

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAZI ANUR TÜRLERİNİN ERGİN VE LARVALARININ  
HİSTOKİMYA, İMMÜNOHİSTOKİMYA ÖZELLİKLERİ İLE  
KAN PARAMETRELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**SEVAY AYŞE ULUBELİ**

**DENİZLİ, OCAK - 2022**

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BIYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**BAZI ANUR TÜRLERİNİN ERGİN VE LARVALARININ**  
**HİSTOKİMYA, İMMÜNOHİSTOKİMYA ÖZELLİKLERİ İLE**  
**KAN PARAMETRELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**SEVAY AYŞE ULUBELİ**

**DENİZLİ, OCAK - 2022**

**Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinatörlüğü tarafından 2012FBE056 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.**

**Sevay Ayşe ULUBELİ**

## ÖZET

**BAZI ANUR TÜRLERİNİN ERGİN VE LARVALARININ  
HİSTOKİMYA, İMMÜNOHİSTOKİMYA ÖZELLİKLERİ İLE KAN  
PARAMETRELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI  
DOKTORA TEZİ  
SEVAY AYŞE ULUBELİ  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. YAKUP KASKA)**

**DENİZLİ, OCAK - 2022**

Bir asırdan fazla zamandır kurbağalar, birçok bilimsel araştırmaya konu olmuş ve birçok açıdan incelenmişlerdir. Bu tez çalışmasında Denizli il sınırları içerisindeki *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Hyla orientalis* ve *Pelophylax bedriagae* türleri bireylerinin derileri histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle incelenmiş, ayrıca çeşitli kan parametrelerinin analizleri gerçekleştirilmiştir.

Histokimyasal çalışmalarda, *Hyla orientalis* bireylerinin müköz bezleri dışındaki tüm müköz bezlerde asit mukopolisakkarit varlığı gösterilmiştir. Sülfatlı müsinler ise yalnızca *Bufo bufo*'nun seröz ve müköz, *Bufo viridis*'in sadece müköz, *Pelophylax bedriagae*'nin ise yalnızca seröz bezlerinde gözlenmiştir. Araştırmaya dahil olan türlerin hem müköz hem de seröz bezlerinde karbonhidratlı yapıların varlığı tespit edilmiştir. Mallory's trikrom pozitif reaksiyon ise yalnızca *Bufo viridis* ve *Hyla orientalis*'in seröz bezlerinde gözlenmiştir.

İmmünohistokimyasal çalışmada, *Hyla orientalis* ve *Pelophylax bedriagae* bireylerinin müköz bezleri serotonin immünonegatif, *Bufo bufo* ve *Bufo viridis*'in müköz bezleri ise immünopozitifdir. *Bufo bufo*, *Bufo viridis* ve *Hyla orientalis*'in seröz bezleri immünopozitif, *Pelophylax bedriagae*'in seröz bezleri ise immünonegatif olarak belirlenmiştir. *Bufo viridis* larvalarında epiderminin tamamında immünoreaktivite tespit edilmiş ve salgı bez taslakları/salgı sınıyumuvarı immünopozitif olarak belirlenmiştir. *Pelophylax bedriagae* larvalarında ise epiderminin kaplama hücreleri serotonin immünoreaktiftir. Bez taslaklarında immünopozitif reaksiyonun bazal bölgede yoğunlaştığı, salgı sınıyumuvarı ise serotonin immünonegatif reaksiyon gösterdiği ortaya koyulmuştur.

Kan parametreleri ile ilgili araştırmalarda istatistiki olarak anlamlı olarak nitelendirilebilecek yegane değer, *Bufo viridis* bireyleri arasındaki kalsiyum konsantrasyonu (cCa) ( $t=-2,30$ ,  $sd=20$ ,  $p=0,03$ ) değerlerinin cinsiyetler arasında gösterdiği fark olmuştur. *Bufo viridis* ve *Pelophylax bedriagae* türleri arasında yapılan karşılaştırmada, istatistiki açıdan anlamlı fark gözlenen parametreler ise pH, kısmi karbondioksit basıncı ( $pCO_2$ ), total hemoglobin konsantrasyonu (ctHb), bikarbonat konsantrasyonu ( $cHCO_3$ ) ve glikoz değerleri (cGlu) olarak tespit edilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Hyla orientalis*, *Pelophylax bedriagae*, histokimya, immünohistokimya, kan parametreleri

## ABSTRACT

### COMPARISON OF HISTOCHEMICAL, IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND BLOOD PARAMETERS OF ADULT AND TADPOLES OF SOME ANURAN SPECIES

PH.D THESIS

SEVAY AYŞE ULUBELİ

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. YAKUP KASKA)

DENİZLİ, JANUARY 2022

For over a century, frogs have been the subject of many scientific studies and have been studied from many perspectives. In this thesis, the skin of *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Hyla orientalis* and *Pelophylax bedriagae* species within the borders of Denizli province were examined by histochemical and immunohistochemical methods and also various blood parameters were analyzed.

Histochemical studies showed the presence of acid mucopolysaccharide in all mucous glands except the mucous glands of *Hyla orientalis* individuals. Sulfated mucins were observed only in the serous and mucous glands of *Bufo bufo*, only in the mucous glands of *Bufo viridis* and only in the serous glands of *Pelophylax bedriagae*. The presence of carbohydrate structures was detected in both mucous and serous glands of the species included in the study. Mallory's trichrome positive reaction was observed only in the serous glands of *Bufo viridis* and *Hyla orientalis*.

In the immunohistochemical study, the mucous glands of *Hyla orientalis* and *Pelophylax bedriagae* individuals were serotonin immunonegative, while the mucous glands of *Bufo bufo* and *Bufo viridis* were immunopositive. Serous glands of *Bufo bufo*, *Bufo viridis* and *Hyla orientalis* were immunopositive, while serous glands of *Pelophylax bedriagae* were immunonegative. Immunoreactivity was detected in the entire epidermis of *Bufo viridis* tadpoles and presecretory cells/secretory syncytiums were determined as immunopositive. In *Pelophylax bedriagae* tadpoles, the covering cells of the epidermis were serotonin immunoreactive. It has been revealed that the immunopositive reaction was concentrated in the basal region in the presecretory cells, while the syncytiums show a serotonin immunonegative reaction.

The only statistically significant value in studies on blood parameters was the difference between genders in calcium concentration (cCa) ( $t=-2.30$ ,  $df=20$ ,  $p=0.03$ ) values among *Bufo viridis* individuals. In the comparison between *Bufo viridis* and *Pelophylax bedriagae* species, the parameters with statistically significant differences were determined as pH, partial carbon dioxide pressure (pCO<sub>2</sub>), total hemoglobin concentration (ctHb), bicarbonate concentration (cHO<sub>3</sub>) and glucose values (cGlu).

**KEYWORDS:** *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Hyla orientalis*, *Pelophylax bedriagae*, histochemistry, immunohistochemistry, blood parameters

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	ix
SEMBOL LİSTESİ.....	x
ÖNSÖZ.....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Kuyruksuz Kurbağaların Deri Histolojisi ve Serotonin İmmünohistokimyası.....	1
1.2 Kuyruksuz Kurbağaların Kan Parametreleri.....	9
1.3 Tezin Amacı ve Önemi.....	16
<b>2. YÖNTEM.....</b>	<b>21</b>
2.1 Örneklerin Toplanması:.....	21
2.2 Laboratuvar Çalışması:.....	23
2.2.1 Histokimyasal Yöntemler.....	23
2.2.1.1 Harris Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi:.....	24
2.2.1.2 Alcian Blue pH 1 boyama yöntemi:.....	25
2.2.1.3 Alcian Blue pH 2,5 boyama yöntemi:.....	26
2.2.1.4 Masson's triple boyama tekniği:.....	27
2.2.1.5 PAS boyama tekniği:.....	29
2.2.2 İmmünohistokimyasal Yöntem.....	30
2.2.3 Kan Parametreleri.....	31
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>32</b>
3.1 Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Bulgular.....	32
3.1.1 Histokimyasal Bulgular.....	32
3.1.1.1 <i>Bufo bufo</i> .....	32
3.1.1.2 <i>Bufotes viridis</i> .....	36
3.1.1.3 <i>Hyla orientalis</i> .....	44
3.1.1.4 <i>Pelophylax bedriagae</i> .....	48
3.1.2 İmmünohistokimyasal Bulgular.....	55
3.1.2.1 <i>Bufo bufo</i> .....	55
3.1.2.2 <i>Bufotes viridis</i> .....	57
3.1.2.3 <i>Hyla orientalis</i> .....	60
3.1.2.4 <i>Pelophylax bedriagae</i> .....	61
3.2 Kan Parametreleri.....	63
3.2.1 <i>Bufo bufo</i> .....	64
3.2.2 <i>Bufotes viridis</i> .....	65
3.2.3 <i>Hyla orientalis</i> .....	67
3.2.4 <i>Pelophylax bedriagae</i> .....	68
3.2.5 <i>Pelophylax bedriagae</i> - <i>Bufotes viridis</i> .....	70
<b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>72</b>
4.1 Histokimya.....	72
4.2 İmmünohistokimya.....	76
4.3 Kan parametreleri.....	78

<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>80</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>89</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

- Şekil 2.1:** Taşıma kabında uygun ortama alınmış *Hyla orientalis* örnekleri .... 22
- Şekil 2.2:** Taşıma kabında uygun sucul ortama alınmış döllenmiş *Bufo* *viridis* yumurtaları ..... 22
- Şekil 3.1:** *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB I-II: Tip I ve II Seröz bezler, BL: Bazal lamina. H&E, Bar 50 µm, 10x. .... 33
- Şekil 3.2:** *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, BL: Bazal lamina, E-K: Eberth-Katschenko tabakası, SS: Stratum spongiosum, SK: Stratum kompaktum. AB pH 2,5-PAS, PAS pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x. .... 34
- Şekil 3.3:** *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, SC: Stratum korneum, SB II: Tip II Seröz bez, BL: Bazal lamina, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. AB pH 2,5-PAS, PAS pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x. .... 34
- Şekil 3.4:** *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB I: Tip I Seröz bez, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. AB pH 2,5, AB-pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x. .... 35
- Şekil 3.5:** *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB I: Tip I Seröz bez, BL: Bazal lamina, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. AB pH 1, AB-pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x. .... 35
- Şekil 3.6:** *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti. SC: Stratum korneum, MB: Müköz Bez, SB II: Tip II Seröz bez. MTK, Kollajen fibril (→), Bar 25 µm, 40x. .... 36
- Şekil 3.7:** *Bufo* *viridis* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, BL: Bazal lamina, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez, E-K: Eberth-Katschenko tabakası, KD: Kan Damarı. H&E, Bar 100 µm, 10x. .... 37
- Şekil 3.8:** *Bufo* *viridis* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez, SC: Stratum korneum, BL: Bazal lamina, E-K: Eberth-Katschenko tabakası, KD: Kan Damarı. AB pH 2,5-PAS, Bar 50 µm, 10x. .... 38
- Şekil 3.9:** *Bufo* *viridis* ergin deri enine kesiti. A: Müköz Bez, B: Seröz Bez. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez, BL: Bazal lamina, KD: Kan Damarı. AB pH 2,5-PAS, PAS pozitif reaksiyon (→), PAS pozitif miyoepitel (→), PAS pozitif seröz salgı (→), A: Bar 25 µm, 40x. B: Bar 25 µm, 40x. .... 38
- Şekil 3.10:** *Bufo* *viridis* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez. AB pH 2,5, AB-pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x. .... 39
- Şekil 3.11:** *Bufo* *viridis* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez. AB pH 1, AB-pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x. .... 40
- Şekil 3.12:** *Bufo* *viridis* ergin deri enine kesiti. MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez, BL: Bazal lamina, K: Kollajen. MTK, pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x. .... 40

<b>Şekil 3.13:</b> <i>Bufo viridis</i> Parotoid bez enine kesit. Ep: Epidermis, De: Dermis, MB: Müköz Bez, PK: Pigment Katmanı, PaB: Parotoid Bez, SG: Salgı Granülleri. H&E, 10x. ....	41
<b>Şekil 3.14:</b> <i>Bufo viridis</i> larva enine kesiti. BB: Bağırsak boşluğu, KC: Karaciğer taslağı, SH: Salgı hücresi. H&E, A:4x, B:10x, C:40x, D:100x. ....	42
<b>Şekil 3.15:</b> <i>Bufo viridis</i> larva enine kesiti. SH: Salgı hücresi. AB pH 2,5-PAS, A: 40x, B: 100x. ....	43
<b>Şekil 3.16:</b> <i>Bufo viridis</i> larva enine kesiti. SH: Salgı hücresi. AB pH 1, A: 40x, B: 100x. ....	43
<b>Şekil 3.17:</b> <i>Bufo viridis</i> larva enine kesiti. SH: Salgı hücresi, BL: Bazal lamina. MTK, A: 40x, B: 100x. ....	44
<b>Şekil 3.18:</b> <i>Hyla orientalis</i> ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB I-II: Tip I ve II Seröz bezler, BL: Bazal lamina, Mel: Melanofor, SC: Stratum korneum, SK: Stratum kompaktum. H&E, Bar 25 µm, 40x. ....	45
<b>Şekil 3.19:</b> <i>Hyla orientalis</i> ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB II: Tip II Seröz bez, Mel: Melanofor, Kr: Kromatoforlar. AB pH 2,5-PAS, PAS Pozitif reaksiyon (→), PAS pozitif miyofibriller (→), PAS pozitif seröz salgı (→), Bar A: 50 µm, 10x. B-C: 25 µm, 40x. ....	46
<b>Şekil 3.20:</b> <i>Hyla orientalis</i> ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB I-II: Tip I ve II Seröz bezler, Mel: Melanofor, SC: Stratum korneum, Kr: Kromatoforlar. AB pH 2,5, AB-pozitif reaksiyon (→), Bar A: 50 µm, 10x. B-C: 25 µm, 40x. ....	46
<b>Şekil 3.21:</b> <i>Hyla orientalis</i> ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB I-II: Tip I ve II Seröz bezler, Mel: Melanofor, Kr: Kromatoforlar. AB pH 1, Bar A-B-C: 25 µm, 40x. ....	47
<b>Şekil 3.22:</b> <i>Hyla orientalis</i> ergin deri enine kesiti. MB: Müköz Bez, SB I-II: Tip I ve II Seröz bezler. MTK, pozitif reaksiyon (→), 40x. ....	47
<b>Şekil 3.23:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, BL: Bazal lamina, SC: Stratum korneum, SS: Stratum spongiosum, SK: Stratum kompaktum, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. H&E, Bar 100 µm, 10x. ....	48
<b>Şekil 3.24:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, BL: Bazal lamina. H&E, Bar 25 µm, 40x. ....	49
<b>Şekil 3.25:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez, BL: Bazal lamina, SC: Stratum korneum, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. AB pH 2,5-PAS, PAS Pozitif reaksiyon (→), PAS pozitif miyoepitel (→), Bar 50 µm, 10x50	
<b>Şekil 3.26:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez, BL: Bazal lamina, SC: Stratum korneum, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. AB pH 2,5, AB-pozitif reaksiyon (→), A: Bar 50 µm, 10x, B: 40x. ....	50
<b>Şekil 3.27:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez. AB pH 1, Bar 50 µm, 10x. ....	51
<b>Şekil 3.28:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez. AB pH 1, Bar 50 µm, 10x. ....	51
<b>Şekil 3.29:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> ergin deri enine kesiti. MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez. MTK, pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x. ....	52

<b>Şekil 3.30:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> larva enine kesiti. BB: Bağırsak boşluğu, KC: Karaciğer taslağı, SH: Salgı Hücresi. H&E, A:4x, B:10x, C:40x, D:100x. ....	53
<b>Şekil 3.31:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> larva enine kesiti. SH: Salgı Hücresi. AB pH 2,5-PAS, A:40x, B:100x. ....	53
<b>Şekil 3.32:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> larva enine kesiti. SH: Salgı Hücresi. AB pH 1, A: 40x, B: 100x. ....	54
<b>Şekil 3.33:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> larva enine kesiti. SH: Salgı Hücresi. MTK, A: 40x, B: 100x. ....	54
<b>Şekil 3.34:</b> <i>Bufo bufo</i> ergin deri enine kesiti, SB I-II: Tip I ve II Seröz bezler, MB: Müköz bez. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Bez hücresi immünopozitif reaksiyon (→), Miyoepitel immünopozitif reaksiyon (→), A:10 x, B-C: 40 x. ....	55
<b>Şekil 3.35:</b> <i>Bufo bufo</i> ergin deri enine kesiti. Müköz bez. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Bez hücresi immünopozitif reaksiyon (→), Epidermis immünopozitif reaksiyon (→), 40x. ....	56
<b>Şekil 3.36:</b> <i>Bufo bufo</i> ergin deri epidermis enine kesiti. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği. Epidermis immünopozitif reaksiyon (→), 40x. ....	56
<b>Şekil 3.37:</b> <i>Bufo viridis</i> ergin deri enine kesiti. Müköz bez. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Bez hücresi immünopozitif reaksiyon (→), Epitel tabaka immünopozitif reaksiyon (→), 40x. ....	57
<b>Şekil 3.38:</b> <i>Bufo viridis</i> ergin deri enine kesiti. Seröz bez. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Salgı immünopozitif reaksiyon (→), Bez epiteli immünopozitif reaksiyon (→), 40x. ....	58
<b>Şekil 3.39:</b> <i>Bufo viridis</i> ergin deri enine kesiti. Seröz bez. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Salgı immünopozitif reaksiyon (→), Bez epiteli immünopozitif reaksiyon (→), Miyoepitel immünopozitif reaksiyon (→), 40x. ....	58
<b>Şekil 3.40:</b> <i>Bufo viridis</i> ergin deri enine kesiti. Müköz ve Seröz bez. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez. Salgı immünopozitif reaksiyon (→), Bez epiteli immünopozitif reaksiyon (→), Miyoepitel immünopozitif reaksiyon (→) 40 x. ....	59
<b>Şekil 3.41:</b> <i>Bufo viridis</i> larva deri enine kesiti. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Bez taslakları/salgı sinsityumlarında immünopozitif reaksiyon (→), A: 10x, B: 40 x. ....	60
<b>Şekil 3.42:</b> <i>Hyla orientalis</i> ergin deri enine kesiti. SB II: Tip II Seröz bez, MB: Müköz bez. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Pigment hücreleri immünopozitif reaksiyon (→), Salgı immünopozitif reaksiyon (→), Bez epiteli immünopozitif reaksiyon (→), Miyoepitel immünopozitif reaksiyon (→), A: 10 x, B-C: 40x. ....	61
<b>Şekil 3.43:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> ergin deri enine kesiti. MB:Müköz Bez, SB: Seröz Bez, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Salgı immünopozitif reaksiyon (→), A: 10x, B: 40x. ....	62
<b>Şekil 3.44:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> larva deri enine kesiti. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Dış (=kaplama) hücrelerin immünopozitif reaksiyonu (→), Bez taslağı immünopozitif reaksiyon (→), A: 10x, B: 40x. ....	63

<b>Şekil 3.45:</b> <i>Bufo viridis</i> kan hücreleri. Giemsa boyama (Er) Eritrosit, (T) Trombosit kümesi, (L) Lenfosit, (N) Nötrofil, (Mo) Monosit, (B) Bazofil, (Eo) Eozinofil, 40x. ....	64
<b>Şekil 3.46:</b> <i>Bufo viridis</i> pH, pCO <sub>2</sub> , pO <sub>2</sub> , cK, cNa, cCa, cCl, cLac ve cGlu - Cinsiyet grafikleri (p>0,05).....	66
<b>Şekil 3.47:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> A: Dişi, B: Erkek bireylerin pH, pCO <sub>2</sub> , pO <sub>2</sub> , cK, cNa, cCa, cCl, cGlu ve cLac-Kan değerleri grafikleri.....	70

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> Bazı türlerin eritrositleri üzerinde yapılan morfometrik çalışmalar (EU: Eritrosit hücre uzunluğu, EG: Eritrosit hücre genişliği, NU: Nükleus uzunluğu, NG: Nükleus genişliği, EA: Eritrosit alanı, NA: Nükleus alanı) .....	10
<b>Tablo 1.1 (devam):</b> Bazı türlerin eritrositleri üzerinde yapılan morfometrik çalışmalar (EU: Eritrosit hücre uzunluğu, EG: Eritrosit hücre genişliği, NU: Nükleus .....	11
uzunluğu, NG: Nükleus genişliği, EA: Eritrosit alanı, NA: Nükleus alanı) .....	11
<b>Tablo 1.1 (devam):</b> Bazı türlerin eritrositleri üzerinde yapılan morfometrik çalışmalar (EU: Eritrosit hücre uzunluğu, EG: Eritrosit hücre genişliği, NU: Nükleus .....	12
<b>Tablo 3.1:</b> ABL 800 radyometre kan parametreleri .....	63
<b>Tablo 3.2:</b> <i>Bufo bufo</i> kan numunelerinin ortalama ve standart sapma değerleri64	
<b>Tablo 3.3:</b> <i>Bufo viridis</i> kan değerlerinin cinsiyete göre tanımlayıcı istatistikleri ve student t testi değerleri (C: Cinsiyet, N: Örnek sayısı, E: Erkek, D: Dişi).....	65
<b>Tablo 3.4:</b> <i>Bufo viridis</i> bireylerinin Pearson korelasyon analizi sonuçları (Her değer için korelasyon katsayısı ve p değeri belirtilmiştir.).....	67
<b>Tablo 3.5:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> kan değerlerinin cinsiyete göre tanımlayıcı istatistikleri ve Mann Whitney U değerleri (C: Cinsiyet, N: Örnek sayısı, E: Erkek, D: Dişi).....	68
<b>Tablo 3.6:</b> <i>Pelophylax bedriagae</i> bireylerinin Pearson korelasyon analizi sonuçları (Her değer için korelasyon katsayısı ve p değeri belirtilmiştir.).....	69
<b>Tablo 3.7:</b> <i>Bufo viridis</i> ve <i>Pelophylax bedriagae</i> bireylerinin kan değerlerinin özet tanımlayıcı istatistikleri ve student t testi karşılaştırmaları (C: Cinsiyet, N: Örnek sayısı, Bv: <i>Bufo viridis</i> , Pb: <i>Pelophylax bedriagae</i> ). .....	71
<b>Tablo 4.1:</b> <i>Bufo bufo</i> , <i>Bufo viridis</i> , <i>Hyla orientalis</i> ve <i>Pelophylax bedriagae</i> bireylerinin müköz bezlerinde gözlenen histokimyasal reaksiyonlar72	
<b>Tablo 4.2:</b> <i>Bufo bufo</i> , <i>Bufo viridis</i> , <i>Hyla orientalis</i> ve <i>Pelophylax bedriagae</i> bireylerinin seröz bezlerinde gözlenen histokimyasal reaksiyonlar72	
<b>Tablo 4.3:</b> <i>Bufo bufo</i> , <i>Bufo viridis</i> , <i>Hyla orientalis</i> ve <i>Pelophylax bedriagae</i> bireylerinin deri bezlerinde gözlenen immünohistokimyasal reaksiyonlar .....	76

## SEMBOL LİSTESİ

<b>µm</b>	:	Mikrometre
<b>µm<sup>2</sup></b>	:	Mikrometrekare
<b>AB</b>	:	Alcian Blue (Alsiyan mavisi)
<b>B</b>	:	Bazofil
<b>BB</b>	:	Bağırsak boşluğu
<b>BL</b>	:	Bazal lamina
<b>Bv</b>	:	<i>Bufo viridis</i>
<b>C</b>	:	Cinsiyet
<b>cCa</b>	:	Calcium ion concentration (Kalsiyum konsantrasyonu)
<b>cCl</b>	:	Chloride ion concentration (Klor konsantrasyonu)
<b>cGlu</b>	:	D-glucose concentration (D-Glukoz konsantrasyonu)
<b>cHO<sub>3</sub></b>	:	Bikarbonat
<b>cK</b>	:	Potassium ion concentration (Potasyum konsantrasyonu)
<b>cLac</b>	:	L(+)-lactate concentration (L-Laktat konsantrasyonu)
<b>cm<sup>2</sup></b>	:	Santimetre kare
<b>cNa</b>	:	Sodium ion concentration (Sodyum konsantrasyonu)
<b>CO<sub>2</sub></b>	:	Karbondioksit
<b>Crist.</b>	:	Kristal
<b>ctHb</b>	:	Total hemoglobin concentration (Total hemoglobin konsantrasyonu)
<b>D</b>	:	Dişi
<b>DD</b>	:	Data deficient (Veri Yetersiz)
<b>De</b>	:	Dermis
<b>dk</b>	:	Dakika
<b>E</b>	:	Erkek
<b>EA</b>	:	Eritrosit hücre alanı
<b>EG</b>	:	Eritrosit hücre genişliği
<b>EU</b>	:	Eritrosit hücre uzunluğu
<b>E-K tabakası</b>	:	Eberth-Katschenko tabakası
<b>Eo</b>	:	Eozinofil
<b>EOO</b>	:	Extent of Occurrence (Bir türün ortaya çıkışının en dıştaki coğrafi sınırları içinde kalan alan)
<b>Ep</b>	:	Epidermis
<b>Er</b>	:	Eritrosit
<b>EU</b>	:	Eritrosit hücre uzunluğu
<b>FHHb</b>	:	Fractional carboxyhemoglobin concentration (Karboksihemoglobin/ total hemoglobin oranı)
<b>FMetHb</b>	:	Fraction of methemoglobin (Methemoglobin/total hemoglobin oranı)
<b>FO<sub>2</sub>Hb</b>	:	Fraction of oxyhemoglobin (Oksihemoglobin/total hemoglobin oranı)
<b>g/dl</b>	:	gram/desilitre
<b>GS</b>	:	Gosner Stage
<b>Hb</b>	:	Hemoglobin
<b>HCT</b>	:	Hematokrit
<b>H&amp;E</b>	:	Hematoksilen-Eozin
<b>IUCN</b>	:	Uluslararası Doğa Koruma Birliği

<b>K</b>	:	Kollajen
<b>KC</b>	:	Karaciğer taslağı
<b>KD</b>	:	Kan damarı
<b>Kr</b>	:	Kromatoforlar
<b>L</b>	:	Lenfosit Kümesi
<b>LC</b>	:	Least Concern (Asgari Endişe verici)
<b>m</b>	:	Metre
<b>M</b>	:	Molar
<b>Ort.</b>	:	Ortalama
<b>Min</b>	:	Minimum
<b>Max</b>	:	Maksimum
<b>Mo</b>	:	Monosit
<b>MB</b>	:	Müköz bez
<b>MCHb</b>	:	Ortalama hücre hemoglobini
<b>MCHbC</b>	:	Ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonu
<b>MCV</b>	:	Ortalama hücre hacmi
<b>mmHg</b>	:	Milimetre civa
<b>mmol/l</b>	:	Milimol/litre
<b>MTK</b>	:	Masson Trichrome
<b>N</b>	:	Nötrofil
<b>NA</b>	:	Nükleus alanı
<b>NG</b>	:	Nükleus genişliği
<b>NU</b>	:	Nükleus uzunluğu
<b>O<sub>2</sub></b>	:	Oksijen
<b>PAS</b>	:	Periodic acid-Schiff
<b>PaB</b>	:	Parotoid Bez
<b>Pb</b>	:	<i>Pelophylax bedriagae</i>
<b>pCO<sub>2</sub></b>	:	Partial pressure of carbon dioxide (Karbondioksitin kısmi basıncı)
<b>pH</b>	:	Power of hydrogen (Hidrojen iyon konsantrasyonu)
<b>pO<sub>2</sub></b>	:	Partial pressure of oxygen (Oksijenin kısmi basıncı)
<b>PK</b>	:	Pigment Katmanı
<b>SB</b>	:	Seröz Bez
<b>SC</b>	:	Stratum korneum
<b>sd (df)</b>	:	Serbestlik derecesi/degrees of freedom
<b>SE</b>	:	Standart Error (=Standart Hata)
<b>Sig</b>	:	Signifikasyon (=anlamlılık) derecesi
<b>SG</b>	:	Salgı Granülleri
<b>SH</b>	:	Salgı Hücresi
<b>SK</b>	:	Stratum kompaktum
<b>sO<sub>2</sub></b>	:	Oxygen saturation (Oksijen saturasyonu)
<b>SS</b>	:	Stratum spongiosum
<b>T</b>	:	Trombosit Kümesi
<b>t</b>	:	T-testi değeri
<b>Tr</b>	:	Tür
<b>W</b>	:	Mann Whitney U testi değeri

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada Denizli il sınırları içerisinde bulunan bazı anur türlerinin ergin ve larvalarının histokimyasal ve immünohistokimyasal özellikleri ile kan parametreleri karşılaştırılmıştır. Denizli il sınırları içerisinde bulunan *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Hyla orientalis* ve *Pelophylax bedriagae* türleri ilk defa bu derecede kapsamlı olarak çalışılmıştır. Histokimyasal ve immünohistokimyasal çalışmalara ek olarak kan parametrelerinin belirlenmesi çalışmaları, Türkiye’de ilk defa bu kadar geniş kapsamlı olarak yapılmıştır.

Doktora eğitimim boyunca sonsuz desteğini, eşsiz tecrübelerini, değerli bilgilerini ve kıymetli zamanını benden esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Yakup KASKA’ya,

Kıymetli katkılarının yanı sıra laboratuvar çalışmalarında da bana klavuzluk eden Tez İzleme Komitesi üyelerimden sayın hocam Prof. Dr. Eyup BAŞKALE’ye,

Histoloji ve immünohistokimya çalışmalarında engin bilgilerini, yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Tez İzleme Komitesi üyelerimden sayın hocam Doç. Dr. Nazan KESKİN’e,

Laboratuvar çalışmalarındaki desteklerinden ötürü Öğr. Gör. Doğan SÖZBİLEN’e,

Arazi çalışmalarım esnasındaki içten katkılarından dolayı sevgili eşim Volkan ULUBELİ’ye,

Doktora eğitimim boyunca bana verdiği maddi, manevi destek ve gösterdiği sınırsız anlayıştan ötürü sevgili annem Sevinç TUFAN’a,

Yanımda olamasa da her daim ilham kaynağım olan ve varlığını hep yanıbaşımda hissettiğim sevgili babam merhum Güray TUFAN’a,

Tezin gerçekleştirilebilmesi için maddi destek sağlayan Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne teşekkürlerimi sunarım.



# 1. GİRİŞ

## 1.1 Kuyruksuz Kurbağaların Deri Histolojisi ve Serotonin İmmünohistokimyası

Omurgalı derisi, vücudun iç ortamını dış çevreden ayıran ve koruyan yegane bariyerdir. Kurbağalar söz konusu olduğunda bu bariyer, canlı ile çevresi arasında su ve iyon transferi açısından ana rota, sahip olduğu zengin kapiller ağ sayesinde ise gaz alışverişi açısından önemli bir yüzeydir (Goniakowska-Witalińska ve Kubiczek 1998). İnce, geçirgen ve nemli olan kurbağa derisinin büyük kısmı alttaki kas tabakasına ancak dar şeritler halinde yapışıktır. Arada lenf ile dolu boşluklar bulunur. Bununla birlikte özellikle epidermiste bazen de dermiste bulunabilen deri bezleri tarafından üretilen salgılar (mukus, zehir, yağ vb.) gaz ve iyon alışverişinin sürekliliğini sağlar, kuraklığa karşı direnci artırır, avcılardan ve zararlı mikroorganizmalardan korunma temin eder.

Kurbağaların deri bezleri ve salgıları, özellikle de kuyruksuz kurbağalarınki çok sayıda biyolojik olarak aktif peptid ve biyojenik amin içermektedir (Erspamer 1971). Bu bileşikler, amfibilerin fizyolojik dengelerini düzenlemeleri, mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlara direnmeleri ve doğal yırtıcılar tarafından avlanmaktan kurtulmaları için büyük önem taşımaktadır (Erişmiş ve Korcan 2017). Söz konusu bileşikler yüksek omurgalıların endokrin sistemlerinde dağılan hormon veya nörotransmitterlerle ya aynı ya da çok benzerdir (Haslam ve diğ. 2014). Başlıca olarak beyinde ve gastrointestinal sistemde bulunan bu bileşiklerin aynı zamanda amfibi derisinde de bulunması ilginçtir (Pearse 1976). Erginlerdekine benzer şekilde, larval kurbağa derisi de oldukça ilginç bir organdır. Fiziksel ve mekanik koruma, solunum, iyon ve su değişimi gibi pek çok göreve sahiptir (Al-Adhami ve Qar 2005).

Yaşayan tüm amfibilerdeki kutanöz bezler dört ana tiptedir: müköz, seröz (granüler ya da zehir), yağ (veya balmumu) ve karışık (serömüköz) bezler (Duellman ve Trueb 1994, Brizzi ve diğ. 2002). Müköz bezler şeffaf, sulu ve viskoz bir salığa

sahiptir. Bu salgı canlının nem dengesini korumasında iş görmektedir (Porter 1972). Granüler bezler sütlü bir salgı üretirler. Bu salgı müköz salgıdan çok daha toksiktir. Mikrobiyal ve fungal patojenlere karşı etkili olmanın yanı sıra, avcılara karşı bir savunma ödevi de görür (Warburg ve diğ. 2000). Özellikle ağaç kurbağalarında gözlenen lipit bezleri, arboreal kurbağaların fizyolojik bir adaptasyonu gibi görülmektedir. Üreme dönemi dışında suda bulunmayan bu canlılar, lipit salgılarını vücut yüzeylerine yayarak su kaybını önlerler ve bu şekilde yarı kurak hatta kurak sezonlarda dahi hayatta kalabilirler (Warburg ve diğ. 2000). Bufonidler başlarının iki yanındaki post orbital bölgede kendilerine özgü bezlere sahiptirler. Sütlü, kremamsı bir salgyya sahip bu bezlere “parotoid bezler” adı verilir (Pough ve diğ. 2015). Zehirli olan salgıları, kurbağayı avcılardan ve parazitlerden korumakla görevlidir (Porter 1972).

Noble (1931) amfibi derisi üzerinde yaptığı çalışmalarda, tüm amfibilerin derilerinde en az iki tip bezin bulunduğunu (müköz, tip I seröz, tip II serözden en az ikisi), granüler bezlerin ise zehir bezleri ya da seröz bezler olarak adlandırıldığını bulmuştur. Bunlardan farklı olarak *Rana temporaria*, *R. pipiens* ve *R. catesbeiana*'daki gibi bakteriyel enfeksiyonlardan korunmayı sağlayabilen salgılara sahip serömüköz bezler de mevcuttur (Mills ve Prum 1984).

Seki ve diğ. (1995) *Rana cancrivora* (yengeç yiyen kurbağa) derisini histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak incelemiştir. Çalışma sonucunda deride üç farklı tipte bez tanımlanmıştır; müköz bez, karışık bez ve vakuollü bez. Müköz bezlerin asinar hücreleri pH 2,5'ta Alcian Blue (AB) ile yoğun, PAS (Periodic acid-Schiff) boyamayla ise zayıf bir şekilde boyanmaktadır. Karışık bezlerin asinözlerinde birkaç farklı tipte hücre tanımlanabilmektedir:

1) Asinöz ve kanal arasındaki geçiş bölgesi PAS ile boyanan bol sitoplazmalı hücreler;

2) Asinözün apikal bölgesindeki kübik ya da skuamöz hücreler;

3) Karminofilik granüllerle dolu hücreler;

4) PAS ve AB ile boyanan birçok büyük vakuol içeren hücreler.

Vakuollü hücrelerin asinözlerinde bulunan epitel hücrelerin nükleusları periferde yer alır ve geniş lümenleri vakuollerle doludur. Aynı çalışmada amfibi derisinin genellikle iki tip kutanöz beze sahip olduğu ortaya konmuştur; müköz bezler ve granüler bezler. Nispeten daha az sayıda, farklı türdeki bezler de rapor edilmiştir. Müköz bezler PAS yöntemi ile boyanan müköz tipte salgılar üretmektedir. Granüler bezler ise serotonin (5-hidroksitriptamin) ve amfibi deri peptidleri içeren pek çok granülle dolu bir lümene sahiptir. Bu peptidler memeli beyin-bağırsak peptidleri ile ortak aminoasit sekansları paylaşmaktadır.

Delfino ve diğ. (1998) *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae)'in seröz bezlerini mikroskobik ve ultramikroskobik olarak incelemişlerdir. Hem ergin hem juvenil hem de larval bireyler üzerinde yapılan mikroskobik araştırmalar sonucunda tip I ve tip II seröz bezler tanımlanmıştır. Tip I a'nın salgı ürünleri yoğun ve küçük granüllerden meydana gelirken, tip I b bezleri daha büyük granüllü ve yarısaydam salgılar üretmektedirler. Larval, juvenil ve ergin bireylerde bulunan seröz bezler arasındaki en göze çarpan fark, salgı ünitelerinin boyutları ve salgı kanallarının uzunluklarıdır. Araştırmada birey büyüdükçe, epidermisin olgunlaşmasını izler şekilde bezlerin de olgunlaştıkları gözlenmiştir. Larval ve juvenil örneklerin salgı materyalini içinde barındıran sinsityum kalınlıklarının ise erginlerdekinden fazla olduğu ortaya konmuştur.

