physiol B* 106:907–912.
- SOTA, T., TAKAMI, Y., KUBOTA, K., UJIE, M. AND ISHIKAWA, R. 2000. Interspecific body size differentiation in species assemblages of the carabid subgenus *Ohomopterus* in Japan. *Popul. Ecol.*, **42**: 279–291.
- SPAANS, E. J. A. AND BAKER, J. M. (1996). The soil freezing characteristic: its measurement and similarity to the soil moisture characteristic. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60, 13-19.
- STINNER JN, NEWLON DL, HEISLER N. (1994). Extracellular and intracellular carbon dioxide concentration as a function of temperature in the toad *Bufo marinus*. *J Exp Biol* 195:345–60.
- STOLYAR, O.B., LOUMBOURDIS, N.S., FALFUSHINSKA, H.I., ROMANCHUK, L.D. (2008). Comparison of metal bioavailability in frogs from urban and rural sites of Western Ukraine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 107–113.
- STOREY B.K. (2004). Strategies for exploration of freeze responsive gene expression: advances in vertebrate freeze tolerance. *Cryobiology* 48, 134–145.
- STOREY K. B, STOREY J.M. (2017). Molecular physiology of freeze tolerance in vertebrates. *Physiol Rev* 97:623–665.
- STOREY KB. (1987). Organ-specific metabolism during freezing and thawing in a freeze-tolerant frog. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 253: R292–R297.
- STOREY, K. B. (2004). Vertebrate freeze tolerance: role of freeze-responsive gene expression. In *Life in the Cold: Evolution, Mechanisms, Adaptation, and Application* (ed. B. M. Barnes and H. V. Carey), pp. 299-306. Fairbanks, AK: Institute of Arctic Biology, University of Alaska Fairbanks.
- STOREY, K. B. AND STOREY, J. M. (1988). Freeze tolerance in animals. *Physiol. Rev.* 68, 27-84.
- STOREY, K.B. AND STOREY, J.M. (1986). Freeze tolerant frogs: Cryoprotectants and tissue metabolism during freeze/thaw cycles. *Can J Zool.* 64, 49-56.
- STOREY, K.B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715–1733.

- STOREY, K.B., STOREY, J.M. (1990). Facultative metabolic rate depression: molecular regulation and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation, and estivation. *Quart. Rev. Biol.* 65, 145–174.
- STOREY, K.B., STOREY, J.M. (1992). Natural freeze tolerance in ectothermic vertebrates. *Ann. Rev. Physiol.* 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*, Pages 1-19.
- SVENDSEN C, SPURGEON DJ, HANKARD PK, WEEKS JM (2004) A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicol Environ Saf* 57:20–29.
- TALKE H, SCHUBERT GE.(1965). Enzymatic Urea Determination In The Blood And Serum In The Warburg Optical Test . *Klin Wochenschr.* Page: 1;43:174-5.
- TICE R.R., AGURELL, E., ANDERSON D., BURLINSON B., HARTMANN A., KOBAYASHI H. (2000) .Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–21.
- TICE RR, ANDREWS PW, HIRAI O, SINGH NP. (1991). The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 283: 157-164.
- TICE RR. (1995). The single cell gel /comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillipps DH, Venitt S editors. *Environmental Mutagenesis. Bios Scientific Publishers, Oxford*, pp 315-339.
- TICE, R. R., AGURELL, E., ANDERSON, D., ET AL. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221.
- TIFFANY T. O., JANSEN J. M., BURTIS C. A., OVERTON J. B. and SCOTT C. D. (1972) Enzymatic kinetic rate and endpoint analyses of substrate, by use of a GeMSAEC fast analyzer. *Clin Chem.* 18, 829-840.
- TRINDER P. (1996). Determination Of Glucose In Blood Using Glucose Oxidase With An Alternative Oxygen With On Alternative Oxygen Receptor *Ann. The Clinical Biochemist Reviews,* . 6,P.24-27.
- TWENTE JW, TWENTE JA. (1964). A hypothesis concerning the evolution ofheterothermy in bats. *Ann. Acad. Sci. Fenn. Series A Biol.;* 71: 435-42.