Goniakowska-Witalińska ve Kubiczek (1998) *Hyla arborea arborea* L. üzerinde yaptıkları çalışmada dorsal derinin pürüzsüz ve kesitin tamamında neredeyse aynı kalınlıkta olduğunu göstermiştir. Deri çok tabakalı epitelden ve belirgin şekilde kalın bir dermis tabakasından meydana gelmiştir. Dorsal derinin hemen altında pigment hücreleri görülebilmektedir. Ventral bölgenin enine kesitleri ise tümsek ve oluklara sahiptir. Buna bağlı olarak derinin kalınlığı değişkenlik göstermektedir. Deri katmanlarının dizilişi dorsal deridekiyle aynıdır. Goniakowska-Witalińska ve Kubiczek'e göre ağaç kurbağası derisinde üç tip bez mevcuttur: müköz, tip I seröz ve tip II seröz. Müköz bezlerin salgıları Passini yöntemi kullanılan kesitlerde homojen bir şekilde boyanmaktadır. Müköz bezlerin boyutları seröz bezlerden küçüktür. Tip I ve tip II seröz bezler hem dorsal hem de ventral deride bulunmaktadır. Tip I bezlerin salgı granülleri küçüktür. Tip II bezler ağaç kurbağasındaki en büyük bezlerdir ve salgı granülleri iridir. Seröz bezler müköz

bezler kadar belirgin bir lümeneye sahip değildir. Ağaç kurbağalarında lipit bezlerinin bulunduğunu varsayan hipotez ise kanıtlanamamıştır.

Delfino ve diğ. (2001) *Physalaemus biligonigerus* (Anura, Leptodactylidae) iribaşlarının seröz kutanöz bezleri üzerine yaptıkları araştırmada, erken evredeki deri bezleri taslaklarının bazal epitel boyunca uzandıklarını ortaya koymuşlardır. Bez tomurcuğunun merkezinde bulunan yuvarlak hücrelerin muhtemel adenositler olduğunu göstermişlerdir. *Physalaemus biligonigerus* larvalarında gelişim devam ettikçe muhtemel adenositler konkav ve konveks miyoblastlar tarafından sarılmaktadır. Taslağın üst kısmında oluşan kap şeklindeki yapı ise bezin muhtemel boyun bölgesini oluşturmaktadır. İlerleyen evrelerde bez tomurcuğu aşağıya yani dermise doğru büyümekte ve anurlarda görülen iki esas bez sırası gözlenmeye başlamaktadır.

Terenni ve diğ. (2003) *Scinax nasica* (Anura, Hylidae) larva ve juvenilleri üzerinde gerçekleştirdikleri araştırmada seröz (zehir) bezlerinin gelişimlerini ince yapı düzeyinde incelemişlerdir. Gosner Stage (GS) 39-46 arasında değişen aşamalarda Discoglossidae, Leptodactylidae, Pelobatidae ve Pipidae familyalarını temsil eden üyeler ile karşılaştırmalar yapılarak değerlendirilen çalışmada, *S. nasica* bireylerinde genellikle anur iribaşlarında gözlenen aksine seröz bez farklılaşmasının müköz bezlerden daha erken bir safhada gerçekleştiği ortaya konmuştur. Gelişmiş iribaşlarda keratinogenez mukogenezin yerini alana kadar geçen süre boyunca, göreceli olarak geciken müköz bez aktivitesi ise mukus üretimine de katkıda bulunan süperfisyal epidermis tabakası tarafından dengelenmektedir.

Azvedo ve diğ. (2005) *Bufo ictericus* derisindeki Eberth-Katschenko tabakasının yapısal görünüşü hakkında yürüttükleri çalışmanın histokimyasal ayağında, kuvvetli alsianofilik, bazofilik ve metakromatik özellik gösteren tabakanın dağınık şeklinde gözlendiğini belirtmişlerdir. Temel olarak kalsiyum tuzları ile bağlantılı glikozaminoglikanlardan meydana gelen E-K tabakası hücresel bir yapıya sahip değildir ve devamlılık göstermemektedir. Ancak kalsiyumun derideki fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Stratum spongiosum ve stratum kompaktum arasında yer alan tabakanın desikasyon engelleyici, kalsiyum

depolanması ve mobilizasyonu ile ilişkili ya da canlının iç ve dış ortamları arasındaki maddelerin yer değiştirmesini engelleyen bir bariyer olduğu görüşleri mevcuttur.

Mebs ve diğ. (2005) *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae) bireylerinin zehirli deri salgıları üzerinde yaptıkları çalışmada, Dendrobatidae ailesine mensup pek çok neotropikal kurbağada görüldüğü gibi benzersiz özellikler gösteren, kuvvetli ve yüksek derecede seçici fizyolojik özelliklere sahip pek çok alkaloidin varlığından bahsetmişlerdir. Söz konusu alkaloidlerin epidermal tabakada sıkıca paketlenmiş şekilde gözlenen bol miktarda granüler bez içerisinde bulunduğu ve belki de söz konusu bezler tarafından üretilerek salgılandığı tespit edilmiştir.

Arifulova ve diğ. (2007) *Ceratophrys ornata* bireylerini geç gelişim aşamalarındaki larvaları (GS 38-46) üzerinde yaptıkları araştırmada ilk seröz bez taslaklarını incelemişlerdir. GS 38'de gözlenen seröz bez taslaklarını, belirgin sekretuar özellikleri taşımalarına rağmen yetersiz olarak nitelendirilebilecek mini salgı bezleri olarak tanımlamışlardır. Bu aşamada seröz bez taslakları, küresel hücre kümeleri şeklinde gözlenmeleri ve ilerleyen aşamalarda epidermisten ayrılarak dermise doğru göç etmeleri sayesinde müköz bezlerden ayrılabilirler. Metamorfozun tamamlandığı GS 46'da seröz bezler karakteristik özelliklerini kazanarak sıkıca paketlenmiş salgı veziküllerini üretmeye başlarlar.

Almeida ve diğ. (2007) *Bufo ictericus*'un parotoid beziyle yaptıkları çalışmada parotoid bez bölgesinin, dermis tarafından desteklenen epidermis tabakası tarafından sarıldığını göstermişlerdir. Epidermin hemen altında bulunan dermis, oldukça gevşek bir yapıya sahiptir ve bir pigment katmanı subepidermik bölgeyi süngerimsi dermisten ayırmaktadır. Parotoid bez bölgesi kendi içinde üç ekzokrin bez tipine sahiptir; karışık bezler, küçük granüler bezler ve büyük granüler bezler. Karışık bezler süngerimsi epitelde bulunurlar. Tek başlarına ya da büyük granüler bezlerin boşaltım kanalları etrafında gruplar halinde gözlenebilirler. Küçük granüler bezler retiküler dermisen en dışına yerleşmişlerdir. Büyük granüler bezlerin alveolleri ise makroskobik olarak bile gözlenebilirler.

Rigolo ve diğ. (2008) *Trachycephalus aff. venulosus* Laurenti, 1768 (Anura, Hylidae)'in deri bezlerini histokimyasal olarak incelemişlerdir. Epidermis, keratinize bir üst tabakaya sahip skuamöz çok katlı epitelden meydana gelmiştir. Dermis ise iki

kısımdan oluşmaktadır; üstte gevşek bağ dokulu süngerimsi dermis ve altta kollajen ve elastik fibrillere sahip kompakt dermis. Tüm kutanöz bezler süngerimsi dermiste yer alırlar. Granüler bezlerin boyutları müköz bezlerden büyüktür. Bu durum bütün anurlar için geçerlidir. Her iki türdeki bezin, salgı ünitesini saran miyoepitel hücreler gözlenmektedir. Miyoepitel hücreler sekresyon için gereklidirler. Salgının biriktiği sinsityumu kasılmak suretiyle sıkıştırarak, salgı içeriğinin salgı kanalı vasıtasıyla dışarı çıkmasında iş görürler.

Jared ve diğ. (2009) *Rhinella jimi* (Anura: Bufonidae)'nin parotoid bezleri üzerinde yaptıkları çalışmada, kurbağanın dorsal ve ventral bölgelerinden aldıkları deri örneklerini incelemişlerdir. Dorsal deri epidermisi yaklaşık 6 hücre kalınlığındadır ve düzensiz bir yüzeye sahiptir. Dermis ise müköz ve granüler bezlerin bulunduğu stratum spongiosum ve kalın kollajen fibrillere sahip stratum kompaktum'dan meydana gelmiştir. Müköz bezler epidermisen hemen altında dizilmişlerdir. Salgı epiteli PAS ve Alcian Blue pozitifdir. Ancak Bromofenol Blue ile reaksiyon vermemektedir. Daha büyük yapıdaki granüler bezler ise Bromofenol Blue pozitifken PAS ve Alcian Blue negatifdir. Ventral deri, dorsal deri ile karşılaştırıldığında oldukça incedir ve daha az sayıda salgı bezine sahiptir. Dorsal derinin aksine müköz bezler ağırlıktadır. Parotoid bezlerde yapılan analizler ise dorsal derinin kalınlaşmış olan bu bölgesindeki epidermisen hemen altında bulunan müköz ve granüler bezlere ilave olarak, stratum kompaktum'a kadar uzanan şişe şeklinde ve çok büyük boyutlu sinsityal bezlerin varlığını ortaya çıkarmıştır. Bu bezlerin kanalları dermis ve epidermisi kat ederek dışarı açılmaktadır ve yalnızca parotoidde bulunan farklılaşmış pek çok bez tarafından sarılmışlardır. Farklılaşmış bezler hem müköz hem de granüler bezlerden açık bir şekilde farklıdır. Müköz bezlere benzer şekilde PAS ve Alcian Blue pozitif olmasına rağmen bu bezlerin boyutları müköz bezlere göre oldukça (3-4 kat) büyüktür.

Delfino ve diğ. (2010) *Phyllobates bicolor* (Anura: Dendrobatidae) larva, juvenil ve erginlerinin seröz kutanöz bezleri üzerinde çalışmışlardır. 25. evredeki larvaların epidermisi iki tabakalıdır; iç (bazal) ve dış (kaplama) hücreler. Dermis ise 6-8 µm kalınlığındadır ve yoğundur. 38. evredeki örneklerde seröz bezlerin tomurcukları gözlenebilmektedir. 43. evredeki bireylerde muhtemel seröz bezler olgunlaşmaya başlamıştır. Miyoepitel teşekkül etmiş, bezlerin dışa açılan kanalları

epidermisi kat ederek dışarı açılmıştır. Oluşmaya başlayan salgı ürünü veziküller halinde ve opaktır. Ergin bireylerde ise kutanöz bezler sıkıca paketlenmiştir ve genellikle geniş yüzey bölgeleri boyunca biri diğerine yapışık halde bulunmaktadır. Seröz bezler, müköz ünitelerle birbirlerini izler şekilde sıralanmışlardır. Böylece her bezin kendi salgısı, diğerine karışmadan yüzeye çıkabilmektedir.

Kurbağaların deri yapıları ve bezleri ile ilgili yapılan çalışmaların bazılarında, ergin kurbağaların deri bezlerinde serotonin bulunduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir. Bu konu hakkında yapılan en kapsamlı çalışma İnceli ve diğ. tarafından 2004 yılında gerçekleştirilmiştir. *Rana ridibunda* üyeleri üzerinde yapılan çalışmada, deride gözlenen mukus bezlerinin morfolojik açıdan iki farklı tipte olduklarını tespit etmişlerdir. Söz konusu çalışmaya göre, birinci tipteki mukus bezleri küçüktür ve salgı bölümleri kısa kübik hücreler içermektedir. Lümenlerinde herhangi bir salgı ürünü gözlenmemiştir. Bazı hücrelerin sitoplazmaları ise PAS pozitif reaksiyon göstermiştir. İkinci tip mukus bezleri ise daha büyüktür. Salgı bölümündeki hücreler kübikten silindiriğe doğru değişmektedir. Lümeninde gözlenen salgı maddesi fibrillerdir ve PAS pozitifdir. Sekresyon ürünü Hematoksilin-Eozin ya da Masson's triple boyası ile boyanmamaktadır. Zehir bezleri ise mukus bezlerinden çok daha büyüktür. Salgı epiteli sinsityaldır ve miyoepitel hücreler gözlenmektedir. Yapılan çalışmada belirlenen salgı hücrelerinin lümenleri eliptiktir ve dairesel salgı granüllerine sahiptir. Bu granüller Hematoksilin-Eozin ya da Masson's triple boyası ile kırmızımsı turuncu bir renge boyanmaktadır ve PAS negatiftirler.

İnceli ve diğ. (2004) tarafından Streptavidin-Biyotin yöntemiyle immünohistokimyasal olarak boyanan kesitlerde ise epidermis ve dermisi oluşturan bağ doku serotonin immünoreaktif değildir. Birinci ve ikinci tipteki mukus bezlerinin salgı bölümlerindeki bazı hücreler ise serotonin immünoreaktiftir. İkinci tip mukus bezlerinin lümen maddeleri serotonin immünoreaktifken, birinci tiptekiler değildir. Çok az miktarda salgı içeren zehir bezleri serotonin immünoreaktif gibi görünmemektedir. Ancak salgı biriktirmeye başlayanlar veya lümeninde salgı bulunan hücreler serotonin immünoreaktiftir. Benzer şekilde az miktarda salgı içeren bezlerin miyoepitel hücreleri serotonin immünoreaktif değilken, lümeninde bol miktarda salgı bulunan bezlerin miyoepitel hücreleri de kısmen serotonin immünoreaktif özellik göstermektedir.

Kurbağa larvalarında ise döllenenmeden itibaren serotonin varlığı saptanmıştır. Fukumoto ve diğ. (2005) erken evredeki *Xenopus* embriyoları üzerinde yapıları çalışmada döllenmeyi takip eden bölünme evreleri boyunca serotoninin bulunduğu hücreleri tespit etmişlerdir. Segmentasyondan önce hemen hemen tüm yumurtaya yayılmış olan serotoninin, 64 blastomerli evreye gelindiğinde azaldığını ve spesifik blastomerlerde toplanıyor gibi görüldüğünü ortaya koymuşlardır.

Olea ve diğ. (2019) *Rhinella bergi* (Anura: Bufonidae)'nin deri ve parotoid bezlerinin farklılaşması üzerine yaptıkları histolojik ve immünohistokimyasal çalışmada premetamorfik, postmetamorfik, juvenil ve ergin bireyleri ayrıntılı bir şekilde değerlendirmişlerdir. Histolojik örnekler genel yapının tanımlanması için H&E, glikokonjugatlar (glikanlar) için PAS-Hematoksilen, primer karboksilli asidik glikozaminoglikanlar için Alcian blue pH 2,5 ve hematoksilen, proteinler için Coomassie mavisi, yağlar için Oil-red ve sinir lifleri için Bielschowsky gümüş empregnasyonu yöntemiyle muamele edilmişlerdir. GS 31-41 arasında stereomikroskop altında incelenen örneklerin kutanöz yüzeylerinde katman olarak herhangi bir protuberans (=kabartı) gözlenmemiştir. Parotoid bez ise postorbital bölgede yer alan bir protrusyon (=çıkıntı) şeklindedir. Işık mikroskobu çalışmalarının GS 31-35 erken evrelerinde epidermis, oldukça kalın bazal membrana sahip, piramit şeklinde, çok tabakalı epitel hücrelerinden meydana gelmiştir. Ancak müköz bezlerin gözlenmesi GS 35-41 evrelerine kadar mümkün olmamaktadır. Salgı varlığı göstermeyen bu bezler, aynı merkez çevresinde devamlı olarak sıralanmış kübik hücreler şeklindedir. Tek sıralı miyoepitel hücre katmanı tarafından sarılmış, periferal nükleusa sahip sinsityal salgı epiteli içerisinde gözlenen 2-3 salgı granülü ile ayırt edilebilen granüler bezlerin ortaya çıkışı ise GS 42-46 arasında gerçekleşmektedir. Juvenil bireylerde epidermis çok katmanlı bir tabaka haline gelmektedir. Müköz bezler küçük boyutlu ve tüm deri tabakaları boyunca yayılmış vaziyettedir. Granüler bezler az sayıda olup sinsityumlarında depoladıkları eozinofilik granüller sayesinde ayırt edilebilmektedir. Bu evrede hem müköz hem de seröz bezler deri yüzeyine açılan salgı kanallarına sahiptir. GS 43-44 itibarıyla vücudun her iki yanında, postorbital bölgedeki deride yapısal bir yenilenme süreci meydana gelmektedir. Granüler bezlerin birikerek büyümesi sonucunda erişkin bireylerin karakteristik parotoid bezleri ortaya çıkmaktadır. Ergin bireylerde epidermis 3-5 tabakadan meydana gelmektedir. Dış kısmında bulunan keratinize



yapıdaki stratum korneumu çok tabakalı stratum spinosum takip etmektedir. En içte ise stratum germinatum ve bazal membran yer almaktadır. Bununla birlikte, serotonin hormonunun larval ve ergin *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Hyla orientalis* ve *Pelophylax bedriagae* türlerinin derilerinde salgılandığı bölgeler ve bu bölgelerde bulunan serotonin immünoreaktif bezler hakkında tam bir bilgi bulunmamaktadır.

## 1.2 Kuyruksuz Kurbağaların Kan Parametreleri

Kurbağalar, dolaşımında gözlemlenen kan hücre sayıları ve boyutları açısından omurgalıların en heterojen gruplarından birisidir. Bununla birlikte amfibilerin kan hücre sayıları geniş bir bireysel çeşitlilik ve türler arasında dikkate değer farklılıklara sahiptir (Hutchison ve Szarski 1965, Szarski ve Czopek 1966, Rouf 1969, Sinha 1983, Atatür ve diğ. 1999, Cabagna ve diğ. 2005). Kan fizyolojisi başlığı altında özelleşen hematolojik, morfolojik, serolojik ve biyokimyasal çalışmalar özellikle çevresel etkilerin belirlenmesi açısından büyük bir önem arz etmektedir. Tıpkı diğer omurgalılarda olduğu gibi kan fizyolojisi çalışmaları, amfibi popülasyonlarının fizyolojik, patolojik, ekolojik ve sağlık durumu hakkında bilgi edinebilmek için indikatör olarak kullanılabilir (Cabagna ve diğ. 2005, Davis ve Durso 2009, Mahapatra ve diğ. 2012, Young ve diğ. 2012, Hota ve diğ. 2013, Das ve Mahapatra 2014). Bifazik bir yaşam döngüsüne sahip olmaları dolayısıyla amfibiler ani sıcaklık değişimleri, nem değişimleri, habitat ve sulak alan koşulları, çeşitli kirleticiler vb. çevresel değişimler açısından çok daha kırılgandırlar (Cabagna ve diğ. 2005, Mahapatra ve diğ. 2012). Bununla birlikte amfibiler potansiyel olarak takip edilebilir ve güvenilir biyoindikatörlerdir (Welsh ve Ollivier 1998, Mahapatra ve diğ. 2012). Bu sebeple kan parametreleri hakkındaki herhangi bir bilgi ya da referans değer hem amfibiler hem de çevre açısından oldukça değerlidir.

Kan parametreleri üzerinde yapılan çalışmaların pek çoğu hematolojik ya da serolojik çalışmalardır. Genellikle kan hücrelerinin şekillerini, sayılarını ve boyutlarını ya da kan serumunun kimyasal yapısını inceleyen bu araştırmalarda, diğer kan parametreleri yalnızca kısmi olarak incelenmiştir. Bazı anur türlerinin eritrositleri üzerinde yapılan morfolojik çalışmalar Tablo 1.1’de listelenmiştir.

**Tablo 1.1:** Bazı türlerin eritrositleri üzerinde yapılan morfometrik çalışmalar (EU: Eritrosit hücre uzunluğu, EG: Eritrosit hücre genişliği, NU: Nükleus uzunluğu, NG: Nükleus genişliği, EA: Eritrosit alanı, NA: Nükleus alanı)

Tür	EU ( $\mu\text{m}$ )	EG ( $\mu\text{m}$ )	NU ( $\mu\text{m}$ )	NG ( $\mu\text{m}$ )	EU/EG	NU/NG	EA ( $\mu\text{m}^2$ )	NA ( $\mu\text{m}^2$ )	Yazarlar
<b>SUCUL VE YARISUCUL</b>									
<i>Pelophylax bedriagae</i>	23,14±0,22	13,10±0,09	8,51±0,11	5,01±0,01	1,61±0,03	1,58±0,03	265,63±2,53	38,34±0,74	Arıkan ve Çiçek, 2010
	20,98±0,20	13,39±0,06	8,61±0,06	5,44±0,02	1,57±0,02	1,58±0,01	220,63±2,42	36,77±0,29	Arıkan ve Çiçek, 2011
<i>Pelophylax caralitanus</i>	24,36±0,23	14,46±0,11	8,13±0,13	5,03±0,03	1,69±0,01	1,61±0,02	276,72±3,86	32,15±0,62	Atatür ve diğ, 1999
<i>Rana holtzi</i>	19,10±0,12	12,80±0,06	7,84±0,04	4,13±0,04	1,64±0,10	1,93±0,02	192,81±1,83	25,46±0,27	Arıkan ve diğ, 2001
<i>Rana macrocnemis</i>	20,55±0,12	13,46±0,05	8,66±0,06	4,14±0,04	1,54±0,01	2,14±0,03	217,68±1,76	28,03±0,28	Arıkan ve diğ, 2001
	22,66±0,05	14,22±0,03	10,08±0,03	5,91±0,02	1,46±0,02	1,73±0,01	278,23±0,90	36,76±0,21	Arserim ve Mermer, 2008
<i>Rana camerani</i>	19,81±0,08	12,78±0,03	8,45±0,06	3,94±0,03	1,55±0,01	2,18±0,02	198,85±1,11	26,09±0,20	Arıkan ve diğ, 2001
<i>Rana dalmatina</i>	19,99±0,24	12,11±0,11	8,78±0,09	5,59±0,02	1,65±0,02	1,57±0,02	190,47±3,53	38,48±0,42	Arıkan ve Çiçek, 2010

**Tablo 1.1 (devam):** Bazı türlerin eritrositleri üzerinde yapılan morfometrik çalışmalar (EU: Eritrosit hücre uzunluğu, EG: Eritrosit hücre genişliği, NU: Nükleus uzunluğu, NG: Nükleus genişliği, EA: Eritrosit alanı, NA: Nükleus alanı)

Tür	EU (µm)	EG (µm)	NU (µm)	NG (µm)	EU/EG	NU/NG	EA (µm <sup>2</sup> )	NA (µm <sup>2</sup> )	Yazarlar
<i>Bombina</i>	21,80±0,12	15,05±0,08	9,59±0,16	4,88±0,06	1,45±0,02	1,98±0,04	258,14±2,36	36,66±0,82	Atatür ve diğ, 1999
<i>bombina</i>	22,08±0,80	14,74±0,70	10,77±1,00	7,11±0,60	1,49±0,06	-	255,82±19,80	-	Wojtaszek ve Adamowicz, 2003
	24,98±0,21	15,77±0,09	11,91±0,07	7,48±0,02	1,59±0,01	-	310,95±4,030	69,95±0,47	Arıkan ve diğ, 2010
<b>KARASAL</b>									
<i>Bufo bufo</i>	20,85±0,10	13,45±0,07	7,81±0,10	4,34±0,10	1,55±0,01	1,86±0,05	221,22±1,90	26,60±0,63	Atatür ve diğ, 1999
<i>Bufo</i>	17,86±0,07	12,71±0,04	6,25±0,13	3,72±0,04	1,38±0,01	1,96±0,05	179,18±0,96	18,13±0,56	Atatür ve diğ, 1999
<i>viridis</i>	18,31±0,12	13,92±0,11	7,60±0,10	5,42±0,04	1,32±0,01	1,42±0,02	200,16±2,52	32,03±0,60	Ulubeli ve diğ, 2020
<i>Pelobates syriacus</i>	17,56±0,08	11,70±0,07	6,63±0,09	3,47±0,04	1,50±0,01	1,96±0,05	161,85±1,31	18,13±0,56	Atatür ve diğ, 1999
<i>Pelodytes caucasicus</i>	15,29±0,18	9,68±0,09	6,21±0,07	3,81±0,05	1,58±0,01	1,63±0,02	116,42±2,07	18,71±0,31	Arıkan ve diğ, 2003

**Tablo 1.1 (devam):** Bazı türlerin eritrositleri üzerinde yapılan morfolometrik çalışmalar (EU: Eritrosit hücre uzunluğu, EG: Eritrosit hücre genişliği, NU: Nükleus uzunluğu, NG: Nükleus genişliği, EA: Eritrosit alanı, NA: Nükleus alanı)

Tür	EU ( $\mu\text{m}$ )	EG ( $\mu\text{m}$ )	NU ( $\mu\text{m}$ )	NG ( $\mu\text{m}$ )	EU/EG	NU/NG	EA ( $\mu\text{m}^2$ )	NA ( $\mu\text{m}^2$ )	Yazarlar
<i>Odontophrynus americanus</i>	21,59±0,65	14,97±0,54	7,76±0,46	4,51±0,34	-	-	253,99±14,25	27,37±2,22	Grenat ve diğ, 2009
<i>Odontophrynus cordobae</i>	18,52±0,52	12,78±0,31	6,29±0,37	3,68±0,24	-	-	186,03±4,64	18,14±1,23	Grenat ve diğ, 2009
<b>ARBOREAL</b>									
<i>Hyla arborea</i>	19,80±0,10	12,89±0,06	7,94±0,10	3,50±0,08	1,54±0,01	2,35±0,07	200,33±1,66	21,88±0,61	Atatür ve diğ, 1999
<i>Hyla savignyi</i>	18,63±0,18	12,41±0,08	7,09±0,09	3,97±0,08	1,50±0,02	1,82±0,04	181,44±1,98	22,30±0,55	Arıkan ve Çiçek, 2010
<i>Polypedates maculatus</i>	M=18,64±2,27 F=18,43±3,43	12,86±1,18 11,36±1,18	7,71±1,04 7,50±1,22	5,14±0,80 5,57±1,13	-	-	243,15±37,84 210,59±38,28	41,85±9,64 43,13±2,82	Mahapatra ve diğ, 2012
<i>Hypsiboas cordobae</i>	22,54±0,99	14,94±0,62	9,54±0,41	5,33±0,42	1,51±0,07	1,79±0,10	265,40±19,00	40,86±5,60	Baraquet ve diğ, 2013
<i>Microhyla ornata</i>	M=22,11±2,16 F=21,96±2,11	13,18±2,20 13,93±2,22	12,27±1,16 12,42±1,63	6,81±1,62 7,72±1,78	1,73±0,34 1,62±0,32	1,86±0,32 1,66±0,31	254,39±40,82 238,29±29,75	65,96±18,13 76,43±23,51	Hota ve diğ, 2013
<i>Polypedates traiensis</i>	M=16,87±1,30 F=19,77±1,53	8,95±0,12 8,62±0,34	6,15±0,26 7,5±1,73	5,0±0,08 5,5±0,90	1,88±0,16 2,29±0,18	1,22±0,04 1,35±0,15	117,77±9,20 153,01±35,11	23,98±1,27 33,0±12,80	Das ve Mahapatra, 2014

Leftwich ve Burke (1964), Ranid kurbağaların kanlarındaki oksijen kapasitesi hakkında yaptıkları araştırmada 50 *Rana pipiens*, 43 *Rana clamitans* ve 52 *Rana catesbeiana* bireyi üzerinde çalışmışlardır. *Rana pipiens* ile *Rana clamitans* üyeleri arasındaki oksijen kapasitesi arasındaki farkı hacimsel olarak %4,3, *Rana pipiens* ile *Rana catesbeiana* üyeleri arasındaki farkı ise %3,4 olarak hesaplamışlardır. Ortalama değerler arasındaki farkın standart hatanın 3 katından fazla olması sebebiyle, söz konusu farkları istatistiksel açıdan belirgin derecede anlamlı olarak tanımlamışlardır. *Rana clamitans* ve *Rana catesbeiana* arasında ise bahsi geçen hacimsel fark %0,9 olmakla birlikte, benzer değerlendirme sonucunda bu iki tür arasındaki oksijen kapasitesi farkının da istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Emilio (1974) *Rana ridibunda* bireylerinin kan gazı konsantrasyonları üzerine yaptığı çalışmada, “normal soluk alma” ve “dalış” esnasındaki oksijen ve karbondioksit seviyelerini araştırmıştır. Normal soluk alma esnasındaki pO<sub>2</sub> ve pCO<sub>2</sub> seviyeleri sırasıyla 65-90 mmHg ve 6-9 mmHg iken yaklaşık 10 dakikalık dalış sonrasında söz konusu seviyeleri 10-20 mmHg ve 14-20 mmHg olarak göstermiştir. Çalışmanın ilk bölümündeki deneylerde, akciğerlerin karbondioksit boşaltımında çok küçük bir rol oynadığının ve asıl boşaltımın deri vasıtasıyla gerçekleştiğinin ortaya çıkması sebebiyle, pCO<sub>2</sub> seviyesinde bir şekilde meydana gelen artışın sürpriz olduğunu belirtmiştir. Buna ek olarak dalış esnasında oksijen alımının minimum seviyede olması ve oksijen rezervinin olağan aerobik metabolizma seviyesini 5 dakikadan fazla sabit tutamayacağını işaret etmiştir. Böylece uzun süreli dalışlarda (20-30 dk) her ne kadar deri solunumu ile oksijen alımı gerçekleşse de karbondioksit üretimi ve depolanmasının azalması gerektiğini öngörmüştür.

Atatür ve diğ. (1999), Wright boyası ile boyanmış yayma kan preparatlarından yararlanarak Türkiye’de yaşayan bazı kuyuksuz kurbağaların (*Rana ridibunda*, *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Pelobates syriacus*, *Bombina bombina*, *Hyla arborea*) eritrosit büyüklüklerini tespit etmişlerdir. En büyük eritrositler *Rana ridibunda*’da, en geniş eritrositler *Bombina bombina*’da ve en küçük eritrositler ise *Pelobates syriacus*’ta bulunmuştur (Tablo 1.1).

Arıkan ve diğ. (2001) amfibilerde eritrosit büyüklükleri ve sayılarının türler arasında önemli derecede farklılıklar gösterdiğini belirttikleri çalışmada, Anadolu dağ kurbağalarında eritrosit hücre ve nükleus büyüklüklerini saptayarak nükleus ve

hücre büyüklüğü arasındaki ilişkiyi ortaya koymayı amaçlamışlardır. Elde ettikleri verilere göre en büyük eritrositler 1630 metre rakımdan toplanan *Rana macrocnemis* üyelerinde gözlenmiştir. En küçük eritrositler 2460 metreden alınan *Rana holtzi* örneklerinde tespit edilirken, 2215 metreden örneklenen *Rana camerani* üyelerinin eritrositleri büyüklük açısından 2. sıradadır. Sonuç olarak söz konusu çalışmada yükseklik arttıkça eritrosit büyüklüğünün azaldığı yönünde bir görüş öne sürülmüştür (Tablo 1.1).

*Pelodytes caucasicus* (Kafkas kurbağası)'un 10 erkek ve 10 dişi bireyi üzerinde gerçekleştirilen çalışmada ise Arıkan ve diğ. (2003), cinsiyetler arasında kan hücre sayıları ve boyutları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmezken, eritrosit büyüklüklerinin Türkiye'de görülen diğer anur türlerine göre boyut olarak küçük ancak sayı olarak yüksek miktarda olduğunu bildirmişlerdir (Tablo 1.1).

Wojtasnek ve Adamovic (2003), *Bombina bombina* bireylerinin kan parametreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, ortalama eritrosit hücre alanlarını  $255,82 \pm 19,8 \mu\text{m}^2$  olarak hesaplamışlardır. Aynı genusa ait *B. orientalis* üyelerinin ortalama eritrosit yüzey alanından 1,07 kat büyük ve *B. variegata* üyelerinin ortalama eritrosit yüzey alanından 1,2 kat küçük olan söz konusu hücrelerin, 3 tür arasındaki en az eliptik yapıya sahip eritrositler olduğunu belirlemişlerdir (Tablo 1.1).

Tosunoğlu ve Arıkan (2007) *Pelodytes caucasicus* ve *Pelobates syriacus* populasyonlarına ait örneklerin kan serum proteinlerini poliakrilamid disk elektroforezi ve densitometri yöntemleri ile kalitatif ve kantitatif açıdan karşılaştırmışlardır. Her iki türün populasyonlarında kan-serum proteinlerinin hem kalitatif hem de kantitatif olarak farklılıklar gösterdiğini saptamışlardır. Bu sonuç *Pelodytes* genusunun ayrı bir familya (Pelodytidae) olarak değerlendirilmesi gereğine dikkat çeken morfolojik ve osteolojik çalışmaları destekler durumdadır.

Arserim ve Mermer (2008) Uludağ kurbağası, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885'in hematolojisi üzerinde çalışmışlardır. Çalışmada, ergin *Rana macrocnemis* örneğinde periferik kan hücrelerinin (eritrosit, lökosit, trombosit) morfolojisindeki mevsimsel değişimleri histolojik yöntemler kullanarak incelemiş ve istatistiksel açıdan karşılaştırmışlardır. Hazırlanan kan preparatlarını Wright's boyası ile

muamele ederek değerlendirmiş ve ortalama eritrosit sayısı ile ilgili parametreler açısından (Hb: hemoglobin, HCT: hematokrit, MCV: ortalama hücre hacmi, MCHb: ortalama hücre hemoglobini, MCHbC: ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonu) mevsimsel değişikliklerin var olduğunu saptamışlardır. Buna ek olarak hücre büyüklükleri açısından gözlenen küçük mevsimsel farklılıkların ise bireysel varyasyonlar olduğu sonucuna varmışlardır.

Davis (2008) tarafından *Ambystoma talpoideum* (Köstebek semenderi) larvalarının eritrosit morfolojilerinin ontogenetik değişimleri üzerine yapılan çalışmada semender boyutları ile eritrosit hücre genişliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiden bahsedilmiştir. Nitekim artan semender boyutuyla birlikte eritrosit hücrelerinin küçüldüğüne dair herhangi bir kanıt rastlanamamıştır. Ancak, vücut büyüklüğü ile hücre uzunluğu ve genişliğinin standart sapmaları arasında negatif bir ilişkinin varlığından ve vücut büyüklüğü arttıkça hücrelerin uzunluklarının azalarak ve genişliklerinin artarak daha yuvarlak bir form aldıklarından söz edilmiştir.

Grenat ve diğ. (2009), ergin ve larval *Odontophyrnus americanus* bireyleri arasındaki eritrosit varyasyonları hakkında yaptıkları çalışmada, juvenil bireylerin eritrosit hücre ve nükleus büyüklüklerinin ergin bireylere oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede küçük olduğu sonucuna ulaşmışlardır (Tablo 1.1). *Odontophyrnus* genusunun farklı ploidi seviyelerinde 2 kriptik türe sahip olduğu belirtilen çalışmaya göre, *O. americanus*  $4n = 44$  kromozoma sahipken *O. cordobae*  $2n = 22$  kromozomludur. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda, özellikle hücre büyüklüğü kullanılarak yapılan ploidi çalışmaları için önemli bir nokta olarak, larval tetraploid bireylerin eritrosit hücre büyüklüklerinin benzerlik göstermelerine karşın, nükleuslarının diploid bireylere oranla anlamlı derecede büyük olduğunu ortaya koymuşlardır.

Arıkan ve Çiçek (2010), Türkiye herpetofaunasının çeşitli türlerinin periferik kan hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, 12 anur türünü (*Pelophylax bedriagae*, *Pelophylax caralitanus*, *Rana dalmatina*, *Rana holtzi*, *Rana macrocnemis*, *Bufo bufo*, *Pseudepidalea variabilis*, *Pelobates syriacus*, *Pelodytes caucasicus*, *Bombina bombina*, *Hyla arborea*, *Hyla savignyi*) araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda

anurların eritrositlerinin urodellerden daha küçük olduğu ve anurlar arasında en büyük eritrosite sahip türün, sucul *Pelophylax caralitanus* olduğu hesaplanmıştır.

Gül ve diğ. (2011), bazı anurların kan kompozisyonlarındaki (kırmızı ve beyaz kan hücre sayımları, hemoglobin konsantrasyonu, hematokrit değeri, ortalama hücre hacmi, ortalama hücre hemoglobini, ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonu ve total plazma proteini) değişimleri araştırmışlardır. *Pseudepidalea viridis*, *Pelobates syriacus*, *Hyla arborea*, *Rana dalmatina* ve *Pelophylax ridibundus* türleri üzerinde yapılan çalışmanın örnekleri Çanakkale'nin değişik bölgelerinden toplanmıştır. Cinsiyetler arası farklar göz önüne alındığında *P. viridis* bireyleri arasındaki hemoglobin, hematokrit ve ortalama hücre hacmi değerleri istatistiki açıdan anlamlı derecede farklıdır. Karasal ve sucul türlerde kırmızı kan hücreleri sayıca fazlayken yarı sucul türlerde daha azdır. Hemoglobin konsantrasyonu, hematokrit değerleri, ortalama hücre hacmi ve ortalama hücre hemoglobini ise karasal türlerde daha yüksek bulunmuştur.

Mahapatra ve diğ. (2012), Hint ağaç kurbağası *Polypedates maculatus* Gray, 1833 (Anura: Rhacophoridae)'un hematolojisi üzerine çalışmışlardır. Dişi ve erkek bireylerin ayrı olarak değerlendirildiği çalışmada kan hücrelerinin boyutları (eritrosit, lenfosit, monosit, eozinofil, bazofil ve nötrofil), bazı kan parametreleri (hemoglobin konsantrasyonu, hematokrit değeri, kan hücrelerinin hacmi, kan hücrelerinin konsantrasyonu) ile karşılaştırılmıştır. Ancak, çalışmada istatistiki açıdan anlamlı bir fark elde edilememiştir.

Bununla birlikte *Bufo bufo*, *Bufotes viridis*, *Hyla orientalis* ve *Pelophylax bedriagae* türlerinin kan parametreleri hakkında herhangi ayrıntılı bir bilgi bulunmamaktadır.

### **1.3 Tezin Amacı ve Önemi**

Bu çalışma kapsamında Türkiye'de bulunan 6 aileye dahil 16 anur türünden Denizli il sınırları içerisinde bulunan 4'ü *Bufo bufo* (=Siğilli Kurbağa), *Bufotes viridis* (=Gece Kurbağası), *Hyla orientalis* (=Ağaç Kurbağası) ve *Pelophylax bedriagae* (=Levanten Kurbağası) ele alınmıştır.



*Bufo bufo*, Avrupa'da ve Kuzey Avrasya'da, Türkiye dahil olmak üzere Batı Asya'nın bir kısmında yaygındır (Agasyan ve diğ. 2009). İğne yapraklı, karışık ve yaprak döken ormanlarda, korularda, çalılıklarda, çayırlarda, kurak alanlarda, park ve bahçelerde yaygın bulunan ve adapte olabilen bir türdür (Agasyan ve diğ. 2009). Genellikle geniş açık alanlardan kaçınan *Bufo bufo* üyeleri, ekseriyetle yoğun bitki örtüsüne sahip nemli alanlarda gözlenir. Gözlenebilen rakım aralığı deniz seviyesinden 3.000 m'ye kadar değişmektedir (Agasyan ve diğ. 2009). Geniş dağılımı, geniş bir habitat yelpazesine toleransı, varsayılan büyük nüfusu ve tehdit altındaki bir kategoride listelenmeye hak kazanacak kadar hızlı bir şekilde azalması henüz muhtemel olmadığı için IUCN Kırmızı Listesi'nde En Az Endişe verici (LC) olarak listelenmiştir (Agasyan ve diğ. 2009).

*Bufo viridis*, Trakya bölgesi dışında tüm Türkiye'de yaygın olarak görülen karasal bir anur türüdür. Çayır ve bozkır habitatlarında, ormanlarda, çalılık alanlarda, çeşitli sulak alanlarda ve su kütlelerinin yakınlarında bulunabilir (Avcı ve diğ. 2015). Gözlenebilen rakım aralığı deniz seviyesinden 4600 m'ye kadar değişmektedir. Hatta Himalayalar'da da bazı popülasyonlar rapor edilmiştir (Budak ve Göçmen 2008). *B. viridis* taksonomisi ile ilgili devam eden sorunlar ve eksiklikler göz önünde bulundurulduğunda, buna ilaveten Extent of Occurrence bilgileri (EOO=bir türün ortaya çıkışının en dıştaki coğrafi sınırları içinde kalan alan), durumu ve ekolojik gereksinimleri hakkında son bilgilerin bulunmaması nedeniyle IUCN Kırmızı Listesi'nde Veri Yetersiz (DD) olarak listelenmiştir (Avcı ve diğ. 2015).

*Hyla orientalis* batıda Polonya'dan, doğuda Rusya'nın batısı ve Kafkas bölgesinde ve güneyde Balkanlar ve Türkiye'de gözlenen yaygın bir Palearktik türdür (Dufresnes ve diğ. 2020). Genellikle açık, iyi aydınlatılmış geniş yapraklı ve karışık ormanlar, çalılıklar, çayırlar, bahçeler, üzüm bağları, meyve bahçeleri, parklar, göl kıyıları ve alçak nehir kenarı bitki örtüsü yakınlarında bulunmaktadır (Kaya ve diğ. 2009). Popülasyonlar kuraklık dönemlerini tolere edebilir ve kuru habitatlarda hayatta kalabilir. Gözlenebilen rakım aralığı deniz seviyesinden 2300 m'ye kadar değişmektedir (Kaya ve diğ. 2009). Geniş dağılımı, tahmin edilen büyük nüfusu ve tehdit altındaki bir kategoride listelenmeye hak kazanacak kadar hızlı bir şekilde azalması henüz muhtemel olmadığı için IUCN Kırmızı Listesi'nde En Az Endişe verici (LC) olarak listelenmiştir (Kaya ve diğ. 2009).

*Pelophylax bedriagae* büyük ölçüde sucul bir anur türüdür. Doğu Akdeniz'in zengin su bitki örtüsüne sahip kalıcı sulak alanlarında (kalıcı göletler, yağmur havuzları, akarsular, dereler, boşaltım kanalları, su depoları, bataklıklar, temiz su kaynakları, dalyanlar vb.) oldukça geniş bir yayılış göstermektedir (Papenfuss ve diğ. 2008). Oldukça suculdur ve su birikintileri, sığ göletler, büyük göller, büyük nehirler, dağ akarsuları gibi çok çeşitli akan ve durgun su habitatlarında yaşar (Başkale ve diğ. 2018). Türkiye'de ise Ege kıyılarında ve Anadolu yaylalarının güney kesimlerinde yaygındır. Aynı zamanda, Rodos adası da dahil olmak üzere Türkiye kıyılarına yakın Yunan adalarında bulunmakta (Arnold 2003, Baran ve diğ. 2021) ve Kıbrıs'ın çoğu bölgesinde de gözlenmektedir (Papenfuss ve diğ. 2008). Gözlenebilen rakım aralığı deniz seviyesinden 1500 m'ye kadar değişmektedir. *Pelophylax bedriagae*, geniş alandaki dağılımı, geniş bir habitat yelpazesine toleransı, yaygın ve büyük bir popülasyona sahip olması ve tehdit altındaki bir kategoride listelenmek için yeteri kadar hızlı bir şekilde azalması muhtemel olmadığı için IUCN Kırmızı Listesi'nde En Az Endişe verici (LC) olarak listelenmiştir (Papenfuss ve diğ. 2008).

Amfibi derisi, morfolojik karmaşıklığını yansıtan şekilde, birden fazla fonksiyona sahip olan iki tabakadan meydana gelmektedir; epidermis ve dermis (Rigolo ve diğ. 2008). Epidermis ektodermal, dermis ise mezodermal kökenlidir ve türler arasındaki varyasyonlarına (kalınlığı, oluklu veya pürüzsüz oluşu vb.) ilave olarak tür içinde de yaşa, mevsime, bölgeye göre farklı sayıda ve yapıda hücreden ya da tabakadan meydana gelebilmektedir (Mangione ve diğ. 2011).

Deri, türe bağlı olarak, su alımına, iyon taşınımına, solunuma, ısı transferine, kamuflaja ve hatta avcının caydırılmasına katkıda bulunur (Varga ve diğ. 2019). Klasik bir amfibi epidermisi, en dışta kısmen kornifiye olmuş bir veya iki katmanlı skuamöz hücre tabakasından (stratum korneum), küboidal veya polihedral hücre yapısına sahip 3 ila 4 katmanlı ara tabakadan (stratum granulosum ve stratum spinosum) ve küboidal veya kolumnar hücrelerden meydana gelen bir bazal tabakadan (stratum bazale veya germinativum) meydana gelmektedir (Farquhar ve diğ. 1965). Dermis tabakası ise stratum spongiosum ve stratum kompaktum olmak üzere iki tabakalı klasik bir yapı göstermektedir (Azvedo ve diğ. 2005).

Yapılan çalışmaya konu olan anur türlerinin deri yapıları histokimyasal açıdan ayrıntılı bir şekilde ortaya koyularak değerlendirilmiş, deri bezleri incelenmiş

ve kullanılan immünohistokimyasal yöntemler sayesinde serotonin immünopozitif bölgeler ve bezler tam olarak belirlenmiştir. Uygun türler için ergin ve larval evreler göz önünde bulundurularak gerçekleştirilen çalışmalar sayesinde, *Hyla orientalis* ve *Bufo bufo* türlerinin deri serotonin immünohistokimyasaları ilk kez belirlenirken, *Pelophylax bedriagae* ve *Bufo viridis* türlerinde ise larval bireylerin (GS 26-28) ergin bireylerle olan farklılıkları da yine ilk defa ortaya koyulmuştur.

Göreceli olarak küçük boyutlu bir canlıdan örnek toplama zorluğu; referans ve ortalama kan değerlerinin eksikliği; mevsim, tür, diyet, cinsiyet vb. gibi çeşitli faktörlerin hücre boyutu, kan sayımı ve kan değerlerini etkileme riski göz önüne alındığında amfibi kanı çalışmak için oldukça zorlu bir doku haline gelebilmektedir (Mahapatra ve diğ. 2012). Ancak her omurgalı gibi kurbağaların kan parametreleri üzerine yapılan çalışmalar bireylerin, dolayısıyla da populasyonların genel sağlık durumları hakkında bilgi edinilmesine yardımcı olurlar. Bununla birlikte ortam koşulları, yaş, cinsiyet, vücut ağırlığı, beslenme ve mevsimsel değişikliklerin kan dolaşımındaki hücre sayılarına ve kan değerlerine etki edip etmediği, farklı türler ve değişik lokasyonlardan toplanan aynı türe ait farklı bireyler arasındaki kan değerlerinin kapsamlı olarak araştırılması ve karşılaştırılması ile ilgili çalışmalar ise oldukça kısıtlıdır.

Kurbağalarda bireysel değerlendirmelere ek olarak populasyonların fizyolojik, patolojik, ekolojik açıdan değerlendirilmesi söz konusu olduğunda hematolojik, serolojik ve morfolojik çalışmalar oldukça yaygındır. Tıpkı diğer canlılarda olduğu gibi söz konusu teşhis koymak olduğunda başvuru ilk veriler kan parametreleridir. Çünkü bu değerler tıpkı bireyler üzerinde olduğu gibi çevresel faktörlerin populasyon üzerindeki etkisini belirlemek açısından da indikatör olarak kullanılabilirler (Cabagna ve diğ. 2005, Davis ve Durso 2009, Mahapatra ve diğ. 2012, Young ve diğ. 2012, Hota ve diğ. 2013, Das ve Mahapatra 2014). Metamorfoz geçiren canlılar olarak iki evreli bir yaşam süren amfibiler ani sıcaklık değişimleri, nem farklılıkları, habitat ve su koşulları, kirleticiler vb. çevresel değişimler açısından potansiyel olarak güvenilebilir biyoindikatörlerdir (Welsh ve Ollivier 1998, Mahapatra ve diğ. 2012). Bu sebeple kan değerleriyle ilgili herhangi bir veri ya da referans değeri bireylerin, dolayısıyla populasyonun ve buna ek olarak da habitatın sağlığı hakkında bilgi edinebilmek açısından oldukça değerlidir. Bu kapsamda,

ekseriyetle hematolojik ve serolojik çalışmalara konu olan hedef türlerden üçünün (*Bufo viridis*, *Pelophylax bedriagae* ve *Bufo bufo*) kan parametreleri karşılaştırılarak incelenmiş ve yeni verilerin elde edilmesi sayesinde söz konusu türler ve populusyonları hakkında daha ileri bilgiler edinmemizi olası kılmıştır.

zet olarak bu tez çalışmasındaki başlıca amaçlar:

- 1) Teze konu olan kurbağa türlerinin larva ve erginlerinin deri yapılarını ve deri bezlerini incelemek suretiyle serotonin salgılanan bölgelerin belirlenerek, söz konusu alanlardaki salgı bezlerinin yerleşim ve tiplerinin belirlenmesi,
- 2) Toplanan numunelerden alınan kan örneklerinin, kan parametreleri detaylı bir Şekilde araştırılmasıdır.

## 2. YÖNTEM

Bu tez çalışması, Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 06.11.2012 tarih ve 2012/09 sayılı toplantısı sonucunda verdiği PAUHDEK-2012/033 no'lu izni ile Mart 2014-Aralık 2016 tarihleri arasında özellikle hayvanların aktif olduğu Nisan-Eylül ayları arasında Denizli ili sınırları dahilinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada toplam olarak 12 *Bufo bufo*, 32 *Bufo viridis*, 7 *Hyla orientalis* ve 35 *Pelophylax bedriagae* olmak üzere toplam 86 örnek değerlendirmeye alınmıştır. Larval bireyler ise döllenmiş yumurta gelişmelerinin laboratuvar ortamında Gosner Stage (GS) 26-28'e kadar takip edilmesi sonucunda örneklenmiştir.

### 2.1 Örneklerin Toplanması:

*Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Hyla orientalis* ve *Pelophylax bedriagae* örnekleri Denizli il sınırları içindeki uygun lokalitelerden toplanarak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Karasal formlar olan *B. bufo* ve *B. viridis* örnekleri elle toplanmış olup örnekleme işlemi üreme dönemleri göz önüne alınarak gerçekleştirilmiştir. Ağaç kurbağaları (*H. orientalis*) da üreme dönemleri esnasında sulak alan kenarlarında bulunan vejetasyonda akşamüzeri ve gece boyunca sürdürülen arazi çalışmaları sayesinde özellikle erkek bireylerin vokalizasyonu takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Sucul *P. bedriagae* örnekleri göl, gölet ve akarsu habitatlarından atrap yardımı ile yakalanmışlardır. Taşıma kaplarına alınarak uygun ortamlar sağlanan ergin örnekler ve döllenmiş yumurta örnekleri ivedilikle laboratuvar ortamına taşınmışlardır (Şekil 2.1 ve 2.2).



Şekil 2.1: Taşıma kabında uygun ortama alınmış *Hyla orientalis* örnekleri



Şekil 2.2: Taşıma kabında uygun sucul ortama alınmış döllenmiş *Bufo viridis* yumurtaları

## 2.2 Laboratuvar Çalışması:

Toplanan larval ve ergin örnekler ayrı ayrı numaralandırıp etiketlenmiştir. Histokimyasal ve immünohistokimyasal çalışmalar için larva örnekleri total olarak Bouin sıvısında 24 saat süresince fikse edilmiştir. Ergin kurbağalar eter ile bayıltılarak disseksiyon tablasına alınmış, dorsal, ventral ve lateral bölgelerden 1'er cm<sup>2</sup>'lik deri örnekleri alınarak Bouin sıvısında 24 saat fikse edilmiştir. Dehidrasyonun ardından örnekler parafine gömülerek histokimyasal çalışmalar için 5 µm, immünohistokimyasal çalışmalar içinse 3 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Ardından kesitler, genel histolojik görünüm için Harris Hematoksilen-Eozin; sülfatlı mukopolisakkaritler için Alcian Blue pH 1; asidik mukopolisakkaritler için Alcian Blue pH 2,5; bağ ve kas dokularını ayırt etmek için Masson's triple; glikojen, mukus ve nötral mukopolisakkaritler için PAS (Periyodik Asit Schiff) yöntemleriyle boyanmışlardır. Histolojik araştırmalar histokimyasal ve immünohistokimyasal olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak üç başlık halinde gerçekleştirilmiştir.

1. Genel histoloji
2. Bez histolojisi
3. Serotonin immünohistokimyası

Kan parametreleri için, örneklerden alınan kan numunelerinin morfolojik ve biyokimyasal kompozisyonlarının belirlenmesi ve bu sayede elde edilen verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.1 Histokimyasal Yöntemler

Genel histolojik değerlendirmeler için Harris Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi kullanılmıştır. Sülfatlı mukopolisakkaritler ve sülfat içeren proteoglikanlar için Alcian Blue pH 1; karboksilli asit mukopolisakkaritler ve glikoproteinler için Alcian Blue pH 2,5; nötral mukopolisakkaritler, glikojen, glikoprotein, mukoprotein gibi kompleks karbonhidratlar için PAS; bağ ve destek dokuları için ise Masson's trikrom boyama yöntemleri kullanılmıştır.

### **2.2.1.1 Harris Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi:**

#### Solüsyonlar:

Harris hematoksilen için:

Hematoksilen (Crist.) 1 gr.

Absolu alkol 10 ml.

Amonyum veya Potasyum alüminyum sülfat 20 gr.

Distile su 200 ml.

Civa oksit 0,5 gr.

Asit alkol için:

HCl 1 ml.

%70 Alkol 100 ml.

#### Metot:

1. Deparafinizasyon işlemi için, parafin bloktan lama alınmış kesitler 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilir.
2. Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 30'ar dakika 2 değişim ksilende tutulur.
3. Rehidratasyon işlemi için, Absolu alkol, %96, %80, %70 etil alkol serilerinde 10'ar dakika tutulur.
4. 5 dakika distile su ile yıkanır.
5. 1 dakika Hematoksilen boyasında tutulur.
6. Diferansiyasyon işlemi için asit alkol solüsyonuna 1-3 saniye batırılıp çıkarılır.
7. 1 dakika %1'lik Eozin solüsyonunda tutulur.
8. 1 dakika akar suda yıkanır.
9. 10 dakika %70'lik alkolde tutulur.
10. 10 dakika %80'lik alkolde tutulur.
11. 10 dakika %96'lık alkolde tutulur.
12. 10 dakika Absolu alkolde tutulur.



13. 10 dakika ksilol alkolde (1:1) tutulur.
14. 20 dakika Ksilol I, Ksilol II ve Ksilol III serilerinde tutulur.
15. Kesitler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatılır.

Sonuç:

Nükleuslar - Koyu mor

Sitoplazma -Pembe

**2.2.1.2 Alcian Blue pH 1 boyama yöntemi:**

Solüsyonlar:

Alcian Blue pH 1 için:

Alcian Blue 1g

0.1 M Hidroklorik Asit 100ml

Metot:

1. Deparafinizasyon işlemi için, parafin bloktan lama alınmış kesitler 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilir.
2. Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 30'ar dakika 2 değişim ksilende tutulur.
3. Rehidratasyon işlemi için, Absolü alkol, %96, %80, %70 etil alkol serilerinde 10'ar dakika tutulur.
4. 5 dakika distile su ile yıkanır.
5. Alcian Blue pH 1 solüsyonuyla 15 dakika boyanır.
6. Akarsuda 5 dakika yıkanır (pH 1 için kesitlerin suyu iyice süzdürülür ve preparatlar kurutulur).
7. Nötral kırmızı ile 1 dakika zıt boyama yapılır.
8. Distile su ile yıkanır.
9. 10 dakika %70'lik alkolde tutulur.
10. 10 dakika %80'lik alkolde tutulur.
11. 10 dakika %96'lık alkolde tutulur.
12. 10 dakika Absolü alkolde tutulur.

13. 10 dakika ksilol alkolde (1:1) tutulur.
14. 20 dakika Ksilol I, Ksilol II ve Ksilol III serilerinde tutulur.
15. Kesitler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatılır.

Sonuç:

Sülfatlı Müsinler - Mavi

Nükleuslar - Kırmızı

**2.2.1.3 Alcian Blue pH 2,5 boyama yöntemi:**

Solüsyonlar:

Alcian Blue pH 2,5 için:

Alcian Blue 1g

%3 Asetik Asit 100ml

%0,1 Nuclear fast red için:

Nuclear fast red 0.1g

Aluminyum sülfat 2.5g

Distile su 100ml

Metot:

1. Deparafinizasyon işlemi için, parafin bloktan lama alınmış kesitler 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilir.
2. Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 30'ar dakika 2 değişim ksilende tutulur.
3. Rehidratasyon işlemi için, Absolü alkol, %96, %80, %70 etil alkol serilerinde 10'ar dakika tutulur.
4. 5 dakika distile su ile yıkanır.
5. Alcian Blue pH 2,5 solüsyonuyla 5 dakika boyanır.
6. Distile su ile yıkanır.
7. %0,1 nuclear fast red ile 5 dakika zıt boyama yapılır.
8. Distile su ile yıkanır.

9. 10 dakika %70'lik alkolde tutulur.
10. 10 dakika %80'lik alkolde tutulur.
11. 10 dakika %96'lık alkolde tutulur.
12. 10 dakika Absolü alkolde tutulur.
13. 10 dakika ksilol alkolde (1:1) tutulur.
14. 20 dakika Ksilol I, Ksilol II ve Ksilol III serilerinde tutulur.
15. Kesitler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatılır.

Sonuç:

Müsin - Açık mavi

Nükleuslar – Kırmızı

**2.2.1.4 Masson's triple boyama tekniği:**

Solüsyonlar:

Weigert's demir hematoxilen veya muadili

Solüsyon A:

Asit fuksin 0.5g

Xylidine ponceau 0.5g

Distile su 99mL

Glasiyal Asetik Asit 1ml

Solüsyon B:

Fosfomolibdik Asit 1g

Distile su 100ml

Solüsyon C:

Light green SF yellowish 2g

Glasiyal Asetik Asit 2ml

Distile su 100ml

Metot:

1. Deparafinizasyon işlemi için, parafin bloktan lama alınmış kesitler 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilir.
2. Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 30'ar dakika 2 değişim ksilende tutulur.
3. Rehidratasyon işlemi için, Absolü alkol, %96, %80, %70 etil alkol serilerinde 10'ar dakika tutulur.
4. 5 dakika distile su ile yıkanır.
5. 10 dakika Solüsyon A'da (Weighert's demirli hematoksilin A çözeltisi) tutulur.
6. Distile su ile çalkalanır.
7. 5 dakika Solüsyon B'de (Weighert's demirli hematoksilin B çözeltisi) tutulur.
8. Distile su ile çalkalanır.
9. 10 dakika Solüsyon C'de tutulur.
10. Distile su ile çalkalanır.
11. 10 dakika %70'lik alkolde tutulur.
12. 10 dakika %80'lik alkolde tutulur.
13. 10 dakika %96'lık alkolde tutulur.
14. 10 dakika Absolü alkolde tutulur.
15. 10 dakika ksilol alkolde (1:1) tutulur.
16. 20 dakika Ksilol I, Ksilol II ve Ksilol III serilerinde tutulur.
17. Kesitler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatılır.

Sonuç:

Nükleus - Siyah

Sitoplazma, Keratin, Adele - Kırmızı

Kollajen, Mukus - Mavi

### **2.2.1.5 PAS boyama tekniği:**

#### Solüsyonlar:

Az miktarda toz DNPH (2,4-dinitrofenil-hidrazin) %15'lik asetik aside eklenir, sature olana kadar 1-2 saat boyunca çalkalanır.

#### Schiff reaktifi:

Bazik fuksin 0.5g

Sodyum metabisülfid 0.5g

0.15 N HCl 100ml

Tamamen çözüne kadar karıştırılır. Renk açık kahverengi-turuncu olmalıdır. Test etmek için 1 damla formaldehite 1 damla Schiff reaktifi damlatılır. Parlak mor bir renk elde edilmelidir.

#### Metot:

1. Deparafinizasyon işlemi için, parafin bloktan lama alınmış kesitler 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilir.
2. Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 30'ar dakika 2 değişim ksilende tutulur.
3. Rehidratasyon işlemi için, Absolü alkol, %96, %80, %70 etil alkol serilerinde 10'ar dakika tutulur.
4. 5 dakika distile su ile yıkanır.
5. %15'lik asetik asitte çözülmüş DPHN'de 30 dakika bekletilir.
6. Distile su ile 2 defa 5'er dakika yıkanır.
7. %1'lik Periyodik asitte içinde 10 dakika tutulur.
8. Distile su ile yıkanır.
9. Schiff reaktifi içinde 30 dakika tutulur (çok morlaşırsa süre kısaltılır).
10. [%1 HCl içine %0,5 Sodyum metabisulfid] her defasında 2 dakika olmak üzere 3 kez tutulur.
11. Akar su altında 2 defa 5'er dakika yıkanır.
12. Tol-Blue (kullanılmayabilir veya başka bir zıt boya kullanılabilir)
13. Akar su altında su altında 2 defa 5'er dakika yıkanır.

14. Diferansiyasyon işlemi için asit alkol solüsyonuna 1-3 saniye batırılıp çıkarılır.
15. Akar su altında 10 dakika yıkanır.
16. 10 dakika %70'lik alkolde tutulur.
17. 10 dakika %80'lik alkolde tutulur.
18. 10 dakika %96'lık alkolde tutulur.
19. 10 dakika Absolü alkolde tutulur.
20. Kesitler 2 defa 10'ar dakika Absolü alkol içinde tutulur.
21. 10 dakika ksilol alkolde (1:1) tutulur.
22. 20 dakika Ksilol I, Ksilol II ve Ksilol III serilerinde tutulur.
23. Kesitler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatılır.

Sonuç:

Pas pozitif reaksiyon - Kırmızımsı mor

Nükleus - Mavi

### **2.2.2 İmmünohistokimyasal Yöntem**

Serotoninin saptanabilmesi için **Streptavidin-Biyotin kompleks** tekniği adı verilen immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanılmıştır. Tespit için The Ultra Vision Large Volume Detection System, Anti-Polyvalent, HRP, TP-125-HL kit (Lab Vision Corporation, USA) uygulanmıştır. Tamamı oda sıcaklığında gerçekleştirilen prosedür şöyledir:

1. Deparafinizasyon
2. Endojen peroksidaz aktiviteyi durdurmak için 20 dakika boyunca Hydrogen Peroxide Block (TA-060-HP)
3. Belirli olmayan boyamayı engellemek için 30 dakika boyunca Large Volume Ultra V Block (TA-125-UB)
4. Tavşan poliklonal anti-serotonin (Zymed 18-0077; 1:100) primer antiserumda 65 dakika inkübasyon
5. Biotinlenmiş sekonder antiserumda (TP-125-BN) 20 dakika inkübasyon

6. Streptavidin-Biyotin peroksidaz kompleksinde (TS-125-HR) 20 dakika inkübasyon
7. 1 ml Large Volume DAB Substrata (TA-125-HDS) 1 damla DAB Kromojen (TA-012-HDC) eklenmesiyle oluşan Kromojen substrat solüsyonunda yaklaşık 6 dakika inkübasyon. Bu prosedür esnasında tavşan poliklonal anti-serotoninle muamele edilen kesitler 3. basamak dışındaki her basamaktan sonra 3 defa olmak üzere fosfat tamponu (0.01 M, pH 7.2) ile yıkanır.
8. 1 dakika boyunca distile su ile yıkama
9. Dehidrasyon, şeffaflaştırma ve kapama.

İmmünreaksiyon primer antibadının yerine non-immune serum (TA-125-UB), fosfat tamponu (0.01 M, pH 7,2) veya izotip tavşan primer antibody (NC-100-R7) kullanılarak dokular, pozitif reaksiyon için de kontrol edilmiştir. Zıt boyama için Harris hematoksilen kullanılmıştır.

### **2.2.3 Kan Parametreleri**

Deri örnekleri alınan ergin kurbağaların ventrikuluslarından Pico 50 marka heparinli enjektörler kullanılarak kan örnekleri alınmış ve etiketlenen örneklerin kan parametreleri (pH: hidrojen iyon konsantrasyonu; kısmi O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> basıncı; hemoglobin konsantrasyonu; O<sub>2</sub> saturasyonu; kandaki total hemoglobinde kısmioksi-, karboksihemoglobin; plazmada potasyum, sodyum, kalsiyum, glikoz konsantrasyonları vb.) ABL 800 radyometre ile zaman kaybetmeden incelenmiştir. Artan numunelerden kuru frotta kan preparatları hazırlanmış, Romanovski teknikleri kullanılarak boyamaları yapılan preparatlar incelenerek karşılaştırılmışlardır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Bulgular

##### 3.1.1 Histokimyasal Bulgular

Histokimyasal bulgular, arazi çalışmasında larval evrede elde edilebilen türlerde ergin ve larval bireyler olmak üzere 2 farklı aşamada çalışılmıştır. Söz konusu türler *Bufo viridis* ve *Pelophylax bedriagae* olmuştur. *Bufo bufo* ve *Hyla orientalis* bireylerinde ise larval evrede birey elde edilememesi dolayısıyla yalnızca ergin bireyler değerlendirilmeye alınmıştır.

##### 3.1.1.1 *Bufo bufo*

*Bufo bufo* ergin bireylerinde epiderminin, yaşa bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte, ortalama 5-8 hücre sırasından meydana geldiği belirlenmiştir. Stratum korneumun görece olarak kalın, bazal laminanın ise oldukça belirgin yapıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.1). Dermiste stratum spongiosum ve stratum kompaktum ayrımı oldukça belirgindir (Şekil 3.2). Müköz bezler stratum basalenin hemen altında yer almaktayken (Şekil 3.2), seröz bezler ise genellikle bazal membranın ventralinden stratum kompaktum sınırına kadar uzanabilmektedir (Şekil 3.3).

Müköz bezler bazal ve mediyal bölgede PAS pozitif reaksiyon göstermekte iken (Şekil 3.2), AB pH 2,5 ve AB pH 1 reaksiyonları bazal kısımda mediyale göre daha yoğun tepkimeye yol açmaktadır (Şekil 3.4 ve 3.5). Bez hücreleri MTK negatif sonuç vermekte iken müköz bezleri saran kollajen fibriller açık mavi renkte MTK pozitif olarak gözlenmektedir (Şekil 3.6).

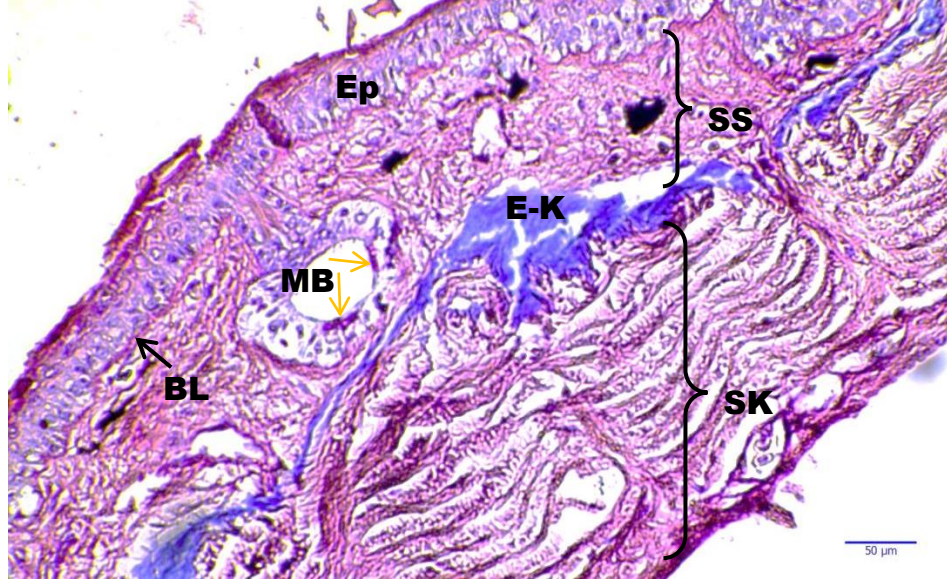




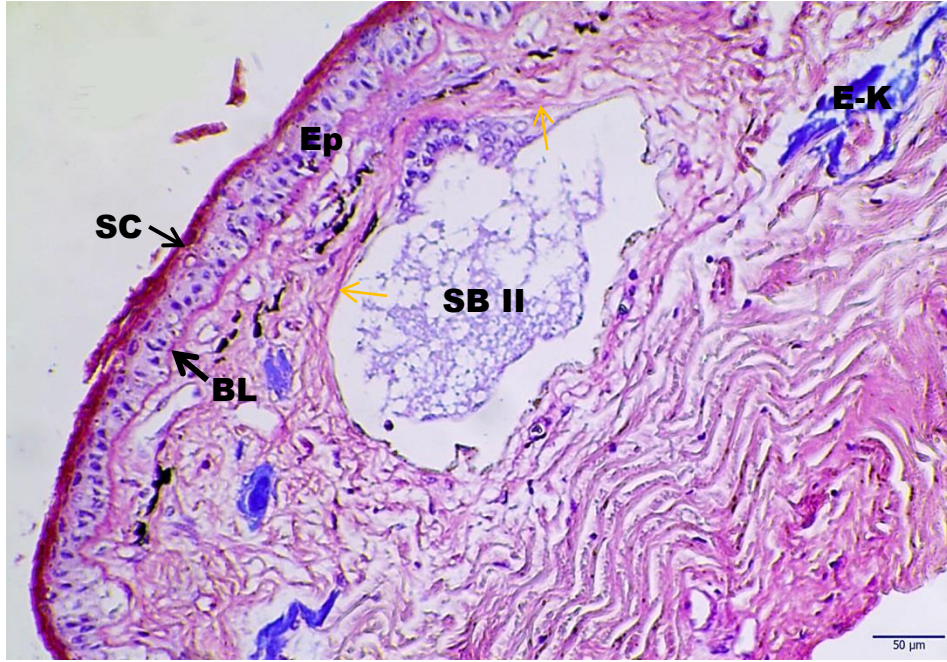
**Şekil 3.1:** *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB I-II: Tip I ve II Seröz bezler, BL: Bazal lamina. H&E, Bar 50 µm, 10x.

Seröz bezler Tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki farklı yapıda gözlenmektedir (Şekil 3.1). Seröz bez miyoepiteli zayıf PAS pozitif reaksiyon göstermekteyken salgı epiteli ise PAS negatiftir (Şekil 3.3). Seröz salgı materyalinin AB pH 2,5 reaksiyonu oldukça kuvvetlidir (Şekil 3.4). Benzer şekilde AB pH 1 pozitiflik de gözlenmekle birlikte, söz konusu reaksiyon pH 2,5'daki kadar yoğun değildir (Şekil 3.5). MTK negatif olan seröz bezlerin etrafı kollajen fibriller ile sarılıdır (Şekil 3.6).

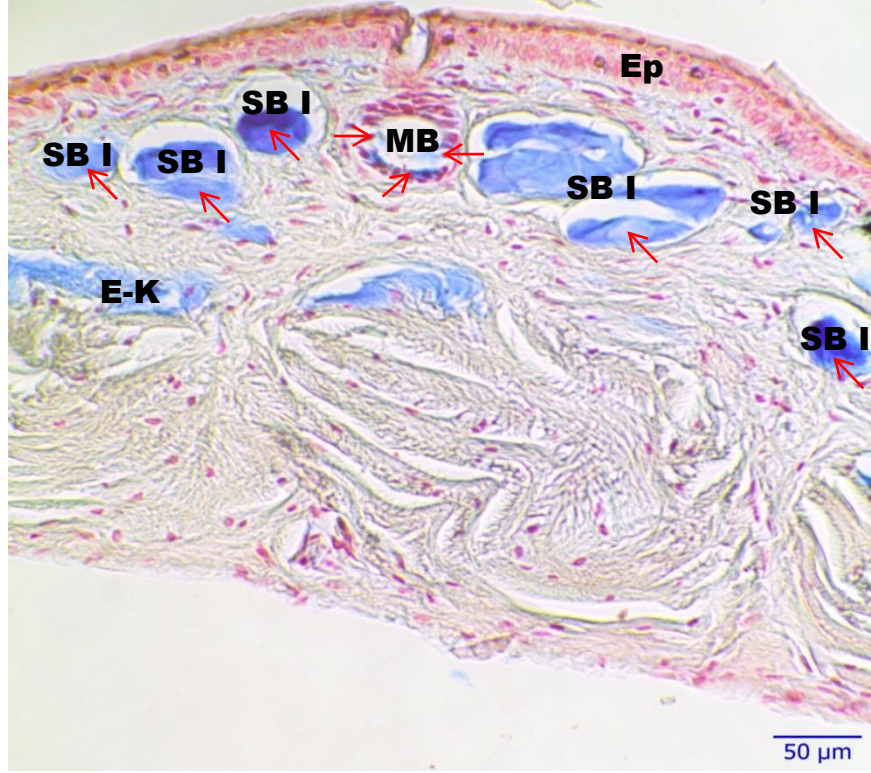
Stratum spongiosum ile stratum kompaktum arasında yer alan Eberth-Katschenko tabakası ise AB pH 2,5'da yoğun bir reaksiyon göstermektedir (Şekil 3.4). Söz konusu tabakada AB pH 1 ise göreceli olarak daha zayıf bir tepkimeye yol açtığı gözlenmiştir (Şekil 3.5).



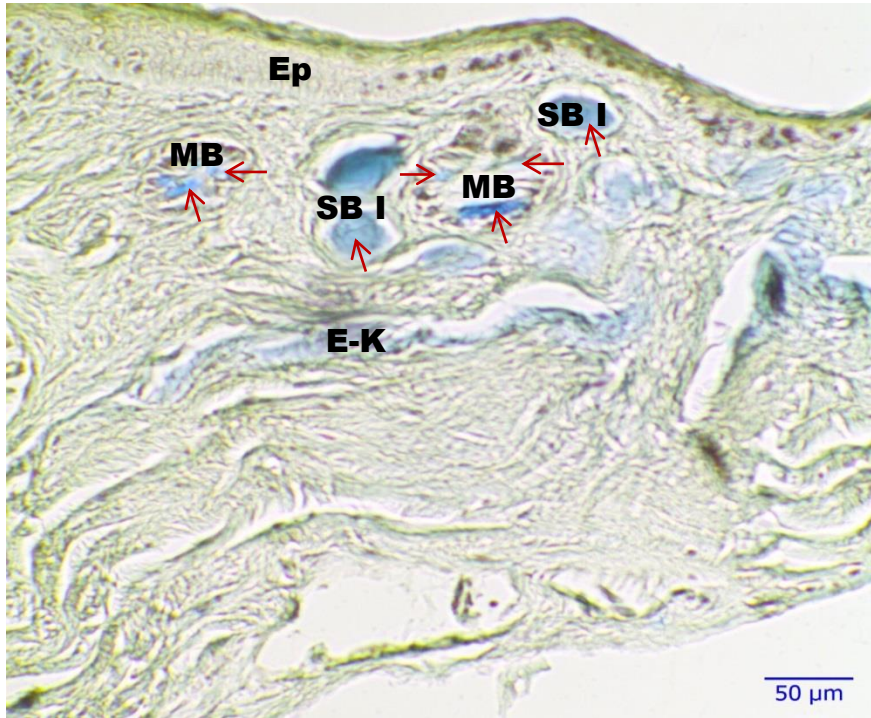
**Şekil 3.2:** *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, BL: Bazal lamina, E-K: Eberth-Katschenko tabakası, SS: Stratum spongiosum, SK: Stratum kompaktum. AB pH 2,5-PAS, PAS pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x.