- VOGIATZIS, A., LOUMBOURDIS, N.S.(1997). Uptake, tissue distribution and depuration of cadmium (Cd) in the frog *Rana ridibunda*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 770–776.
- VOITREN Y., BARRE, H.,RAMLOV,H.& DOUADY, C.J. (2009). Freeze Tolarence Evolution among anurans: *Fequency and timing of appearance.cryobiology* 58,241-247.
- VOITURON, Y., JOLY, P., EUGENE, M., BARRE, H. (2005) . Freezing tolerance of the European water frogs: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol Regular Integr Comp Physiol*, 288: R1563-R1570
- VOITURON Y. ,SERVAIS S. ,ROMESTAING C. ,DOUKI T. ,BARRÉ H. (2006) . Oxidative DNA damage and antioxidant defenses in the European common lizard (*Lacerta vivipara*) in supercooled and frozen states., *Cryobiology* 52 74–82.
- VUCETIĆ, M., STANČIĆ, A., OTASEVIĆ, V., JANKOVIĆ, A., KORAC, A., MARKELIĆ, M., VELICKOVIĆ, K., GOLIC, I., BUZADŽIĆ, B., STOREY, K.B. AND KORAC B. (2013). The impact of cold acclimation and hibernation on antioxidant defenses in the ground squirrel (*Spermophilus citellus*): an update. *Free Radic Biol Med.* 65:916-924.
- WADE, O. (1930). The behaviour of certain spermophiles with special references to aestivation and hibernation. *J. Mamm.*, 11 (2), 160-188.
- WANG, L.C.H. (1978). Energetics and field aspects of mammalian torpor: The Richardson's ground squirrel, In *Strategies in cold*. Wang, L. C. H. and Hudson, J. W. (eds.), *Academic Press, New York*, pp, 109-145.
- WANG, M.Z., AND JIA, X.Y. (2009). Low levels of lead exposure induce oxidative damage and DNA damage in the testes of the frog *Rana nigromaculata*. *Ecotoxicology* 18, 94–99.
- WELLS, K.D., (2007). The Ecology and Behavior of Amphibians. *Hearing and Sound Communication in Amphibians*.pp 44-86 The University of Chicago Press, USA.
- WHITE, B.C., SULLIVAN, J.M., DEGRACIA, D.J. (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 179, 1–33.
- WILLIAMS GM, JEFFREY AM. (2000). Oxidative DNA damage: Endogenous and chemically induced. *Regul Toxicol Pharmacol*, 32 (3): 283-92.
- WILLMORE, W.G. AND STOREY, K.B. (1997). Antioxidant systems and anoxia tolerance in a freshwater turtle *Trachemys scripta elegans*. *Mol Cell Biochem.* 170(1-2):177-185.

- WOOD SC, MALVIN GM. (1991). Physiological significance of behavioral hypothermia in hypoxic toads (*Bufo marinus*). *J Exp Biol* 159:203–15.
- WOOD SC. 1991. Interactions between hypoxia and hypothermia. *Annu Rev Physiol* 53:71–85.
- XIAO Y. ,WU. YONGHUA ,SUN K. ,FENG J. (2016). Cell proliferation: a potential compensatory mechanism for tissue damage during hibernation , *Musculoskeletal Regeneration* . doi: 10.14800/mr.1307
- YANG L, ZHANG YM, LIU JH, HUANG DJ (2006) The role of reactive oxygen species in the herbicide acetochlor-induced DNA damage on *Bufo taddei* tadpole liver. *Aquat Toxicol* 78:21–26.
- YIN H.X. , LI N.S. ZHANG L. , ZHU N.G. , ZHUANG S.H. (2008). Evaluation of DNA damage in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) after in vivo exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the comet assay. *Springer Science*, 17:280–286.
- YUAN, L., J. CHEN, B. LIN, J. ZHUNG, AND S. ZHANG. 2007. Differential expression and functional constraint of PRL-2 in hibernating bat. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part b 148:375-381.
- ZENG, Q., HONG,W., TAN, Y.H., (1998). Mouse PRL-2 and PRL-3, two potentially prenylated protein tyrosine phosphatases homologous to PRL-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 421–427.
- ZHANG J. AND STOREY K. B.(2012). Cell cycle regulation in the freeze-tolerant *wool Zool.*, 16, 685-697.
- ZIMMERMAN SL. , FRISBIE J. , GOLDSTEIN DL. , WEST J, RIVERA K. , KRANE CM . (2007) . Excretion and conservation of glycerol, and expression of aquaporins and glyceroporins, during cold acclimation in Cope's gray tree frog *Hyla chrysoscelis*. *American Journal of Physiology*.- Reg I 292:R544–R555.
- ZWEIER, J.L. AND TALUKDER, M.A. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 70(2):181-190.

İnternet kaynakları

1. <http://www.bilgiler.gen.tr/kis-uykusu-hibernasyon.html> (08.08.2018, 02:22)
2. <http://www.pbs.org/wgbh/nova/nature/bear-essentials-of-hibernation.html>
(08.08.2018, 02:45)
3. <http://www.iucnredlist.org/> (11.08.2018, 15:30)

Kitap Kaynakları

1. Kalıtım ve Evrim, Ali Demirsoy, 5. Baskı, Bölüm 14, sy. 542-543.
2. Türkiye Amfibi ve Sürüngenleri, 3. Baskı, İbrahim Baran, Kuyruksuz Kurbağalar, sy. 30.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

- **İsim:** Selin GÜLEÇ
- **Doğum Yeri:** MANİSA
- **Doğum Tarihi:** 07.07.1992
- **Uyruğu:** T.C
- **Telefon numarası:** 05077128229
- **E-mail adresi:** selin.glc@gmail.com



ÖĞRENİM DURUMU

- 2006-2008: Mehmet Akif Ersoy Lisesi
- 2008-2010: Halit Görgülü Lisesi
- 2010-2015: Afyon Kocatepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
- 2014-2015: Afyon Kocatepe Üniversitesi, Biyoloji Pedagojik Formasyon
- 2015- Devam: Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Medikal Biyoloji ve Genetik Bölümü(YL)