**Şekil 3.3:** *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, SC: Stratum kerneum, SB II: Tip II Seröz bez, BL: Bazal lamina, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. AB pH 2,5-PAS, PAS pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x.



Şekil 3.4: *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB I: Tip I Seröz bez, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. AB pH 2,5, AB-pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x.



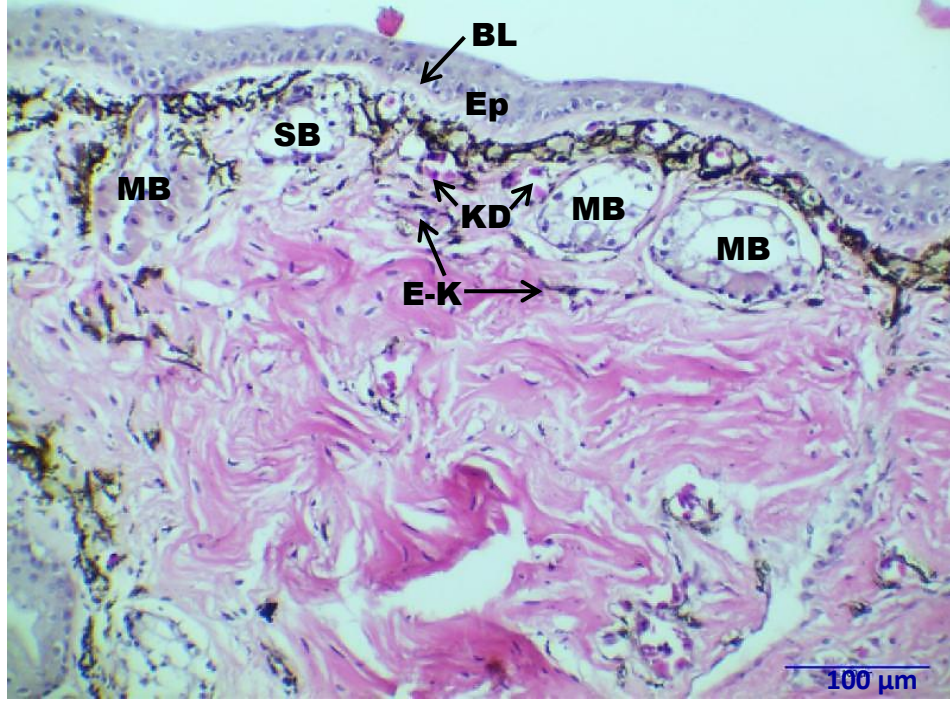
Şekil 3.5: *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB I: Tip I Seröz bez, BL: Bazal lamina, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. AB pH 1, AB-pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x.



**Şekil 3.6:** *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti. SC: Stratum korneum, MB: Müköz Bez, SB II: Tip II Seröz bez. MTK, Kollajen fibril (→), Bar 25 µm, 40x.

### 3.1.1.2 *Bufo viridis*

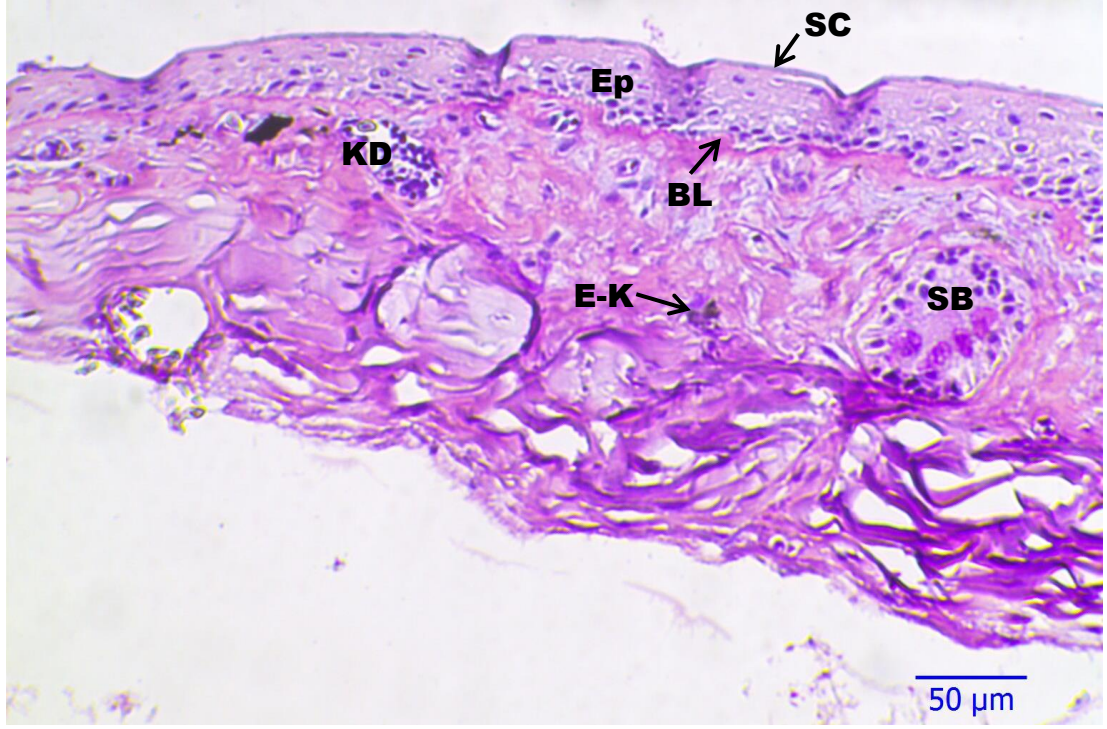
*Bufo viridis* ergin bireylerinde epiderminin, yaşa bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte, ortalama 8-10 hücre sırasından meydana geldiği belirlenmiştir. Stratum korneumun kalın, bazal laminanın ise özellikle PAS ve MTK boyamalarda oldukça belirgin yapıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.8 ve 3.12). Dermiste, Eberth-Katschenko tabakası ile birbirinden ayrılan stratum spongiosum ve stratum kompaktum sınırları *Bufo bufo* örneklerindeki kadar olmasa da göreceli olarak belirgindir (Şekil 3.7).



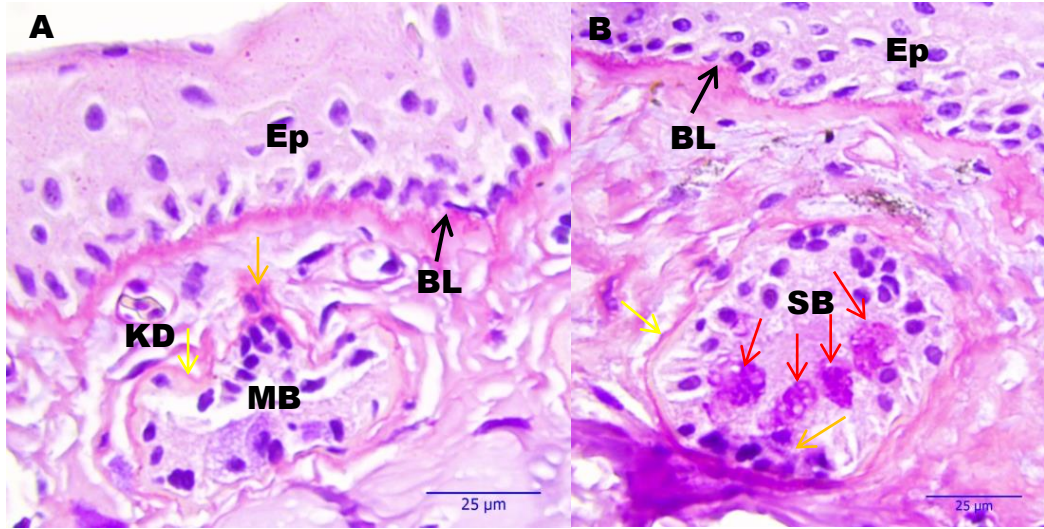
**Şekil 3.7:** *Bufo viridis* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, BL: Bazal lamina, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez, E-K: Eberth-Katschenko tabakası, KD: Kan Damarı. H&E, Bar 100 µm, 10x.

Müköz bezler stratum basalenin (=bazal lamina) hemen altında yer almaktadır (Şekil 3.9A). Seröz bezler ise bazal membranın ventralinden stratum kompaktum sınırına kadar uzanabilmektedir (Şekil 3.8 ve 3.9B). Apikal bölgede PAS pozitif olan müköz bezlerin miyoepiteli yoğun şekilde PAS pozitifdir (Şekil 3.9A). Müköz bezlerin salgıları suda çözünebildiklerinden doku takibi esnasında ortadan kalkar. Dolayısıyla asinusları ekseriyetle boş olarak gözlenen müköz bezlerde de *B. bufo* örneklerindeki benzer şekilde herhangi bir reaksiyon gerçekleşmemiştir (Şekil 3.9A). Buna karşın, seröz bezlerin asinuslerinde bulunan salgı materyali uygulanan tüm histokimyasal boyamalara pozitif reaksiyon göstermiştir (Şekil 3.8, 3.9B, 3.10, 3.11 ve 3.12).

Seröz bezler, stratum kompaktuma daha yakın bölgelerde lokalize olmuş bezlerdir. Asinusları ekseriyetle salgı ile dolu olduğundan, müköz bezlere nazaran daha büyük yapıda gözlenen seröz bezlerin salgı hücreleri ve etraflarını saran miyoepitel hücreler iğ şeklinde görünmektedir ve PAS pozitifdir. Seröz bezlerin özellikle bazal kısmındaki salgı hücreleri ise kuvvetli PAS pozitifdir. Apokrin yapıdaki bu hücrelerin salgı ile dolu olan apikal kısımlarının da yoğun şekilde PAS pozitif olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.9B).



**Şekil 3.8:** *Bufotes viridis* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez, SC: Stratum korneum, BL: Bazal lamina, E-K: Eberth-Katschenko tabakası, KD: Kan Damarı. AB pH 2,5-PAS, Bar 50 µm, 10x.

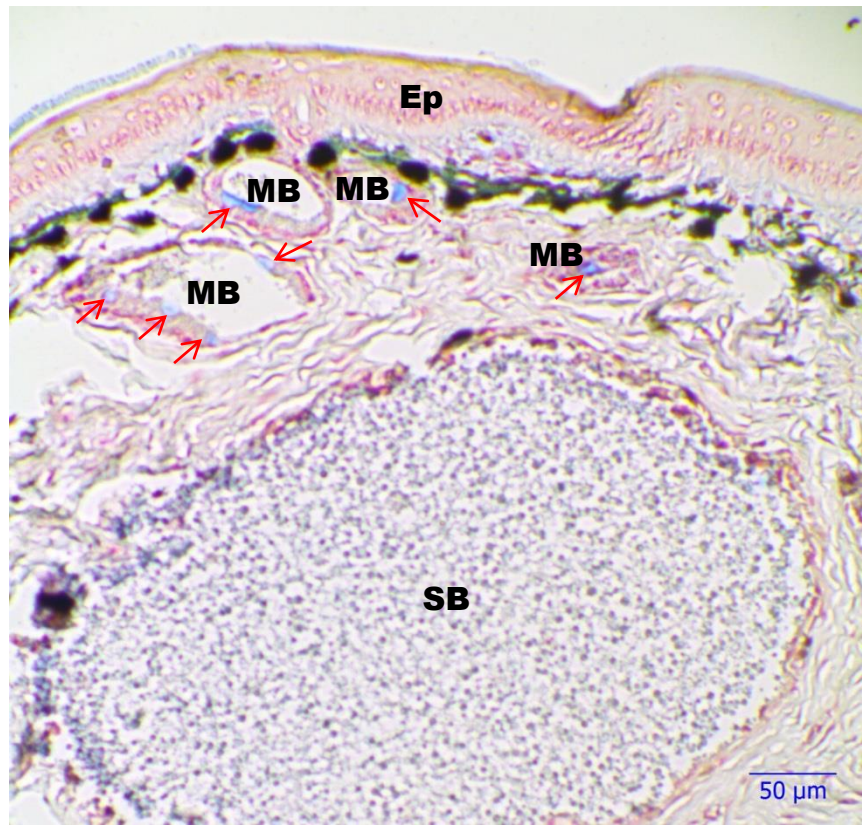


**Şekil 3.9:** *Bufotes viridis* ergin deri enine kesiti. A: Müköz Bez, B: Seröz Bez. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez, BL: Bazal lamina, KD: Kan Damarı. AB pH 2,5-PAS, PAS pozitif reaksiyon (→), PAS pozitif miyoepitel (→), PAS pozitif seröz salgı (→), A: Bar 25 µm, 40x. B: Bar 25 µm, 40x.

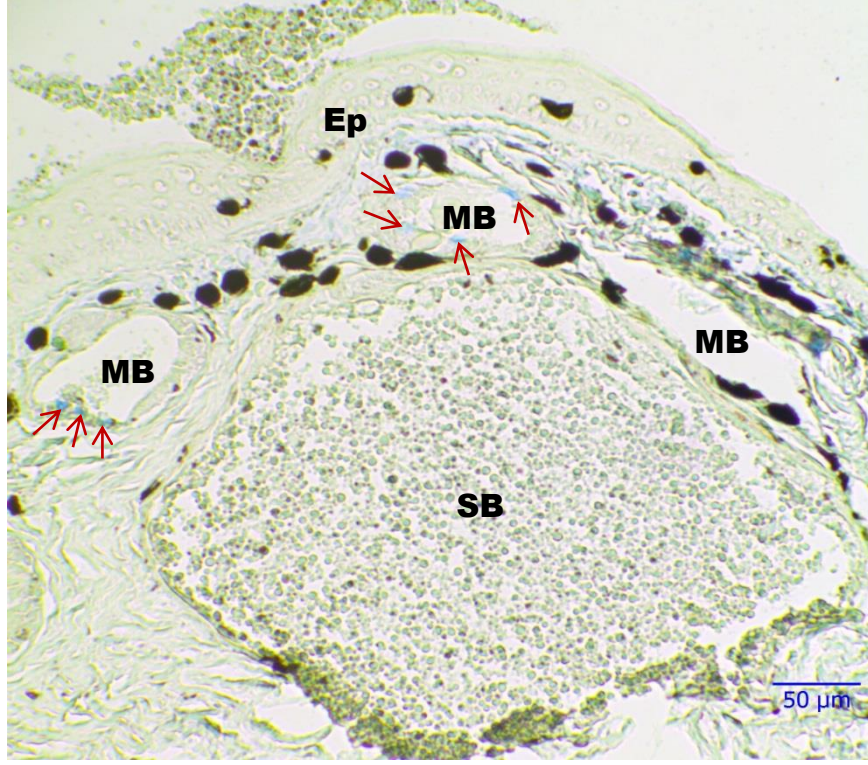
MTK boyamada bazal lamina belirgindir. Müköz bez epitelinde ve asinuslarında ise herhangi bir reaksiyon gözlenmemiştir. Bununla birlikte stratum spongiosum tabakada bol miktarda kollajen fibril varlığı saptanmıştır (Şekil 3.12).

Müköz bezler AB pH 2,5 ve AB pH 1 pozitif olarak belirlenmiştir. Ancak pozitif kısımlar genellikle müköz bezlerin bazal ve mediyal kısımlarındaki salgı epiteli hücrelerinin apikal bölgeleri ile sınırlı kalmıştır (Şekil 3.10 ve 3.11).

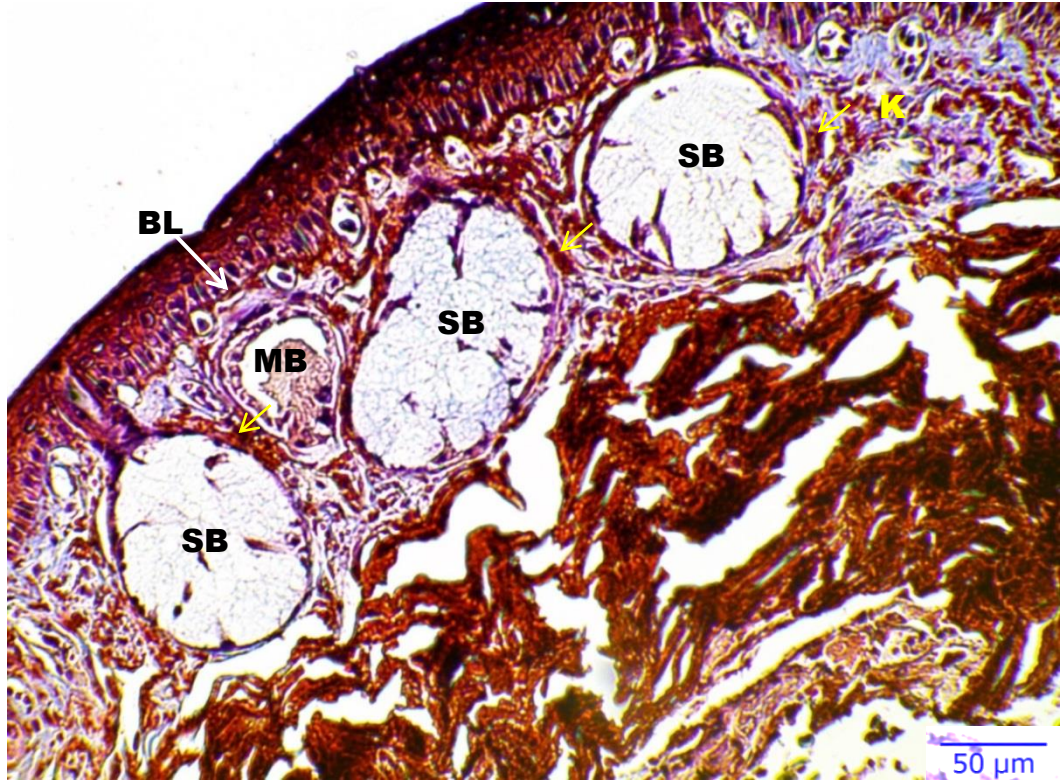
AB pH 2,5'da seröz bezin miyoepiteli ve epitel hücreleri ile salgı materyali pozitif reaksiyon göstermiştir. Bu yapılarda AB pH 1 ise negatif reaksiyon olarak ayırt edilmiştir (Şekil 3.10 ve 3.11). Seröz bez epiteli ve miyoepitel hücreleri MTK pozitifdir. Seröz salgı bazofilik özellikte olması dolayısıyla MTK boyamada, Masson anilin mavisi ile açık mavi renkte sonuç vermektedir (Şekil 3.12).



**Şekil 3.10:** *Bufotes viridis* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez. AB pH 2,5, AB-pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x.



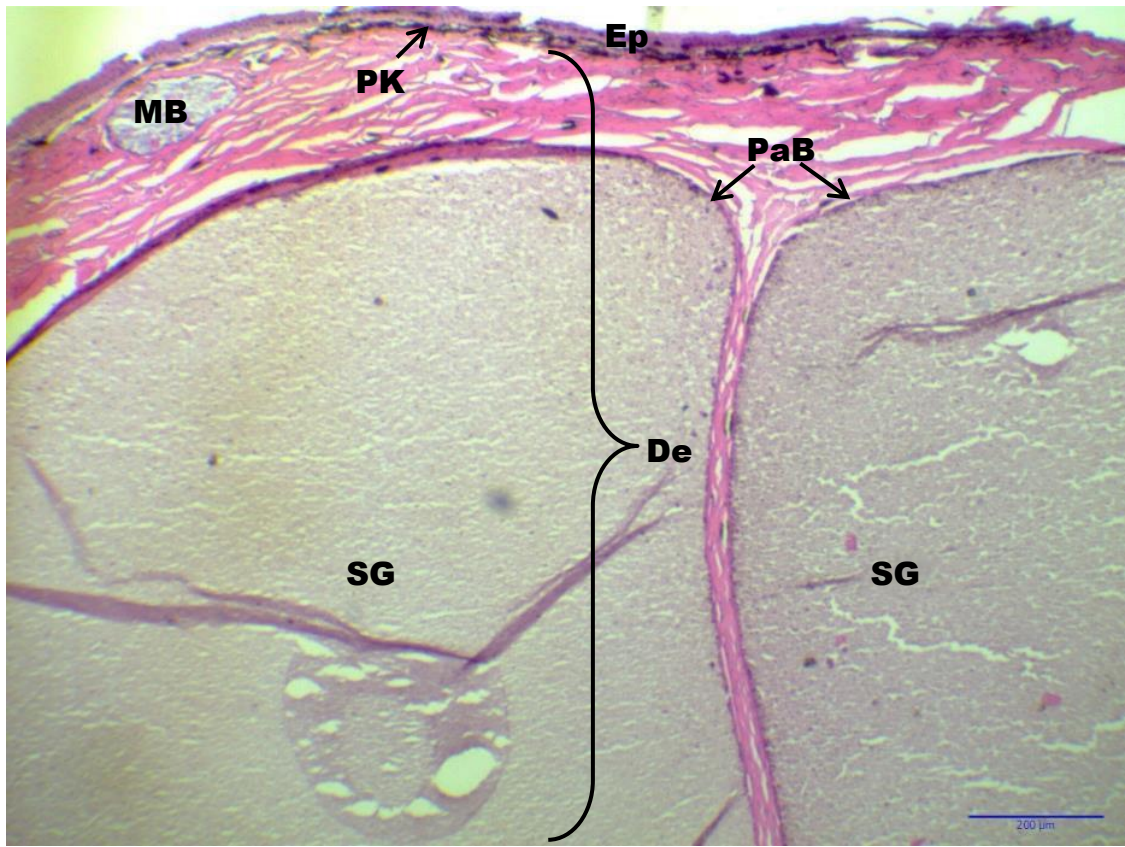
Şekil 3.11: *Bufo viridis* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez. AB pH 1, AB-pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x.



Şekil 3.12: *Bufo viridis* ergin deri enine kesiti. MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez, BL: Bazal lamina, K: Kollajen. MTK, pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x.



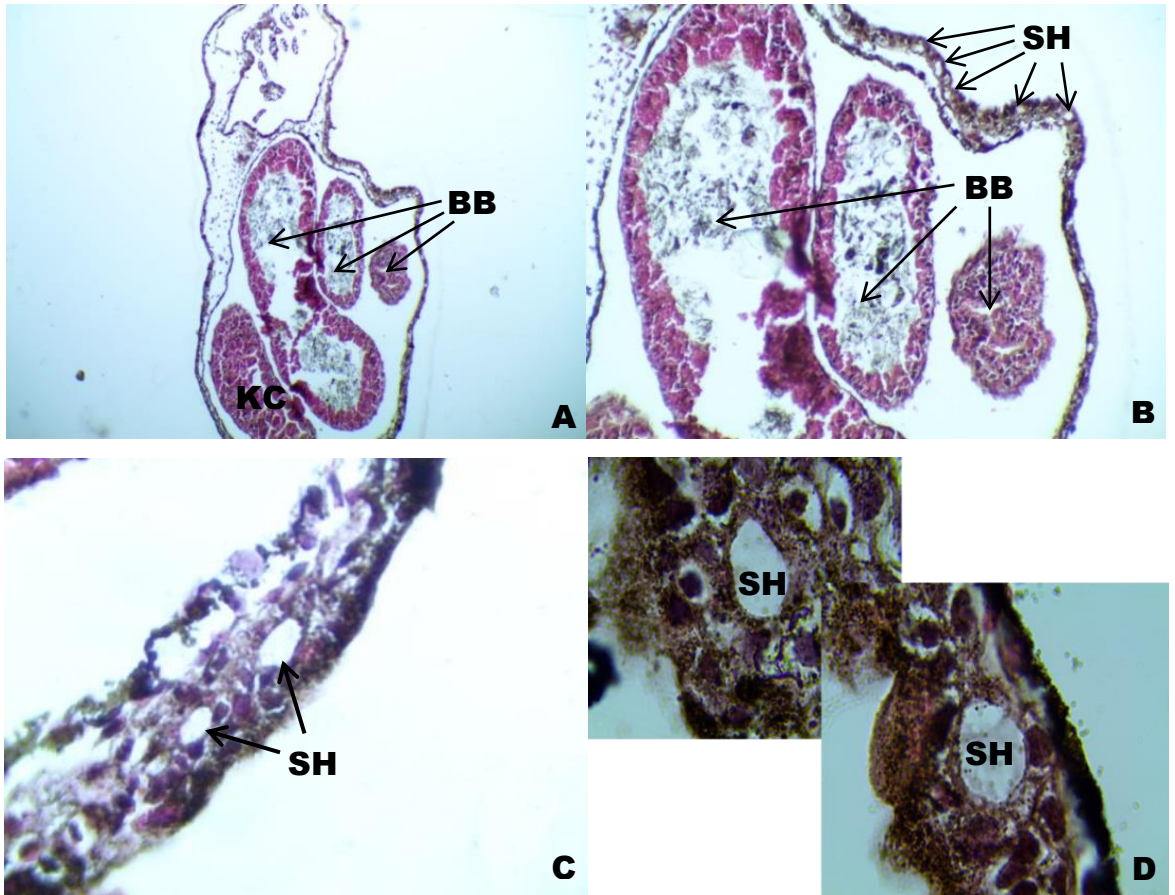
Bufonidlerde zehir bezleri olarak da adlandırılan parotoid bezler mevcuttur. Gözlerin hemen arkasında, başın iki yanında yer alan parotoid bezler avcılara karşı caydırıcı olan ve bufotoksin adı verilen özel bir salgı barındırmaktadır. Yapılan çalışmada parotoid bezlerin epidermis tarafından desteklenen kompakt bir dermis tarafından çepeçevre sarıldığı gösterilmiştir. Epiderminin hemen altında müköz bezler yer almaktadır. Dermis, oldukça gevşek bir yapıya sahiptir ve bazal lamina ile spongiyal epidermis arasında bir pigment katmanı mevcuttur. Stratum spongiosum boyunca geniş bir alan kaplayan parotoid bezlerin, neredeyse ağsı gibi görünen küçük salgı granülleri ile dolu oldukları gözlenmiştir (Şekil 3.13).



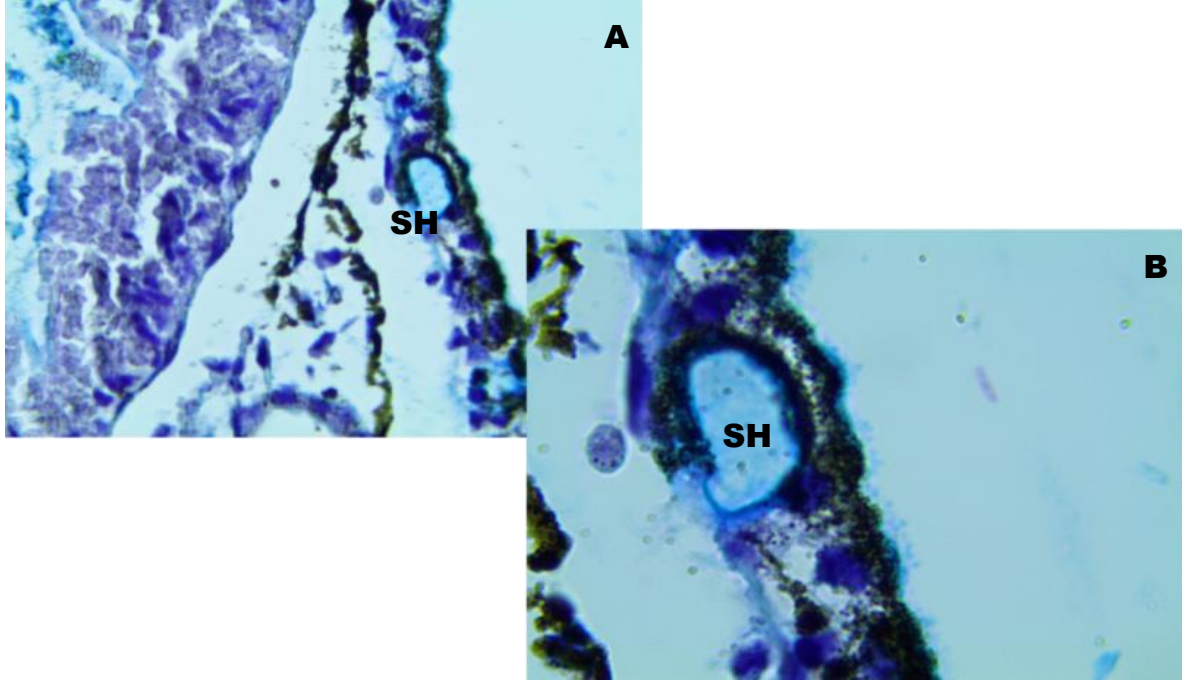
**Şekil 3.13:** *Bufotes viridis* Parotoid bez enine kesit. Ep: Epidermis, De: Dermis, MB: Müköz Bez, PK: Pigment Katmanı, PaB: Parotoid Bez, SG: Salgı Granülleri. H&E, 10x.

### 3.1.1.2.1 Larval Bireyler:

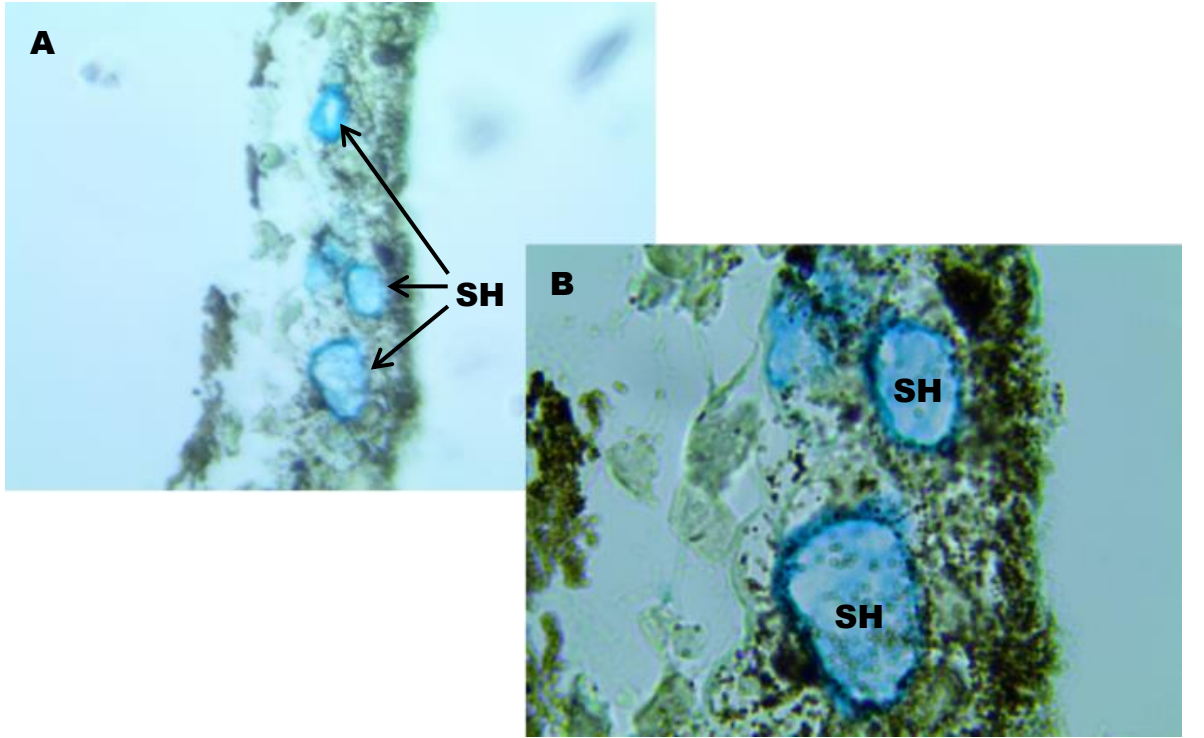
*Bufo viridis* larvalarında (GS 26-28) deri, bol miktarda salgı hücrelerine sahiptir. Söz konusu hücreler AB pH 1, AB pH 2,5 ve MTK ile pozitif reaksiyon göstermekte iken PAS negatiftirler. Bazal lamina, ergin bireylerdekine benzer şekilde, MTK boyamada belirgin bir şekilde izlenebilmektedir (Şekil 3.14, 3.15, 3.16 ve 3.17).



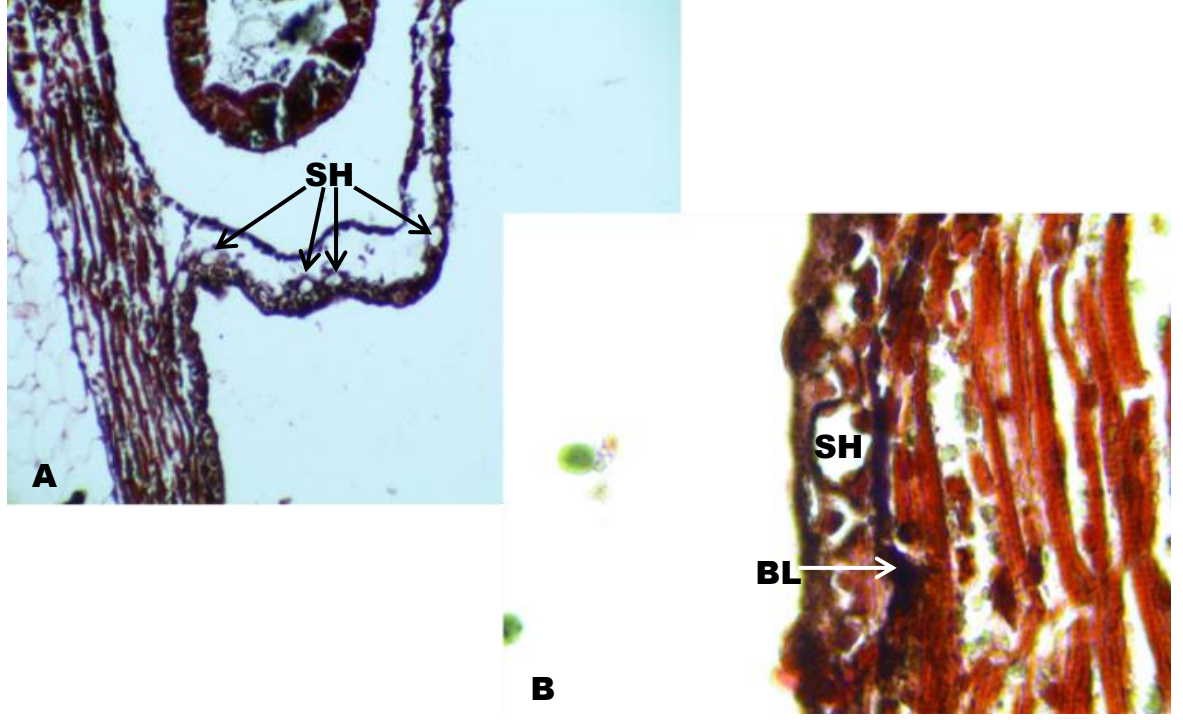
Şekil 3.14: *Bufo viridis* larva enine kesiti. BB: Bağırsak boşluğu, KC: Karaciğer taslağı, SH: Salgı hücresi. H&E, A:4x, B:10x, C:40x, D:100x.



Şekil 3.15: *Bufotes viridis* larva enine kesiti. SH: Salgı hücresi. AB pH 2,5-PAS, A: 40x, B: 100x.



Şekil 3.16: *Bufotes viridis* larva enine kesiti. SH: Salgı hücresi. AB pH 1, A: 40x, B: 100x.



**Şekil 3.17:** *Bufo viridis* larva enine kesiti. SH: Salgı hücresi, BL: Bazal lamina. MTK, A: 40x, B: 100x.

### 3.1.1.3 *Hyla orientalis*

*Hyla orientalis* ergin bireylerinde epiderminin, yaşa bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte, ortalama 2-4 hücre sırasından meydana geldiği belirlenmiştir. Oldukça ince bir epidermis tabakasına sahip olan bu bireylerde, stratum korneumun göreceli olarak kalın oluşu göze çarpmaktadır. Bazal lamina ise oldukça belirgindir (Şekil 3.18).

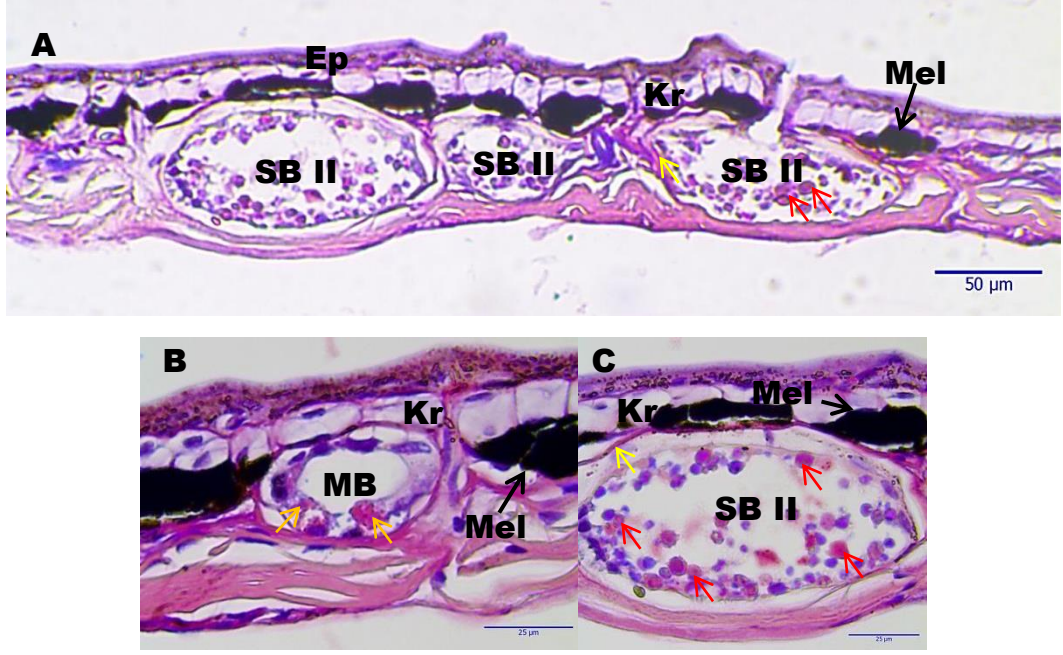
Dermiste stratum spongiosum oldukça bol sayıdaki müköz ve seröz bezler ile kaplanmıştır. Stratum kompaktum ise açıkça belirgindir. Müköz bezler stratum basalenin hemen altında yer almaktayken, seröz bezler ise bazal membranın ventralinden stratum kompaktum sınırına kadar uzanabilmektedir (Şekil 3.18).



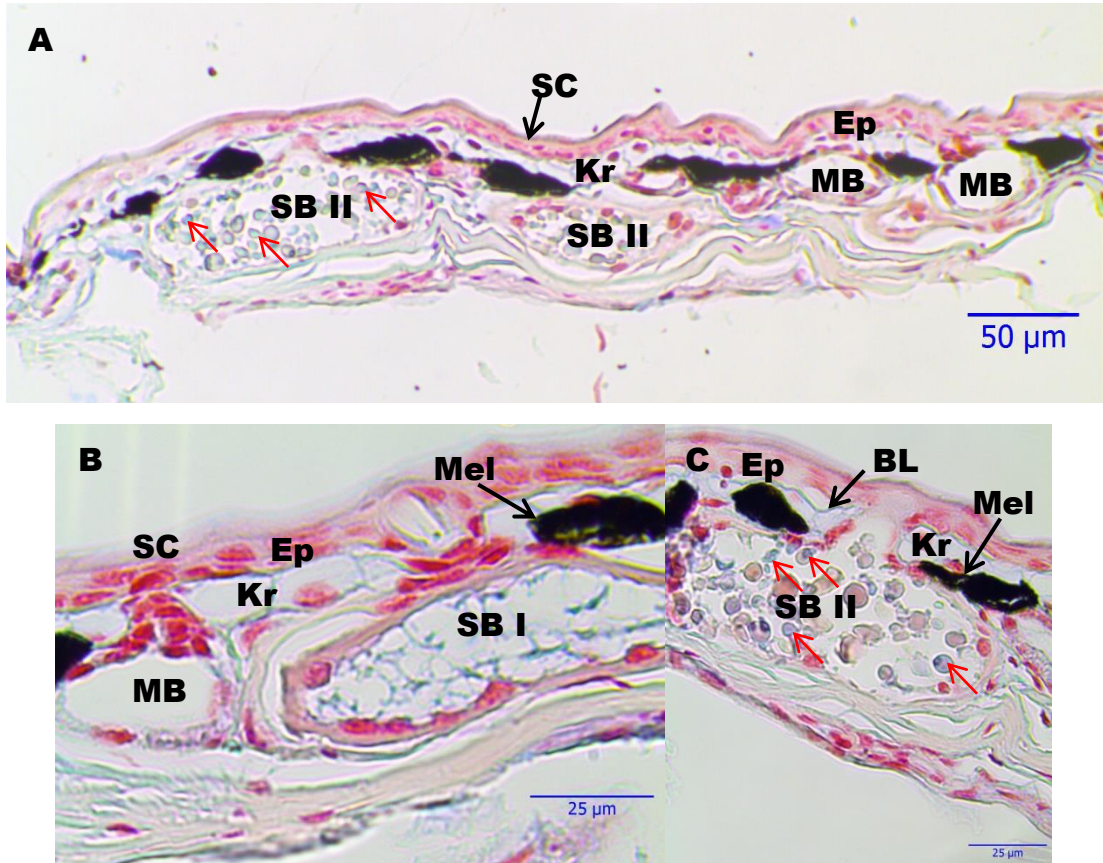
**Şekil 3.18:** *Hyla orientalis* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB I-II: Tip I ve II Seröz bezler, BL: Bazal lamina, Mel: Melanofor, SC: Stratum korneum, SK: Stratum kompaktum. H&E, Bar 25 µm, 40x.

Müköz bezlerin mediyal ve bazal bölgeleri PAS pozitif reaksiyon gösterirken (Şekil 3.19B), AB pH 2,5 ve AB pH 1 reaksiyonu gözlenmemektedir (Şekil 3.20A ve 3.21A). Benzer şekilde MTK negatif özellik gösteren müköz bezlerin çevresindeki kollajen fibriller ise pozitif reaksiyon vermektedir (Şekil 3.22A).

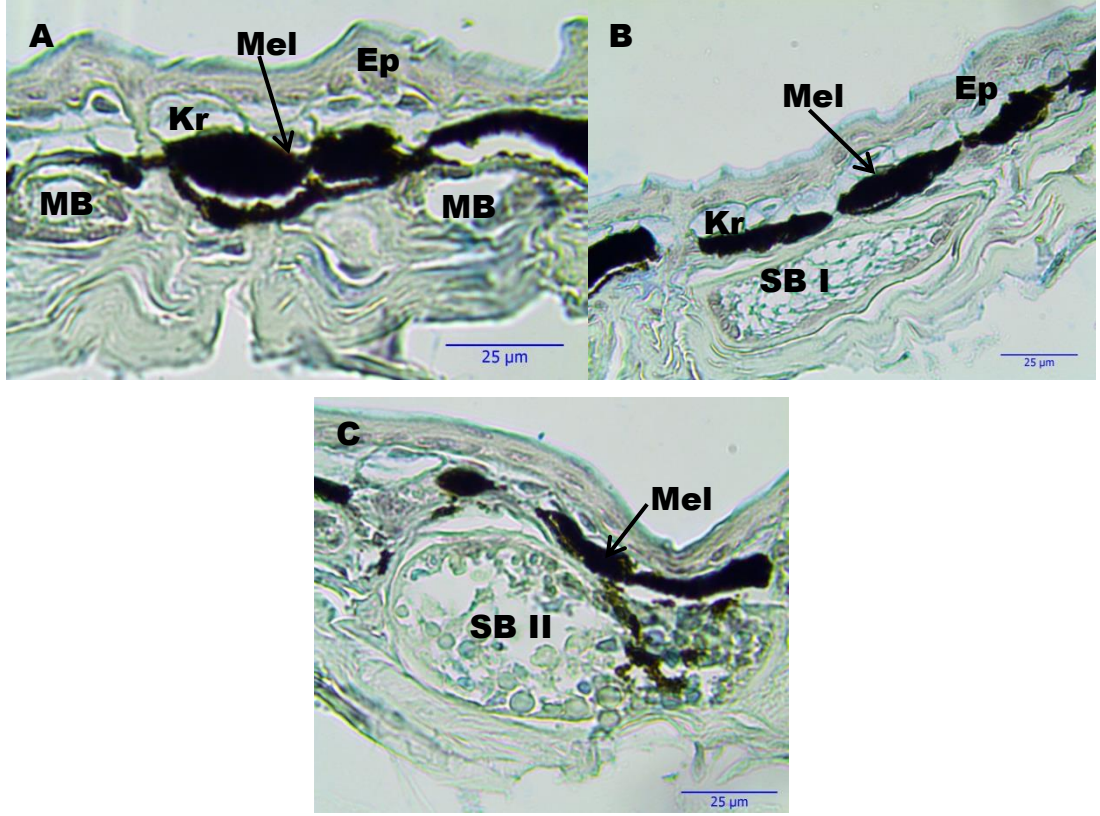
Tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki farklı yapıda gözlenen seröz bez hücreleri ve miyofibriller PAS pozitif reaksiyon vermekle birlikte, yalnızca seröz salgı hem PAS (Şekil 3.19A ve 3.19C) hem de AB pH 2,5 pozitif özellik göstermektedir (Şekil 3.20A ve 3.20C). Seröz bezlerin AB pH 1 reaksiyonu ise çok zayıftır (Şekil 3.21B ve 3.21C). Benzer şekilde MTK boyamada seröz salgı oldukça zayıf bir reaksiyon göstermekte iken, bezlerin çevresinde konumlanmış olan kollajen MTK boyamaya kuvvetli tepki vermektedir (Şekil 3.22B ve 3.22C).



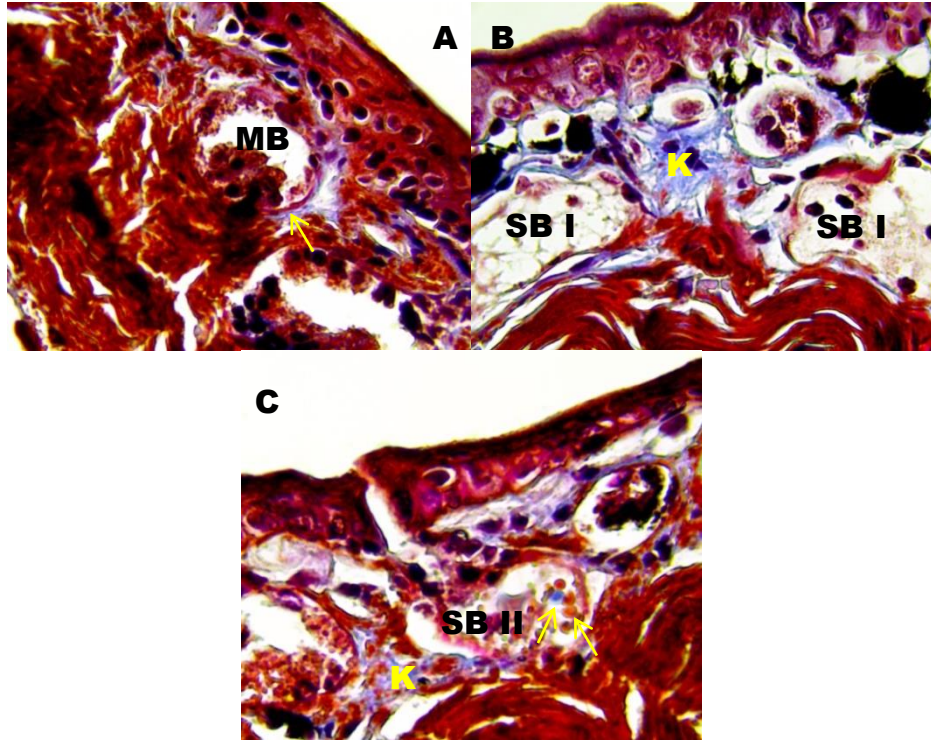
Şekil 3.19: *Hyla orientalis* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB II: Tip II Seröz bez, Mel: Melanofor, Kr: Kromatoforlar. AB pH 2,5-PAS, PAS Pozitif reaksiyon (→), PAS pozitif miyofibriller (→), PAS pozitif seröz salgı (→), Bar A: 50 µm, 10x. B-C: 25 µm, 40x.



Şekil 3.20: *Hyla orientalis* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB I-II: Tip I ve II Seröz bezler, Mel: Melanofor, SC: Stratum korneum, Kr: Kromatoforlar. AB pH 2,5, AB-pozitif reaksiyon (→), Bar A: 50 µm, 10x. B-C: 25 µm, 40x.



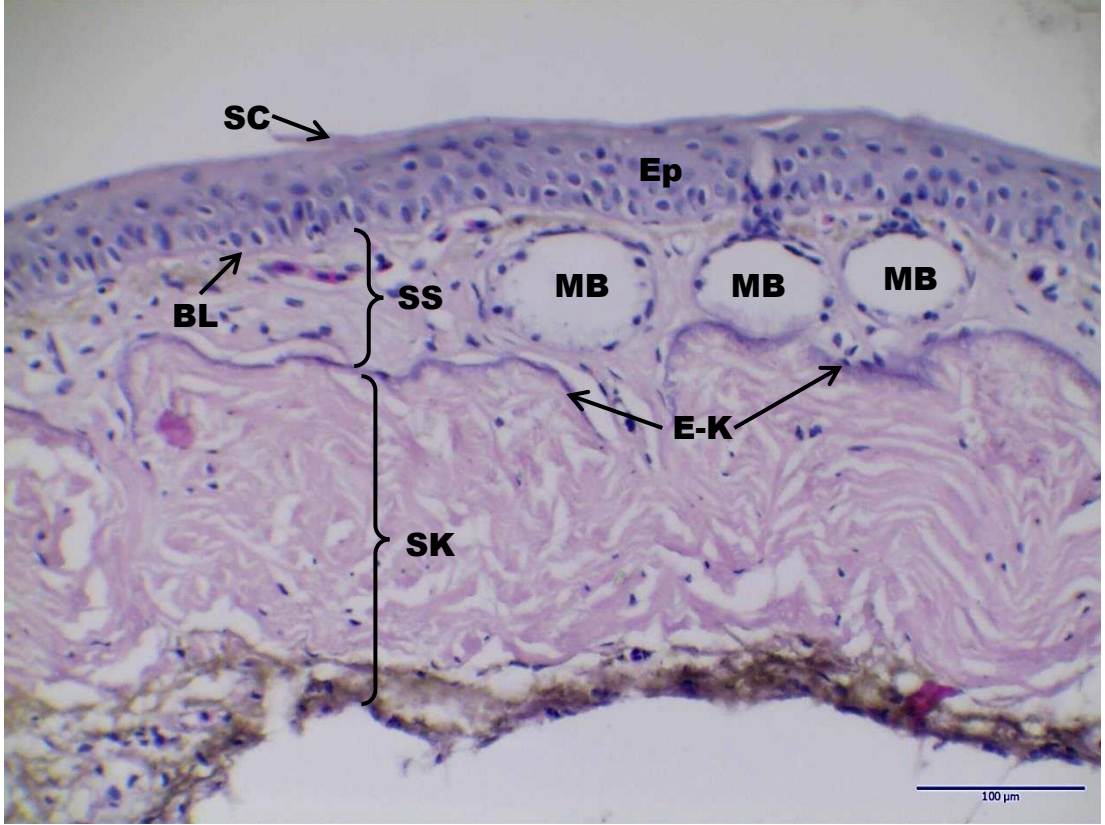
Şekil 3.21: *Hyla orientalis* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB I-II: Tip I ve II Seröz bezler, Mel: Melanofor, Kr: Kromatoforlar. AB pH 1, Bar A-B-C: 25 µm, 40x.



Şekil 3.22: *Hyla orientalis* ergin deri enine kesiti. MB: Müköz Bez, SB I-II: Tip I ve II Seröz bezler. MTK, pozitif reaksiyon (→), 40x.

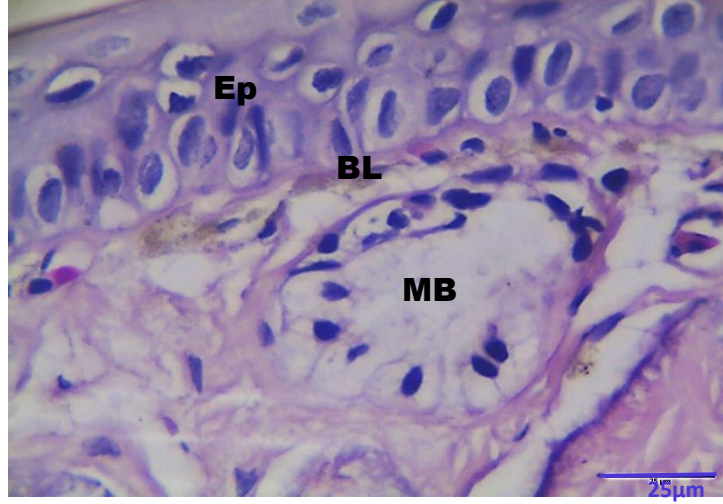
### 3.1.1.4 *Pelophylax bedriagae*

*Pelophylax bedriagae* ergin bireylerinde epiderminin, yaşa bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte, ortalama 5-8 hücre sırasından meydana geldiği belirlenmiştir. Stratum korneumun oldukça ince, bazal laminanın ise oldukça belirgin yapıda olduğu gözlenmiştir. Stratum spongiosum ile stratum kompaktum arasında yer alan Eberth-Katschenko tabakası, bu iki tabakayı birbirinden ayırmaktadır. AB pH 1 dışındaki tüm boyamalarda pozitif reaksiyon gösteren Eberth-Katschenko tabakası oldukça belirgin bir yapıya sahiptir (Şekil 3.23, 3.25, 3.26 ve 3.29). Müköz bezler stratum basalenin hemen altında yer almaktadır (Şekil 3.23 ve 3.24). Seröz bezler ise bazal membranın ventralinden stratum kompaktum sınırına kadar uzanabilmektedir (Şekil 3.25).



**Şekil 3.23:** *Pelophylax bedriagae* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, BL: Bazal lamina, SC: Stratum korneum, SS: Stratum spongiosum, SK: Stratum kompaktum, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. H&E, Bar 100 µm, 10x.





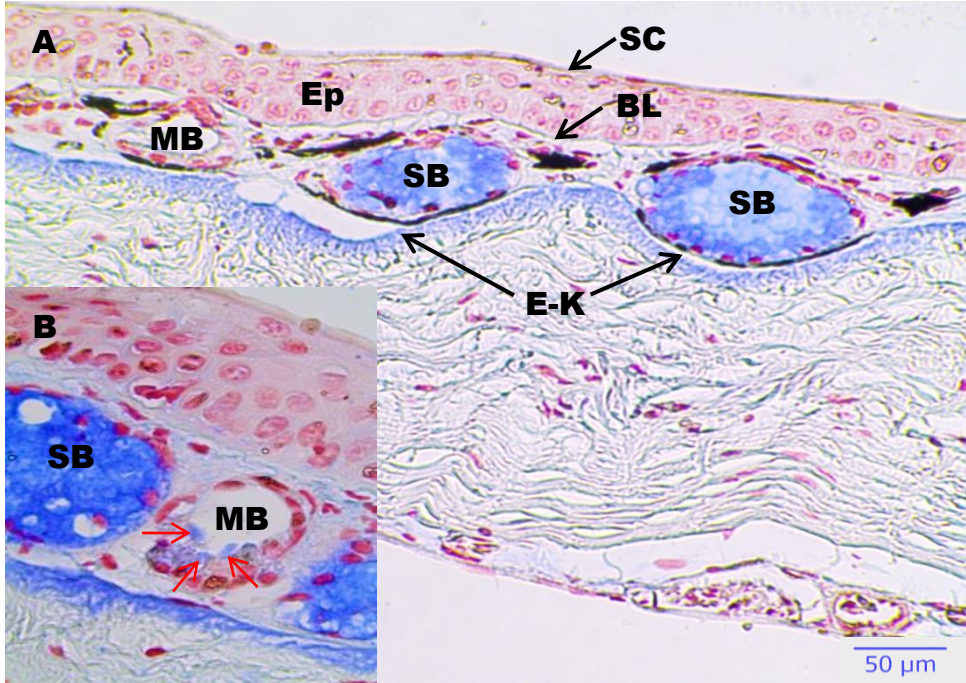
**Şekil 3.24:** *Pelophylax bedriagae* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, BL: Bazal lamina. H&E, Bar 25 µm, 40x.

Müköz bezler, epidermisin hemen altında kübik epitel hücrelerden meydana gelen basit bezler olarak gözlemlenmişlerdir. Müköz bezlerde, özellikle salgı epitel hücrelerinin apikal bölgelerinde, kuvvetli PAS pozitif reaksiyon gösterilmiştir. Müköz bez miyoepiteli de PAS pozitif özellikte olmakla birlikte, müköz bezin bazal kısmında yer alan salgı hücrelerinde gözlenen PAS pozitif sonuçlar yer yer tüm hücreyi kapsamaktadır (Şekil 3.25). AB pH 2,5 için yalnızca bazal bölgede yer alan salgı hücrelerinin apikal kısımlarında pozitif reaksiyon gözlenmekte iken (Şekil 3.26B), AB pH 1 ve MTK boyamalarda ise herhangi bir reaksiyon gerçekleşmemiştir (Şekil 3.27 ve 3.29). Müköz bezlerin salgıları suda çözünebildiklerinden doku takibi esnasında ortadan kalkar, dolayısıyla asinusları ekseriyetle boş olarak gözlendiğinden müsin göstermekte sıklıkla kullanılan MTK boyanma pozitif reaksiyon göstermemiştir (Şekil 3.29).

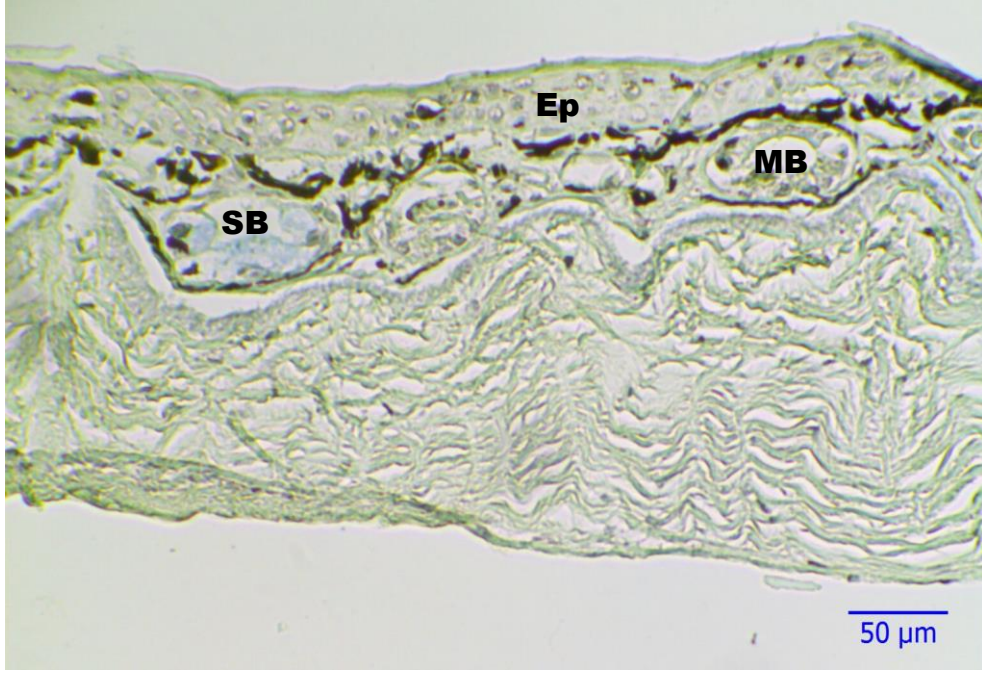
Seröz bezlerin müköz bezlere oranla çok daha geniş bir alan kapladıkları gözlenmiştir. Kollajen fibriller bakımından zengin stratum spongiosum içinde stratum kompaktuma kadar uzanan seröz bezlerin miyoepitellerinin PAS pozitif ancak MTK negatif oldukları belirlenmiştir (Şekil 3.25 ve 3.29). Seröz bezlerin asinusları ise AB pH 2,5 ve 1 pozitif olmakla birlikte granüler salgı materyali barındıran seröz bezlerin AB pH 1 negatif özellik gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 3.26, 3.27 ve 3.28).



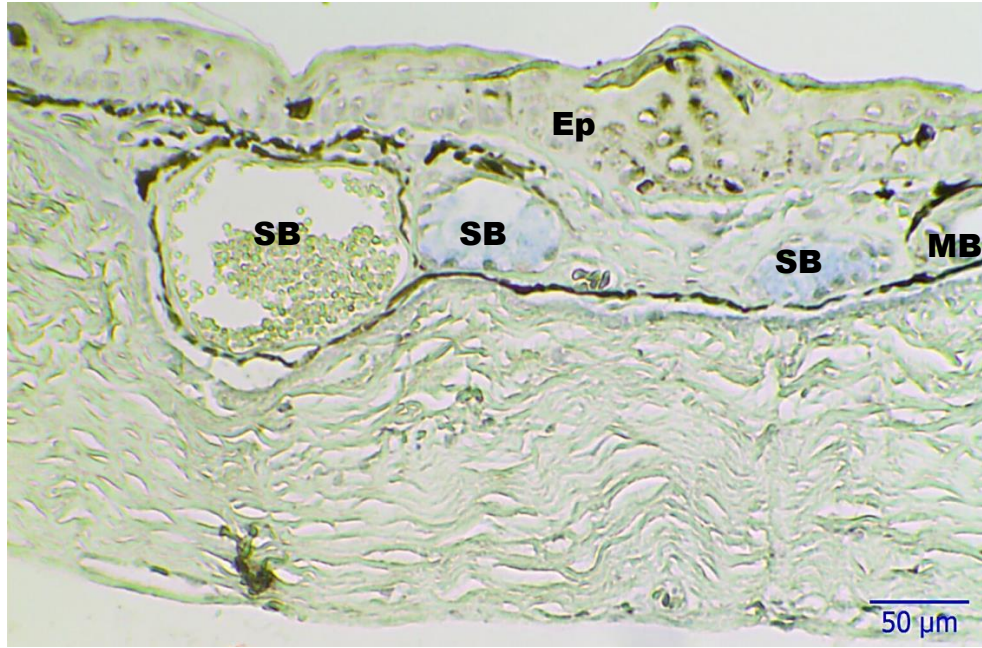
Şekil 3.25: *Pelophylax bedriagae* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez, BL: Bazal lamina, SC: Stratum korneum, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. AB pH 2,5-PAS, PAS Pozitif reaksiyon (→), PAS pozitif miyoepitel (→), Bar 50 µm, 10x.



Şekil 3.26: *Pelophylax bedriagae* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez, BL: Bazal lamina, SC: Stratum korneum, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. AB pH 2,5, AB-pozitif reaksiyon (→), A: Bar 50 µm, 10x, B: 40x.



**Şekil 3.27:** *Pelophylax bedriagae* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez. AB pH 1, Bar 50 µm, 10x.



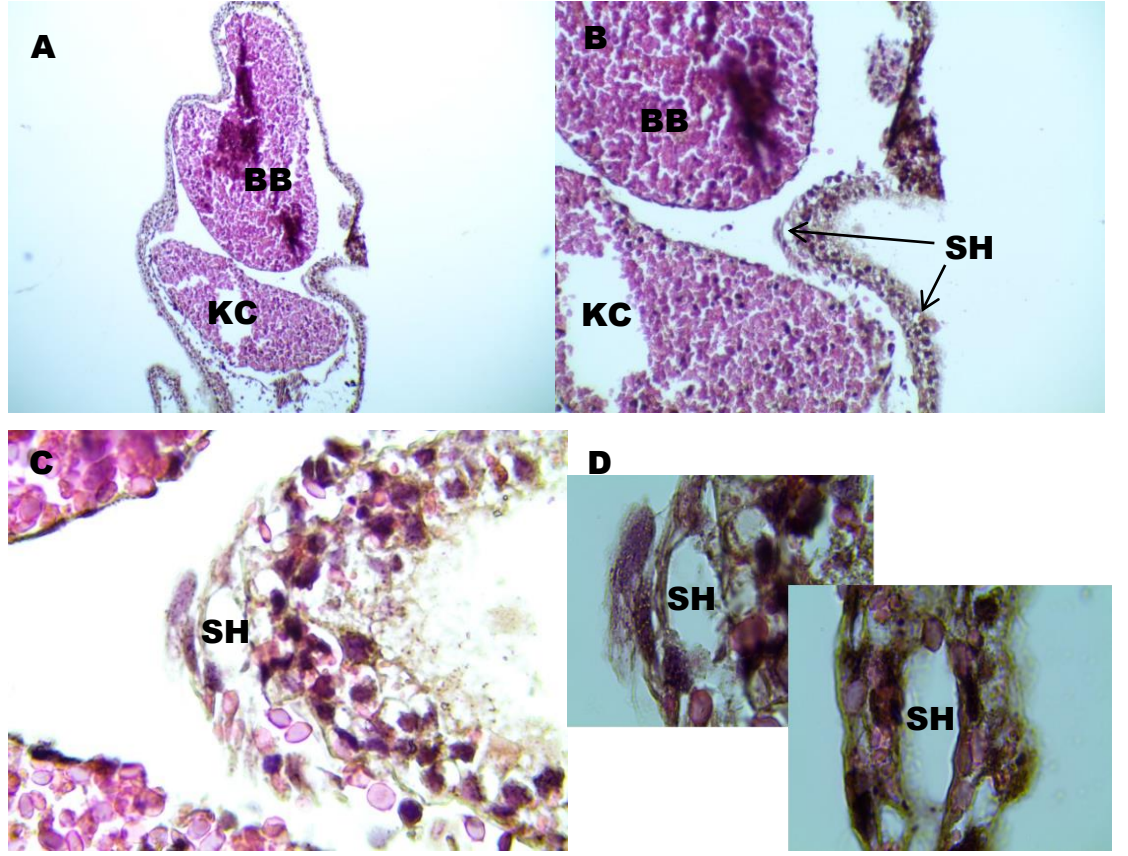
**Şekil 3.28:** *Pelophylax bedriagae* ergin deri enine kesiti. Ep: Epidermis, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez. AB pH 1, Bar 50 µm, 10x.



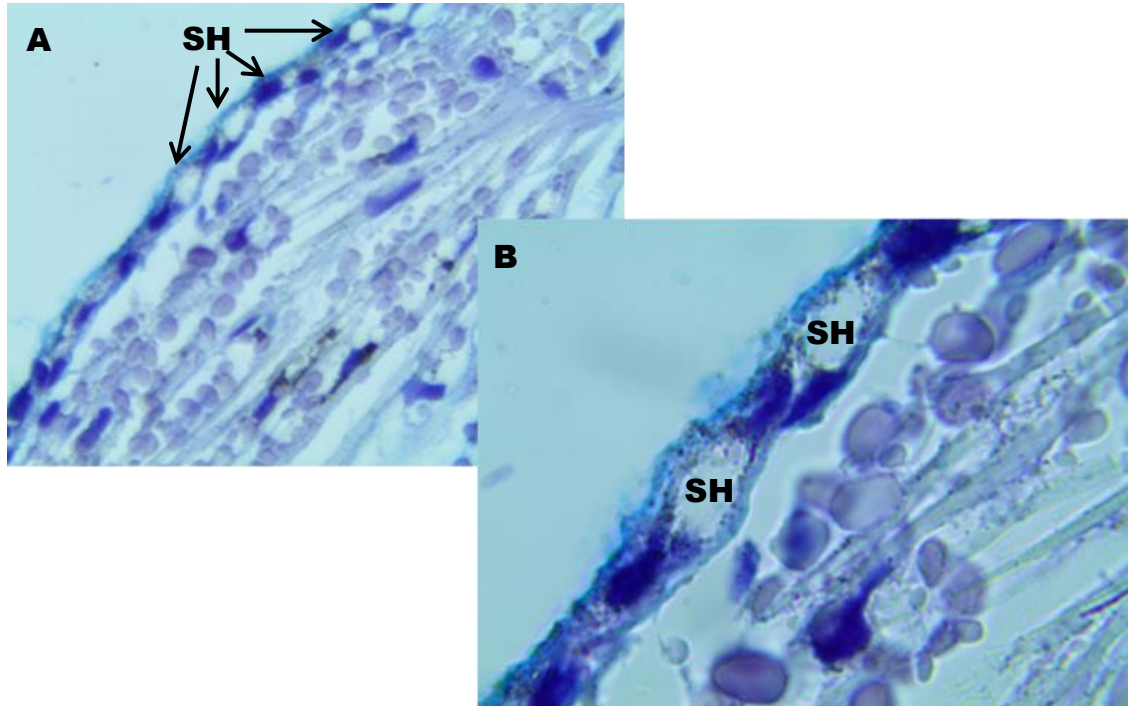
Şekil 3.29: *Pelophylax bedriagae* ergin deri enine kesiti. MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez. MTK, pozitif reaksiyon (→), Bar 50 µm, 10x.

#### 3.1.1.4.1 Larval Bireyler:

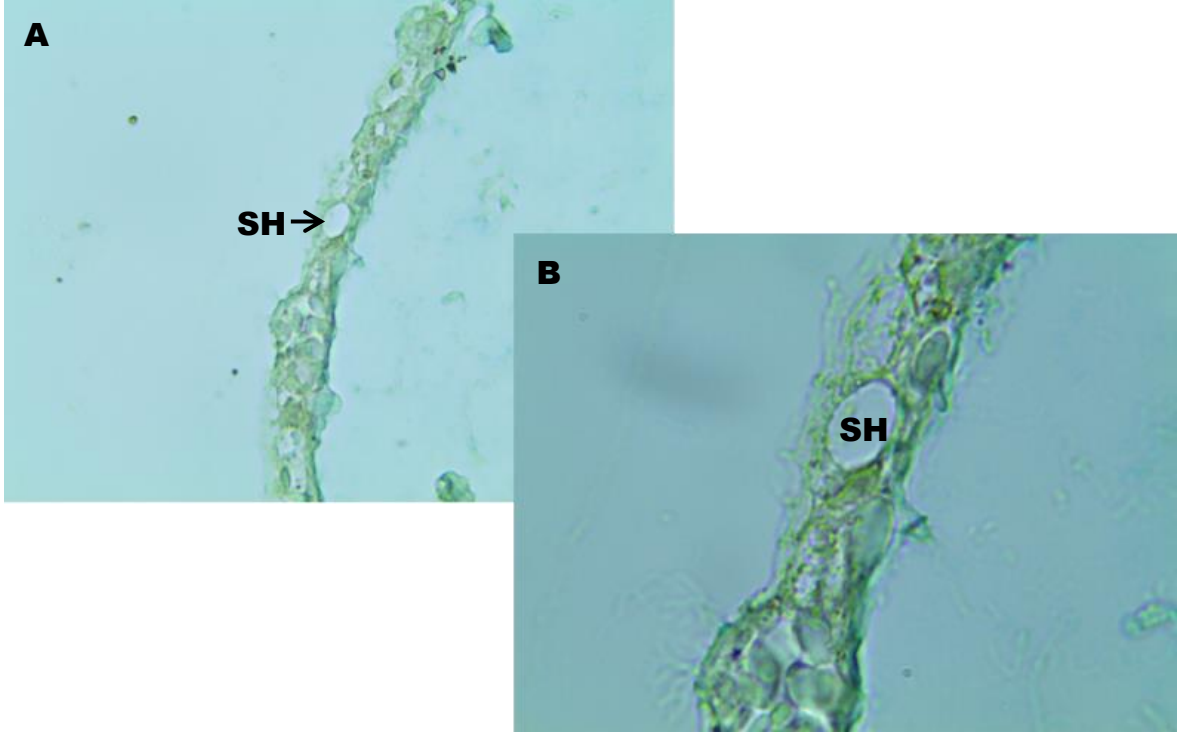
*Pelophylax bedriagae* larvalarında (GS 26-28) deri, *B. viridis* larvalarına nazaran daha az miktarda salgı hücrelerine sahiptir. Müköz-Seröz ayrımı henüz yapılamayan taslak şeklindeki söz konusu hücreler, apikal bölgelerinde AB pH 2,5 ile pozitif reaksiyon göstermekte iken AB pH 1, PAS ve MTK negatiftirler (Şekil 3.29, 3.30, 3.31 ve 3.32).



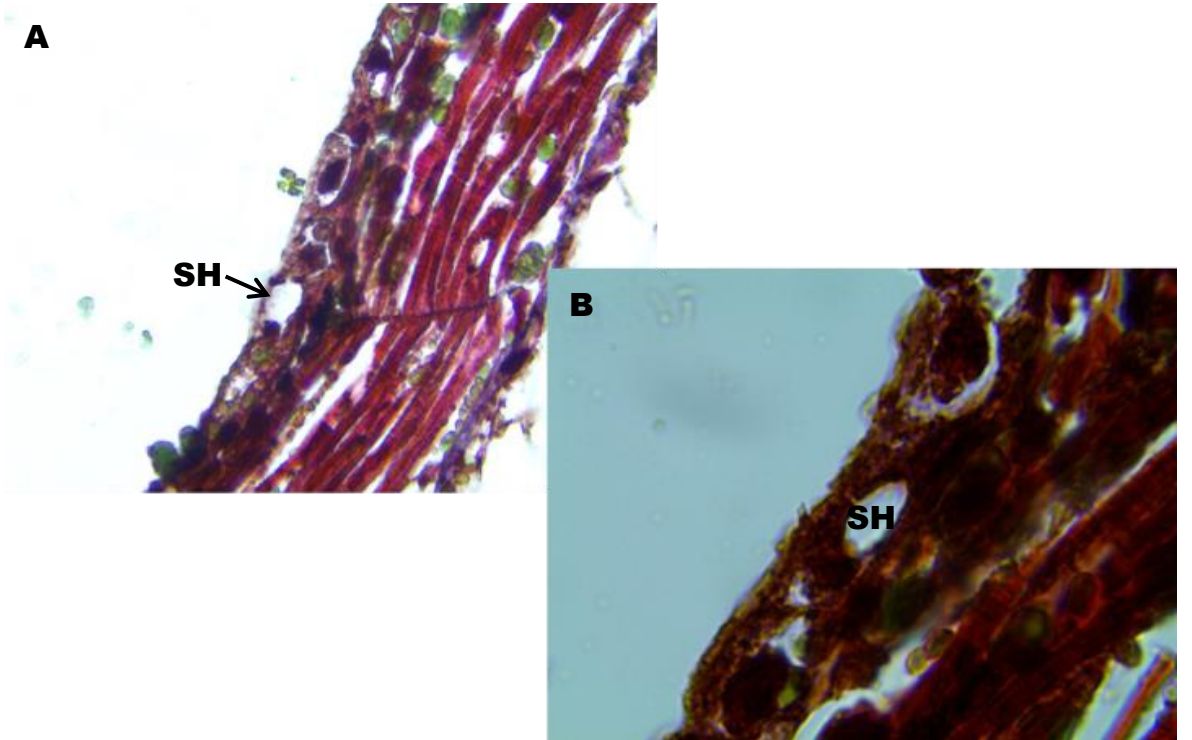
Şekil 3.30: *Pelophylax bedriagae* larva enine kesiti. BB: Bağırsak boşluğu, KC: Karaciğer taslağı, SH: Salgı Hücresi. H&E, A:4x, B:10x, C:40x, D:100x.



Şekil 3.31: *Pelophylax bedriagae* larva enine kesiti. SH: Salgı Hücresi. AB pH 2,5-PAS, A:40x, B:100x.



Şekil 3.32: *Pelophylax bedriagae* larva enine kesiti. SH: Salgı Hücresi. AB pH 1, A: 40x, B: 100x.



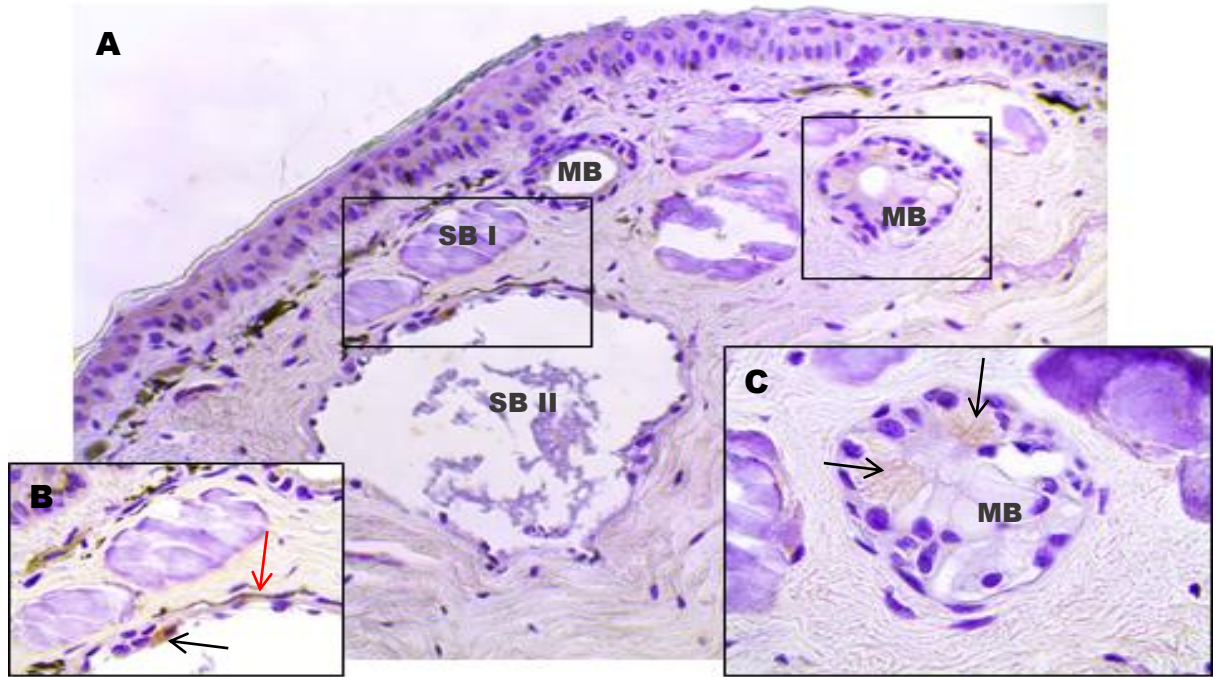
Şekil 3.33: *Pelophylax bedriagae* larva enine kesiti. SH: Salgı Hücresi. MTK, A: 40x, B: 100x.

### 3.1.2 İmmünohistokimyasal Bulgular

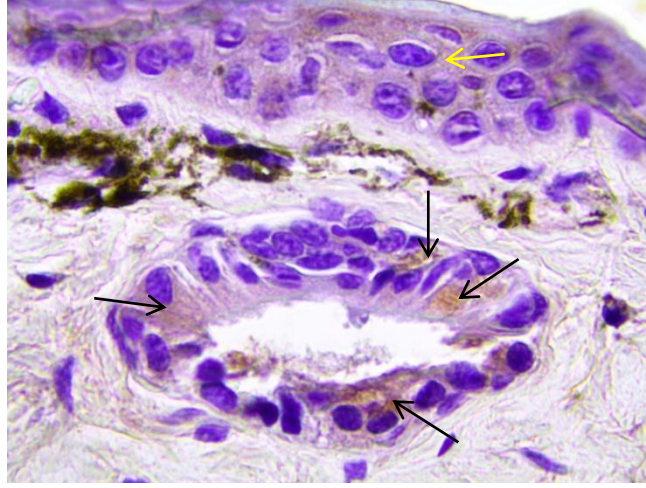
Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, farklı dokular ve bezler arasında az yoğun ve yoğun immünopozitif reaksiyonlar ayırt edilmiştir.

#### 3.1.2.1 *Bufo bufo*

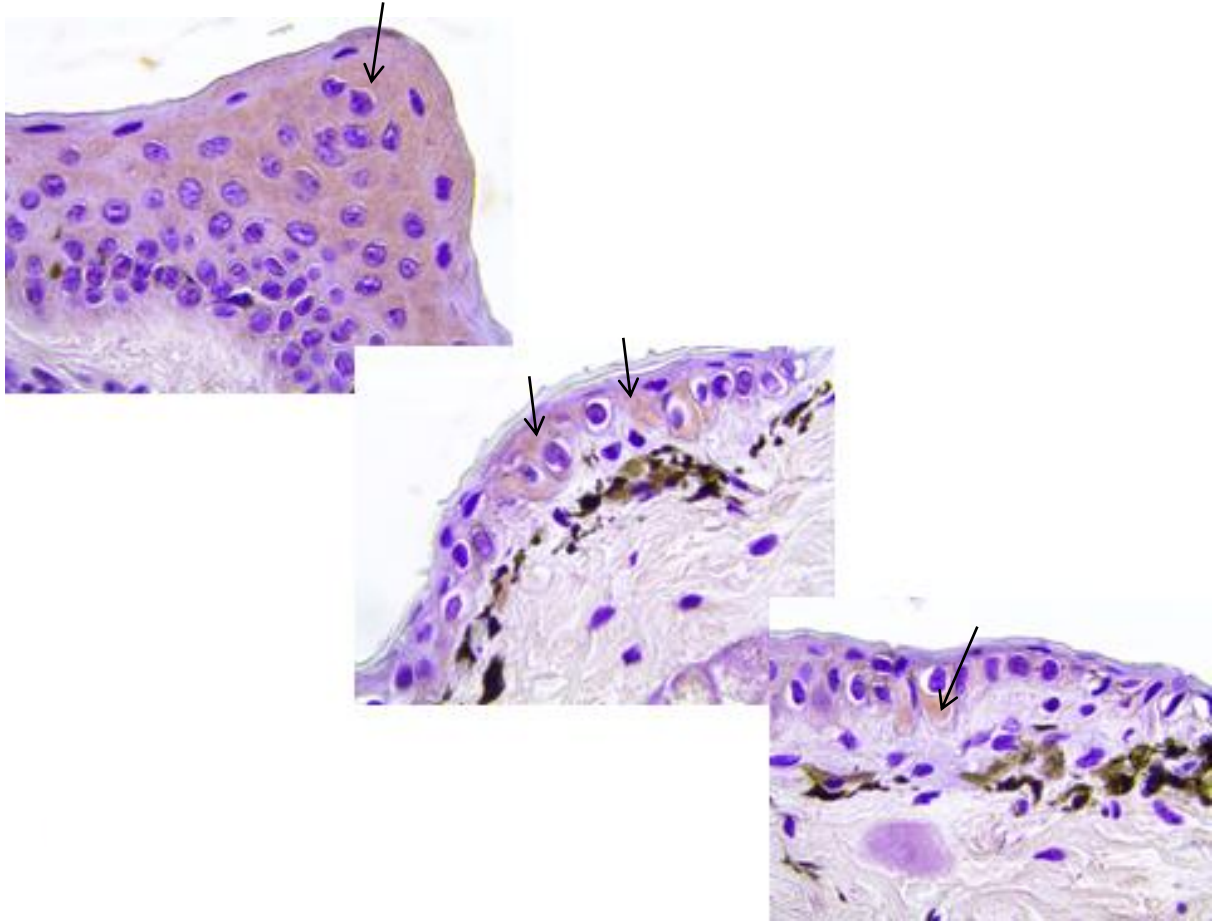
Müköz bez hücreleri serotonin immünoreaktivite göstermektedir. Müköz bez miyoepiteli ise serotonin immünonegatifdir (Şekil 34C). Seröz bez hücrelerinde yer yer çok yoğun olarak belirlenen immünopozitif reaksiyon, miyoepitel hücreler içinse az yoğun olarak gözlenmiştir (Şekil 3.34B). Epidermis germinal tabaka hariç tüm tabakalarda (stratum korneum, stratum granulosum ve stratum spinosum) serotonin immünopozitif görülmektedir (Şekil 3.35 ve 3.36).



**Şekil 3.34:** *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti, SB I-II: Tip I ve II Seröz bezler, MB: Müköz bez. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Bez hücresi immünopozitif reaksiyon (→), Miyoepitel immünopozitif reaksiyon (→), A:10 x, B-C: 40 x.



**Şekil 3.35:** *Bufo bufo* ergin deri enine kesiti. Müköz bez. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Bez hücresi immünopozitif reaksiyon (→), Epidermis immünopozitif reaksiyon (→), 40x.

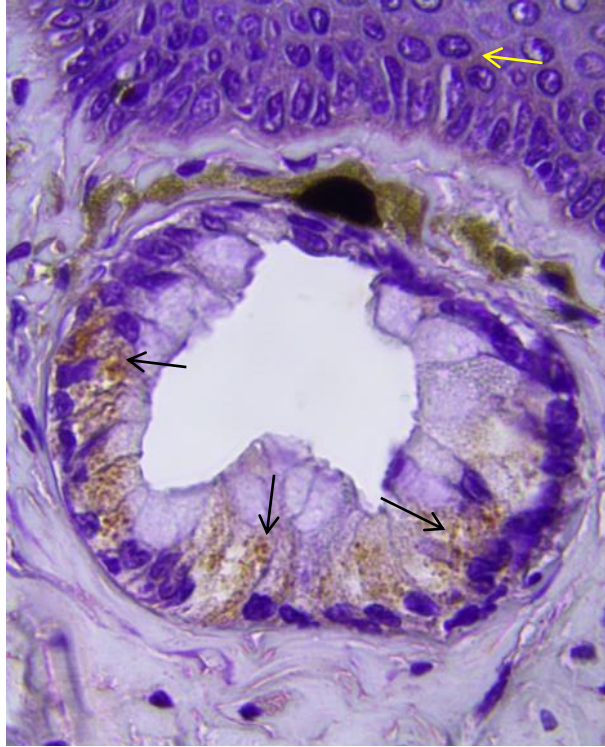


**Şekil 3.36:** *Bufo bufo* ergin deri epidermis enine kesiti. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği. Epidermis immünopozitif reaksiyon (→), 40x.

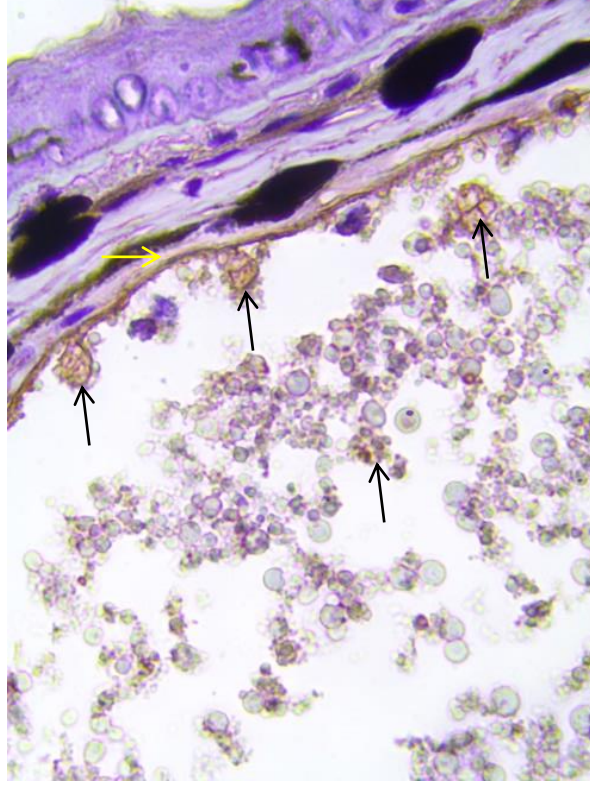


### 3.1.2.2 *Bufo viridis*

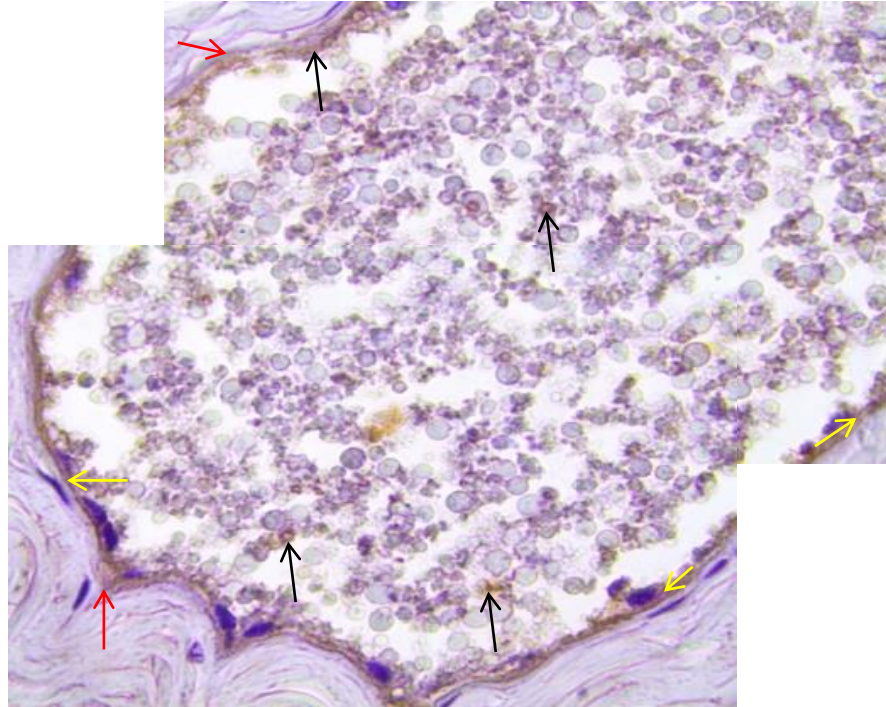
Müköz bezlerin özellikle mediyal ve bazal kısımları çok yoğun serotonin immünoaktif olarak gözlenmiştir (Şekil 3.37). Seröz bezlerin ise hem miyoepitel hücrelerinde hem seröz bez epitelinde hem de seröz salgının kendisinde yoğun serotonin immünoaktivite gösterdiği gözlenmektedir (Şekil 3.37, 3.38 ve 3.39). Epitel tabakada görülen boyanma da serotonin immünoaktif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.37).



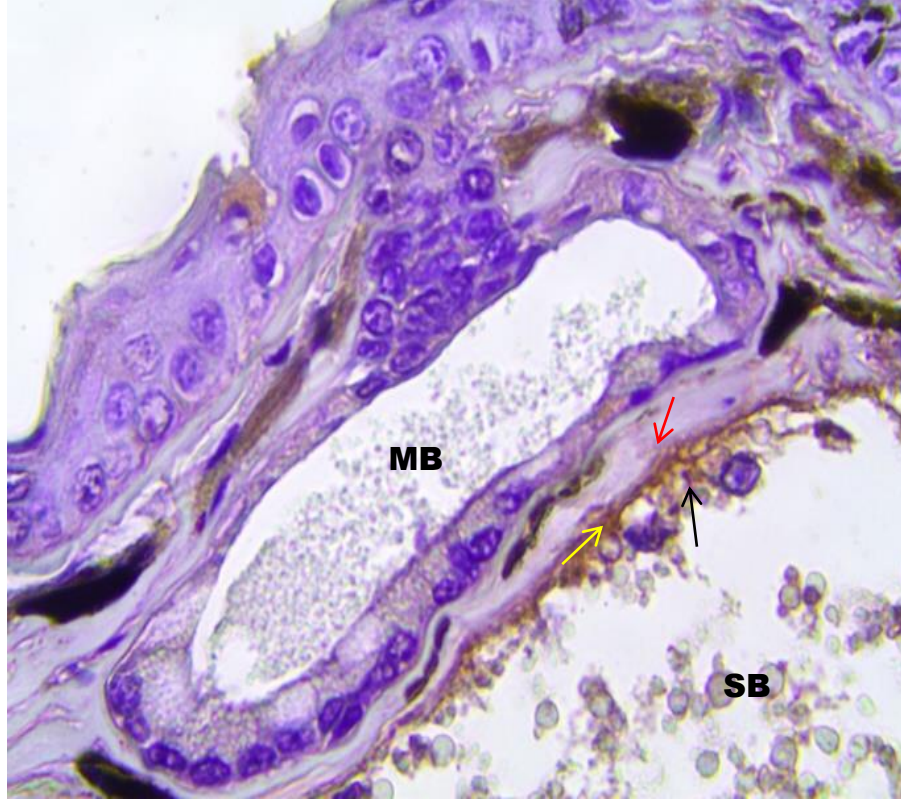
**Şekil 3.37:** *Bufo viridis* ergin deri enine kesiti. Müköz bez. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Bez hücresi immünoaktif reaksiyon (→), Epitel tabaka immünoaktif reaksiyon (→), 40x.



**Şekil 3.38:** *Bufotes viridis* ergin deri enine kesiti. Seröz bez. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Salgı immünopozitif reaksiyon (→), Bez epiteli immünopozitif reaksiyon (→), 40x.



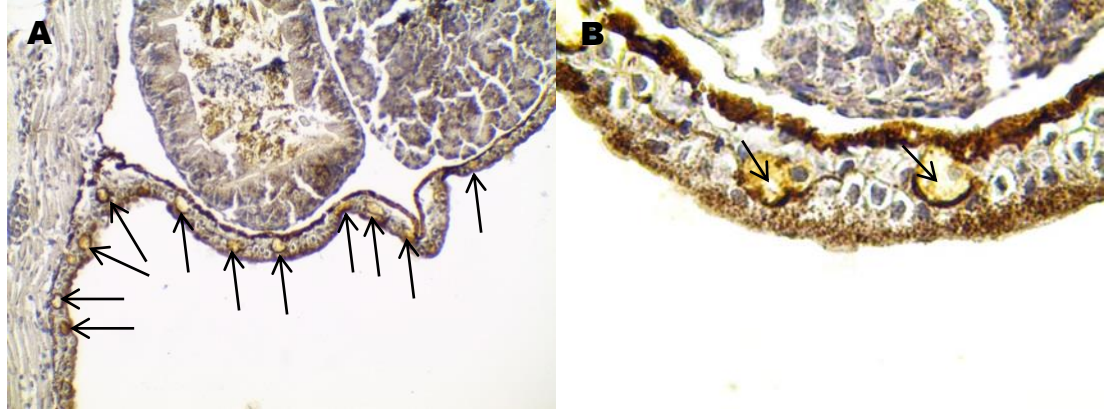
**Şekil 3.39:** *Bufotes viridis* ergin deri enine kesiti. Seröz bez. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Salgı immünopozitif reaksiyon (→), Bez epiteli immünopozitif reaksiyon (→), Miyoepitel immünopozitif reaksiyon (→), 40x.



**Şekil 3.40:** *Bufo viridis* ergin deri enine kesiti. Müköz ve Seröz bez. Streptavidin-Biyotin kompleksi tekniği, MB: Müköz Bez, SB: Seröz Bez. Salgı immünopozitif reaksiyon (→), Bez epiteli immünopozitif reaksiyon (→), Miyoepitel immünopozitif reaksiyon (→) 40 x.

### 3.1.2.2.1 Larval Bireyler

*Bufo viridis* larvalarında (GS 26-28), epidermis tabakasının hem iç (=bazal) hem de dış (=kaplama) hücrelerinde yoğun şekilde serotonin immünoaktivite gözlenmiştir (Şekil 3.41B). Deri bezi taslaklarında ise söz konusu pozitif immünoaktivite bez taslakları/salgı sinsityumlarında immünopozitifdir (Şekil 3.41A ve 3.41B).

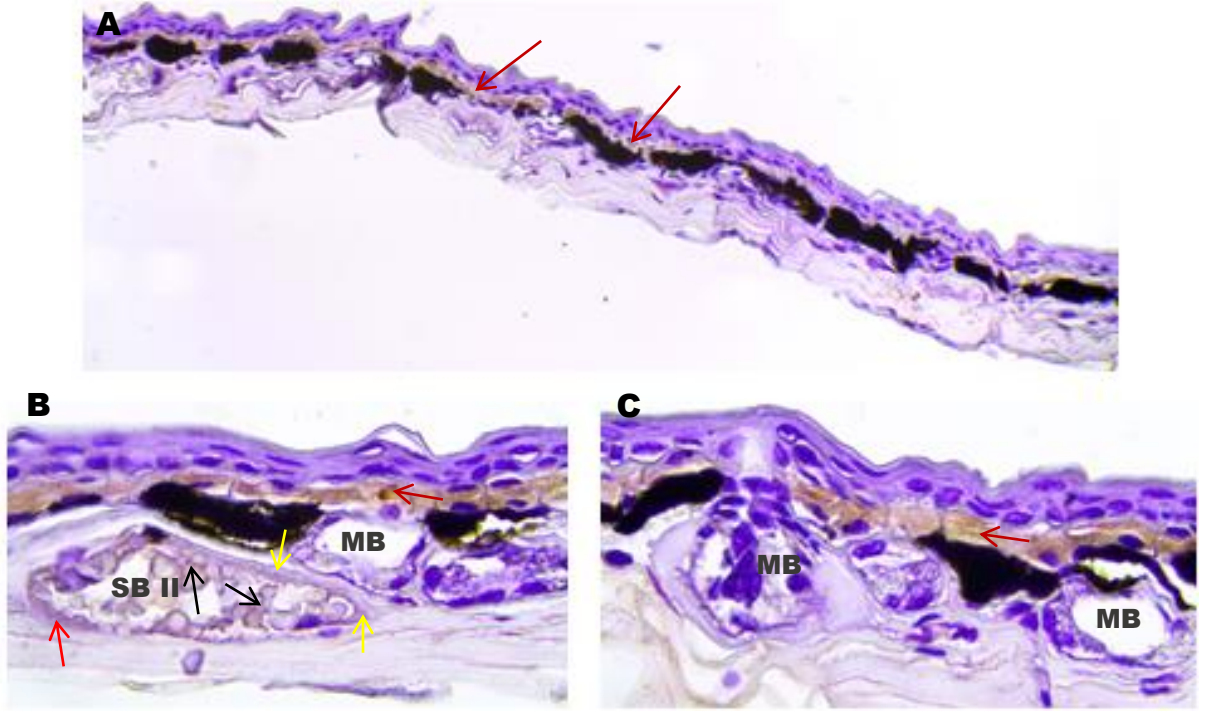


**Şekil 3.41:** *Bufotes viridis* larva deri enine kesiti. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Bez taslakları/salgı sinsityumlarında immünopozitif reaksiyon (→), A: 10x, B: 40 x.

### 3.1.2.3 *Hyla orientalis*

Epidermis ile dermis arasında, bazal laminanın hemen altında pigment hücreleri 3 tabaka halinde sıralanmaktadır. İlk ikisi sırasıyla daha açık renkli bir sitoplazmaya sahip gibi görünen ksantafor ve iridoforlardan meydana gelir. Üçüncü ve en alt tabaka ise koyu renkli melanoforlardan ibarettir. Melanoforların siyaha yakın kahverengi doğaları gereği herhangi bir boyamaya reaksiyon verip vermedikleri gözlenememekle birlikte, diğer 2 pigment tabakasının çok yoğun şekilde serotonin immünopozitif reaksiyon verdiği açıkça görülmektedir (Şekil 3.42A, 3.42B ve 3.42C).

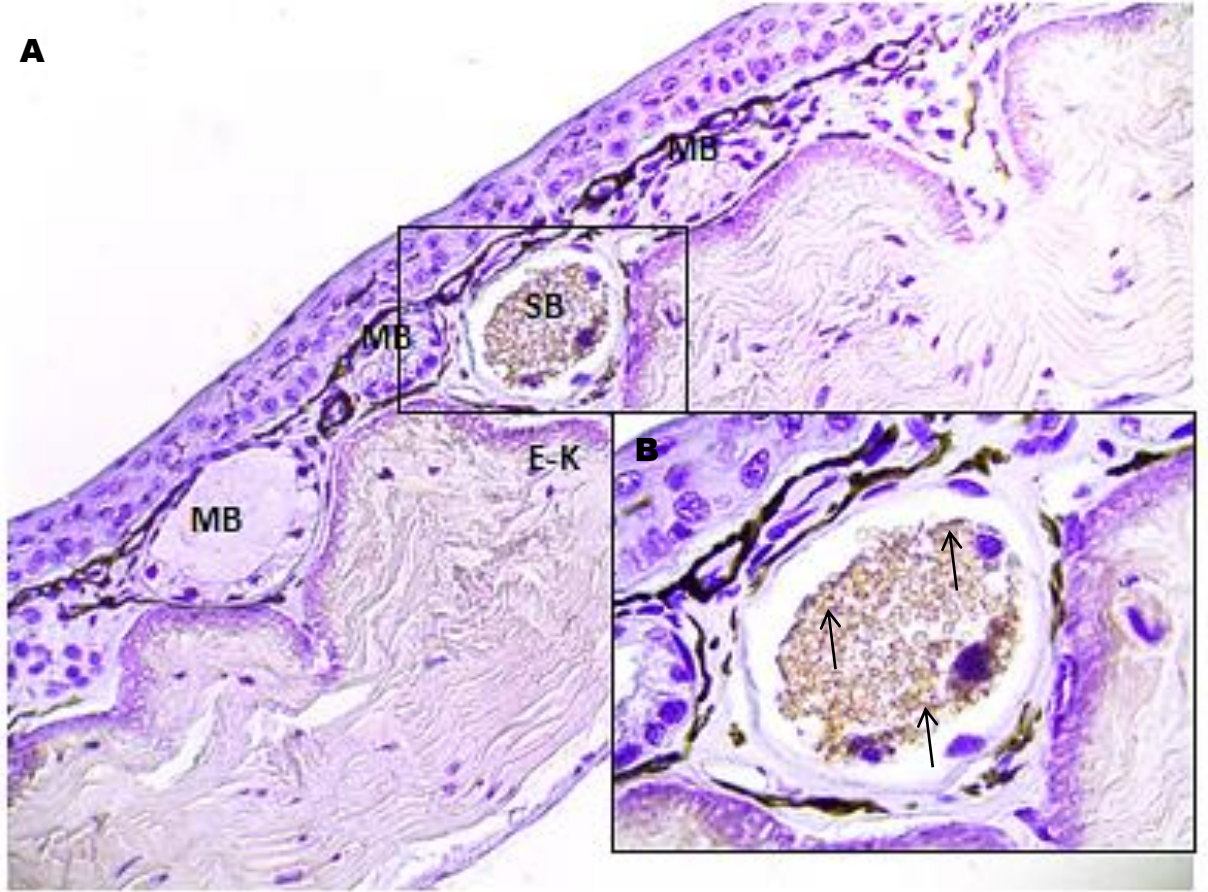
Müköz bezler serotonin immünonegatif iken (Şekil 3.42C) seröz bezlerin miyoepitel tabakaları, bez hücreleri ve salgıları pigment tabakasında gözlenen pozitif cevaba nazaran daha az yoğun olmakla birlikte, serotonin immünopozitif reaksiyon göstermiştir (Şekil 3.42B).



**Şekil 3.42:** *Hyla orientalis* ergin deri enine kesiti. SB II: Tip II Seröz bez, MB: Müköz bez. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Pigment hücreleri immünopozitif reaksiyon (→), Salgı immünopozitif reaksiyon (→), Bez epiteli immünopozitif reaksiyon (→), Mioepitel immünopozitif reaksiyon (→), A: 10 x, B-C: 40x.

#### 3.1.2.4 *Pelophylax bedriagae*

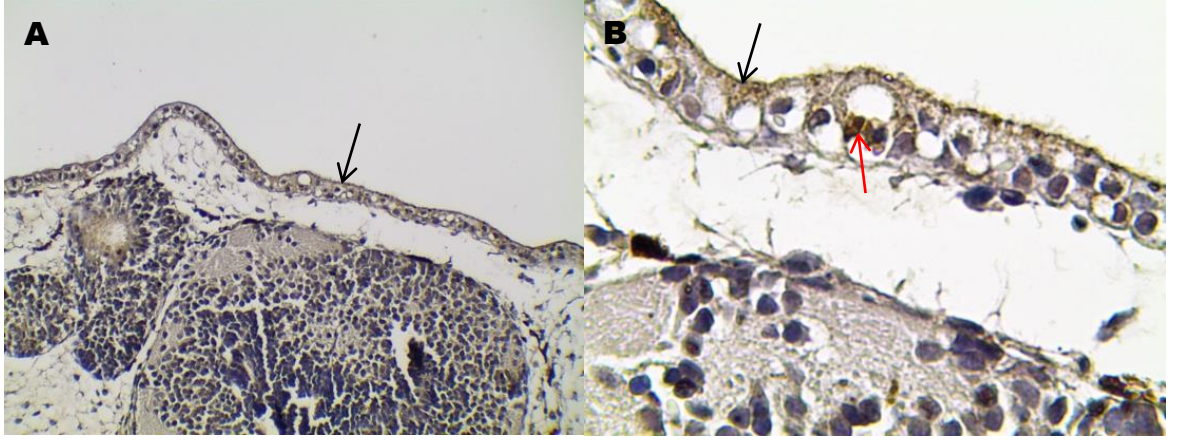
Müköz bezlerde serotonin immünoreaktivite gözlenmez iken, seröz bezlerde ise salgı maddesinin serotonin immünoreaktif olmasına karşın, bez epiteli ve mioepitelin immünoreaktivite göstermediği görülmektedir (Şekil 3.43A ve 3.43B).



**Şekil 3.43:** *Pelophylax bedriagae* ergin deri enine kesiti. MB:Müköz Bez, SB: Seröz Bez, E-K: Eberth-Katschenko tabakası. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Salgı immünopozitif reaksiyon (→), A: 10x, B: 40x.

#### 3.1.2.4.1 Larval Bireyler

*Pelophylax bedriagae* larvalarında (GS 26-28), epidermis tabakasının dış (=kaplama) hücrelerinde yoğun şekilde serotonin immünoreaktivite gözlenmiştir. Ancak iç (=bazal) hücreler herhangi bir serotonin immünoreaktivite göstermemektedir. (Şekil 3.44A ve 3.44B). Deri bezi taslaklarında ise söz konusu pozitif immünoreaktivite, salgı hücre taslaklarının bazal bölgesinde daha yoğun olarak izlenmiştir. Salgı sinsityumları ise serotonin immünonegatif olarak belirlenmiştir (Şekil 3.44B).



**Şekil 3.44:** *Pelophylax bedriagae* larva deri enine deri enine kesiti. Streptavidin-Biyotin kompleks tekniği, Dış (=kaplama) hücrelerin immünopozitif reaksiyonu (→), Bez taslağı immünopozitif reaksiyon (→), A: 10x, B: 40x.

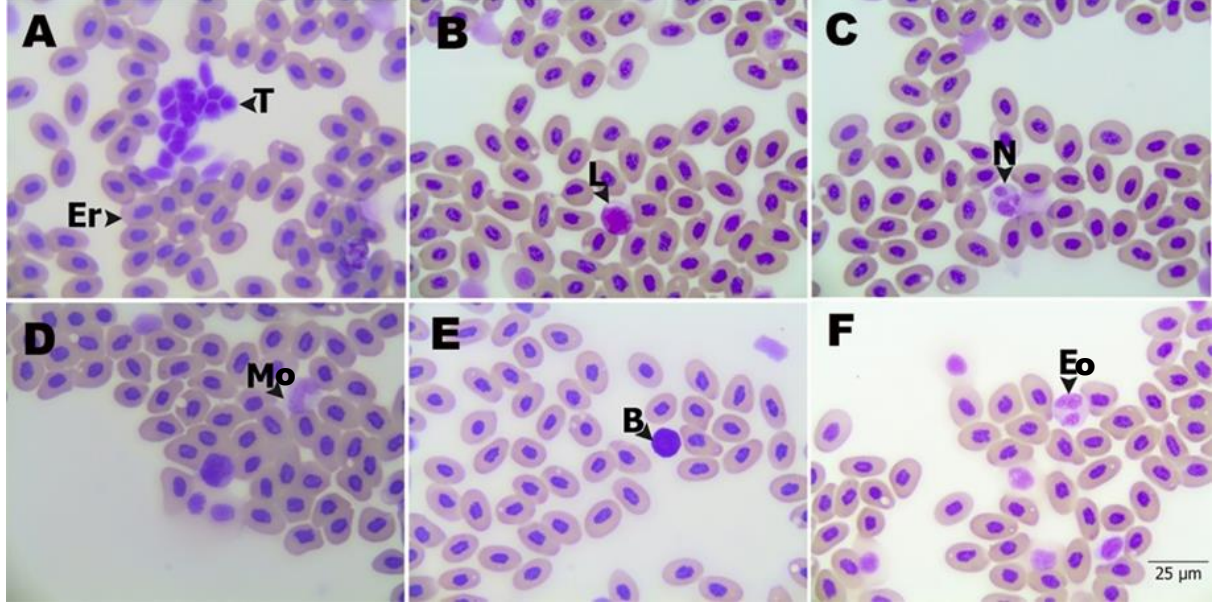
### 3.2 Kan Parametreleri

Arazi çalışmasını takiben ivedi şekilde alınan kan örnekleri ABL 800 radyometre ile analiz edilmiştir. Radyometreye yüklenen kan örnekleri üretici firmanın talimatları doğrultusunda işlenmiş ve alınan veriler istatistiki olarak Minitab 17’de değerlendirilerek karşılaştırılmışlardır. ABL 800 radyometreden elde edilen kan gazı, oksimetri, elektrolit ve metabolit parametreleri Tablo 3.1’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

**Tablo 3.1:** ABL 800 radyometre kan parametreleri

ABL800 RADYOMETRE KAN PARAMETRELERİ		
pH/Kan Gazı	pH	(Power of hydrogen) Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimidir.
	pCO <sub>2</sub>	(Partial pressure of carbon dioxide) Karbondioksitin kısmi basıncı.
	pO <sub>2</sub>	(Partial pressure of oxygen) Oksijenin kısmi basıncı.
Oksimetri	ctHb	(Total hemoglobin concentration) Total hemoglobin konsantrasyonu.
	sO <sub>2</sub>	(Oxygen saturation) Oksijen saturasyonu. Oksijenle doyan Hemoglobin miktarıdır.
	FO <sub>2</sub> Hb	(Fraction of oxyhemoglobin) Oksihemoglobinin total hemoglobine oranıdır.
	FHHb	(Fractional carboxyhemoglobin concentration) Karboksihemoglobinin total hemoglobine oranıdır.
	FMethHb	(Fraction of methemoglobin) Methemoglobinin total hemoglobine oranıdır.
Elektrolitler	cK	(Potassium ion concentration) Potasyum konsantrasyonu.
	cNa	(Sodium ion concentration) Sodyum konsantrasyonu.
	cCa	(Calcium ion concentration) Kalsiyum konsantrasyonu.
	cCl	(Chloride ion concentration) Klorid konsantrasyonu.
Metabolitler	cGlu	(D-glucose concentration) D-Glukoz konsantrasyonu.
	cLac	(L(+)-lactate concentration) L-Laktat konsantrasyonu.

Alınan numunelerden arta kalan örnekler yayma sürtme preparat haline getirilerek kan hücrelerinin tanımlanabilmesi açısından incelenmiştir. Eritrosit, lenfosit, nötrofil, monosit, bazofil, eozinofil ve trombosit hücrelerinden meydana gelen kan dokusunda, belirlenen kan hücrelerinden *B. viridis* türüne ait olanlar Şekil 3.44'de gösterilmiştir.



Şekil 3.45: *Bufo viridis* kan hücreleri. Giemsa boyama (Er) Eritrosit, (T) Trombosit kümesi, (L) Lenfosit, (N) Nötrofil, (Mo) Monosit, (B) Bazofil, (Eo) Eozinofil, 40x.

### 3.2.1 *Bufo bufo*

Karasal bir tür olan *Bufo bufo* örneklerinden yalnızca 4 dişi 4 erkek olmak üzere toplamda 8 adet birey kan parametreleri açısından değerlendirilebilmiştir (Tablo 3.2). Söz konusu örnek sayısı istatistiksel değerlendirmeler yapabilmek için yeterli değildir.

Tablo 3.2: *Bufo bufo* kan numunelerinin ortalama ve standart sapma değerleri

	pH	pCO <sub>2</sub>	pO <sub>2</sub>	ctHb	sO <sub>2</sub>	FO <sub>2</sub> Hb	FHHb	FMetHb	cK	cNa	cCa	cCl	cGlu	cLac
Dişi Ortalama	7,56	26,08	146,75	8,23	84,78	92,45	16,55	2,13	4,30	155,00	1,85	101,75	2,65	5,48
Standart Sapma	0,09	6,53	8,98	1,63	3,90	5,36	4,07	0,93	0,61	45,67	0,83	34,54	0,85	3,02
Erkek Ortalama	7,62	40,83	142,75	7,80	72,20	77,90	30,00	1,00	6,78	191,67	3,70	83,25	0,80	2,20
Standart Sapma	0,25	27,41	17,34	0,40	5,00	5,50	5,40	0,20	2,98	50,15	1,70	15,93	0,50	1,24
Total Ortalama	7,59	33,45	144,75	8,08	80,58	87,60	21,03	1,75	5,54	170,71	2,78	92,50	1,73	3,84
Standart Sapma	0,19	21,24	13,95	1,37	7,32	8,73	7,81	0,93	2,48	50,98	1,63	28,44	1,16	2,83



### 3.2.2 *Bufotes viridis*

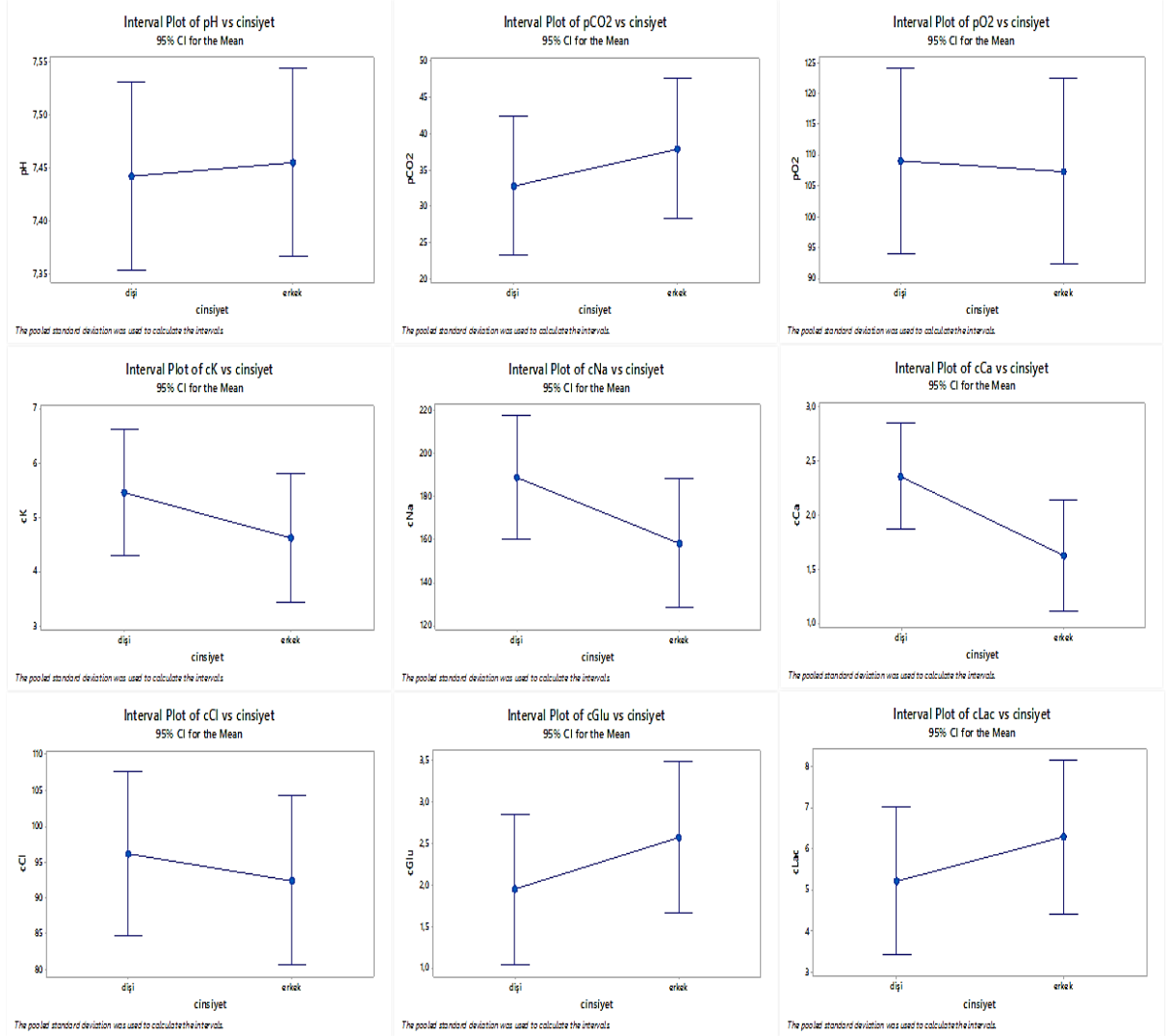
Yapılan istatistiki değerlendirmeler sonucunda, 15 dişi 15 erkek olmak üzere toplamda 30 adet *B. viridis* örneği arasında, cinsiyete bağlı olarak yalnızca cCa parametresi açısından ( $t=-2,30$ ,  $df=20$ ,  $p=0,03$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. Elde edilen veriler cinsiyetin pH, kan gazı ( $pCO_2$ ,  $pO_2$ ), elektrolit (cK, cNa, cCl) ve metabolit (cGlu, cLac) değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadığını göstermiştir ( $p > 0,05$ ), (Tablo 3.3).

**Tablo 3.3:** *Bufotes viridis* kan değerlerinin cinsiyete göre tanımlayıcı istatistikleri ve student t testi değerleri (C: Cinsiyet, N: Örnek sayısı, E: Erkek, D: Dişi).

Parametre	C	N	Min	Max	Ort.	SE	t	sd	Sig.																																																																																																																																																																																																																												
pH	E	15	7,29	7,81	7,46	0,03	-0,26	24	0,80																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	6,98	7,90	7,44	0,05				$pCO_2$ (mmHg)	E	15	8,40	86,40	37,91	5,15	-0,76	26	0,45	D	15	5,20	66,50	32,87	4,18	$pO_2$ (mmHg)	E	15	62,40	152,00	109,31	7,29	-0,02	27	0,98	D	15	61,80	163,00	109,09	7,62	ctHb (g/dl)	E	15	6,60	13,20	10,39	0,63	-0,37	18	0,72	D	15	3,20	16,90	9,97	0,97	sO <sub>2</sub> (g/dl)	E	15	57,20	97,60	79,76	4,70	-0,158	21	0,57	D	15	46,10	96,80	75,89	4,71	FO <sub>2</sub> Hb (g/dl)	E	15	58,10	100,90	77,61	5,89	0,06	16	0,95	D	15	47,30	97,00	78,05	4,72	FHHb (g/dl)	E	15	2,50	43,40	21,00	4,74	0,68	21	0,50	D	15	3,40	57,00	25,79	5,18	FMetHb (g/dl)	E	15	1,00	5,00	2,94	0,41	-1,08	16	0,30	D	15	0,20	4,00	2,24	0,50	cK (mmol/l)	E	15	2,70	6,70	4,39	0,40	1,46	23	0,16	D	15	1,30	9,70	5,45	0,62	cNa (mmol/l)	E	15	100,00	234,00	158,20	12,50	1,54	26	0,14	D	15	103,00	301,00	189,10	15,60	cCa (mmol/l)	E	15	1,00	2,72	1,60	0,15	2,30	20	0,03*	D	15	1,01	4,56	2,36	0,30	cCl (mmol/l)	E	15	46,00	126,00	92,50	5,16	0,47	26	0,65	D	15	54,00	151,00	96,20	6,04	cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	15	14,10	37,10	26,01	2,52	-1,14	18	0,27	D	15	6,70	34,00	21,94	2,52	cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40	cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15
$pCO_2$ (mmHg)	E	15	8,40	86,40	37,91	5,15	-0,76	26	0,45																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	5,20	66,50	32,87	4,18				$pO_2$ (mmHg)	E	15	62,40	152,00	109,31	7,29	-0,02	27	0,98	D	15	61,80	163,00	109,09	7,62	ctHb (g/dl)	E	15	6,60	13,20	10,39	0,63	-0,37	18	0,72	D	15	3,20	16,90	9,97	0,97	sO <sub>2</sub> (g/dl)	E	15	57,20	97,60	79,76	4,70	-0,158	21	0,57	D	15	46,10	96,80	75,89	4,71	FO <sub>2</sub> Hb (g/dl)	E	15	58,10	100,90	77,61	5,89	0,06	16	0,95	D	15	47,30	97,00	78,05	4,72	FHHb (g/dl)	E	15	2,50	43,40	21,00	4,74	0,68	21	0,50	D	15	3,40	57,00	25,79	5,18	FMetHb (g/dl)	E	15	1,00	5,00	2,94	0,41	-1,08	16	0,30	D	15	0,20	4,00	2,24	0,50	cK (mmol/l)	E	15	2,70	6,70	4,39	0,40	1,46	23	0,16	D	15	1,30	9,70	5,45	0,62	cNa (mmol/l)	E	15	100,00	234,00	158,20	12,50	1,54	26	0,14	D	15	103,00	301,00	189,10	15,60	cCa (mmol/l)	E	15	1,00	2,72	1,60	0,15	2,30	20	0,03*	D	15	1,01	4,56	2,36	0,30	cCl (mmol/l)	E	15	46,00	126,00	92,50	5,16	0,47	26	0,65	D	15	54,00	151,00	96,20	6,04	cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	15	14,10	37,10	26,01	2,52	-1,14	18	0,27	D	15	6,70	34,00	21,94	2,52	cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40	cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93												
$pO_2$ (mmHg)	E	15	62,40	152,00	109,31	7,29	-0,02	27	0,98																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	61,80	163,00	109,09	7,62				ctHb (g/dl)	E	15	6,60	13,20	10,39	0,63	-0,37	18	0,72	D	15	3,20	16,90	9,97	0,97	sO <sub>2</sub> (g/dl)	E	15	57,20	97,60	79,76	4,70	-0,158	21	0,57	D	15	46,10	96,80	75,89	4,71	FO <sub>2</sub> Hb (g/dl)	E	15	58,10	100,90	77,61	5,89	0,06	16	0,95	D	15	47,30	97,00	78,05	4,72	FHHb (g/dl)	E	15	2,50	43,40	21,00	4,74	0,68	21	0,50	D	15	3,40	57,00	25,79	5,18	FMetHb (g/dl)	E	15	1,00	5,00	2,94	0,41	-1,08	16	0,30	D	15	0,20	4,00	2,24	0,50	cK (mmol/l)	E	15	2,70	6,70	4,39	0,40	1,46	23	0,16	D	15	1,30	9,70	5,45	0,62	cNa (mmol/l)	E	15	100,00	234,00	158,20	12,50	1,54	26	0,14	D	15	103,00	301,00	189,10	15,60	cCa (mmol/l)	E	15	1,00	2,72	1,60	0,15	2,30	20	0,03*	D	15	1,01	4,56	2,36	0,30	cCl (mmol/l)	E	15	46,00	126,00	92,50	5,16	0,47	26	0,65	D	15	54,00	151,00	96,20	6,04	cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	15	14,10	37,10	26,01	2,52	-1,14	18	0,27	D	15	6,70	34,00	21,94	2,52	cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40	cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93																												
ctHb (g/dl)	E	15	6,60	13,20	10,39	0,63	-0,37	18	0,72																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	3,20	16,90	9,97	0,97				sO <sub>2</sub> (g/dl)	E	15	57,20	97,60	79,76	4,70	-0,158	21	0,57	D	15	46,10	96,80	75,89	4,71	FO <sub>2</sub> Hb (g/dl)	E	15	58,10	100,90	77,61	5,89	0,06	16	0,95	D	15	47,30	97,00	78,05	4,72	FHHb (g/dl)	E	15	2,50	43,40	21,00	4,74	0,68	21	0,50	D	15	3,40	57,00	25,79	5,18	FMetHb (g/dl)	E	15	1,00	5,00	2,94	0,41	-1,08	16	0,30	D	15	0,20	4,00	2,24	0,50	cK (mmol/l)	E	15	2,70	6,70	4,39	0,40	1,46	23	0,16	D	15	1,30	9,70	5,45	0,62	cNa (mmol/l)	E	15	100,00	234,00	158,20	12,50	1,54	26	0,14	D	15	103,00	301,00	189,10	15,60	cCa (mmol/l)	E	15	1,00	2,72	1,60	0,15	2,30	20	0,03*	D	15	1,01	4,56	2,36	0,30	cCl (mmol/l)	E	15	46,00	126,00	92,50	5,16	0,47	26	0,65	D	15	54,00	151,00	96,20	6,04	cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	15	14,10	37,10	26,01	2,52	-1,14	18	0,27	D	15	6,70	34,00	21,94	2,52	cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40	cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93																																												
sO <sub>2</sub> (g/dl)	E	15	57,20	97,60	79,76	4,70	-0,158	21	0,57																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	46,10	96,80	75,89	4,71				FO <sub>2</sub> Hb (g/dl)	E	15	58,10	100,90	77,61	5,89	0,06	16	0,95	D	15	47,30	97,00	78,05	4,72	FHHb (g/dl)	E	15	2,50	43,40	21,00	4,74	0,68	21	0,50	D	15	3,40	57,00	25,79	5,18	FMetHb (g/dl)	E	15	1,00	5,00	2,94	0,41	-1,08	16	0,30	D	15	0,20	4,00	2,24	0,50	cK (mmol/l)	E	15	2,70	6,70	4,39	0,40	1,46	23	0,16	D	15	1,30	9,70	5,45	0,62	cNa (mmol/l)	E	15	100,00	234,00	158,20	12,50	1,54	26	0,14	D	15	103,00	301,00	189,10	15,60	cCa (mmol/l)	E	15	1,00	2,72	1,60	0,15	2,30	20	0,03*	D	15	1,01	4,56	2,36	0,30	cCl (mmol/l)	E	15	46,00	126,00	92,50	5,16	0,47	26	0,65	D	15	54,00	151,00	96,20	6,04	cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	15	14,10	37,10	26,01	2,52	-1,14	18	0,27	D	15	6,70	34,00	21,94	2,52	cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40	cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93																																																												
FO <sub>2</sub> Hb (g/dl)	E	15	58,10	100,90	77,61	5,89	0,06	16	0,95																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	47,30	97,00	78,05	4,72				FHHb (g/dl)	E	15	2,50	43,40	21,00	4,74	0,68	21	0,50	D	15	3,40	57,00	25,79	5,18	FMetHb (g/dl)	E	15	1,00	5,00	2,94	0,41	-1,08	16	0,30	D	15	0,20	4,00	2,24	0,50	cK (mmol/l)	E	15	2,70	6,70	4,39	0,40	1,46	23	0,16	D	15	1,30	9,70	5,45	0,62	cNa (mmol/l)	E	15	100,00	234,00	158,20	12,50	1,54	26	0,14	D	15	103,00	301,00	189,10	15,60	cCa (mmol/l)	E	15	1,00	2,72	1,60	0,15	2,30	20	0,03*	D	15	1,01	4,56	2,36	0,30	cCl (mmol/l)	E	15	46,00	126,00	92,50	5,16	0,47	26	0,65	D	15	54,00	151,00	96,20	6,04	cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	15	14,10	37,10	26,01	2,52	-1,14	18	0,27	D	15	6,70	34,00	21,94	2,52	cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40	cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93																																																																												
FHHb (g/dl)	E	15	2,50	43,40	21,00	4,74	0,68	21	0,50																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	3,40	57,00	25,79	5,18				FMetHb (g/dl)	E	15	1,00	5,00	2,94	0,41	-1,08	16	0,30	D	15	0,20	4,00	2,24	0,50	cK (mmol/l)	E	15	2,70	6,70	4,39	0,40	1,46	23	0,16	D	15	1,30	9,70	5,45	0,62	cNa (mmol/l)	E	15	100,00	234,00	158,20	12,50	1,54	26	0,14	D	15	103,00	301,00	189,10	15,60	cCa (mmol/l)	E	15	1,00	2,72	1,60	0,15	2,30	20	0,03*	D	15	1,01	4,56	2,36	0,30	cCl (mmol/l)	E	15	46,00	126,00	92,50	5,16	0,47	26	0,65	D	15	54,00	151,00	96,20	6,04	cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	15	14,10	37,10	26,01	2,52	-1,14	18	0,27	D	15	6,70	34,00	21,94	2,52	cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40	cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93																																																																																												
FMetHb (g/dl)	E	15	1,00	5,00	2,94	0,41	-1,08	16	0,30																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	0,20	4,00	2,24	0,50				cK (mmol/l)	E	15	2,70	6,70	4,39	0,40	1,46	23	0,16	D	15	1,30	9,70	5,45	0,62	cNa (mmol/l)	E	15	100,00	234,00	158,20	12,50	1,54	26	0,14	D	15	103,00	301,00	189,10	15,60	cCa (mmol/l)	E	15	1,00	2,72	1,60	0,15	2,30	20	0,03*	D	15	1,01	4,56	2,36	0,30	cCl (mmol/l)	E	15	46,00	126,00	92,50	5,16	0,47	26	0,65	D	15	54,00	151,00	96,20	6,04	cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	15	14,10	37,10	26,01	2,52	-1,14	18	0,27	D	15	6,70	34,00	21,94	2,52	cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40	cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93																																																																																																												
cK (mmol/l)	E	15	2,70	6,70	4,39	0,40	1,46	23	0,16																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	1,30	9,70	5,45	0,62				cNa (mmol/l)	E	15	100,00	234,00	158,20	12,50	1,54	26	0,14	D	15	103,00	301,00	189,10	15,60	cCa (mmol/l)	E	15	1,00	2,72	1,60	0,15	2,30	20	0,03*	D	15	1,01	4,56	2,36	0,30	cCl (mmol/l)	E	15	46,00	126,00	92,50	5,16	0,47	26	0,65	D	15	54,00	151,00	96,20	6,04	cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	15	14,10	37,10	26,01	2,52	-1,14	18	0,27	D	15	6,70	34,00	21,94	2,52	cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40	cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93																																																																																																																												
cNa (mmol/l)	E	15	100,00	234,00	158,20	12,50	1,54	26	0,14																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	103,00	301,00	189,10	15,60				cCa (mmol/l)	E	15	1,00	2,72	1,60	0,15	2,30	20	0,03*	D	15	1,01	4,56	2,36	0,30	cCl (mmol/l)	E	15	46,00	126,00	92,50	5,16	0,47	26	0,65	D	15	54,00	151,00	96,20	6,04	cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	15	14,10	37,10	26,01	2,52	-1,14	18	0,27	D	15	6,70	34,00	21,94	2,52	cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40	cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93																																																																																																																																												
cCa (mmol/l)	E	15	1,00	2,72	1,60	0,15	2,30	20	0,03*																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	1,01	4,56	2,36	0,30				cCl (mmol/l)	E	15	46,00	126,00	92,50	5,16	0,47	26	0,65	D	15	54,00	151,00	96,20	6,04	cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	15	14,10	37,10	26,01	2,52	-1,14	18	0,27	D	15	6,70	34,00	21,94	2,52	cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40	cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93																																																																																																																																																												
cCl (mmol/l)	E	15	46,00	126,00	92,50	5,16	0,47	26	0,65																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	54,00	151,00	96,20	6,04				cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	15	14,10	37,10	26,01	2,52	-1,14	18	0,27	D	15	6,70	34,00	21,94	2,52	cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40	cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93																																																																																																																																																																												
cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	15	14,10	37,10	26,01	2,52	-1,14	18	0,27																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	6,70	34,00	21,94	2,52				cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40	cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93																																																																																																																																																																																												
cGlu (mmol/l)	E	15	0,80	5,50	2,58	0,46	-1,04	17	0,32																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	0,30	4,30	1,95	0,40				cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93																																																																																																																																																																																																												
cLac (mmol/l)	E	15	0,30	10,80	5,91	0,80	-0,56	26	0,58																																																																																																																																																																																																																												
	D	15	0,50	12,20	5,22	0,93																																																																																																																																																																																																																															

\* $p < 0,05$

Bununla birlikte erkek bireylerin pH, pCO<sub>2</sub>, cGlu ve cLac değerlerinin dişilere oranla daha yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.46). *Bufores viridis* bireylerinin Pearson korelasyon analizi sonuçları Tablo 3.4’de gösterilmiş olup kan parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkilerin varlığı ortaya koyulmuştur.



Şekil 3.46: *Bufores viridis* pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, cK, cNa, cCa, cCl, cLac ve cGlu -Cinsiyet grafikleri (p>0,05)

**Tablo 3.4:** *Bufores viridis* bireylerinin Pearson korelasyon analizi sonuçları (Her değerin analizi için korelasyon katsayısı ve p değeri belirtilmiştir.)

	pH	pCO <sub>2</sub>	pO <sub>2</sub>	ctHb	sO <sub>2</sub>	FO <sub>2</sub> Hb	FHHb	FMetHb	cK	cNa	cCa	cCl	cGlu	cLac	cHO <sub>3</sub>
pCO <sub>2</sub>	-0.394*														
	0.031														
pO <sub>2</sub>	0.264	-0.548**													
	0.159	0.002													
ctHb	-0.188	-0.042	-0.026												
	0.380	0.846	0.904												
sO <sub>2</sub>	0.377	-0.599**	0.938**	-0.066											
	0.069	0.002	0.000	0.758											
FO <sub>2</sub> Hb	0.447*	-0.539*	0.920**	0.070	0.978**										
	0.048	0.014	0.000	0.771	0.000										
FHHb	-0.347	0.586**	-0.939**	0.051	-0.993**	-0.948**									
	0.096	0.003	0.000	0.814	0.000	0.000									
FMetHb	0.051	0.058	0.211	0.570*	0.212	0.294	-0.232								
	0.836	0.813	0.387	0.011	0.383	0.236	0.340								
cK	0.418*	-0.487**	0.343	-0.217	0.423*	0.460*	-0.354	-0.295							
	0.024	0.007	0.069	0.321	0.044	0.041	0.098	0.220							
cNa	0.529**	-0.331	0.160	-0.306	0.289	0.362	-0.224	-0.044	0.806**						
	0.003	0.080	0.408	0.155	0.181	0.116	0.304	0.859	0.000						
cCa	0.353	-0.160	0.018	-0.142	-0.025	0.127	0.111	-0.077	0.768**	0.851**					
	0.061	0.408	0.926	0.517	0.909	0.594	0.615	0.754	0.000	0.000					
cCl	0.119	-0.096	0.075	0.092	-0.013	0.028	-0.016	0.180	0.092	0.382*	0.294				
	0.537	0.619	0.697	0.677	0.953	0.906	0.942	0.461	0.637	0.041	0.122				
cGlu	-0.548*	0.235	-0.130	0.169	-0.239	-0.244	0.199	0.391	-0.322	-0.358	-0.227	-0.045			
	0.012	0.318	0.585	0.502	0.340	0.380	0.429	0.167	0.167	0.121	0.335	0.850			
cLac	-0.383*	0.309	-0.101	0.041	-0.185	-0.078	0.165	0.516*	-0.368*	-0.259	-0.116	0.119	0.647**		
	0.040	0.103	0.601	0.854	0.398	0.743	0.452	0.024	0.050	0.174	0.549	0.537	0.002		
cHO <sub>3</sub>	0.341	0.765**	-0.330	-0.075	-0.251	-0.044	0.258	0.128	-0.299	-0.132	-0.020	-0.050	-0.355	0.122	
	0.130	0.000	0.144	0.745	0.272	0.866	0.258	0.637	0.201	0.578	0.934	0.833	0.194	0.609	

\*p<0,05, \*\*p<0,001

### 3.2.3 *Hyla orientalis*

*Hyla orientalis* bireylerinden alınan kan örnekleri ABL 800 radyometrenin değerlendirebileceği minimum miktar olan 1ml'den az olduğu için kan parametreleri değerlendirmeye alınamamıştır.

### 3.2.4 *Pelophylax bedriagae*

9 erkek, 7 dişi olmak üzere toplamda 16 örnek üzerinden elde edilen veriler doğrultusunda yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda *Pelophylax bedriagae* bireyleri arasında cinsiyete bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Tablo 3.5).

**Tablo 3.5:** *Pelophylax bedriagae* kan değerlerinin cinsiyete göre tanımlayıcı istatistikleri ve Mann Whitney U değerleri (C: Cinsiyet, N: Örnek sayısı, E: Erkek, D: Dişi).

Parametre	C	N	Min	Max	Ort.	SE	W	Sig.
pH	E	9	7,05	7,54	7,36	0,05	11	0,39
	D	7	7,08	7,58	7,27	0,07		
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	E	9	8,00	28,20	16,50	2,38	7	0,30
	D	7	8,40	57,70	31,59	7,77		
pO <sub>2</sub> (mmHg)	E	9	89,90	180,00	131,40	10,20	11	0,73
	D	7	55,70	156,00	118,70	13,20		
ctHb (g/dl)	E	9	2,30	9,60	5,20	1,10	8	0,65
	D	7	1,20	7,90	5,82	1,22		
sO <sub>2</sub> (g/dl)	E	9	62,00	100,60	87,40	5,77	6	0,12
	D	7	41,00	93,70	64,90	10,0		
FO <sub>2</sub> Hb (g/dl)	E	9	56,70	94,50	80,97	8,33	5	0,06
	D	7	25,30	63,10	43,35	7,86		
FCOHb (g/dl)	E	9	3,30	8,00	6,42	0,39	3	1,00
	D	7	3,40	14,10	8,08	2,46		
FHHb (g/dl)	E	9	-0,60	34,70	12,37	5,40	4	0,11
	D	7	2,60	54,90	32,40	21,80		
cK (mmol/l)	E	9	3,60	8,50	6,42	0,74	9	0,30
	D	7	2,40	8,40	5,08	1,01		
cNa (mmol/l)	E	9	132,00	275,00	178,60	26,10	7	0,30
	D	7	105,00	289,00	151,40	35,10		
cCa (mmol/l)	E	9	1,06	4,08	1,97	0,57	7	0,83
	D	7	1,05	3,82	1,79	0,52		
cCl (mmol/l)	E	9	79,00	125,00	101,50	6,70	6	0,52
	D	7	74,00	145,00	96,60	12,40		
cHO <sub>3</sub> (mmol/l)	E	9	8,70	15,20	12,93	2,12	3	0,38
	D	7	14,30	19,70	17,60	1,67		
cGlu (mmol/l)	E	9	2,10	63,00	22,70	10,60	6	0,80
	D	7	2,40	21,00	8,06	2,61		
cLac (mmol/l)	E	9	0,70	12,20	5,78	2,17	9	0,94
	D	7	1,00	11,90	6,57	1,67		

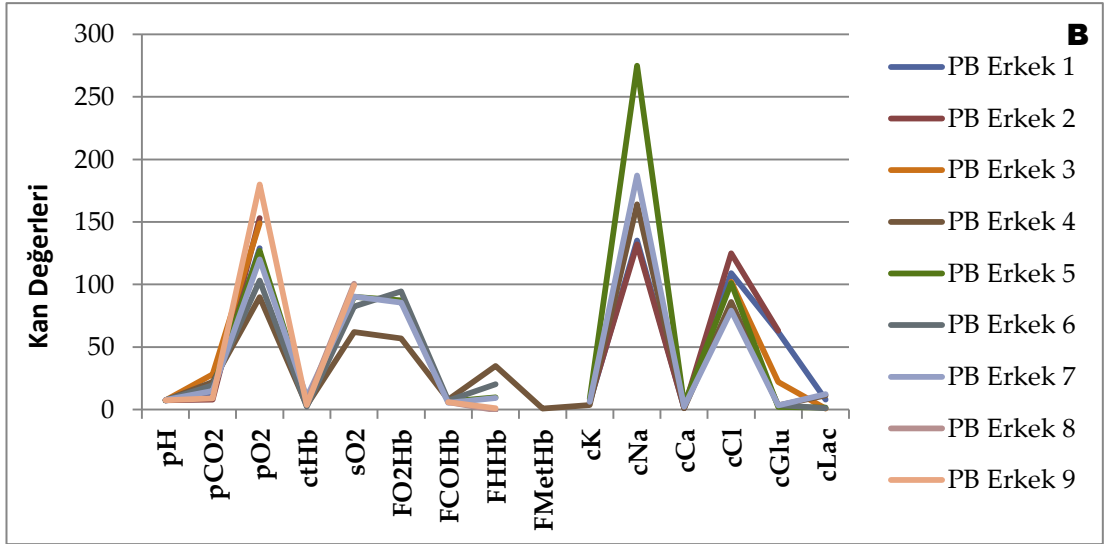
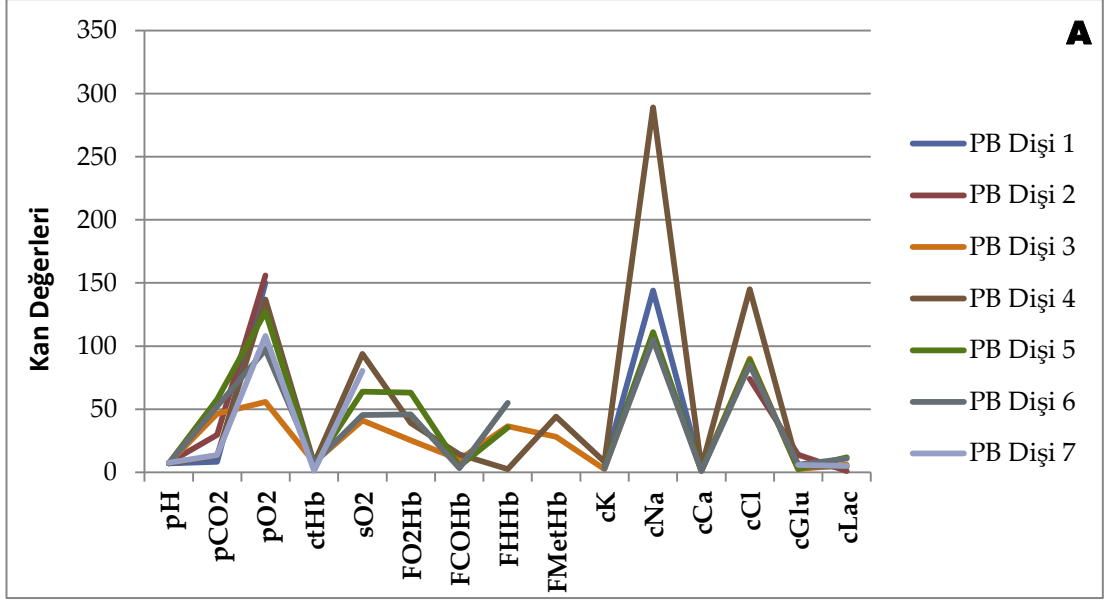
\*p<0,05

Elde edilen veriler *Pelophylax bedriagae* bireylerinde cinsiyet ile pH, kan gazı (pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>), elektrolit (cK, cNa, cCa, cCl) ve metabolit (cGlu, cLac) değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadığını göstermiştir (p> 0,05), (Tablo 3.5). Bununla birlikte erkek bireylerin pH, pO<sub>2</sub>, cK, cNa, cCa, cCl ve cGlu değerlerinin dişilere oranla daha yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.46). *Pelophylax bedriagae* bireylerinin Pearson korelasyon analizi sonuçları Tablo 3.6'da gösterilmiş olup, kan parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkilerin varlığı ortaya koymıştır.

**Tablo 3.6:** *Pelophylax bedriagae* bireylerinin Pearson korelasyon analizi sonuçları (Her değer için korelasyon katsayısı ve p değeri belirtilmiştir.)

	pH	pCO <sub>2</sub>	pO <sub>2</sub>	ctHb	sO <sub>2</sub>	FO <sub>2</sub> Hb	FCO <sub>2</sub> Hb	FHHb	cK	cNa	cCa	cCl	cGlu	cLac
pCO <sub>2</sub>	-0,313 0,256													
pO <sub>2</sub>	0,092 0,744	-0,484 0,068												
ctHb	-0,321 0,365	0,302 0,397	-0,136 0,708											
sO <sub>2</sub>	0,492 0,149	-0,843 0,002*	0,801 0,005*	-0,158 0,643										
FO <sub>2</sub> Hb	0,585 0,128	-0,470 0,240	0,462 0,249	-0,286 0,492	0,636 0,090									
FCO <sub>2</sub> Hb	-0,031 0,937	-0,332 0,383	-0,109 0,781	0,075 0,838	0,094 0,796	-0,467 0,243								
FHHb	-0,517 0,154	0,861 0,003*	-0,695 0,038*	0,048 0,896	-0,950 0,000**	-0,428 0,291	-0,290 0,417							
cK	0,390 0,210	-0,594 0,042*	0,760 0,004*	0,216 0,642	0,937 0,002*	0,488 0,267	0,372 0,411	-0,900 0,006*						
cNa	0,341 0,335	-0,515 0,127	0,311 0,382	0,100 0,832	0,879 0,009*	0,353 0,437	0,527 0,224	-0,882 0,009*	0,843 0,002*					
cCa	0,270 0,450	-0,390 0,265	0,286 0,423	0,294 0,522	0,834 0,020*	0,355 0,435	0,451 0,310	-0,864 0,012*	0,827 0,003*	0,955 0,000**				
cCl	-0,390 0,235	-0,515 0,105	0,336 0,312	0,011 0,981	0,501 0,252	-0,301 0,512	0,812 0,027*	-0,573 0,178	0,459 0,155	0,504 0,167	0,455 0,219			
cGlu	-0,304 0,291	-0,403 0,154	0,470 0,090	-0,268 0,485	-0,053 0,892	-0,282 0,498	-0,056 0,895	0,327 0,429	0,179 0,577	-0,281 0,432	-0,330 0,351	0,408 0,213		
cLac	-0,385 0,217	0,337 0,284	-0,366 0,242	0,324 0,394	-0,411 0,272	-0,238 0,571	-0,428 0,290	0,479 0,230	-0,728 0,017*	-0,654 0,079	-0,746 0,034*	-0,290 0,417	-0,065 0,842	
cHO <sub>3</sub>	-0,499 0,314	0,294 0,571	-0,609 0,200	0,712 0,112	-0,327 0,528	-0,615 0,270	0,721 0,106	0,159 0,764	0,238 0,700	0,280 0,648	0,328 0,590	0,699 0,189	-0,152 0,808	-0,443 0,456

\*p<0,05, \*\*p<0,001



Şekil 3.47: *Pelophylax bedriagae* A: Dişi, B: Erkek bireylerin pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, cK, cNa, cCa, cCl, cGlu ve cLac-Kan değerleri grafikleri

### 3.2.5 *Pelophylax bedriagae* - *Bufo viridis*

Karasal *Bufo viridis* ve sucul *Pelophylax bedriagae* örneklerinin kan parametreleri tür bazında karşılaştırıldığında pH, pCO<sub>2</sub>, ctHb, cHO<sub>3</sub> ve cGlu değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdiği ortaya çıkmıştır (Tablo 3.7).

**Tablo 3.7:** *Bufo viridis* ve *Pelophylax bedriagae* bireylerinin kan değerlerinin özet tanımlayıcı istatistikleri ve student t testi karşılaştırmaları (C: Cinsiyet, N: Örnek sayısı, Bv: *Bufo viridis*, Pb: *Pelophylax bedriagae*).

Parametre	Tr	N	Ort.	SE	t	sd	Sig.
<b>pH</b>	Bv	30	7,45	0,03	2,54	27	0,02*
	Pb	16	7,32	0,04			
<b>pCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	Bv	30	35,4	3,3	2,22	30	0,03*
	Pb	16	23,5	4,2			
<b>pO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	Bv	30	109,2	5,2	-1,69	25	0,10
	Pb	16	125,5	8,1			
<b>ctHb (g/dl)</b>	Bv	30	10,18	0,57	4,86	20	0,00**
	Pb	16	5,48	0,78			
<b>sO<sub>2</sub> (g/dl)</b>	Bv	30	77,8	3,3	0,09	15	0,93
	Pb	16	77,2	6,3			
<b>FO<sub>2</sub>Hb (g/dl)</b>	Bv	30	77,9	3,6	1,64	9	0,14
	Pb	16	62,2	8,9			
<b>FHHb (g/dl)</b>	Bv	30	23,4	3,5	0,44	15	0,67
	Pb	16	20,4	6,0			
<b>cK (mmol/l)</b>	Bv	30	4,94	0,38	-1,10	19	0,29
	Pb	16	5,75	0,63			
<b>cNa (mmol/l)</b>	Bv	30	174,2	10,0	0,39	13	0,70
	Pb	16	165,0	21,0			
<b>cCa (mmol/l)</b>	Bv	30	1,99	0,18	0,28	13	0,79
	Pb	16	1,88	0,36			
<b>cCl (mmol/l)</b>	Bv	30	94,4	3,9	-0,56	18	0,58
	Pb	16	98,6	6,4			
<b>cHO<sub>3</sub> (mmol/l)</b>	Bv	30	23,69	1,8	3,49	18	0,00*
	Pb	16	15,27	1,6			
<b>cGlu (mmol/l)</b>	Bv	30	2,26	0,30	-2,33	13	0,04*
	Pb	16	15,4	5,6			
<b>cLac (mmol/l)</b>	Bv	30	5,55	0,61	-0,43	15	0,67
	Pb	16	6,18	1,3			

\*p<0,05, \*\*p<0,001

## 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 4.1 Histokimya

Yapılan çalışmada ergin bireylerin derilerinde bulunan müköz ve seröz bezler açısından elde edilen histokimyasal sonuçlar (miyoepitel, salgı epiteli ya da salgı materyalinin herhangi birinde pozitif reaksiyon gözlenmesi durumu “+” kabul edilerek) Tablo 4.1 ve 4.2’de özetlenmiştir.

**Tablo 4.1:** *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Hyla orientalis* ve *Pelophylax bedriagae* bireylerinin müköz bezlerinde gözlenen histokimyasal reaksiyonlar

Boyama Tekniği	<i>Bufo bufo</i>	<i>Bufo viridis</i>	<i>Hyla orientalis</i>	<i>Pelophylax bedriagae</i>
Alcian Blue pH 1	+	+	-	-
Alcian Blue pH 2,5	+	+	-	+
Masson’s Triple	-	-	-	-
PAS Boyama	+	+	+	+

**Tablo 4.2:** *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Hyla orientalis* ve *Pelophylax bedriagae* bireylerinin seröz bezlerinde gözlenen histokimyasal reaksiyonlar

Boyama Tekniği	<i>Bufo bufo</i>	<i>Bufo viridis</i>	<i>Hyla orientalis</i>	<i>Pelophylax bedriagae</i>
Alcian Blue pH 1	+	-	-	+
Alcian Blue pH 2,5	+	+	+	+
Masson’s Triple	-	+	+	-
PAS Boyama	+	+	+	+

Amfibi derisi üzerinde yapılan çalışmalarda gözlenen müköz, tip I seröz ve tip II seröz bezler çalışma kapsamında elde edilen numunelerde de gözlenmiştir. Ancak *P. bedriagae* ve *B. viridis* türleri yalnızca tip I seröz bezlere sahipken, *B. bufo* ve *H. orientalis* türlerinde ise hem tip I hem de tip II seröz bezler gözlemlenmiştir.



Müköz bezler tarafından salgılanan mukus, esas olarak müsinler ve inorganik tuzlar adı verilen büyük glikoproteinlerden oluşur. Mukusun jel benzeri özellikleri, kompleks glikoproteinlerinden kaynaklanmaktadır (Keskin ve diğ. 2012). Müköz bezler sahip oldukları bu sulu ve viskoz sıvıyı doku takibi esnasında gerçekleştirilen alkol serileri ile kaybederler. Dehidrasyon etkisine sahip olan bu basamaklar mukotik sıvıyı giderir ve müköz bezi boş bir kese haline getirir. Dolayısıyla müköz bez salgıları hakkında herhangi bir gözlem yapılamamıştır.

Seröz bezler için ise böyle bir risk söz konusu değildir. Mukusun aksine seröz bezlerin salgıları alkol basamaklarında çözülmezler. Dolayısıyla tipik olarak salgıları sayesinde ayrılabilirler. Tip I bezlerin salgıları daha yoğun ve küçük granüllü hatta neredeyse ağısı bir yapı gösterirken, Tip II bezlerin salgıları granüler ve yarı saydamdır (Delfino ve diğ. 1998). Dolayısıyla çalışma esnasında elde edilen örneklerden *P. bedriagae* Tip I yapıdaki seröz bezlere sahipken, *B. viridis* üyelerindeki seröz bezlerinde gözlenen granüler yapıya dayanarak söz konusu türde ise yalnızca Tip II seröz bezlere sahip oldukları tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *Pelophylax bedriagae* örneklerinin tek tipte seröz bezlere sahip oldukları belirtilmiştir. Fakat salgı asinusları göz önüne alındığında, salgı içermiyor gibi görünen seröz bezler AB pH 1 pozitif özellik göstermekteyken, granüler salgı materyali barındıran seröz bezlerin ise AB pH 1 negatif özellik gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu çerçevede, iki itimalin var olduğu düşünülmektedir. Seröz bezlerin salgı içermeyen asinuslarında bulunan öncül maddeler sülfatlı mukopolisakkaritler ihtiva etmektedir veya iki farklı tipte seröz bezin varlığı söz konusudur. Ancak çalışmada kullanılan diğer histokimyasal yöntemlerle bu olasılıkların hangisinin geçerli olduğuna dair kesin ve geçerli bir kanıt rastlanamamıştır.

Tüm Bufonidler gibi *B. bufo* ve *B. viridis* türleri de başlarının iki yanındaki post orbital bölgede kendilerine özgü parotoid bezlere sahiplerdir. Bu bezlerin zehirli olan salgıları, kurbağayı avcılardan ve parazitlerden korumakla görevlidir (Porter 1972). *B. viridis* ve *B. bufo* örneklerinde de gözün hemen arkasında, derinin kalınlaşmış olan dorsal bölgesindeki epidermisin altında konumlanmış olan müköz ve granüler bezlere ilave olarak, *Rhinella jimi*'nin parotoid bezlerine benzer şekilde stratum kompaktuma kadar uzanan, zehir bezlerin varlığı onaylanmıştır (Jared ve diğ. 2009). *Bufo ictericus*'un parotoid bezleriyle yapılan başka bir çalışmada ise

(Almeida ve diğ. 2007) parotoid bez bölgesinin dermis tarafından desteklenen bir epidermis tarafından sarıldığı gösterilmiştir. Epidermisin hemen altında müköz bezler yer almaktadır. Dermis, oldukça gevşek bir yapıya sahiptir ve bir pigment katmanı subepidermik bölgeyi süngerimsi dermisten ayırmaktadır. Yapılan çalışmada, *B. ictericus*'a benzer şekilde, *B. bufo* ve *B. viridis* bireylerinde de parotoid bezlerin stratum spongiosum boyunca geniş bir alan kapladığı ve neredeyse ağsı gibi görünen küçük salgı granülleri ile dolu oldukları gözlenmiştir.

*Bufo viridis* ergin bireylerinde epidermisin, yaşa bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte, ortalama 8-10 hücre sırasından meydana geldiği, *B. bufo* ergin bireylerinde ise söz konusu tabakanın biraz daha ince olduğu ve 5-8 hücre sırasından oluştuğu belirlenmiştir. Her iki türün dermislerinde de stratum spongiosum ve stratum kompaktum ayrımı belirgindir ve müköz bezler stratum basalenin hemen altında yer almaktadır. Seröz bezler ise bazal membranın ventralinden stratum kompaktum sınırına kadar uzanabilmektedir ve salgı epiteli PAS ve Alcian Blue pH 2,5 pozitifdir. *Rhinella jimi*'de epidermis tabakası yaklaşık 6 hücre kalınlığındadır. Dermis ise müköz ve granüler bezlerin bulunduğu stratum spongiosum ve kalın kollajen fibrillere sahip stratum kompaktum'dan meydana gelmiştir. Müköz bezler epidermisin hemen altında dizilmişlerdir. Salgı epiteli PAS ve Alcian Blue pozitifdir.

*Hyla arborea arborea* L. üzerinde yaptıkları çalışmada Goniakowska-Witalińska ve Kubiczek (1998) dorsal derinin pürüzsüz ve kesitin tamamında neredeyse aynı kalınlıkta olduğunu göstermiştir. *Hyla orientalis* bireylerinde de benzer şekilde özellik gösteren deri 2-4 hücre sırasına sahip epitelden meydana gelmiştir. Dermis ise bol miktarda salgı bezine sahip olmakla birlikte göreceli olarak incedir. Goniakowska-Witalińska ve Kubiczek (1998)'e göre ağaç kurbağası derisinde üç tip bez mevcuttur: müköz, Tip I seröz ve Tip II seröz bezler. Diğer ağaç kurbağalarındakine benzer şekilde, *Hyla orientalis* bireyleri de üç farklı tipte bez yapısına sahiptir: salgı granülleri küçük olması dolayısıyla ağsı gibi görünen Tip I seröz bezler, salgı granüllerinin daha iri ve granüle olmasıyla farklılaşan Tip II seröz bezler ve belirgin bir lümenine sahip olan müköz bezler. Ağaç kurbağalarında lipid bezlerinin bulunduğunu varsayan hipotez ise benzer şekilde kanıtlanamamıştır.

*Bufo viridis* ve *P. bedriagae* larvalarında (GS 26-28) epidermis, *Phyllobates bicolor* (Anura: Dendrobatidae) 25. evredeki larvaların epidermisine

benzer şekilde iki tabakalıdır; iç (bazal) ve dış (kaplama) hücreler (Delfino ve diğ. 2010). *B. viridis* larvalarında deri, bol miktarda salgı hücresine sahiptir ve belirgin bir şekilde izlenebilen bazal laminaya kadar uzanmaktadır. *P. bedriagae* larvalarında (Gosner Stage 26-28) deri, *B. viridis* larvalarına nazaran daha az miktarda salgı hücresine sahiptir. Söz konusu salgı hücre taslakları, *B. viridis* örneklerinde olduğu gibi bazal laminaya kadar uzanmışlardır. Delfino ve diğ. (2001), *Physalaemus biligonigerus* (Anura, Leptodactylidae) iribaşlarının seröz kutanöz bezleri üzerine yaptıkları araştırmada, erken evredeki deri bezleri taslaklarının bazal epitel boyunca uzandıklarını ortaya koymuşlardır. Bez tomurcuğunun merkezinde bulunan yuvarlak hücreler muhtemel adenositlerdir. Gelişim devam ettikçe muhtemel adenositler konkav ve konveks miyoblastlar tarafından sarılırlar. Taslağın üst kısmında oluşan kap şeklindeki yapı ise bezin muhtemel boyun bölgesini oluşturacaktır. *B. viridis* ve *P. bedriagae* larvalarında da epidermis tabakasına doğru bezin muhtemel salgı kanalını oluşturacak olan ince açıklıklar gözlemlenmiştir.

*Pelophylax bedriagae* ve *B. bufo*'da son derece belirgin, *B. viridis* bireylerinde ise bazofilik boyalarla göreceli olarak daha silik bir şekilde gözlenebilen Eberth-Katschenko tabakası mevcuttur. Azvedo ve diğ. (2005), *Bufo ictericus* derisindeki Eberth-Katschenko tabakası hakkında yürüttükleri çalışmanın histokimyasal ayağında, kuvvetli alsiyanoofilik, bazofilik ve metakromatik özellik gösteren tabakanın dağınık şeklinde gözlendiğini belirtmişlerdir. Temel olarak kalsiyum tuzları ile bağlantılı glikozaminoglikanlardan meydana gelen E-K tabakası hücrel bir yapıya sahip değildir ve çalışmaya konu olan türlerde de benzer şekilde devamlılık göstermemektedir. Stratum spongiosum ve stratum kompaktum arasında yer alan tabakanın, distile su ile seyreltilen formaldehit karışımlarının genellikle asidik olması dolayısıyla dekalsifiye edici özellik kazanması yüzünden, bazı durumlarda gözlenemediği belirtilmektedir. Bununla birlikte söz konusu olan tez çalışmamızda kullanılan fiksatif türü Bouin'dir. Sonuç olarak çalışmaya konu olan türlerdeki Eberth-Katshenko tabakaları açık bir şekilde gözlenebilmiştir.

*Hyla orientalis* ergin bireylerinde oldukça ince bir epidermis tabakası gözlenmesine rağmen *Trachycephalus aff. venulosus* Laurenti, 1768 (Anura, Hylidae)'ye benzer şekilde keratinize bir üst tabakaya sahiptir (Rigolo ve diğ. 2008). Yine aynı çalışmada *Trachycephalus aff. venulosus* Laurenti, 1768 (Anura, Hylidae)

bireylerinde dermisin iki katmandan meydana geldiği bildirilmiştir; üstte gevşek bağ dokulu, tüm kutanöz bezlerin içinde yer aldığı süngerimsi dermis ve altta kollajen ve elastik fibrillere sahip kompakt dermis. *H. orientalis* bireylerinin dermis tabakası da bol sayıdaki müköz ve seröz bezi barındıran stratum spongiosum ve oldukça belirgin fibriler yapıdaki stratum kompaktumdan meydana gelmektedir. Müköz bezler stratum basalenin hemen altında yer almaktayken, seröz bezler ise bazal membranın ventralinden stratum kompaktum sınırına kadar uzanabilmektedir.

## 4.2 İmmünohistokimya

Yapılan çalışmada ergin bireylerin derilerinde bulunan müköz bezler, seröz bezler ve epitel tabaka açısından elde edilen (miyoepitel, salgı epiteli ya da salgı materyalinin herhangi birinde pozitif reaksiyon gözlenmesi durumu “+” kabul edilerek) immünohistokimyasal sonuçlar Tablo 4.3’de özetlenmiştir.

**Tablo 4.3:** *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Hyla orientalis* ve *Pelophylax bedriagae* bireylerinin deri bezlerinde gözlenen immünohistokimyasal reaksiyonlar

<b>Streptavidin</b>				
<b>Biyotin Kompleks Tekniği</b>	<i>Bufo bufo</i>	<i>Bufo viridis</i>	<i>Hyla orientalis</i>	<i>Pelophylax bedriagae</i>
Müköz Bez	+	+	-	-
Seröz Bez	+	+	+	-
Epidermis	+	+	-	-

Biyokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak yapılan bazı çalışmalar, çeşitli amfibi türlerinin derilerinin serotonin içerdiğini ortaya koymuştur (Yoshie ve diğ. 1985, Roseghini ve diğ. 1989, Seki ve diğ. 1995, İnceli ve diğ. 2004). Serotonin düz kas kontraksiyonunu stimüle eden bir bileşiktir. Aynı zamanda omurgalı sinir sistemi için oldukça önemli olan serotonin, monoamin bir nörotransmitterdir. Beyinde serotonin kimyasal salındığında kan damarları kasılarak daralır, serotonin düzeyi düşüğe ise genişler. Kurbağa derisinde bulunan serotoninin ise renk değişimi ve su alışverişine ek olarak kendini korumada da rol

oynadığı ileri sürülmektedir (Kramer 1970, Lillywhite 1971, Bennett ve diğ. 1981). Bununla birlikte tam olarak buldukları yerler ve salgılandıkları bezler hakkında yeterli veri bulunmamaktadır.

Bu konu hakkında yapılan en kapsamlı çalışma İnceli ve diğ. tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız, yine Streptavidin-Biyotin yöntemiyle 2004 yılında gerçekleştirilen çalışmada elde edilen veriler ile kısmen paralellik göstermektedir. *B. viridis* ve *B. bufo* örneklerinin immünohistokimyasal olarak boyanan kesitlerde epidermis ve dermisi oluşturan bağ doku serotonin immünoreaktif değildir. Mukus bezlerinin salgı bölümlerindeki bazı hücreler ise serotonin immünoreaktiftir. *P. bedriagae* ve *H. orientalis* üyelerinde ise söz konusu immünoreaktivite gözlenmemiştir. Az miktarda salgı içeren zehir bezleri serotonin immünoreaktif gibi görünmemektedir. Ancak *Hyla orientalis* örneklerinde salgı biriktirmeye başlayan veya lümeninde salgı bulunan hücreler serotonin immünoreaktiftir. Benzer şekilde az miktarda salgı içeren bezlerin miyoepitel hücreleri serotonin immünoreaktif değilken, lümeninde bol miktarda salgı bulunan bezlerin miyoepitel hücreleri de kısmen serotonin immünoreaktif özellik göstermektedir.

Anur larvalarında ise döllemeden itibaren serotonin varlığı saptanmıştır. Erken evredeki *Xenopus* embriyoları üzerinde yapılan bir çalışma döllelmeyi takip eden bölünme evreleri boyunca dokularda serotonin varlığını göstermiştir. Segmentasyondan önce hemen hemen tüm yumurtaya yayılmış olan serotoninin, gelişim aşamaları ilerledikçe azaldığını ve spesifik bölgelerde toplanıyor gibi görüldüğünü ortaya koymuşlardır (Fukumoto ve diğ. 2005). *Pelophylax bedriagae* larvalarında (GS 26-28), epidermis tabakasının dorsal yüzeyinde belirgin şekilde serotonin immünoreaktivite gözlenmiştir. Deri bezi taslaklarında ise söz konusu reaktivite salgı hücre taslaklarının özellikle bazal bölgesinde yoğun immünopozitif olarak gözlenmektedir *Bufo viridis* larvalarında (GS 26-28), epidermis tabakasının dorsal yüzeyinde belirgin şekilde serotonin immünoreaktivite gözlenmiştir. Deri bezi taslaklarında ise söz konusu reaktivite hem bez taslaklarında hem de salgı sınıyularında immünopozitiftir.

### 4.3 Kan parametreleri

ABL 800 radyometreden elde edilen bulgular 4 bölümde değerlendirilmektedir.

- a) pH ve kan gazları ( $pO_2$ =kısmi oksijen basıncı,  $pCO_2$ =kısmi karbondioksit basıncı)
- b) Oksimetri değerleri ( $sO_2$ = oksijen saturasyonu,  $FO_2Hb$ = oksihemoglobin fraksiyonu,  $FCOHb$ = karboksihemoglobin fraksiyonu,  $FHHb$ = deoksihemoglobin fraksiyonu)
- c) Elektrolitler ( $cK$ = potasyum iyon konsantrasyonu,  $cNa$ = sodyum iyon konsantrasyonu,  $cCa$ = kalsiyum iyon konsantrasyonu ve  $cCl$ = klorid iyon konsantrasyonu,  $cHO_3$ = bikarbonat konsantrasyonu)
- d) Metabolitler ( $cGlu$ = Glikoz konsantrasyonu,  $cLac$ = Laktat konsantrasyonu)

Kuyruksuz kurbağaların kan parametreleri hakkında yapılan kaynak taramaları sonucunda benzer kapsam ve özelliğe sahip bir çalışmanın henüz gerçekleştirilmediğini ortaya çıkarmıştır. Dolayısıyla bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen araştırmalar, içerdiği türler açısından bir ilk olmaktadır. En dikkat çekici sonuç *B. viridis* bireyleri arasında cinsiyete bağlı olarak yalnızca  $cCa$  parametresi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermesidir. Arazi çalışmalarının üreme dönemlerinde gerçekleştirildiği göz önüne alındığında, dişi bireylerin kanlarındaki kalsiyum artışının sebebi yumurtlama döneminde olmalarıyla ilişkilendirilebilir (Ulubeli ve diğ. 2020).

*B. viridis* ve *P. bedriagae* kan değerleri arasında yapılan testler sonucunda pH,  $pCO_2$ ,  $ctHb$ ,  $cHO_3$  ve  $cGlu$  değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdiği ortaya çıkmıştır. Ancak söz konusu farkların yorumlanabilmeleri için herhangi bir referans değer ve/veya kaynak elde edilememesi dolayısıyla veriler, ileriki çalışmalara ışık tutmaları açısından açık bir şekilde sunulmuştur. Bu çerçevede, Denizli il sınırları içerisinde bulunan *Bufo bufo*, *Bufotes viridis* ve *Pelophylax bedriagae* türlerinin kan parametreleri ile ilgili veriler ilk kez ortaya koyulmuş ve benzeri çalışmaların gerçekleştirilmesiyle birlikte gerekli analiz ve değerlendirmelerin karşılaştırılarak yapılabilmesi açısından ilk adım atılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada Denizli il sınırları içerisinde bulunan *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Hyla orientalis* ve *Pelophylax bedriagae* populasyonlarına ait bireylerin;

- 1) Deri ve deri bezleri, farklı boyama teknikleri kullanılarak, histokimyasal açıdan ortaya koyulmuştur.
- 2) Deri ve deri bezlerinde bulunan serotonin immüno pozitif bölgeler belirlenmiştir.
- 3) Kan parametreleri ile gerçekleştirilen çalışmalar cinsiyet ve türler arasında karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve kuyruksuz kurbağalar açısından ilk kez spesifik kan değerlerine (kan gazı, oksimetre, elektrolit ve metabolit değerleri) ait veriler elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasının histokimyasal ve immünohistokimyasal ayağı, kuyruksuz kurbağaların deri yapılarına ayrıntılı bir bakış açısı sağlamaktadır. Ancak farklı türlerle ve/veya farklı bölgelerde yapılabilecek benzer çalışmalar, elde edilen bulguların türler arasında ve/veya lokaliteye bağlı olarak değişiklik gösterip göstermeyeceği konusuna ışık tutması açısından önemlidir. Ayrıca, ince yapı düzeyinde gerçekleştirilecek araştırmalarla söz konusu bulguların desteklenmesi önerilebilir.

Kan parametreleriyle ilgili veriler ayrıntılı olarak değerlendirildiğinde, özellikle populasyon sağlığı açısından benzer çalışmaların gerekliliği açık bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Öncelikle kan parametreleri açısından elde edilen verilerin değerlendirilebilmesi, takiben emsal değerlerin karşılaştırılarak yorumlanabilmesi açısından benzer araştırmaların devamlılığının önemi açıktır. Farklı türler için de veri setleri genişledikçe, kan gazı, oksimetre değerleri, elektrolit ve metabolit ölçümleri arasında hem bireyler hem de populasyonlar açısından mukayeseler yaparak değerlendirmelerde bulunmak mümkün olacaktır. Bu çerçevede, çevresel etkenlerin hem tek tek bireyler hem de populasyonlar üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi konusunda daha kesin, gerçekçi ve isabetli tespitlerde bulunmak olası hale gelecektir.

## 5. KAYNAKLAR

Agasyan, A., Avcı, A., Tuniyev, B., Isailovic, J. C., Lymberakis, P., Andrén, C., Cogalniceanu, D., Wilkinson, J., Ananjeva, N., Üzüm, N., Orlov, N., Podloucky, R., Tuniyev, S., Kaya, U., *Bufo bufo*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2009: e.T54596A11159939, (2009).

Al-Adhami, M. A. ve Qar, J. S., “A New Type of Cell in the Larval Epidermis of the Green Toad *Bufo viridis viridis*”, *Folia biol.* (Kraków), 53: 179-181, (2005).

Almeida, P. G., Felsemburg, F. A., Azevedo, R. A. ve de Brito-Gitirana L., “Morphological re-evaluation of the parotoid glands of *Bufo ictericus* (Amphibia, Anura, Bufonidae)”, *Contrib. Zool.*, 76 (3): 145-152, (2007).

Arıkan H., Çevik I. E., Kaya U. ve Mermer A., “Anadolu Dağ Kurbağalarında eritrosit ölçümleri”, *Anadolu Üniv. Bilim Teknol. Dergisi*, 2(2), 387 – 391, (2001).

Arıkan, H., Mehmet K. A. ve Tosunoğlu M., "A study on the blood cells of the Caucasus Frog, *Pelodytes caucasicus*", *Zool. Middle East*, 30(1): 43-47, (2003).

Arıkan H., Alpagut-Keskin N., Çevik I. E. ve Erişmiş U. C., “A study on the blood cells of the firebellied toad, *Bombina bombina* L. (Anura: Bombinatoridae),” *Anim. Biol.*, 60,61–68, (2010).

Arıkan, H. ve Çiçek, K., “Morphology of peripheral blood cells from various species of Turkish Herpetofauna”, *Acta Herpetol.*, 5(2): 179-198, (2010).

Arıkan, H. ve Çiçek, K., “Changes in blood-serum proteins, erythrocyte count, and size of *Pelophylax bedriagae* (Camerano, 1882) during metamorphosis (Anura, Ranidae),” *Herpetozoa*, 24,3–11, (2011).



Arifulova, I., Delfino, G., Dujsebayaeva, T., Fedotovskikh, G., Nosi, D. ve Terreni, A., “Serous cutaneous glands in the South American horned frog *Ceratophrys ornata* (Leptodactyliformes, Chthonobatrachia, Ceratophryidae): Ultrastructural expression of poison biosynthesis and maturation”, *J. Morphol.*, 268: 690-700, (2007).

Arnold, E.N., Reptiles and amphibians of Europe, Princeton University Press., (2003).

Arserim, S. H. ve Mermer, A., "Hematology of the Uludağ Frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 in Uludağ National Park (Bursa, Turkey)", *EGEJFas*, 25(1): 39-46, (2008).

Atatür, M. K., Arıkan, H. ve Çevik, İ. E., “Erythrocyte Sizes of Some Anurans from Turkey”, *Turk. J. Zool.*, 23: 111-114, (1999).

Avcı, A., Tuniyev, B., Isailovic, J. C., Lymberakis P., Andrén, C., Cogalniceanu, D., Wilkinson, J., Ananjeva, N., Üzüm, N., Orlov, N., Podloucky, R., Tuniyev, S., Kaya, U., Nilson, G., Sharifi, M., Papenfuss, T. ve Bafti S. S., “*Bufoles variabilis*,” in: The IUCN Red List of Threatened Species 2015, e.T153571A74506874, (2015).

Azevedo, R. A., Pelli, A. A., Ferreira-Pereira, A., Santana, A. S. J., Felseburgh, F. ve Brito-Gitirana, L., “Structural aspects of the Eberth-Katschenko layer of *Bufo ictericus* integument: Histochemical characterization and biochemical analysis of the cutaneous calcium (Amphibia: Bufonidae)”, *Micron*, 36: 61-65, (2005).

Baran İ., Avcı A., Kumlutaş Y., Olgun K. ve Ilgaz Ç., Türkiye Amfibi ve Sürüngenleri, Ankara - Türkiye: TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları (2021).

Baraquet, M., Grenat, P. R., Salas, N. E., ve Martino, A. L., "Intraspecific variation in erythrocyte sizes among populations of *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae)," *Acta Herpetol.*, 8, 93–97, (2013).

Başkale, E., Ulubeli S. A. ve Kaska Y., "Age structures and growth parameters of the Levantine frog, *Pelophylax bedriagae*, at different localities in Denizli, Turkey", *Acta Herpetol.* 13(2): 147-154, (2018).

Bennett, G. W., Balls, M., Clothier, R. H., Marsden, C. A., Robinson, G. ve Wemyss-Holden, G. D., "Location and release of TRH and 5-HT from amphibian skin", *Cell Biol. Int. Rep.* 5: 151-158, (1981).

Brizzi R., Delino G., Pellegrini R., "Specialized mucous glands and their possible adaptive role in the males of some species of *Rana* (Amphibia, Anura)", *J. Morphol.*, 254: 328-341 (2002).

Budak, A. ve Göçmen, B., Herpetoloji, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, (2008).

Cabagna, M. C., Lajmanovich, R. C., Stringhini, G., Sanchez hernandez, J. C. ve Peltzer, P. M., "Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina," *Appl. Herpetol.*, 2(4): 373 – 380, (2005).

Das, M. ve Mahapatra, P. K., "Hematology of wild caught Dubois's tree frog *Polypedates teraiensis*, Dubois, 1986 (Anura: Rhacophoridae)", *The Sci. World J.*, 2014, (2014).

Davis, A. K., "Ontogenetic changes in erythrocyte morphology in larval mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*, measured with image analysis", *Comp. Clin. Path.*, 17(1): 23-28, (2008).

Davis, A.K. ve Durso, A. M., “White Blood Cell Differentials of Northern Cricket Frogs (*Acris c. crepitans*) with a Compilation of Published Values from Other Amphibians”, *Herpetologica*, 65(3): 260–267, (2009).

Delfino, G., Brizi, R., Alvarez, B. B. ve Kracke-Berndorff, R., “Serous cutaneous glands in *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae): secretory patterns during ontogenesis”, *Tissue and Cell*, 30(1): 30-40, (1998).

Delfino, G., Nosi, D., Brizzi, R. ve Alvarez, B. B., “Serous cutaneous glands in the paludicine frog *Physalaemus biligonigerus* (Anura, Leptodactylidae): patterns of cytodifferentiation and secretory activity in pre-metamorphic specimens”, *Acta Zool.*, 82: 149–158, (2001).

Delfino, G., Giachi, F., Nosi, D. ve Malentacchi, C., “Serous Cutaneous Glands in *Phyllobates bicolor* (Anura: Dendrobatidae): An Ontogenetic, Ultrastructural Study on Secretory Product Biosynthesis and Maturation”, *Copeia*, No. 1: 27–37, (2010).

Duellman, W. E. ve Trueb, L., *Biology of amphibians*, JHU press, (1994).

Dufresnes, C., Berroneau, M., Dubey, S., Litvinchuk, S. N. ve Perrin, N., “The effect of phylogeographic history on species boundaries: a comparative framework in *Hyla* tree frogs”, *Sci. Rep.*, 10(1), 1-12, (2020).

Emílio, M. G., “Gas exchanges ve blood gas concentrations in the frog *Rana ridibunda*”, *J. Exp. Biol.*, 60(3): 901-8, (1974).

Erişmiş, U. C. ve Korcan S. E., "Comparison of Antimicrobial Activity in the Skin Secretion of Same Anurans from Turkey" *Uşak Üniv. Fen ve Doğa Bil. Dergisi*, 1(2): 85-94, (2017).

Erspamer, V., "Biogenic amines and active polypeptides of the amphibian skin", *Arm. Rev. Pharmacol.* 11(1): 327-350, (1971).

Farquhar, M. G. ve Palade, G. E., "Cell junctions in amphibian skin", *J. Cell. Biol.*, 26(1): 263-291, (1965).

Fukumoto, T., Kema, I. P. ve Levin, M., "Serotonin Signaling Is a Very Early Step in Patterning of the Left-Right Axis in Chick and Frog Embryos", *Curr. Biol.*, Vol. 15: 794–803, (2005).

Goniakowska-Witalińska, L. ve Kubiczek, U., "The structure of the skin of the tree frog (*Hyla arborea arborea* L.)", *Ann. Anat.*, 180: 237-246, (1998).

Grenat, P. R., Bionda, C. L., Salas, N. E. ve Martino, A. L., "Variation in erythrocyte size between juveniles and adults of *Odontophrynus americanus*", *Amphib-Reptil.*, 30, 141 – 145, (2009).

Grenat, P. R., Salas, N. E. ve Martino, A. L., "Erythrocyte size as diagnostic character for the identification of live cryptic *Odontophrynus americanus* and *O. cordobae* (Anura: Cycloramphidae)", *Zootaxa*, 2049(1): 67-68, (2009).

Gül, Ç., Tosunoğlu, M., Erdoğan, D. ve Özdamar, D., "Changes in the blood composition of some Anurans", *Acta Herpetol.*, 6 (2): 137-147, (2011).

Haslam, I. S., Roubos, E. W., Mangoni, M. L., Yoshizato, K., Vaudry, H., Kloepper, J. E., Patwell, D. M., Maderson, P. F. A. ve Paus, R., "From frog integument to human skin: dermatological perspectives from frog skin biology", *Biol. Rev.*, 89(3): 618-655, (2014).

Hota, J., Das, M. ve Mahapatra, P. K., "Blood cell profile of the developing tadpoles and adults of the ornate frog, *Microhyla ornata* (Anura: Microhylidae)", *Int. J. Zool.*, 2013, 1–14, (2013).

Hutchison, V. H. ve Szarski H., "Number of erythrocytes in some amphibians and reptiles", *Copeia*, 1965(3): 373-375, (1965).

İnceli, M., Süren, S., Murathanoğlu, O. ve Kaptan, E., "Immunohistochemical detection of serotonin in the skin of frogs (*Rana ridibunda*) kept at different temperatures", *Biol. Bratisl.*, 59: 273-281, (2004).

Jared, C., Antoniazzi M. M., Jordão, A. E., Silva, J. R., Greven, H. ve Rodrigues M. T., "Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defence", *Toxicon*, 54: 197-207, (2009).

Kaya, U., Agasyan, A., Avcı, A., Tuniyev, B., Isailovic, J. C., Lymberakis, P., Andrén, C., Cogalniceanu, D., Wilkinson, J., Ananjeva, N., Üzüm, N., Orlov, N., Podloucky, R., Tuniyev, S., *Hyla arborea*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2009: e.T10351A3197050, (2009).

Keskin, N., Ili, P. ve Sahin, B., "Histochemical demonstration of mucosubstances in the mouse gastrointestinal tract treated with *Origanum hypericifolium* O. Schwartz and PH Davis extract", *Afr. J. Biotechnol.*, 11(10): 2436-2444, (2012).

Kramer, B., "Histochemical demonstration of 5-hydroxytryptamine in poison glands of amphibian skin", *Histochemie*, 24: 336-342, (1970).

Leftwich, F. B. ve Burke J. D., "Blood oxygen capacity in ranid frogs", *Am. Midl. Nat.*, (1964): 241-248, (1964).

Lillywhite, H. B., "Thermal modulation of cutaneous mucus discharge as a determinant of evaporative water loss in the frog, *Rana catesbeiana*", *Z. Vergl. Physiol.*, 73: 84-104, (1971).

Mahapatra, B. B., Das, M., Dutta, S. K. ve Mahapatra, P. K., "Hematology of Indian rhacophorid tree frog *Polypedates maculatus* Gray, 1833 (Anura: Rhacophoridae)", *Comp. Clin. Path.*, 21: 453–460, (2012).

Mangione, S., Garcia, G. ve Cardozo, O. M., "The Eberth–Katschenko layer in three species of ceratophryines anurans (Anura: Ceratophryidae)", *Acta Zool.*, 92(1): 21-26, (2011).

Mebs, D., Pogoda, W., Maneyro R. ve Kwet, A., "Studies on the poisonous skin secretion of individual red bellied toads, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), from Uruguay", *Toxicon*, 46: 641–650, (2005).

Mills, J. W. ve Prum B. E., "Morphology of the exocrine glands of the frog skin", *Am. J. Anat.*, 171(1): 91-106, (1984).

Noble, G. K., *Biology of the Amphibia*, New York: McGraw-Hill, (1931).

Olea, G. B., Cheij, E. O., Curi, L. M., Boccioni, A. P. C., Céspedes, J. A. ve Lombardo, D. M., "Histological and immunohistochemical characterization of the integument and parotoids glands *Rhinella bergi* (Anura: Bufonidae): Development and differentiation", *Acta histochem.*, 121(3): 277-283, (2019).

Papenfuss, T., Kuzmin, S., Disi, A.M., Degani, G., Ugurtas, I.H., Sparreboom, M., Anderson, S., Sadek, R., Hraoui-Bloquet, S., Gasith, A., Elron, E., Gafny, S., Lymberakis, P., Böhme, W. & Baha El Din, S. 2008. *Pelophylax bedriagae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T58559A11803034, (2008).

Pearse, A. G. E., "Peptides in brain and intestine", *Nature*, 262: 92-94, (1976).

Porter, K. R., *Herpetology*, V. B. Saunders Company, United States of America, (1972).

Pough, F. H., Andrews, R. M., Crump, M. L., Savitzky, A. H., Wells, K. D. ve Brandley M. C., “*Herpetology*, Fourth edition”, Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, (2015).

Rigolo, J.R., Almeida, J. A. ve Ananias, F., “Histochemistry of skin glands of *Trachycephalus aff. venulosus* Laurenti, 1768 (Anura, Hylidae)”, *Micron*, 39: 56–60, (2008).

Roseghini, M., Erspamer, G. F., Severini, C. ve Simmaco, M., “Biogenic amines and activepeptides in extracts of the skin of thirty-two European amphibian species”, *Comp. Biochem. Physiol.*, 94C: 455-460, (1989).

Rouf, M. A., "Hematology of the leopard frog, *Rana pipiens*", *Copeia*, (1969): 682-687, (1969).

Seki, T., Kikuyama, S. ve Yanaihara, N., “Morphology of the skin glands of the crab-eating frog (*Rana cancrivora*)”, *Zool. Sci.*, 12: 623-626, (1995).

Sinha, R. C., "Haematological studies on the prewintering and wintering frog, *Rana esculenta*", *Comp. Biochem. and Physiol. Part A, Physiol.*, 74(2): 311-314, (1983).

Szarski, H. ve Czopek G., "Erythrocyte diameter in some amphibians and reptiles", *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 14(6): 433, (1966).

Terreni, A., Nosi, D., Greven, H. ve Delfino, G., "Development of serous cutaneous glands in *Scinax nasica* (Anura, Hylidae): patterns of poison biosynthesis and maturation in comparison with larval glands in specimens of other families", *Tissue and Cell*, 35(4): 274-287, (2003).

Tosunoğlu, M. ve Arıkan, H., "A Serological Investigation of *Pelodytes caucasicus* and *Pelobates syriacus* (Amphibia, Anura) Populations in Turkey", *Turk. J. Zool.*, 31: 395-398, (2007).

Ulubeli, S. A., Başkale E. ve Kaska Y., "Red Blood Cell Morphology and Blood Biochemistry of *Bufo variabilis*", *Russ. J. Herpetol.*, 27(6), 316 - 324, (2020).

Varga, J. F. A., Bui-Marinis, M. P. ve Katzenback, B. A., "Frog skin innate immune defences: sensing and surviving pathogens", *Front. in immunol.*, 9: 3128, (2019).

Warburg, M. R., Rosenberg, M., Roberts, J. R. ve Heatwole, H., "Cutaneous glands in the Australian hylid *Litoria caerulea* (Amphibia, Hylidae)", *Anat. Embryol.*, 201(5): 341-348, (2000).

Welsh Jr, H. H. ve Ollivier L. M., "Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's redwoods", *Ecol. Appl.*, 8(4): 1118-1132, (1998).

Wojtaszek, J. ve Adamowicz, A., "Haematology of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L.", *Comp. Clin. Pathol.*, 12: 129-134, (2003).

Yoshie, S., Iwanaga, T. ve Fujita, T., "Coexistence of bombesin and 5-hydroxytryptamine in the cutaneous gland of the frog, *Bombina orientalis*", *Cell Tissue Res.*, 239: 25-29, (1985).

Young, S., Warner, J., Speare, R., Berger, L., Skerratt, L. F. ve Muller, R., "Hematologic and plasma biochemical reference intervals for health monitoring of wild Australian tree frogs", *Vet. Clin. Pathol.*, 41(4): 478 – 492 (2012).